

วารสาร



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 59 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2560 Vol. 59 No.2 April - June 2017

ISSN 0125-684X

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข	
ที่ปรึกษาด้านบริหาร	นพ.สุขุม กาญจนพิมาย ภก.ดร.วรวิทย์ กิตติวงศ์สุนทร	นพ.พิเชฐ บัญญัติ นพ.สมฤกษ์ จิงสมาน
ที่ปรึกษาด้านวิชาการ	ศ.เกียรติคุณ นพ.ประเสริฐ ทองเจริญ ภญ.อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์ ภญ.ดร.จงดี ว่องพินัยรัตน์ ภญ.สุภัทรา อัมเอิบ	ดร.ปนัดดา ชิลวา พญ.มยุรา กุสุมภ์ นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท ภญ.ดร.สุมล ปวีตรานนท์
บรรณาธิการ	นางธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ผู้ช่วยบรรณาธิการ	ดร.เลาจนา เขาวนาดีชัย	นักวิชาการอิสระ
คณะบรรณาธิการ	ศ.ดร. นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล ศ.ดร.อรษา สุตเธียรกุล ศ.ดร.พิไลพันธ์ พุฒินะ ศ.พญ.พรรณิ ปิติสุทธิธรรม รศ.ดร. ภญ.พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร ผศ.สุชาดา ไชยสวัสดิ์ ดร.दनัย ทิวาเวช ภญ.สุวรรณา จารุณข นางพรรษา ไชยวานิช ดร.นพ.ปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ ดร.อุษาวดี ถาวรระ ดร.สลักจิต ชูติพงษ์วิเวท ดร.เดือนถนนอม พรหมชาติแก้ว นางสาวพรรณทิพย์ ตียพันธ์ ดร.บุษราวรรณ ศรีวรรณะ นางกนกพร อธิสุข นายศิริ ศรีมนโรถ นางวิชชุดา จริยะพันธุ์ ภญ.ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา	ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี มหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ นักวิชาการอิสระ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข นักวิชาการอิสระ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ฝ่ายจัดการ	นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ นางสาวประสาน จุลวงษ์	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
กำหนดออก อัตราสมาชิก	ราย 3 เดือน ในประเทศปีละ 200.- บาท ต่างประเทศปีละ 50.00 เหรียญสหรัฐอเมริกา	
สำนักงานวารสาร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 88/7 ซอยติวานนท์ 14 ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000 โทร. 0-2951-0000 โทรสาร 0-2951-1297	
พิมพ์ที่	หจก. อรุณการพิมพ์ 457/6-7 ถนนพระสุเมรุ แขวงบวรนิเวศ เขตพระนคร กรุงเทพฯ 10200 โทร. 0-2282-6033-4	

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 59 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2560

Vol. 59 No. 2 April - June 2017

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ยาสัตว์ตกค้างกลุ่ม **Sulfonamides** ในเนื้อสัตว์ และตับ
โดยเทคนิค **HPLC** 77
เฉลิมพร ควรหา และจิตผกา สันต์ตรบ
- คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของสมุนไพรกำแพงเจ็ดชั้น 94
ณัฐชา ดั่งรัก และธงชาติ ทรัพย์จอมทอง
- คุณลักษณะของไกลแคนในยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำหน่ายในประเทศไทย 104
วิชชุดา จริยะพันธุ์ วิฑาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์ และสายวรุฬ จตุรภิตตินันท์
- การประเมินความเสี่ยงโลหะหนักในปลาและกุ้งจากทะเลสาบสงขลาต่อคนไทย 115
สุดชญา ศรประสิทธิ์ กิ่งแก้ว กาญจนรัตน์ และอรัญญา อัสวารี
- ความสัมพันธ์ของค่านับวัดกับค่าพลังงานสำหรับงานรังสีวินิจฉัย 128
ยุทธนา บางม่วง และสิริชัย เขียวรัตน์กุล

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 59 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2560

Vol. 59 No. 2 April - June 2017

CONTENTS

Page

Original Articles

- Development of Analytical method for Sulfonamides residue
in animal tissues and liver by HPLC Technique** 77
Chalearmphorn Kuanha and Jitpaka Suntudrob
- Physicochemical quality of *Salacia chinensis* Linn.** 94
Natthacha Duangrak and Thongchat Supjomthong
- Characteristics of Glycan in Biotherapeutic Monoclonal Antibodies
Marketed in Thailand** 104
Wichuda Jariyapan Titaporn Pootipinyowat and Saiwarul Jadoonkittinan
- Risk Assessment of Heavy Metals in Fish and Shrimp from
Songkhla Lake to Thais** 115
Sudchada Sornprasit Kingkeaw Kanchanarat and Aranya Assava-aree
- Relationship between count and energy for diagnostic radiology** 128
Yoothana Bangmuang and Sirichai Theirrattanakul



บทบรรณาธิการ



การจัดทำวารสารวิชาการในปัจจุบัน หากต้องการพัฒนาคุณภาพของวารสารให้เป็นที่ยอมรับในระดับประเทศและสากล นอกจากพัฒนากระบวนการจัดการวารสาร และคุณภาพของบทความที่ตีพิมพ์ในวารสารแล้ว การประเมินคุณภาพวารสารโดยศูนย์ดัชนีการอ้างอิงวารสารไทย (Thailand Citation Index Center) ก็เป็นกระบวนการสำคัญหนึ่งที่จะทำให้ทราบถึงจุดอ่อนที่ต้องปรับปรุง และช่วยให้วารสารได้รับการยอมรับในระดับประเทศและสากล

ในปี 2560 นี้ทางกองบรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้เสนอขอรับการประเมินคุณภาพ Thailand Citation Index (TCI) เป็นครั้งแรก และได้รับแจ้งจากศูนย์ดัชนีการอ้างอิงวารสารไทยเมื่อวันที่ 29 พฤษภาคม 2560 ว่า วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ถูกจัดคุณภาพให้เป็น วารสารกลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นวารสารที่ผ่านการรับรองคุณภาพ ของ TCI (จนถึง 31 ธันวาคม 2562) และอยู่ในฐานข้อมูล TCI โดยเสนอแนะประเด็นที่ต้องพัฒนาเพิ่มเติม ซึ่งทางกองบรรณาธิการวารสารฯ จะนำไปปรับปรุงแก้ไขต่อไป

จากความสำเร็จของวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ผ่านการรับรองคุณภาพและอยู่ในฐานข้อมูล TCI ดังกล่าวข้างต้น บรรณาธิการจึงขอเชิญชวนนักวิชาการทั้งหลายที่มีผลงานด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ส่งบทความมาลงตีพิมพ์ในวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยสามารถส่งบทความมาถึงกองบรรณาธิการได้ทั้งทางไปรษณีย์ หรือทางระบบออนไลน์ รายละเอียดตามคำแนะนำสำหรับผู้นิพนธ์

นางธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์
บรรณาธิการ

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ยาสัตว์ตกค้างกลุ่ม Sulfonamides ในเนื้อสัตว์ และตับ โดยเทคนิค HPLC

เฉลิมพร ควรหา และจิตตภา สันตตรบ

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ Sulfonamides (SAs) เป็นกลุ่มยาต้านจุลชีพที่ใช้อย่างกว้างขวางเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งในคนและสัตว์ ทั้งยังมีความจำเป็นในการเลี้ยงสัตว์เศรษฐกิจเพื่อเป็นอาหาร การใช้ยาไม่ถูกต้องและไม่เคร่งครัดในการหยุดยาตามระยะเวลาที่กำหนด เป็นสาเหตุของการตกค้างในเนื้อเยื่อของสัตว์ การตกค้างของยาในผลิตภัณฑ์อาหารอาจทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการวิตกกังวลเพราะเป็นภัยต่อระบบภูมิคุ้มกันของคน ทำให้เกิดอาการแพ้ยาหรือเชื้อจุลินทรีย์เกิดการพัฒนานำไปสู่การดื้อยาได้ จึงได้ศึกษาพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม SAs 9 ชนิด ได้แก่ sulfadiazine (SDZ), sulfathiazole (STZ), sulfapyridine (SPY), sulfamerazine (SMR), sulfadimidine (SMZ), sulfamonomethoxine (SMMX), sulfisoxazole (SFI), sulfamethoxazole (SMX) และ sulfaquinoxaline (SQ) ตกค้างในเนื้อสัตว์และตับสัตว์ โดยใช้เนื้อหมูเป็นตัวแทนในการศึกษา ซึ่ง SAs จะถูกสกัดออกจากตัวอย่างด้วย 80% Ethanol แล้วนำมาผ่าน affinity column ที่มีความจำเพาะต่อ SAs จากนั้นตรวจวัดชนิดและปริมาณโดยเครื่อง HPLC-UV Detector จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation) ตามหลักเกณฑ์สากลเพื่อยืนยันวิธีว่าเหมาะสมตรงตามวัตถุประสงค์ ผลทดสอบความถูกต้องของวิธีมีค่า limit of detection เท่ากับ 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ limit of quantitation เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์แบบเส้นตรง เท่ากับ 50 - 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่า Pearson correlation of coefficient (r) มากกว่า 0.990 ทำการทดสอบความเที่ยงความแม่นยำที่ความเข้มข้น 2 ระดับ ระดับละ 10 ซ้ำ พบว่ามีความแม่นยำ อยู่ในช่วง 61 - 106% และค่าความเที่ยง อยู่ในช่วง 2.5 - 15.0% จากการประเมินความชำนาญการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ โดยการเข้าร่วมเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการกับหน่วยงานที่ให้บริการทดสอบความชำนาญที่เชื่อถือได้ทั้งในและต่างประเทศ ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ($|z| < 2$) แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาและทดสอบดังกล่าวมีประสิทธิภาพเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณยา SAs ทั้ง 9 ชนิด ตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สำหรับการควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมายได้ เมื่อนำวิธีที่พัฒนามาสำรวจปริมาณการตกค้างของสารกลุ่ม Sulfonamides ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในตลาดในกรุงเทพมหานครและภาคเอกชน ในช่วงปี พ.ศ. 2554 - 2558 รวม 386 ตัวอย่าง พบ 25 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.5 ชนิด สารที่พบ คือ sulfisoxazole sulfadiazine sulfathiazole sulfamethoxazole sulfadimidine และ sulfaquinoxaline ปริมาณที่ตรวจพบมีค่าระหว่างน้อยกว่า 50 ถึง 1,027 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

บทนำ

ปัญหาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เป็นปัญหาที่หน่วยงานภาครัฐและภาคเอกชนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตต้องให้ความสำคัญในการแก้ไข จากปัญหาดังกล่าวก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค เพราะยาต้านจุลชีพบางชนิดอาจก่อให้เกิดมะเร็ง เช่น ซัลฟาเมทาซีน หลายประเทศทั่วโลกได้มีการประกาศห้ามใช้ยาซัลฟาเมทาซีนในโคนมที่กำลังอยู่ในระยะให้นม เนื่องจากศูนย์วิจัยพิษวิทยาแห่งชาติ ประเทศสหรัฐอเมริกา (The U.S. Food and Drug Administration's Nation Center For Toxicological Research หรือ NCTR) พบว่าซัลฟาเมทาซีนสามารถก่อให้เกิดมะเร็งของต่อมไทรอยด์ในหนูทดลอง ถ้าได้รับการบริโภคในปริมาณสูงในระยะเวลา⁽¹⁾ ในประเทศไทยมีการใช้ยาในกลุ่ม Sulfonamides (SAs) เพื่อป้องกันและรักษาโรคในสัตว์ เนื่องจากการเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทยอยู่ในเขตภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ทำให้สัตว์มีความเครียดสูง การเจริญเติบโตช้า อ่อนแอ และความต้านทานโรคต่ำเจ็บป่วยได้ง่าย มีโรคชุกชุม เกษตรกรจึงใช้ยาเพื่อลดความเสี่ยงของการเกิดโรค ยาในกลุ่ม Sulfonamides (SAs) เป็นยาต้านจุลชีพกลุ่มแรกๆ ที่นำมาใช้ ออกฤทธิ์กว้างต่อแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ โดยการยับยั้งการเจริญเติบโตและการขยายตัวของแบคทีเรีย (Bacteriostatic) โดยจะไปขัดขวางการสร้างเมแทบอลิซึมที่สำคัญของแบคทีเรีย ทำให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียถูกยับยั้งและหยุดการเจริญเติบโต^(2, 3)

จากการศึกษาผลของยาในกลุ่ม Sulfonamides (SAs) พบว่า มีอันตรายต่อระบบการสร้างเลือด ทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง และฮีโมโกลบินลดลง อาจเกิดโรคโลหิตจาง และยังทำให้เกิดอาการที่บริเวณผิวหนัง อาทิ เกิดผื่นแดง ลมพิษ แพ้แสง บางครั้งอาจรุนแรงมากจนมีอาการของโรคตาหัยที่เรียกว่า สตีเวนส์ จอห์นสัน ซินโดรม หรือทำให้เกิดดีซ่านโดยไปจับกับบิลิรูบินในเลือด ซึ่งเป็นอาการที่พบได้ในทารกแรกเกิดซึ่งจะทำให้เด็กมีความผิดปกติทางสมองและปัญญาอ่อน เรียกกลุ่มอาการนี้ว่า เคอร์นิกเทอรัส นอกจากนั้นแล้วอาจทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน และเบื่ออาหาร⁽²⁻⁴⁾ ซึ่งเกษตรกรอาจมีรูปแบบและวิธีการใช้ยาที่ขาดความรู้และความเข้าใจ และละเลยการบริหารจัดการหยุดยาก่อนส่งโรงฆ่าอย่างเหมาะสม ทำให้เกิดสาเหตุของการตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ได้ ส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค เช่น เป็นสาเหตุของการเกิดปฏิกิริยาการแพ้ยา การเกิดปัญหาเชื้อดื้อยาที่ทำให้ทางเลือกในการเลือกใช้ยาลดน้อยลง เป็นต้น การได้รับยาที่ตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ระดับต่ำอาจก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นอีกทางหนึ่ง เนื่องจากจุลินทรีย์จะไม่ถูกทำลายเมื่อได้รับยาในปริมาณที่ต่ำกว่าขนาดยาที่ใช้⁽⁵⁻⁹⁾

คณะกรรมการพิจารณามาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ สาขาสารตกค้างจากยาสัตว์ในอาหาร (Codex Committee on residues of Veterinary Drug in foods, CCRDVF) รวมถึงกระทรวงสาธารณสุขโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้ออกประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 303 (2550) เรื่องอาหารที่มียาสัตว์ตกค้างเพื่อกำหนดค่าการตกค้างสูงสุดของ Sulfonamides ในอาหาร⁽¹⁰⁾ โดยใช้ซัลฟาเมทาซีน หรือซัลฟาไดมีน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของ Sulfonamides เป็นตัวกำหนด โดยในกล้ามเนื้อ ตับ ไต และไขมัน มีปริมาณตกค้างได้สูงสุด Maximum residue limit (MRL) 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในนมปริมาณตกค้างสูงสุด 25 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่ผ่านมาห้องปฏิบัติการได้ทดสอบวิธีวิเคราะห์หาปริมาณการตกค้างของสารกลุ่ม SAs ในเนื้อสัตว์ โดยสกัดสารกลุ่ม SAs ออกจากตัวอย่างด้วย ethyl acetate และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค solid-phase extraction โดยผ่าน C - 18 cartridge แล้วตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณด้วย HPLC-UV detector ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาจากวิธีของ Ya-min และคณะ⁽¹¹⁾ พบว่ามีปัญหาการรบกวนของ matrix โดยพบสารรบกวนที่ให้พีคตรงหรือใกล้เคียงกับสารมาตรฐานและเมื่อขยายขอบข่ายไปตรวจวิเคราะห์ในเครื่องใน พบว่า C -18 cartridge ไม่สามารถกำจัดสารรบกวนในเครื่องในได้ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่เป็น multiresidues method อาจเป็นแนวทางที่สามารถตรวจสอบปริมาณการตกค้างของสารกลุ่ม Sulfonamides จำนวน 9 ชนิดในเนื้อสัตว์ ตับ และไตหมูได้ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้นำวิธีตรวจวิเคราะห์ของ Li และคณะ⁽¹²⁾ มาปรับปรุงวิธีการสกัดสารกลุ่ม Sulfonamides โดยสารกลุ่มนี้จะถูกสกัดออกจากตัวอย่างด้วยสารละลายผสมของ Ethanol: H₂O แล้วใช้ affinity column: IAC-SULF

ในการทำให้สารบริสุทธิ์มากขึ้น ตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณด้วย HPLC-UV detector ซึ่งเป็นเครื่องมือเดิมที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการและเนื่องจากยังไม่มีข้อมูลการตกค้างของสารกลุ่ม SAs ในเนื้อสัตว์และเครื่องในที่จำหน่ายในตลาด การศึกษานี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ multiresidues method และนำมาประยุกต์ใช้ในการสำรวจปริมาณการตกค้างของสารกลุ่ม SAs ในเนื้อหมู ตับหมู ไตหมู เนื้อไก่ ตับไก่ และเนื้อกึ่ง ซึ่งการติดตามตรวจสอบการตกค้างในเนื้อสัตว์และเครื่องในนั้น จะเป็นข้อมูลสำคัญอย่างหนึ่งที่จะใช้ประเมินผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค และใช้สำหรับการควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมายได้

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี : Ethanol, HPLC Grade, glacial acetic acid AR, methanol HPLC grade และ acetonitrile HPLC grade, affinity column: IAC-SULF (Clover)

สารมาตรฐาน : sulfonamides standard 9 ชนิด ได้แก่ sulfadiazine (SDZ), sulfathiazole (STZ), sulfapyridine (SPY), sulfamerazine (SMR), sulfadimidine (SMZ), sulfamonomethoxine (SMMX), sulfisoxazole (SFI), sulfamethoxazole (SMX) ผลิตภัณฑ์ของ Dr.Ehrenstorfer และ sulfaquinolaxine (SQ) ผลิตภัณฑ์ของ Chem Service inc. ความบริสุทธิ์ $\geq 95.0\%$

การเตรียมสารละลายและสารมาตรฐาน

0.2% acetic acid: ปิเปต glacial acetic acid (CH_3COOH) 2 ml ใส่ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารมาตรฐาน SAs (SDZ, STZ, SPY, SMR, SMZ, SMMX, SFI, SMX และ SQ) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : ชั่งสารมาตรฐานแต่ละชนิดปริมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายใน methanol ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรใช้เป็น stock standard solution

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง และ 5 ตำแหน่ง, nitrogen evaporator-temperature-controlled heating box, SPE vacuum manifold, certified volumetric pipette, certified volumetric flask, screw cap centrifuge tube, glass funnel, glass microfiber filter paper, micro spin filter 0.45 μm PVDF และขวดแก้วสีชา (amber glass vial) ขนาด 2 มิลลิลิตร, HPLC system (Agilent 1100 series) ประกอบด้วย vacuum degasser, quaternary pump, thermostatted column compartment และ UV detector โดยใช้ analytical column: Eclipse XDB-C18, 4.6 $\times$ 150 mm, 5 μm

ตัวอย่าง

- ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี : เนื้อหมูใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทุก parameter ส่วน ตับหมู เนื้อไก่ และเนื้อกึ่ง ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีเฉพาะ parameter การทดสอบ matrix blank ความแม่นยำ และความเที่ยง
- ตัวอย่างที่ใช้ในการสำรวจปริมาณการตกค้างของสารกลุ่ม SAs: เนื้อหมู ตับหมู ไตหมู เนื้อไก่ ตับไก่ และเนื้อกึ่ง

การเตรียมตัวอย่าง

เนื้อหมูส่วนสะโพก ตัดส่วนที่เป็นไขมันออกหั่นเป็นชิ้นเล็ก เนื้อไก่ ใช้เฉพาะเนื้อ ตัดส่วนหนังและไขมันออก เนื้อกุ้ง ใช้เฉพาะเนื้อ ปอกเปลือก ตัดส่วนหัว หางและไขมัน ตับหมู และตับไก่ ตัดส่วนพังผืดและไขมันออก ไตหมู ใช้ทั้งหมด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดปั่นประมาณ 300 - 500 กรัม ซึ่งแบ่งตัวอย่างตัวอย่างละ 5 กรัม เพื่อเป็น analytical portions ส่วนตัวอย่างที่ยังไม่วิเคราะห์จะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส

วิธีวิเคราะห์

ซึ่งตัวอย่างน้ำหนัก 5 กรัม ใส่ใน screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำละลายผสมของ ethanol: H₂O (80 : 20) 20 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วย vortex mixer ประมาณ 1 นาที เขย่าต่อด้วยเครื่องเขย่านาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ปิดสารละลายส่วนใส 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน volumetric flask ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร จากนั้นกรองสารผสมที่ได้ผ่าน glass microfiber paper นำสารที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป โดยเตรียม SPE vacuum manifold และ IAC-SULF column ให้พร้อมใช้ และปรับอัตราไหลประมาณ 2 มิลลิลิตรต่อนาที ตัดปลายจุกสีขาวด้านบน (top cap) จาก IAC-SULF column ใช้เป็นส่วนต่อระหว่าง column และ syringe ที่ใช้เป็น sample reservoir ปิดสารสกัดที่ได้จากการกรองแล้ว จำนวน 20 มิลลิลิตร ลงใน reservoir ที่ต่ออยู่กับ column ผ่าน column ด้วยอัตราไหลประมาณ 2 หยดต่อวินาที หรือ 2 มิลลิลิตรต่อนาที จนสารสกัดผ่าน column จนหมด (ทั้ง eluate) ล้าง column ด้วยน้ำ 10 มิลลิลิตร 1 ครั้ง (ทั้ง eluate) เติมน้ำ methanol 2 มิลลิลิตร เป็นตัวชะ (eluent) เก็บสารละลายส่วนที่ผ่านออกมาใน screw cap centrifuge tube ขนาด 10 มิลลิลิตร นำไประเหยแห้งด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ละลายส่วนที่เหลืออยู่ด้วยสารละลายผสมของ CH₃CN: H₂O (30 : 70) 500 ไมโครลิตร จะได้สารสกัดตัวอย่าง ความเข้มข้น 1 กรัมต่อมิลลิลิตร กรองสารละลายตัวอย่างผ่าน micro-spin filters ชนิด PVDF 0.45 µm เก็บในขวดแก้วสีชา ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่องมือต่อไป

การตรวจวัดชนิดและปริมาณสารกลุ่ม sulfonamides จำนวน 9 ชนิด ด้วยเครื่อง HPLC-UV Detector ใช้สภาวะดังนี้

Gradient condition

Time (min)		0.0	10.0	35.0	40.0	45.0	55.0
Mobile phase A 0.2% acetic acid (%)	:	88.0	88.0	60.0	30.0	88.0	88.0
Mobile phase B Acetonitrile (%)	:	12.0	12.0	40.0	70.0	12.0	12.0
Flow rate	:	0.7 ml/min					
Analytical column	:	Eclipse XDB - C18, 4.6 × 150 mm, 5 µm					
Guard column	:	C18, 5 µm					
Column Oven	:	30°C					
Inject volume	:	20 µl					
Detector	:	UV 268 nm					

เมื่อสภาวะของเครื่อง HPLC พร้อมใช้งาน ตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability) โดยการฉีดสารมาตรฐานผสม sulfonamides ความเข้มข้นประมาณ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 3 ซ้ำ คำนวณ %RSD ของ peak area, retention time (RT) และค่า tailing factor โดยเกณฑ์ยอมรับค่าการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบดังนี้ %RSD (peak area) ≤ 5%, %RSD (RT) ≤ 2% และ tailing factor < 2

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

เตรียมสารมาตรฐานกลุ่ม SAs ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 และ 0.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายผสมของ $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$ (30 : 70) ฉีดเข้าเครื่อง HPLC แล้วสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson correlation of coefficient: r)

วิเคราะห์ Method blank และ Matrix blank

Method blank: สกัดสารเคมีทั้งหมดตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา

Matrix blank: สกัดตัวอย่าง เนื้อหมู ตับหมู เนื้อไก่ และเนื้อกุ้ง ตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา (3 ซ้ำ) ฉีด Method blank และ Matrix blank เข้าระบบ HPLC เพื่อตรวจสอบว่าสารเคมีหรืออุปกรณ์ที่ใช้หรือตัวอย่างมีสารรบกวนต่อการวิเคราะห์หรือไม่

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานความเข้มข้นต่ำ ๆ ลงในตัวอย่างวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ค่า LOD เท่ากับความเข้มข้นของสารที่สนใจ ที่ให้พีคที่ความสูงเท่ากับ 3 เท่า signal-to-noise ratio คำนวณต่อน้ำหนักของตัวอย่าง

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ทดสอบโดยการเติมสารมาตรฐานประมาณ 2 เท่าของค่า LOD ลงในตัวอย่างวิเคราะห์ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณ % Recovery และค่า RSD

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and working range)

เติมสารมาตรฐานในตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ แล้วสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมในตัวอย่าง (concentration of the test sample) กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ตรวจพบ (measured concentration) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r)

ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง (Accuracy and Precision)

การทดสอบการกลับคืน (Recovery)

ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีโดยการวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (spiked sample)^(13,14) ที่ระดับ LOQ และ $2 \times \text{LOQ}$ ได้แก่ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทำการวิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบสารมาตรฐาน แล้วคำนวณ % Recovery, %RSD และ HORRAT ผลของการทดสอบความถูกต้องของวิธีที่ได้จะถูกประเมินดังนี้

ความแม่นยำ (accuracy) กำหนดเกณฑ์ยอมรับโดยค่าเฉลี่ย % Recovery ในช่วงร้อยละ 60 - 120 ความเที่ยง (precision) กำหนดเกณฑ์ยอมรับโดยใช้ HORRAT (Horwitz ratio) เกณฑ์ยอมรับค่า HORRAT ที่ codex กำหนดไว้ที่ $\leq 2^{(14)}$

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (Uncertainty)

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด โดยคำนึงถึงแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนทุกแหล่ง⁽¹⁵⁾ รวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมดแล้วคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า $k = 2$ ซึ่งปริมาณสารที่พบคำนวณได้จากการวิเคราะห์โดย HPLC และคำนวณความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบจาก calibration curve โดยใช้สมการเส้นตรง⁽¹⁶⁾

การทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing)

ประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการจากหน่วยงานภายนอก โดยการเข้าร่วมการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการในการทดสอบความชำนาญ กับตัวอย่างที่รู้ค่ากำหนด (assigned value) กับหน่วยงานที่ให้บริการทดสอบความชำนาญที่เชื่อถือได้ เกณฑ์ยอมรับของผลการทดสอบ คือ $|z| < 2$

การควบคุมคุณภาพภายในของการตรวจวิเคราะห์ (Internal Quality control)

กำหนดให้ calibration curve ต้องมีค่า Coefficient of determination (R^2) มากกว่าหรือเท่ากับ 0.990 และทดสอบประสิทธิภาพของ affinity column ทุกครั้ง เมื่อมีการเปลี่ยน lot ใหม่ค่า % recovery ต้องมากกว่าหรือเท่ากับ 80% ทุกครั้งการวิเคราะห์จะต้องวิเคราะห์ method blank, duplicate sample (สกัด 2 ซ้ำ) อย่างน้อยร้อยละ 10 ของจำนวนตัวอย่างในรุ่น ค่า relative percent difference (RPD) ไม่เกิน 30% และ spiked sample ที่ระดับ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม อย่างน้อย 1 ตัวอย่าง ค่า % recovery ต้องอยู่ในช่วง 60 - 120%

การสำรวจปริมาณตกค้างในเนื้อสัตว์ (Survey residue)

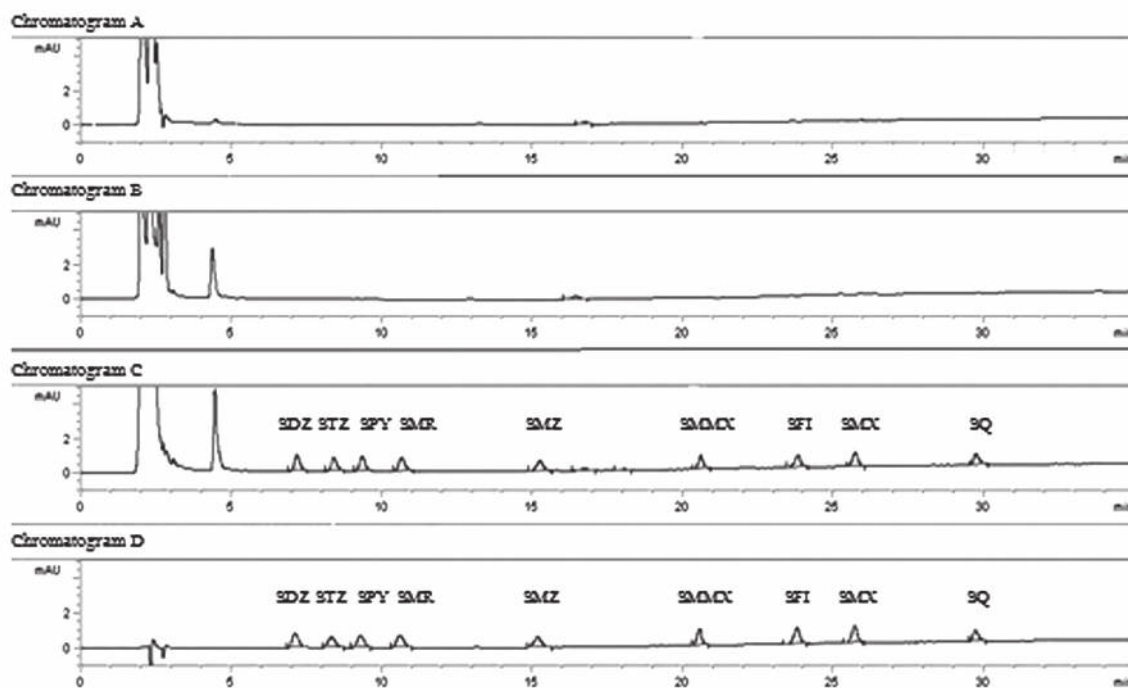
การสำรวจปริมาณตกค้างในเนื้อสัตว์ ได้แก่ เนื้อหมู ตับหมู ไตหมู เนื้อไก่ ตับไก่ และเนื้อกุ้ง เก็บจากตลาดสดและห้างสรรพสินค้าในเขตกรุงเทพมหานคร โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และเอกชน ในปี 2554 จำนวน 70 ตัวอย่าง ปี 2555 จำนวน 71 ตัวอย่าง ปี 2556 จำนวน 79 ตัวอย่าง ปี 2557 จำนวน 84 ตัวอย่าง และ ปี 2558 จำนวน 82 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 386 ตัวอย่าง

ผล

จากการตรวจวิเคราะห์ sulfonamides 9 ชนิด ได้แก่ sulfadiazine (SDZ), sulfathiazole (STZ), sulfapyridine (SPY), sulfamerazine (SMR), sulfadimidine (SMZ), sulfamonomethoxine (SMMX), sulfisoxazole (SFI), sulfamethoxazole (SMX) และ sulfaquinoxaline (SQ) ด้วยเครื่อง HPLC ภายใต้สภาวะที่กำหนดพบว่าสามารถสร้างกราฟมาตรฐานของสารดังกล่าวได้ในช่วง 0.05 - 0.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า r อยู่ในช่วง 0.9998 - 0.9999 และจากการศึกษาสภาวะของเครื่องมือ HPLC พบว่า chromatogram ของ method blank และ matrix blank ตรวจไม่พบสารรบกวนที่ให้พีคตรงหรือใกล้เคียงกับสารมาตรฐานที่อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการรายงานผลวิเคราะห์

ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) มีค่าเท่า 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จากการศึกษาเนื้อหมูที่เติมสารมาตรฐาน จำนวน 10 ซ้ำ มีค่าเฉลี่ยของสาร 9 ชนิด โดยมีค่าความแม่นยำจาก % Recovery เฉลี่ยที่ระดับ LOQ ในช่วง 75.4 - 96.0% และความเที่ยงจาก HORRAT ในช่วง 0.3 - 0.7

ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่า chromatogram ของ matrix blank เนื้อหมู ตับหมู เนื้อไก่ และเนื้อกุ้ง ไม่มีพีคบริเวณที่ตรงกับพีคของสารมาตรฐานทั้ง 9 ชนิด โดยมี runtime 35 นาทีต่อตัวอย่าง chromatogram ของ matrix blank เนื้อหมู และตับหมู (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ผลการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม sulfonamides ด้วยเครื่องมือ HPLC-UV detector (A และ B) chromatogram ของเนื้อหมูและตับหมู (C) chromatogram ของเนื้อหมูที่เติมสารมาตรฐานที่ระดับ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (D) chromatogram ของสารมาตรฐานที่ระดับ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร

ในการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์พบว่าการวิเคราะห์ sulfonamides 9 ชนิด มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 50 - 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยเติมสารมาตรฐานลงในเนื้อหมูที่ระดับความเข้มข้น 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ระดับละ 3 ซ้ำ มีค่า r ในช่วง 0.9941 - 0.9991

เมื่อทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธี โดยการวิเคราะห์ในตัวอย่าง เนื้อหมู ตับหมู เนื้อไก่ และเนื้อกุ้ง ที่เติมสารมาตรฐาน (spiked sample) ลงในตัวอย่างที่ระดับ LOQ (50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) และ $2 \times \text{LOQ}$ (100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ระดับละ 10 ซ้ำ พบว่าความแม่นยำที่ประเมินจาก % Recovery ทั้ง 2 ระดับ อยู่ในช่วง 61.3 - 109.3% และความเที่ยงที่ประเมินด้วย %RSD และ HORRAT จะอยู่ในช่วง 2.5 - 15.0 และ 0.2 - 1.0 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

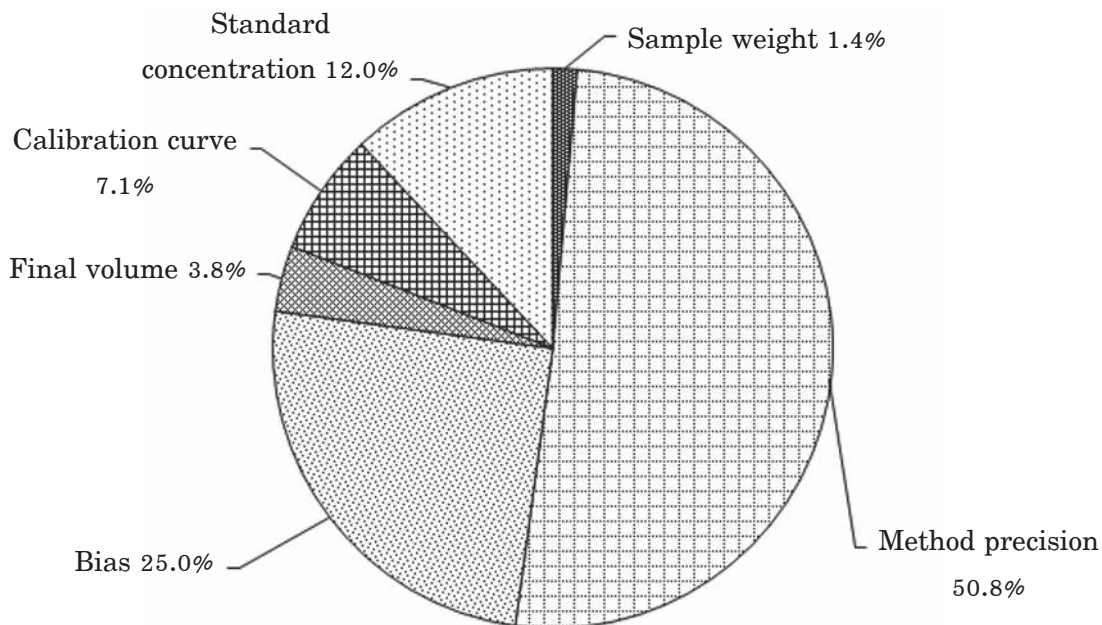
ตารางที่ 1 ความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์เนื้อสัตว์และตับหมูเมื่อเติมสารมาตรฐาน 9 ชนิด ที่ระดับ 50 µg/kg (LOQ) และ 100 µg/kg (2 LOQ)

สารมาตรฐาน	RT (min)	ชนิดตัวอย่าง	Spiked level (µg/kg)	% Recovery (n = 10) mean ± SD	%RSP	HORRAT
Sulfadiazine	7.029	เนื้อหมู	50	93.4 ± 8.2	8.8	0.5
			100	93.5 ± 4.9	5.2	0.3
		เนื้อไก่	50	93.2 ± 10.5	11.3	0.6
			100	91.4 ± 7.7	8.5	0.6
		เนื้อกุ้ง	50	77.8 ± 3.5	4.5	0.2
			100	75.5 ± 8.6	11.4	0.8
		ตับหมู	50	93.6 ± 3.7	4.0	0.2
			100	91.1 ± 4.5	4.9	0.3
Sulfathiazole	8.191	เนื้อหมู	50	96.0 ± 4.8	5.1	0.3
			100	106.7 ± 5.7	5.4	0.4
		เนื้อไก่	50	89.1 ± 7.6	8.6	0.5
			100	96.2 ± 14.4	15.0	1.0
		เนื้อกุ้ง	50	85.7 ± 3.3	3.8	0.2
			100	83.6 ± 8.5	10.2	0.7
		ตับหมู	50	90.5 ± 3.6	4.0	0.2
			100	85.0 ± 5.3	6.2	0.4
Sulfapyridine	9.114	เนื้อหมู	50	81.4 ± 7.2	8.9	0.5
			100	78.6 ± 4.5	5.8	0.4
		เนื้อไก่	50	81.2 ± 8.3	10.2	0.5
			100	74.8 ± 5.2	7.0	0.5
		เนื้อกุ้ง	50	86.6 ± 3.2	3.7	0.2
			100	82.7 ± 6.9	8.3	0.6
		ตับหมู	50	95.9 ± 4.4	4.6	0.2
			100	70.8 ± 5.7	8.0	0.5
Sulfamerazine	10.445	เนื้อหมู	50	89.1 ± 9.7	10.9	0.6
			100	83.0 ± 4.2	5.0	0.3
		เนื้อไก่	50	85.7 ± 11.0	12.9	0.7
			100	77.8 ± 6.4	8.2	0.5
		เนื้อกุ้ง	50	86.1 ± 3.8	4.4	0.2
			100	81.2 ± 5.7	7.0	0.5
		ตับหมู	50	91.4 ± 3.4	3.7	0.2
			100	80.6 ± 5.1	6.3	0.4
Sulfadimidine (Sulfamethazine)	14.961	เนื้อหมู	50	88.3 ± 12.1	13.7	0.7
			100	79.5 ± 7.0	8.8	0.6
		เนื้อไก่	50	77.8 ± 5.4	6.9	0.4
			100	76.0 ± 5.4	7.1	0.5
		เนื้อกุ้ง	50	86.5 ± 5.0	5.7	0.3
			100	83.0 ± 6.3	7.6	0.5
		ตับหมู	50	87.2 ± 5.8	6.7	0.4
			100	69.7 ± 5.2	7.4	0.5

ตารางที่ 1 ความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์เนื้อสัตว์และตับหมูเมื่อเติมสารมาตรฐาน 9 ชนิด ที่ระดับ 50 µg/kg (LOQ) และ 100 µg/kg (2 LOQ) (ต่อ)

สารมาตรฐาน	RT (min)	ชนิดตัวอย่าง	Spiked level (µg/kg)	% Recovery (n = 10) mean ± SD	%RSP	HORRAT
Sulfamonomethoxine	20.377	เนื้อหมู	50	75.4 ± 3.8	5.1	0.3
			100	70.9 ± 2.1	2.9	0.2
		เนื้อไก่	50	72.9 ± 2.7	3.7	0.2
			100	65.7 ± 2.6	3.9	0.3
		เนื้อกุ้ง	50	73.8 ± 2.9	3.9	0.2
			100	71.6 ± 2.4	3.3	0.2
		ตับหมู	50	74.6 ± 3.9	5.2	0.3
			100	63.6 ± 1.6	2.5	0.2
		เนื้อหมู	50	92.6 ± 8.2	8.9	0.5
			100	84.2 ± 2.1	2.5	0.2
Sulfamethoxazole	23.639	เนื้อไก่	50	91.8 ± 7.3	7.9	0.4
			100	83.1 ± 7.0	8.4	0.6
		เนื้อกุ้ง	50	87.9 ± 7.5	8.6	0.5
			100	81.6 ± 4.3	5.3	0.4
		ตับหมู	50	97.2 ± 8.2	8.5	0.4
			100	90.2 ± 4.0	4.5	0.3
Sulfisoxazole	25.563	เนื้อหมู	50	83.3 ± 4.8	5.7	0.3
			100	72.4 ± 4.2	5.8	0.4
		เนื้อไก่	50	83.3 ± 8.1	9.8	0.5
			100	66.9 ± 4.3	6.5	0.4
		เนื้อกุ้ง	50	78.3 ± 6.2	7.9	0.4
			100	74.9 ± 4.8	6.4	0.4
		ตับหมู	50	78.4 ± 2.8	3.6	0.2
			100	71.2 ± 4.2	5.9	0.4
Sulfaquinoxaline	29.624	เนื้อหมู	50	82.2 ± 10.4	12.6	0.7
			100	81.7 ± 5.1	6.3	0.4
		เนื้อไก่	50	85.9 ± 10.4	12.6	0.6
			100	86.7 ± 9.3	10.7	0.7
		เนื้อกุ้ง	50	83.5 ± 5.9	7.0	0.4
			100	73.8 ± 4.8	6.5	0.4
		ตับหมู	50	85.6 ± 7.1	8.3	0.4
			100	86.7 ± 4.0	4.6	0.3

เพื่อยืนยันความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนานี้ จากการประมาณค่าของความไม่แน่นอนของการวัด พบว่าแหล่งของความไม่แน่นอนที่สำคัญคือ precision และค่า bias แหล่งความไม่แน่นอนที่ส่งผลต่อปริมาณสารจากมากไปน้อย ได้แก่ ความเที่ยงของการวิเคราะห์ (method precision, 50.8%), ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (bias, 25.0%), สารมาตรฐาน (standard concentration, 12.0%), (calibration curve 7.1%), ปริมาตรสุดท้ายของสารสกัด (final volume, 3.8%, การชั่งน้ำหนักตัวอย่าง (sample weight, 1.4%) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนที่สำคัญที่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์ sulfonamides

นอกจากนี้ได้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญการวิเคราะห์กับหน่วยงานที่ให้บริการทดสอบความชำนาญ (proficiency testing provider) ที่เชื่อถือได้ โดยการเข้าร่วมการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการในการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing, PT) กับตัวอย่างที่รู้ค่ากำหนด (assigned value) ในตัวอย่างไต่หมู เนื้อกึ่ง และเนื้อไก่ ในระหว่างปี 2554 - 2558 ทั้งหน่วยงานภายในประเทศ ได้แก่ บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด หน่วยงานต่างประเทศ ได้แก่ The Food and Environment Research Agency และเข้าร่วมในโครงการ APEC proficiency testing of veterinary drug residues in food program ซึ่งดำเนินการโดย Chinese Academy of Inspection and Quarantine (Under AQSIQ) ผลการประเมินอยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ ค่า $|z|$ น้อยกว่า 2 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงผลจากการเข้าร่วมการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการในการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing, PT)

ปี พ.ศ.	PT provider	ชนิดตัวอย่าง	ชนิดสารที่พบ	(µg/kg)		z-score
				Result report	Assigned value	
พ.ศ. 2554	The Food and Environment Research Agency	ไต่หมู	sulfadiazine	92.0	97.6	-0.3
พ.ศ. 2556	บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด	เนื้อกุ้ง	Sample A			
			- sulfapyridine	35.3	41.4	-0.66
			- sulfamonomethoxine	31.5	40.1	-0.97
			Sample B			
			- sulfapyridine	34.4	41.4	-0.66
			- sulfamonomethoxine	30.8	40.1	-1.05
	Chinese Academy of Inspection and Quarantine	เนื้อไก่	Sample A			
			- sulfamethoxazole	33.8	28.0	1.00
			- sulfadimidine	36.3	36.2	0.02
			Sample B			
พ.ศ. 2557	บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด	เนื้อกุ้ง	- sulfamethoxazole	135.0	142.5	-0.27
			- sulfadimidine	113.0	122.6	-0.34
			Sample A			
			- sulfadiazine	83.96	88.55	-0.24
			- sulfadimidine	78.03	96.20	-0.86
			- sulfamonomethoxine	51.24	57.76	-0.48
			Sample B			
			- sulfadiazine	85.58	88.55	-0.65
			- sulfadimidine	75.04	96.20	-1.00
			- sulfamonomethoxine	52.86	57.76	-0.36
พ.ศ. 2558	บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด	เนื้อกุ้ง	Sample C			
			- sulfadiazine	86.33	88.55	-0.54
			- sulfadimidine	57.09	96.20	-1.85
			- sulfamonomethoxine	38.98	57.76	-1.46
			- sulfadiazine	52.06	49.62	0.22
			- sulfadimidine	36.68	49.45	-1.17
			- sulfamethoxazole	46.26	49.45	-0.29
			- sulfamerazine	41.30	49.99	-0.75

ได้นำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีแล้ว มาตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่ส่งตรวจที่สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ได้แก่ ตัวอย่างในเนื้อสัตว์และเครื่องในสัตว์ที่จำหน่ายในตลาดในกรุงเทพมหานครและภาคเอกชน เพื่อตรวจสอบปริมาณการตกค้างของสารกลุ่ม Sulfonamides ในเนื้อสัตว์และเครื่องในสัตว์ ในช่วงปี พ.ศ. 2554 - 2558 รวม 386 ตัวอย่าง

ผลการตรวจวิเคราะห์ ตรวจพบสารกลุ่ม Sulfonamides ในเนื้อสัตว์ 11 ตัวอย่าง ตับสัตว์ 12 ตัวอย่าง และไตหมู 2 ตัวอย่าง ชนิดสารที่พบคือ sulfisoxazole, sulfadiazine, sulfathiazole, sulfamethoxazole, sulfadimidine และ sulfaquinolaxaline ปริมาณที่ตรวจพบอยู่ระหว่างน้อยกว่า 50 - 1,027 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จากการตรวจวิเคราะห์เนื้อสัตว์และตับโดยการควบคุมคุณภาพภายในของผลการวิเคราะห์ พบว่า calibration curve มีค่า Coefficient of determination (R^2) ของสารทั้ง 9 ชนิดมากกว่า 0.990% ประสิทธิภาพของ affinity column ที่ทำการทดสอบทุกครั้ง เมื่อมีการเปลี่ยน lot ใหม่มีค่า % recovery มากกว่า 80% ค่า % recovery เฉลี่ยของสารทั้ง 9 ชนิดที่มาจากการ spiked sample ($n = 50$) อยู่ในช่วง 68.6 - 89.8 และค่า %RSD อยู่ในช่วง 13.4 - 17.4 ทุกครั้งการวิเคราะห์ method blank เพื่อดูการปนเปื้อนของขั้นตอนการวิเคราะห์ที่ไม่พบสารรบกวนที่ให้พีคตรงหรือใกล้เคียงกับสารมาตรฐานที่อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการรายงานผล (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การสำรวจปริมาณตกค้างของสารกลุ่ม SAs ในเนื้อสัตว์ และตับ ในเขตกรุงเทพมหานคร พ.ศ. 2554 - 2558

ปี พ.ศ.	ชนิดตัวอย่าง	จำนวน		ชนิดสารที่พบ	ปริมาณที่พบ ($\mu\text{g/kg}$)	
		วิเคราะห์	ตรวจพบ		ต่ำสุด - สูงสุด	mean
2554	เนื้อหมู	24	2	sulfisoxazole	32.0-91.0	61.5
	ตับหมู	6	1	sulfadimidine	59.0	-
	ไตหมู	3	0	-	-	-
	เนื้อไก่	23	1	sulfadiazine	192	-
	ตับไก่	4	0	-	-	-
	เนื้อกุ้ง	10	1	sulfathiazole	31.0	-
2555	เนื้อหมู	24	1	sulfadiazine	41.0	-
	ตับหมู	6	1	sulfamethoxazole	36.0	-
	ไตหมู	2	0	-	-	-
	เนื้อไก่	20	0	-	-	-
	เนื้อกุ้ง	19	0	-	-	-
2556	เนื้อหมู	19	0	-	-	-
	ตับหมู	1	0	-	-	-
	เนื้อไก่	47	0	-	-	-
	ตับไก่	6	0	-	-	-
	เนื้อกุ้ง	6	0	-	-	-

ตารางที่ 3 การสำรวจปริมาณตกค้างของสารกลุ่ม SAs ในเนื้อสัตว์ และตับ ในเขตกรุงเทพมหานคร พ.ศ. 2554 – 2558 (ต่อ)

ปี พ.ศ.	ชนิดตัวอย่าง	จำนวน		ชนิดสารที่พบ	ปริมาณที่พบ ($\mu\text{g/kg}$)	
		วิเคราะห์	ตรวจพบ		ต่ำสุด – สูงสุด	mean
2557	เนื้อหมู	9	0	–	–	–
	ตับหมู	7	2	sulfaquinoxaline	68.4	–
				sulfadimidine	1,027	–
	ไตหมู	3	2	sulfadimidine	45.4–67.5	59.9
	เนื้อไก่	44	5	sulfisoxazole	22.8–41.8	33.5
	ตับไก่	21	0	–	–	–
2558	เนื้อหมู	28	1	sulfaquinoxaline	68.0	–
	ตับหมู	12	8	sulfadimidine	48.4–74.5	61.4
				sulfamethoxazole	33.1–79.9	40.0
	ไตหมู	3	0	–	–	–
	เนื้อไก่	26	0	–	–	–
	ตับไก่	10	0	–	–	–
	เนื้อกุ้ง	3	0	–	–	–
รวม		386	25			

วิจารณ์

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่ม SAs นั้น ใช้หลักการทั่วไปที่จะแยกสารกลุ่มนี้ออกมาโดยวิธี Liquid-liquid extraction ด้วยสารละลายที่เหมาะสม แล้วทำให้สารบริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยใช้สารดูดซับที่เหมาะสมกับวิธีการในการทำให้บริสุทธิ์ สามารถตรวจหาชนิดและปริมาณได้หลายเทคนิค เช่น เทคนิค Enzyme linked immunosorbance assay (ELISA), Radioimmunoassay (Charm II test) สามารถระบุชนิดและช่วงการตกค้างได้เป็นระดับ ใช้ในการตรวจสอบเบื้องต้น^(17,18) ซึ่งส่วนมากเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปที่ต้องสั่งจากต่างประเทศ มีราคาแพง ส่วนวิธี HPLC เป็นวิธีที่สามารถระบุชนิดและปริมาณการตกค้างของสารกลุ่ม SAs ได้หลายชนิด มีค่า LOD และ LOQ ต่ำ ได้แก่ HPLC-UV detector, HPLC-DAD detector, HPLC-Fluorescence detector และ HPLC-MS/MS^(19,20,21) ทางผู้วิจัยเลือก HPLC-UV detector เนื่องจากเป็นเครื่องมือที่สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณการตกค้างของสารกลุ่ม SAs ในเนื้อสัตว์ ในช่วงปี พ.ศ. 2551 – 2553 โดยนำวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาจากวิธีของ Ya min และคณะ⁽¹¹⁾ มาใช้พบว่ามีปัญหาการรบกวนของ matrix โดยพบสารรบกวนที่ให้พีคตรงหรือใกล้เคียงกับสารมาตรฐานคือ sulfadiazine ต้องทำการยืนยันผลการวิเคราะห์โดยการเติมสาร fluorescamine เพื่อทำปฏิกิริยา derivatization ให้สามารถตรวจวัดด้วย Fluorescence detector⁽²¹⁾ ได้ เพื่อแก้ปัญหาการรบกวนของ matrix เนื่องจาก SAs ไม่มีคุณสมบัติในการเรืองแสง ซึ่งมีข้อจำกัดของวิธีคือหลังจากการทำปฏิกิริยา derivatization เพื่อให้ได้สารประกอบ fluorescent ประสิทธิภาพของการเรืองแสงจะให้ค่าสูงสุดคือ 30 นาที ทำให้สามารถตรวจยืนยันได้ในเวลาจำกัดและวิธีเดิมสามารถวิเคราะห์ได้เฉพาะเนื้อสัตว์เท่านั้น จึงได้ปรับเปลี่ยนวิธีโดยนำวิธีตรวจวิเคราะห์ของ Li และคณะ⁽¹²⁾

มาปรับปรุงวิธีการสกัดโดยใช้สารละลายผสมของ ethanol: H₂O แทนการใช้สารละลายผสม methanol: H₂O และสารละลาย phosphate-buffer (PBS) แล้วใช้ affinity column: IAC-SULF ในการทำให้สารบริสุทธิ์ เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะกับสารกลุ่ม SAs สูง พบว่าสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ ลดการใช้สาร ออร์แกนิกที่เป็นอันตรายต่อผู้วิเคราะห์และตกค้างสู่สิ่งแวดล้อม เพิ่มศักยภาพในการวิเคราะห์โดยสามารถวิเคราะห์ ได้หลายตัวอย่างพร้อมๆ กัน เมื่อปรับปรุงวิธีแล้วและยังสามารถขยายขอบข่ายไปวิเคราะห์ในไตและตับได้ เมื่อได้ตรวจสอบความถูกต้องวิธีแล้วตาม Eurachem^(13,14) พบว่ามีค่า LOD, LOQ ความเที่ยงและความแม่นยำ เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของวิธี จากการประมาณค่าของความไม่แน่นอนของการวัดโดยได้พิจารณาแหล่งความ ไม่แน่นอนที่มีผลกระทบต่อปริมาณสาร^(15,16) โดยนำการวิเคราะห์ sulfadimidine ในตัวอย่างเนื้อหมูเป็นตัวอย่าง พบว่าแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน ได้แก่ การชั่งน้ำหนักตัวอย่าง ปริมาตรสุดท้ายของสารสกัด การเตรียมสาร มาตรฐาน เครื่องแก้ววัดปริมาตรที่ใช้ ค่า Co ที่อ่านได้จาก calibration curve ค่า bias ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพ ของการวิเคราะห์จาก % recovery และความเที่ยงของวิธีเมื่อทำซ้ำ (repeatability) ได้ค่า relative standard uncertainty, $u(x)/x$ เมื่อนำค่าความไม่แน่นอนจากทุกแหล่งมารวมกันจะได้ค่า combined standard uncertainty เท่ากับ $\pm 10.2\%$ และนำมาขยายให้เป็น Expanded uncertainty, U จะได้ค่าความไม่แน่นอน เท่ากับ $\pm 17.2\%$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในช่วงวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวยังมีข้อควรระวังคือตัวอย่างที่วิเคราะห์ ขั้นตอนการสกัดหลังจากกรองสารผสมที่ได้ผ่าน glass microfiber paper filtrate ที่ได้ให้รับนำสารที่ได้ไปผ่าน column ขั้นตอนการกรองและผ่าน column ต้องใช้เวลาไม่เกิน 30 นาที filtrate ที่ได้ต้องเป็นของเหลวใส ถ้าไม่ ใสให้กรองซ้ำ ระวังอย่าให้ IAC-SULF column แห้ง ควรสกัดและผ่าน affinity column ให้เสร็จภายในวันเดียว affinity column ที่ยังไม่ใช้งานควรเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส และตรวจสอบประสิทธิภาพ ของ affinity column ทุก Lot ที่ใช้เนื่องจากมีอายุการใช้งานและมีผลต่อปริมาณของสารที่สนใจ และจุดที่ควรระวัง มากคือขั้นตอนการระเหยแห้งด้วย nitrogen evaporator ต้องไม่ให้แห้งเกินไป หากไม่ระวังในขั้นตอนที่กล่าวมา จะทำให้ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ลดลง และ % recovery ของ spiked matrix ต่ำกว่าเกณฑ์กำหนด

จากวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนานี้ได้นำมาใช้ในการสำรวจปริมาณตกค้างในเนื้อสัตว์และเครื่องในสัตว์ ได้แก่ เนื้อหมู ตับหมู ไตหมู เนื้อไก่ ตับไก่ และเนื้อกุ้ง ที่จำหน่ายทั่วไปตามตลาดในเขตกรุงเทพมหานคร จำนวน 386 ตัวอย่าง ในระหว่าง พ.ศ. 2554 - 2558 ตรวจพบ SAs ตกค้าง จำนวน 25 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.5 ซึ่งพบการตกค้าง ในเครื่องในมากกว่าในเนื้อสัตว์ ข้อมูลการตกค้างจากการสำรวจอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี 2554 - 2558 วิเคราะห์ ตัวอย่างปีละประมาณ 80 ตัวอย่าง พบว่าในตัวอย่างเนื้อสัตว์มีแนวโน้มลดลง แต่มีการตรวจพบในตับหมู ไตหมู และ ตับไก่มากขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณที่ตรวจพบกับค่ากำหนด ปริมาณตกค้างสูงสุด (MRL) ของ Sulfonamides ในอาหาร ที่กำหนดโดยคณะกรรมการพิจารณามาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ สาขาสารตกค้างจากยาสัตว์ในอาหาร (Codex Committee on residues of Veterinary Drug in foods, CCRDVF) และกระทรวงสาธารณสุข พบว่ามีเพียง ตับหมู 1 ตัวอย่างที่พบการตกค้างสูงเกินค่ากำหนด จากผลการสำรวจเบื้องต้นอาจสะท้อนให้เห็นว่า กระบวนการผลิตจนถึงจำหน่ายเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ให้แก่ผู้บริโภค มีการควบคุมมาตรฐานการผลิตได้อย่างมี ประสิทธิภาพ ทำให้ผู้บริโภคมั่นใจในระดับหนึ่งว่าเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่นำมาบริโภคนั้นมีความปลอดภัยจากยา สัตว์ในกลุ่มดังกล่าว

สรุป

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณยาสัตว์ตกค้างกลุ่ม Sulfonamides โดยใช้หลักการของ multiresidues method โดยเทคนิค HPLC ที่ได้ปรับปรุงวิธีและทำให้บริสุทธิ์ด้วย affinity column: IAC-SULF นี้สามารถ ลดปัญหาการรบกวนจาก matrix ของตัวอย่างรวมทั้งมีขั้นตอนการวิเคราะห์ไม่ยุ่งยาก ผลการทวนสอบความถูกต้อง

ของวิธีพบว่าเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ สามารถนำวิธีมาใช้ในห้องปฏิบัติการในการสำรวจปริมาณการตกค้างของสารกลุ่ม Sulfonamides ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานคร การติดตามตรวจสอบการตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์นั้นจะเป็นข้อมูลสำคัญอย่างหนึ่งที่จะใช้ประเมินผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค ใช้เป็นข้อมูลสำหรับการควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมาย และสร้างความมั่นใจให้ผู้บริโภคในความปลอดภัยในการบริโภคเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางกนกพร อธิสุข นักวิทยาศาสตร์การแพทย์เชี่ยวชาญด้านมาตรฐานของอาหาร ที่ให้คำแนะนำปรึกษา ตลอดจนสนับสนุนการศึกษาวิจัยจนบรรลุผลสำเร็จในครั้งนี้ ท้ายที่สุดขอขอบคุณนางสาวสิริลักษณ์ ชัยรินทร์ และนางสาวกรรพรณ สงศรี ที่ได้เตรียมและสกัดตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

1. Poirier LA, Doerge DR, Gaylor DW, Miller MA, Lorentzen RJ, Casciano DA, et al. An FDA review of sulfamethazine toxicity. Regul Toxicol Pharmacol 1999; 30(3): 217-22.
2. กำพล ศรีวัฒนกุล และคณะ. คู่มือการใช้ยาฉบับสมบูรณ์. พิมพ์ครั้งที่ 7. ปทุมธานี : บริษัทสกายบุ๊กส์ จำกัด; 2552. หน้า 153-156.
3. โอนซา อุทัยพัฒน์, นงลักษณ์ สุขวานิชย์ศิลป์. เกสซ์วิทยา เล่ม 2. กรุงเทพฯ : บริษัทไทยมิตรการพิมพ์; 2541. หน้า 1-25, 162-171.
4. Jawetz E. Sulfonamides & trimethoprim. In: Katzung BG. Basic & clinical pharmacology. 2nd ed. Los Altos, CA: Lange Medical Publications; 1984. p. 554-558.
5. USP veterinary pharmaceutical information monographs: sulfonamides. [online]. 2003; [cited 2006 Jul 26]. Available from: URL: <http://www.usp.org/audiences/veterinary/monographs/main.html>.
6. 21 CFR 520.2260a; U.S. national archives and records administration's. electronic code of federal regulations. [online]. [cited 2006 Jun 21]. Available from: URL: <https://www.ecfr.gov>.
7. Huber WG. The impact of antibiotic drugs and their residues. In: Brandly CA, Gornelius C, editors. Advances in veterinary science and comparative medicine. New York: Academic Press; 1971. p. 101-132.
8. Wilson RC. Antibiotic residues and public health. In: Crawford LM, Franco DA, editors. Animal drugs and human health. USA: Technomic Publishing; 1994. p. 63-80.
9. Donoghue DJ. Antibiotic residues in poultry tissue and eggs: human health concerns. Poultry Science. 2003; 82: 618-21.
10. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 303 (พ.ศ. 2550) เรื่องอาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 120 ตอนพิเศษ 47ง (ลงวันที่ 23 เมษายน 2546) หน้า 12.
11. Kao YM, Chang MH, Cheng CC, Chou SS. Chieu-Chen Cheng, Shin-Shou Chou. Multiresidue determination of veterinary drugs in chicken and swine muscles by high-performance liquid chromatography. J Food Drug Anal 2001; 9(2): 84-95.
12. Li B, Li C, Jiang H, Wang Z, Cao X, Zhao, et al. Purification of nine sulfonamides from chicken tissues by immunoaffinity chromatography using two monoclonal antibodies. J AOAC Int 2008; 91(6): 1488-93.

13. Eurachem Guide. The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. United Kingdom: LGC (Teddington) LTD; 1998. p. 61, 5-24.
14. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
15. EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2nd ed. United Kingdom; 2000.
16. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550.
17. Sheth HB, Sporns P. Development of a single ELISA for detection of sulfonamides. J Agric Food Chem 1991; 39(9): 1696-700.
18. Korsrud GO, Papich MG, Fesser ACE, Salisbury CDC, Macneil JD. Laboratory testing of the charm test II receptor assays and the charm farm test with tissues and fluids from hogs fed sulfamethazine, chlortetracycline, and penicillin G. J Food Prot 1996; 59(2): 161-6.
19. Ito Y, Oka H, Ikai Y, Matsumoto H, Miyazaki Y, Nagase H. Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis: V. Simultaneous determination of sulphonamide antibacterials in animal liver and kidney using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. J Chromatogr A 2000; 898(1): 95-102.
20. Hela W, Brandtner M, Widek R, Schuh R. Determination of sulfonamides in animal tissues using cation exchange reversed phase sorbent for sample cleanup and HPLC-DAD for detection. J Food Chem 2003; 83(4): 601-08.
21. Salisbury CD, Sweet JC, Munro R. Determination of sulfonamide residues in the tissue of food animals using automated precolumn derivatization and liquid chromatography with fluorescence detection. J AOAC Int 2004; 87(5): 1264-8.

Development of Analytical Method for Sulfonamides residue in Animal tissues and Liver by HPLC Technique

Chalearmphorn Kuanha and Jitpaka Suntudrob

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT Sulfonamides (SAs) are antimicrobial drugs extensively prescribed for bacteriostatic infections in humans and animals and widely used in livestock production. Thus, any misuse or lack of adherence to withdrawal time may result in the presence of tissue residues. Drug residues in food products are of concern to consumers because they may compromise the human immune system causing an allergic reaction or contributing to the development of antibiotic-resistant pathogenic bacterial strains. The study for validation of an analytical method of 9 SAs including sulfadiazine (SDZ), sulfathiazole (STZ), sulfapyridine (SPY), sulfamerazine (SMR), sulfadimidine (SMZ), sulfamonomethoxine (SMMX), sulfisoxazole (SFI), sulfamethoxazole (SMX) and sulfaquinoxaline (SQ) in animal tissue and liver was conducted and developed by using pork as a representative matrix. This, SAs was extracted from sample with 80% ethanol and proceeded to specific of sulfonamides affinity column. SAs was detected and quantitatively determination by HPLC-UV detector. The method validation data were accepted and fitted-for-purpose. As a result of method validation, limit of detection was defined as 30 µg/kg and limit of quantitation was 50 µg/kg The linear working range was 50 – 500 µg/kg with the Pearson correlation of coefficient (r) more than 0.990. The accuracy and the precision as 2 levels by 10 duplicate analyst. Accuracy of the method was found to be in acceptable ranges of 61 – 106 and % precision shown is 2.5 – 15.0%. The results of participated in Proficiency Testing scheme performed by various PT providers were satisfying ($|z| < 2$). The performance of developed method for determination of 9 SAs residue in animal and product was found to be satisfactory to meet with legal requirement for quality in food industry. The survey research on Sulfonamides abuse from 368 samples of edible animal and product, sold in markets in Bangkok and private sector was conducted during 2011 – 2015. The results showed that 25 samples (6.5%) including sulfisoxazole sulfadiazine sulfathiazole sulfamethoxazole sulfadimidine and sulfaquinoxaline. The level found was from less than 50 to 1,027 µg/kg

Key words: Sulfonamides (SAs), animal tissue, liver, HPLC-UV

คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของ สมุนไพรงำแพงเจ็ดชั้น

ณัฐชา ตัวรัก และธงชาติ ทรัพย์จอมทอง

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง ตรัง 92000

บทคัดย่อ กำแพงเจ็ดชั้น (*Salacia chinensis* L.) เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้เป็นส่วนประกอบในสูตรตำรับยาแผนโบราณ มีสรรพคุณรักษาโรคหลายชนิด และใช้กันอย่างแพร่หลาย ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการควบคุมคุณภาพสมุนไพรดังกล่าว จึงเป็นที่มาของการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของกำแพงเจ็ดชั้น โดยเก็บตัวอย่างลำต้นกำแพงเจ็ดชั้นจากแหล่งธรรมชาติ ระหว่างปี พ.ศ. 2556 - 2557 จำนวน 16 ตัวอย่าง ทำการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ พบว่า ปริมาณความชื้น แอ้วรวม แอ้วที่ไม่ละลายกรด สารสกัดด้วยน้ำ และสารสกัดด้วยเอทานอลของกำแพงเจ็ดชั้น คิดเป็นร้อยละ 8.03 ± 0.72 , 3.27 ± 0.25 , 0.18 ± 0.05 , 5.62 ± 1.07 และ 6.28 ± 0.97 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และจากการศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมี ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี-ชนิดผิวนาง ของสารสกัดด้วยน้ำของกำแพงเจ็ดชั้น โดยใช้ส่วนผสมของ hexane และ ethyl acetate 20 : 80 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254, 366 นาโนเมตร และพ่นด้วย น้ำยาพ่น vanillin-sulfuric acid จะได้ลักษณะโครมาโตแกรมเฉพาะของสารสกัดด้วยน้ำของกำแพงเจ็ดชั้น ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีและควบคุมคุณภาพของสมุนไพรดังกล่าวต่อไป

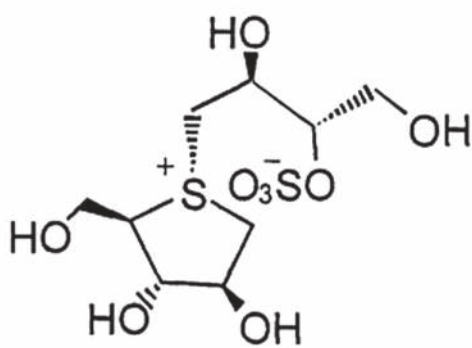
Accepted for publication, 19 April 2017

บทนำ

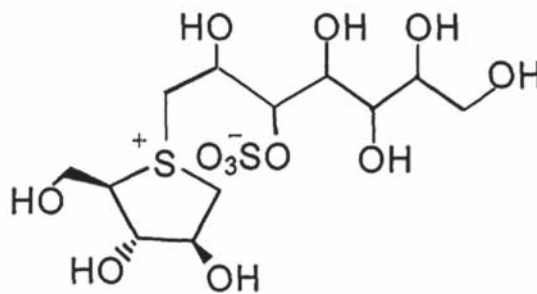
กำแพงเจ็ดชั้น มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Salacia chinensis* L. หรือมีชื่อเรียกอื่นว่า หลุมนก ตะลุ่มนก, ตาไก่, น้ำนอง, มะต๋อมไก่ เป็นพืชอยู่ในวงศ์ Celastraceae ลักษณะเป็นไม้เถาเนื้อแข็ง หรือไม้พุ่มรอเลื้อย สูง 2 - 6 เมตร เปลือกลำต้นเรียบสีเทานวล เนื้อไม้มีวงปีสีน้ำตาลแดงเข้มจำนวนหลายชั้นเห็นชัดเจน เรียงซ้อนกันเป็นชั้น 7 - 9 ชั้น ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปรี รูปไข่หรือรูปไข่กลับ ขอบใบหยัก ห่างๆ ดอกมีสีเขียวยอมเหลือง ออกเป็นช่อสั้นๆ ที่ซอกใบ ผล ทรงกลมหรือรี ผลสุกสีแดง หรือแดงอมส้ม พบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ตามป่าเบญจพรรณ ป่าชายหาด และป่าดิบริมแหล่งน้ำหรือที่โล่ง⁽¹⁾

สรรพคุณยาพื้นบ้านใช้ต้น ต้มน้ำดื่มหรือดองสุราแก้ปวดเมื่อย หรือเข้ายาระบาย (ผสมกับรากตูมกาขาว รากชะมวง และรากปอต้น) บำรุงโลหิต ฟอกโลหิต ขับระดูขาว รักษาโรคตับอักเสบ (ผสมกับเปลือกต้นมะตูม) แก้หืด (ผสมกับแก่นพลับพลึง แก่นโมกหลวง ต้นสบู่ขาว ต้นพลองเหมือด แก่นจำปา และต้นคำรอก) แก้เบาหวาน (ผสมกับรากทองพันชั่ง หัวข้าวเย็นเหนือ หัวข้าวเย็นใต้ หัวร้อยรู แก่นสัก และหญ้าชันกาดทั้งต้น) ราก รสเมา เปื้อนฝาด ต้มหรือดองสุราดื่ม ขับโลหิตระดู บำรุงโลหิต ขับพิษร้อนของโลหิต แก้ลมอัมพฤกษ์ รักษาโรคตา บำรุงน้ำเหลือง ใบ แก้มดกัด ขับระดู ดอก แก้บิดมูกเลือด แก่นและราก ต้มน้ำดื่มเป็นยาระบาย แก้เส้นเอ็นอักเสบ⁽¹⁾ นอกจากนี้เถากำแพงเจ็ดชั้นยังเป็นตัวยาในสูตรตำรับยาแผนโบราณ สำหรับรักษากลุ่มอาการทางสูติศาสตร์นรีเวชวิทยาในบัญชียาหลักแห่งชาติ ขอบ่งใช้ ขับน้ำคาวปลา บำรุงเลือด ช่วยให้มีดลูกเข้าอู่เร็วในหญิงหลังคลอด⁽²⁾

มีรายงานการวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกำแพงเจ็ดชั้น พบว่า มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ลดไขมันในเลือด และปกป้องเซลล์ตับจากสารพิษได้ องค์ประกอบทางเคมีที่พบในกำแพงเจ็ดชั้น เช่น สารกลุ่ม triterpenoids สารกลุ่ม sulfonium (salacinol, kotalanol)⁽¹⁾ (ภาพที่ 1) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีวิธีการควบคุมคุณภาพสมุนไพรดังกล่าว ในปัจจุบันผู้วิจัยจึงทำการศึกษาค้นสมบัติทางเคมีและกายภาพของกำแพงเจ็ดชั้นเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีและควบคุมคุณภาพของกำแพงเจ็ดชั้นต่อไป



Salacinol



Kotalanol

ภาพที่ 1 สารสำคัญที่พบในสมุนไพรกำแพงเจ็ดชั้น

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างสมุนไพร

กัมแพงเจ็ดชั้นที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นส่วนลำต้นซึ่งเก็บจากแหล่งธรรมชาติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น ร้อยเอ็ด มหาสารคาม สกลนคร มุกดาหาร นครพนม ยโสธร ชัยภูมิ บึงกาฬ และหนองคาย ระหว่างปี พ.ศ. 2555 – 2556 จำนวน 16 ตัวอย่าง ผ่านการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ วัตถุดิบสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ เตรียมโดยนำตัวอย่างส่วนลำต้นมาผึ่งลมให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปบดเป็นผงละเอียด ผ่านร่อนเบอร์ 80 และบรรจุในภาชนะที่ปิดสนิท

เครื่องมือและอุปกรณ์

แรงเบอร์ 80

เครื่องชั่งอย่างละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของบริษัท METTLER TOLEDO

เตาเผาอุณหภูมิสูง (Muffle furnace) Lenton

เตาอบร้อน (Hot Air Oven) WTB Binder รุ่น FD - 53

เครื่องเขย่า ORBITAL SHAKER MODEL: S - 101

TLC plate Silica gel 60 F254 ความหนา 0.25 มิลลิเมตร ของบริษัท Merck

สารมาตรฐานและสารเคมี

Absolute ethanol (AR grade) ของบริษัท Merck

Chloroform (AR grade) ของบริษัท Merck

Dichloromethane (AR grade) ของบริษัท Merck

Hydrochloric acid, 37%w/v (AR grade) ของบริษัท Merck

Methanol (AR grade) ของบริษัท Merck

Hexane (AR grade) ของบริษัท Merck

Sulfuric acid (AR grade) ของบริษัท Merck

Vanillin (AR grade) ของบริษัท Merck

น้ำที่ต้มด้วยคลอโรฟอร์ม เตรียมโดยเติมคลอโรฟอร์ม 2.5 มิลลิลิตร ในน้ำ 900 มิลลิลิตร เขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ

ดำเนินการโดยมีขั้นตอนต่อไปนี้

1. การหาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ

เตรียมผงสมุนไพรกัมแพงเจ็ดชั้น 5 กรัม หมักด้วยน้ำที่ต้มด้วยคลอโรฟอร์ม จำนวน 100 มิลลิลิตร ในขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิทเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดย 6 ชั่วโมงแรกให้เขย่าขวดโดยใช้เครื่องเขย่า ตั้งทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง จากนั้นกรองอย่างรวดเร็ว นำสารละลายที่กรองได้จำนวน 20 มิลลิลิตร ใส่ในถ้วยปากกว้างที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไประเหยแห้งบนอ่างอังไอน้ำ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยน้ำที่ได้⁽³⁾

2. การหาปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล

ดำเนินการเช่นเดียวกับการหาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ แต่ใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 และคำนวณค่าร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลที่ได้⁽³⁾

3. การหาปริมาณเอทานอล

ดำเนินการตามวิธีการที่ระบุไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย⁽³⁾ โดยชั่งผงสมุนไพรจำนวน 2 กรัม ใส่ลงในถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักคงที่ แล้วนำไปเผาในเตาเผา อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จนได้เอทานอลจากสีดำ ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) ณ อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่งน้ำหนักคงที่ บันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ คำนวณหาร้อยละของปริมาณเอทานอล

4. การหาปริมาณเอทานอลที่ไม่ละลายในกรด

ดำเนินการตามวิธีที่กำหนดไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย⁽³⁾ โดยนำเอทานอลในถ้วยกระเบื้องมาเติมกรดเกลือ 25 มิลลิลิตร นำไปต้มบนเตาไฟฟ้า เป็นเวลา 5 นาที กรองด้วยกระดาษกรองชนิดปราศจากเถ้า ล้างถ้วยกระเบื้องและกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่นร้อน จนกว่าน้ำล้างเปลี่ยนจากกรดเป็นกลาง จากนั้นนำกระดาษกรองใส่ในถ้วยกระเบื้องใบเดิมแล้วทำให้แห้งบนเตาไฟฟ้า และนำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ณ อุณหภูมิห้อง นำไปชั่งน้ำหนัก จนน้ำหนักคงที่ บันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ คำนวณร้อยละของปริมาณเอทานอลที่ไม่ละลายในกรด

5. การหาปริมาณความชื้น

ดำเนินการตามวิธีที่กำหนดไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย⁽⁴⁾ โดยชั่งผงสมุนไพร จำนวน 5 กรัม บรรจุลงในขวดซึ่งที่ทราบน้ำหนักคงที่ นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก นำไปอบอีกครั้ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น นำไปชั่งน้ำหนักอีกครั้ง และบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ นำไปอบซ้ำ แล้วชั่งน้ำหนัก จนได้น้ำหนักที่คงที่ โดยให้น้ำหนักที่ได้มีค่าต่างกันไม่เกิน 12.5 มิลลิกรัม แล้วคำนวณหาร้อยละของปริมาณความชื้นในสมุนไพร

การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดผิบบาง (Thin Layer Chromatography)

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง นำผงสมุนไพรกำแพงเจ็ดชั้น ทั้ง 16 ตัวอย่าง มาแยกชั่งน้ำหนัก ตัวอย่างละ 1 กรัม เติมน้ำที่ต้มด้วยคลอโรฟอร์ม จำนวน 20 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และตั้งทิ้งไว้จนครบ 24 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรอง ระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ละลายสารสกัดที่ได้ด้วยเมทานอล 1 มิลลิลิตร

การเตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ (developing solvent) ผสม hexane และ ethyl acetate ในอัตราส่วน 20 : 80 ให้เข้ากัน นำสารละลายมาใส่ในถังทำโครมาโตกราฟี แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง

การเตรียมน้ำยาพ่น vanillin-sulfuric acid โดยนำ vanillin จำนวน 1 กรัม ละลายใน sulfuric acid ความเข้มข้น 2 N จำนวน 100 มิลลิลิตร

วิธีการ นำสารละลายตัวอย่าง ทั้ง 16 ตัวอย่าง ชนิดละ 10 ไมโครลิตร มาหยดบนแผ่น TLC ในแนวระนาบเดียวกัน โดยให้ห่างจากขอบล่าง 1 เซนติเมตร และให้มีระยะห่างระหว่างแถบสารแต่ละชนิด 1 เซนติเมตร ผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปวางในถังทำโครมาโตกราฟีที่อิ่มตัวด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยให้วัฏภาคเคลื่อนที่ เคลื่อนที่ไป 10 เซนติเมตร แล้วนำแผ่น TLC ออกมาผึ่งไว้ให้แห้ง นำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร สังเกตผล แล้วนำมาพ่นด้วยน้ำยาพ่น vanillin-sulfuric acid ให้ความร้อนที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที สังเกตสี บันทึกผล และบันทึกภาพเก็บไว้

ผล

จากการศึกษาปริมาณความชื้น เถ้ารวม เถ้าที่ไม่ละลายกรด สารสกัดด้วยน้ำ และสารสกัดด้วยเอทานอล ของก้ำแพงเจ็ดชั้น ทั้ง 16 ตัวอย่าง มีค่าเฉลี่ยร้อยละ 8.03 ± 0.72 , 3.27 ± 0.25 , 0.18 ± 0.05 , 5.62 ± 1.07 และ 6.28 ± 0.97 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และพบว่าตัวอย่างก้ำแพงเจ็ดชั้นที่เก็บจากจังหวัดนครพนมมีปริมาณ สารสกัดสูงสุด (ตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2)

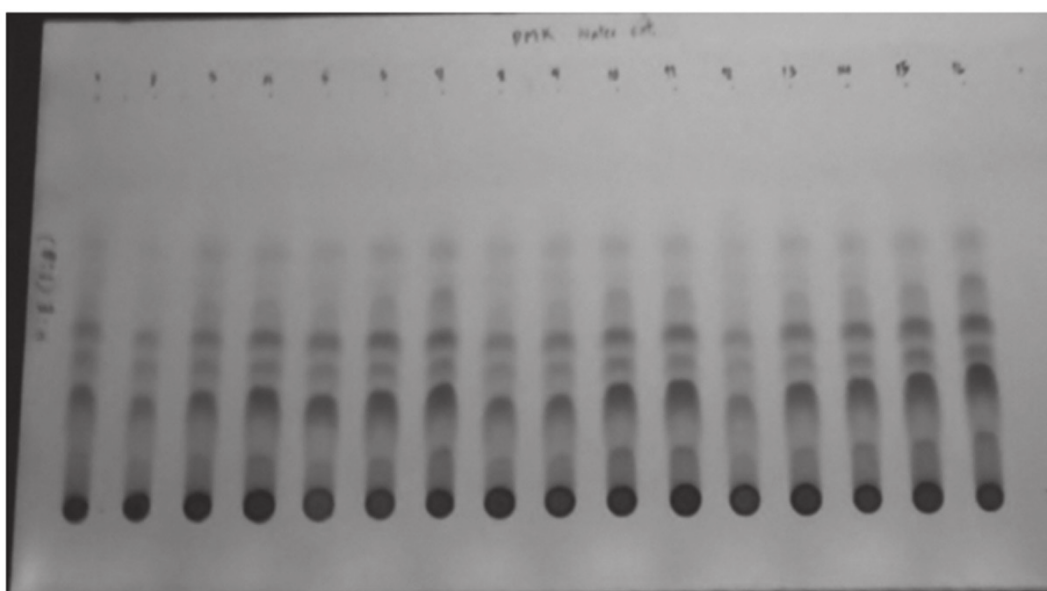
ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของก้ำแพงเจ็ดชั้น ทั้ง 16 ตัวอย่าง

สารมาตรฐาน	ปริมาณ ความชื้น (% w/w)	ปริมาณ เถ้ารวม (% w/w)	ปริมาณเถ้า ไม่ละลายกรด (% w/w)	ปริมาณสารสกัด ด้วยน้ำ (% w/w)	ปริมาณสารสกัด ด้วยเอทานอล (% w/w)
อ.น้ำพอง จ.ขอนแก่น	7.78	3.51	0.16	6.52	7.51
อ.บ้านฝาง จ.ขอนแก่น	7.78	3.42	0.18	6.51	7.72
อ.ชุมแพ จ.ขอนแก่น	outlier	3.08	0.18	6.60	6.11
อ.วาปีปทุม จ.ร้อยเอ็ด	9.13	2.75	0.20	3.84	5.57
อ.ปทุมรัตน์ จ.ร้อยเอ็ด	7.81	2.95	0.18	5.05	4.83
อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม	6.92	3.43	0.20	4.72	4.72
อ.วไลยบุรี จ.มหาสารคาม	7.32	3.48	0.26	5.22	5.29
อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม	6.90	3.32	0.13	6.35	6.57
อ.ภูพาน 1 จ.สกลนคร	8.56	3.22	0.15	6.50	6.32
อ.ภูพาน 2 จ.สกลนคร	8.29	3.26	0.19	4.71	5.63
จ.มุกดาหาร	8.76	2.97	0.27	4.60	6.06
อ.เมือง จ.นครพนม	7.49	3.58	0.08	7.98	7.64
อ.กุด้ชุม จ.ยโสธร	9.01	3.02	0.14	5.62	6.49
อ.คอนสาร จ.ชัยภูมิ	8.42	3.49	0.14	6.09	7.59
อ.บึงคล้า จ.บึงกาฬ	8.23	3.52	0.27	4.84	6.65
จ.หนองคาย	8.03	3.37	0.17	4.82	5.79
ค่าเฉลี่ย	8.03	3.27	0.18	5.62	6.28
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.72	0.25	0.05	1.07	0.97

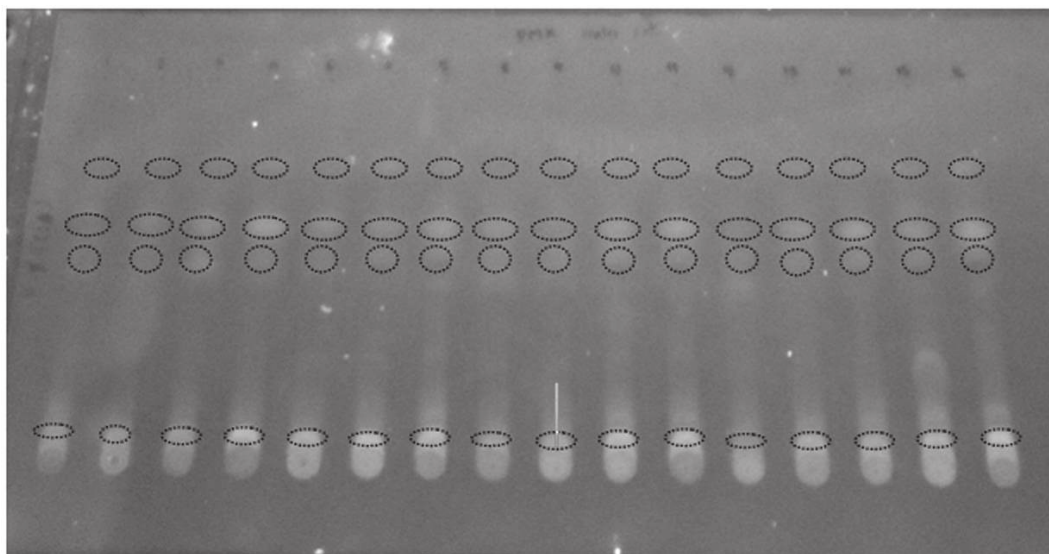
ตารางที่ 2 ผลการประเมินข้อกำหนดทางเคมีและกายภาพของกำแพงเจ็ดชั้น

รายการทดสอบ (หน่วย)	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 16)	เกณฑ์กำหนด ค่าบน ($\bar{x} + SD\%$)	เกณฑ์กำหนด ค่าล่าง ($\bar{x} - SD\%$)
ปริมาณความชื้น (%w/w)	8.03 $\pm$ 0.722	8.75	-
ปริมาณเถ้ารวม (%w/w)	3.27 $\pm$ 0.25	3.52	-
ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (%w/w)	0.18 $\pm$ 0.05	0.23	-
ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (%w/w)	5.62 $\pm$ 1.07	-	4.55
ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 (%w/w)	6.28 $\pm$ 0.97	-	5.31

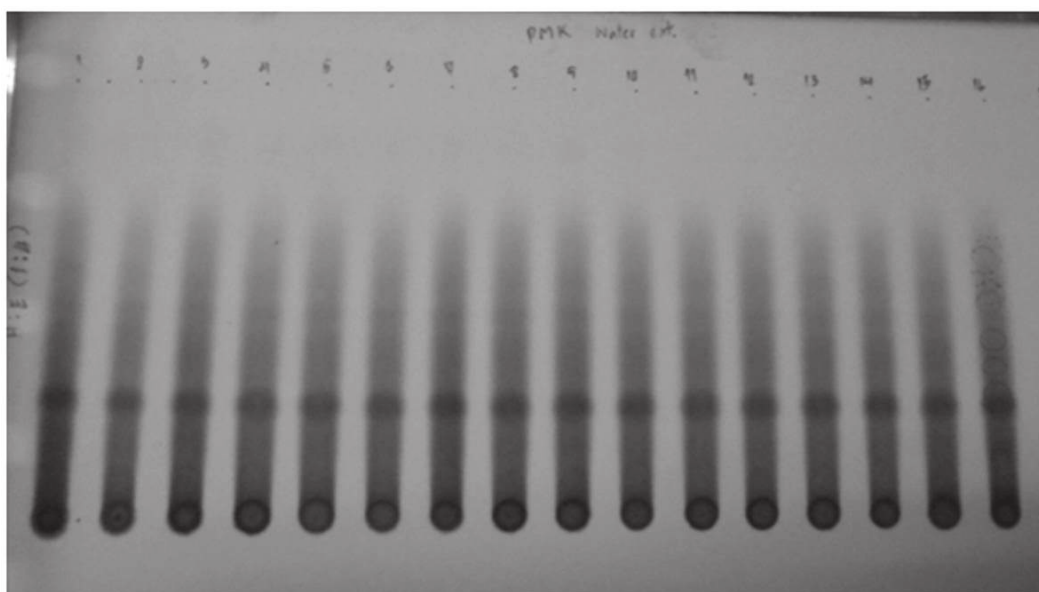
จากการศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดผิวบางของสารสกัดด้วยน้ำของกำแพงเจ็ดชั้น ทั้ง 16 ตัวอย่างโดยใช้ส่วนผสมของ hexane และ ethyl acetate 20 : 80 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ สามารถแยกสารออกจากกันได้ดี เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร แสดงแถบของสาร 6 แถบ และ 4 แถบ ตามลำดับ และเมื่อพ่นด้วยน้ำยาพ่น vanillin-sulfuric acid แล้วให้ความร้อนที่ 110 องศาเซลเซียส จะให้แถบสารสีน้ำเงิน 3 แถบ โดยทุกตัวอย่างให้ผลโครมาโตแกรมที่เหมือนกัน (ภาพที่ 2, 3, 4 และตารางที่ 3)



ภาพที่ 2 ที่แอลซีโครมาโตแกรมของสารสกัดน้ำของกำแพงเจ็ดชั้น ทั้ง 16 แหล่ง เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็น hexane: ethyl acetate (20 : 80) ตรวจสอบภายใต้ UV 254 nm



ภาพที่ 3 ที่แอลซีโครมาโตแกรมของสารสกัดน้ำของก้ามแงเจ็ดชั้น ทั้ง 16 แหล่ง เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น hexane: ethyl acetate (20 : 80) ตรวจสอบภายใต้ UV 366 nm



ภาพที่ 4 ที่แอลซีโครมาโตแกรมของสารสกัดน้ำของก้ามแงเจ็ดชั้น ทั้ง 16 แหล่ง เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น hexane: ethyl acetate (20 : 80) ตรวจสอบด้วยน้ำยาพ่น vanillin-sulfuric acid แล้วให้ความร้อนที่ 110 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3 ค่า hR_f และผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีทั่วไปในสารสกัดด้วยน้ำของกำแพงเจ็ดชั้น

จุด	ค่า hR_f	การตรวจสอบ		
		แสงยูวี 254 นาโนเมตร	แสงยูวี 366 นาโนเมตร	น้ำยาพ่น vanillin-sulfuric acid
1	9 - 11	ทึบแสง	เหลือง	-
2	24 - 26	ทึบแสง	-	น้ำเงิน
3	34 - 36	ทึบแสง	-	-
4	41 - 43	ทึบแสง	-	น้ำเงิน
5	48 - 50	ทึบแสง	-	น้ำเงิน
6	55 - 56	-	ฟ้า	-
7	62 - 63	ทึบแสง	เขียว - ฟ้า	-
8	80 - 81	-	ฟ้า	-

วิจารณ์

จากการศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีของตัวอย่างส่วนลำต้นของกำแพงเจ็ดชั้น ทั้ง 16 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บจากแหล่งธรรมชาติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่า เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นส่วนผสมของ hexane และ ethyl acetate อัตราส่วน 20 : 80 สามารถแยกสารออกจากกันได้ดี เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ให้ผล quenching ประกอบด้วยแถบสาร 6 แถบ เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร ให้ผลเรืองแสงสีเหลือง สีเขียว - ฟ้า ประกอบด้วยแถบสาร 4 แถบ และเมื่อพ่นด้วยน้ำยาพ่น vanillin - sulfuric acid แล้วให้ความร้อนที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ให้แถบสารสีน้ำเงิน 3 แถบ โดยทุกตัวอย่างให้ผลโครมาโตแกรมที่เหมือนกัน จึงได้ลักษณะโครมาโตแกรมเฉพาะของสารสกัดด้วยน้ำของกำแพงเจ็ดชั้น

ในการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกหรือตำรายา⁽⁵⁾ ครอบคลุมโดยการพิสูจน์เอกลักษณ์ การตรวจสอบปริมาณสารสำคัญ และการตรวจสอบคุณภาพทั่วไป ได้แก่ ปริมาณสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายกรด และปริมาณความชื้น หรือค่าอื่น ๆ ตามคุณสมบัติของสารเคมีในสมุนไพรแต่ละชนิด ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ตรวจสอบคุณภาพทั่วไปตามเกณฑ์ การหาปริมาณความชื้นในสมุนไพรมีความสำคัญต่อคุณภาพของสมุนไพร เนื่องจากความชื้นสูงจะทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์หรือเชื้อราได้ง่าย และอาจทำให้สารสำคัญเสื่อมคุณภาพ สำหรับปริมาณเถ้าและเถ้าที่ไม่ละลายในกรด เป็นค่าที่บอกการปนเปื้อนทางกายภาพ เช่น ทรายที่ปนเปื้อนมากับสมุนไพร ซึ่งจะมีผลทำให้คุณภาพทางเคมีต่ำลง เมื่อนำไปเตรียมสารสกัดทำให้ได้ปริมาณสารสำคัญต่ำลง ส่วนปริมาณสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เป็นตัวที่บ่งบอกคุณภาพของสารสำคัญในสมุนไพรที่ยังไม่มีวิธีวิเคราะห์สารสำคัญที่เหมาะสม ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้เลือกใช้น้ำและเอทานอลร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลายในการหาปริมาณสารสกัดดังกล่าว จากการศึกษา พบว่า ปริมาณสารสกัดด้วยตัวทำละลายของตัวอย่างแต่ละแหล่ง มีความแตกต่างกัน อาจเป็นปัจจัยจากแหล่งตัวอย่าง ฤดูกาลเก็บเกี่ยว หรืออายุของพืช ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป

สรุป

วิธีการควบคุมคุณภาพสมุนไพรกำแพงเจ็ดชั้น สามารถดำเนินการโดยวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ อาทิ ปริมาณความชื้น เถ้ารวม เถ้าที่ไม่ละลายในกรด สารสกัดด้วยน้ำ และสารสกัดด้วยเอทานอล โดยกำหนดเกณฑ์ที่แน่นอน ส่วนการหาเอกลักษณ์ทางเคมีสามารถใช้วิธีโครมาโตกราฟีชนิดผิบบางในการวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้ ทำให้ได้ข้อกำหนดคุณภาพทางเคมีของกำแพงเจ็ดชั้น เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ชยันต์ พิเชียรสุนทร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์เก็บตัวอย่างสมุนไพร และตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของสมุนไพร สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เตรียมตัวอย่างผงสมุนไพร คณะที่ปรึกษาโครงการวิจัยการพัฒนาศักยภาพของสมุนไพรที่มีใช้ในท้องถิ่น และสำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่สนับสนุนงบประมาณ และให้คำปรึกษาการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. กำแพงเจ็ดชั้น. [ออนไลน์]. 2553; [สืบค้น 3 ก.ค. 2558] เข้าถึงได้ที่: URL: <http://phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=4>.
2. บัญชียาหลักแห่งชาติ. บัญชียาจากสมุนไพร. [ออนไลน์]. 2556; [สืบค้น 3 ก.ค. 2558] เข้าถึงได้ที่: URL: <http://drug.fda.moph.go.th:81/nlem.in.th/medicine/herbal/list/636>.
3. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thai Herbal Pharmacopoeia Vol. II. 2nd ed. Appendices 7.6 Acid-insoluble ash, 7.7 Total ash and 7.12 Extractives. Bangkok: Prachachon; 2000. p. 108, 141.
4. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thai Herbal Pharmacopoeia Vol. II. 2nd ed. Appendices 4.15 Loss on drying. Bangkok: Prachachon; 1998. p. 123-4.
5. World Health Organization. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva: WHO; 1998.

Physicochemical Quality of *Salacia chinensis* Linn.

Natthacha Duangrak and Thongchat Supjomthong

Regional Medical Sciences Center, 12/1 Trang, Department of Medical Sciences, Amphoe Muang, Trang 92000, Thailand.

ABSTRACT **Khampang Jedchan** or *Salacia chinensis* L., family Celastraceae has been widely used in Thai traditional medicine for treatment of hepatitis, muscle relaxant, blood tonic, asthma and diabetes. It is also included in the National Essential Drugs for treatment of amniotic fluid drive, blood tonic and help the uterus in women soon after birth. At present there is no standard specification in Thai Herbal Pharmacopoeia yet. In 2013 – 2014, sixteen samples of stem of *Salacia chinensis* L. were collected from natural resources in the North East of Thailand were studied for physico-chemical properties. It was found that the contents of moisture, total ash, acid-insoluble ash, water-soluble extractive and ethanol-soluble extractive were 8.03 ± 0.72 , 3.27 ± 0.25 , 0.18 ± 0.05 , 5.62 ± 1.07 and $6.28 \pm 0.97\%$ w/w respectively. The chemical identification of the water extract was carried out by Thin Layer Chromatography, using TLC plate silica gel 60 F254 and mixture of hexane-ethyl acetate 20 : 80 as the mobile phase. The plate was examined under ultraviolet light 254 and 366 nm, then sprayed with vanillin-sulfuric acid, and heated at 110°C for 5 minutes. The results of this study can be used to set up the chemical specifications of Khampang Jedchan which will be useful for quality control of this crude drug.

Key words: *Salacia chinensis*, Physicochemical quality

คุณลักษณะของไกลแคนในยาโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่จำหน่ายในประเทศไทย

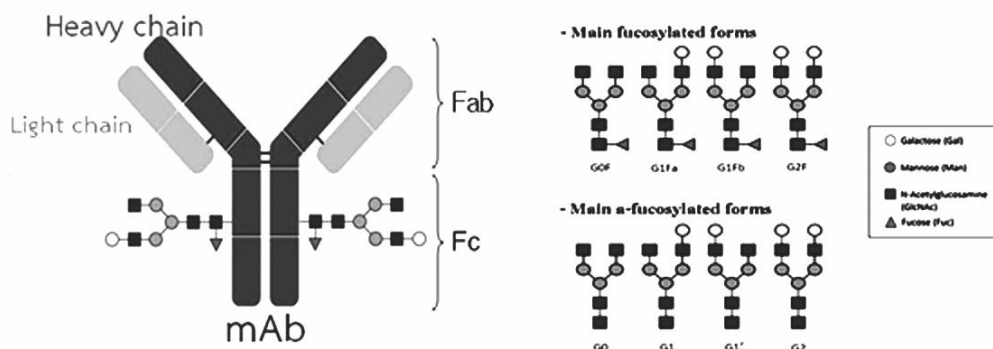
วิษชุดา จริยะพันธุ์, ฐิตาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์ และสายวรุฬ จตุรภิตตินันท์
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การวิเคราะห์คุณลักษณะของโครงสร้างและองค์ประกอบของไกลแคนของยาชีววัตถุเพื่อการรักษาชนิดโมโนโคลนอลแอนติบอดี (mAb) เป็นสิ่งสำคัญในการพัฒนาการผลิตและควบคุมคุณภาพยา หากผู้ผลิตไม่สามารถควบคุมการผลิตให้สม่ำเสมอ มีโอกาสที่จะได้ไกลแคนที่มีหมู่น้ำตาลแตกต่างกัน ซึ่งอาจเปลี่ยนแปลงคุณภาพของยาและมีผลกระทบต่อความปลอดภัยและประสิทธิผลในการรักษาโรค ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาคุณลักษณะและองค์ประกอบของไกลแคนที่ประกอบในโมเลกุลของยา mAb ที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทยในระหว่างปี 2557 - 2559 จำนวน 12 ชนิด โดยวิธี Capillary Electrophoresis แบบ Laser Induced Fluorescence (CE-LIF) การตรวจวัดสารเรืองแสงด้วย 9-aminopyrene-1, 4, 6-trisulfonic acid บนไกลแคนที่ตัดออกจากโมเลกุลของ mAb ด้วยเอนไซม์ PNGase F ได้ผลตรงตามสารมาตรฐานของ mAb ชนิดนั้นๆ และสารมาตรฐาน USP มีไกลแคนหลัก 4 แบบ คือ ชนิด GoF, G1Fa, G1Fb และ G2F ซึ่งเป็นไปตามที่จัดแจ้งไว้ในการขึ้นทะเบียน โดย GoF มีปริมาณมากที่สุดในช่วงร้อยละ 39.30 - 85.29 และเวลาที่ตรวจสอบได้จาก CE เป็นช่วงเวลาที่ 9.41 - 9.65

Accepted for publication, 22 June 2017

บทนำ

ยาชีววัตถุเพื่อการรักษา (biotherapeutic products: BTP) ชนิดโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพ (recombinant monoclonal antibody: mAb) มีความสำคัญในการนำมารักษาโรค⁽¹⁾ เช่น โรคมะเร็ง โรคภูมิคุ้มกันตนเอง โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ เป็นต้น mAb เป็นอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin: Ig) ที่เป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ผลิตจากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงมีการเติมน้ำตาลเรียกว่าไกลแคน (glycan)⁽²⁾ ในตำแหน่งไนโตรเจนของกรดอะมิโนแอสพาราจีน (N-linked glycosylation) ในส่วน Fc ของโมเลกุล Ig บนสายโปรตีน จากชนิดของน้ำตาลที่ประกอบอยู่ทำให้ได้ไกลแคนหลายรูปแบบ (glycoforms) ซึ่งชนิดที่ปรากฏในยา mAb เป็นแบบที่มีน้ำตาลต่อเป็น 2 สาย (complex biantennary glycan) มีน้ำตาลประกอบ 7 ตัว (ภาพที่ 1) คือ แมนโนส และ N-acetylglucosamine (GlcAc) และไม่มีน้ำตาลฟิวโคส (α-fucosylated forms) เรียกเป็น GO และอาจพบไกลแคนรูปแบบอื่น คือ มีการเติมน้ำตาลกาแล็กโตสเข้าที่สายใดสายหนึ่งของไกลแคน เรียกเป็น G1 หรือ G1' หากมีการเติมทั้ง 2 สายเรียกเป็น G2 ขณะเดียวกันอาจมีการเติมน้ำตาลฟิวโคส (fucosylated forms) บนโมเลกุลน้ำตาล GlcAc จะเรียกเป็น GoF, G1Fa, G1Fb และ G2F



ภาพที่ 1 โครงสร้าง mAb แสดงส่วน Fc ที่มีไกลแคนประกอบ และแสดงรูปแบบไกลแคนที่พบในยา mAb

จากกระบวนการผลิตที่ซับซ้อนการสร้างไกลแคนของเซลล์ไม่มีรูปแบบที่ชัดเจนเนื่องจากไม่ได้ถูกกำหนดโดยสารพันธุกรรมแต่ควบคุมจากกระบวนการผลิตและสภาวะการเลี้ยงเซลล์^(3,4) และเซลล์แต่ละชนิดมีความสามารถที่จะผลิตโปรตีนจำนวนมากให้มียอดประกอบไกลแคนแตกต่างกัน หากไม่สามารถควบคุมการผลิตให้สม่ำเสมอมีโอกาสสูงที่จะได้ไกลแคนที่มีหม่อน้ำตาลแตกต่างไปหลายรูปแบบ (glycoforms) ซึ่งส่วน Fc นี้มีบทบาทสำคัญต่อการออกฤทธิ์ผ่านกลไก antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) และ complement-dependent cytotoxicity (CDC) เพื่อทำลายเซลล์เป้าหมาย⁽⁵⁾ ความแตกต่างของโครงสร้างน้ำตาลเพียงเล็กน้อยบน Fc อาจเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา ความปลอดภัยและประสิทธิภาพของยาได้ เช่น อาจทำให้มีความแรงต่างไปจากเดิมและอาจมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน⁽⁶⁾ (immunogenicity) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ไม่ต้องการในยารักษาโรคชนิดนี้

การวิเคราะห์คุณลักษณะของโครงสร้างและองค์ประกอบของไกลแคนของยา mAb เป็นส่วนสำคัญในการพัฒนาและควบคุมคุณภาพยา ซึ่ง glycoform profile เป็น critical quality attributes⁽²⁾ (CQA) ของการผลิต mAb จึงต้องมีความสม่ำเสมอของคุณภาพจากการผลิตยาที่ดีจากโรงงาน ดังนั้น ต้องมีวิธีตรวจสอบไกลแคนที่เหมาะสม เพื่อให้มั่นใจถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัย มีข้อกำหนดที่ชัดเจนตามที่ภาครัฐกำหนด นอกจากนี้ ลิขสิทธิ์ของยา mAb ต้นแบบ (originator/inventor) เริ่มหมดลงจึงเริ่มมีการพัฒนาผลิตยาคัลลีย (biosimilars) ที่มีกระบวนการผลิตไม่เหมือนกับการผลิตยาต้นแบบ (originator/inventor) ทั้งหมด^(7,8) เช่น

ชนิดของเซลล์สำหรับการผลิต mAb และสภาวะการเลี้ยงเซลล์อาจแตกต่างกัน รวมทั้งขนาดของกำลังการผลิตที่แตกต่างกัน ในการควบคุมกำกับคุณภาพของยาที่จำหน่าย ภาครัฐต้องสามารถตรวจเพื่อเปรียบเทียบไกลแคนของยาล้างคลึงกับยาต้นแบบและการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับหมู่น้ำตาลได้^(9,10) ซึ่งวิธีต่างๆ สำหรับการตรวจวิเคราะห์คุณลักษณะของ mAb ซึ่งเป็นยากลุ่ม recombinant DNA-derived products มีแนะนำไว้ในตำรายา เช่น ตำรายาของสหรัฐอเมริกา⁽¹¹⁾

โดยทั่วไปผู้ผลิตจะแสดงรายละเอียดคุณลักษณะของไกลแคนไว้แล้วในขั้นตอนการวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลของตัวยาสสำคัญ (drug substance) และไม่ตรวจซ้ำในยาสำเร็จรูปจึงไม่มีข้อมูลไกลแคนของยาที่ได้ขึ้นทะเบียนแล้วและจำหน่ายในประเทศ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาคุณลักษณะของไกลแคน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของไกลแคนที่ประกอบในโมเลกุลของยา mAb สำเร็จรูปที่ขึ้นทะเบียนและจำหน่ายในประเทศไทยโดยวิธี Capillary Electrophoresis แบบ Laser Induced Fluorescence^(12,13) (CE-LIF) เพื่อให้ได้ข้อมูลไกลแคนของยาที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทย และเป็นฐานข้อมูลด้านคุณภาพของยาเพื่อการเฝ้าระวังหลังจำหน่ายและใช้ประกอบการพิจารณาความคล้ายคลึงในการขึ้นทะเบียนยาล้างคลึงต่อไป

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง Capillary electrophoresis รุ่น PA 800 plus system ยี่ห้อ Pharmaceutical Analysis System (Beckman Coulter, USA) ประกอบด้วยชุดคอมพิวเตอร์ ท่อแคปิลลารีแบบ N-CHO Coated ขนาด 50 μm i.d. $\times$ 60 cm เครื่องตรวจจับฟลูออเรสเซนซ์ด้วยเลเซอร์ ชนิด Ar และโปรแกรมประมวลผล 32 Karat Software version 9.1 patch และ PA 800 plus Software version 1.1 patch, heat box, water bath, micro-centrifuge, microcon 10 kDa, centrifugal evaporator

น้ำยาและสารเคมี

ชุดน้ำยา Carbohydrate Labeling & Analysis Kit (Beckman # 477600), HPLC water, ชุดน้ำยาเอนไซม์ N-glycosidase F (PNGase F) (New England Biolabs # P0704S), Sodium Cyanoborohydride

สารมาตรฐานไกลแคนและสารมาตรฐานสำหรับ CE-LIF

Glucose Ladder Standard (G20), Maltose Quantitative Control/Mobility Marker (1 nmol/ μl) (G22), สารมาตรฐาน USP Oligosaccharide System Suitability Mixture A

ตัวอย่างและสารมาตรฐาน mAb

ตัวอย่างยา BTP ชนิด mAb ที่จำหน่ายในประเทศไทยจำนวน 12 ยี่ห้อ (Brand) คือ mAb ชนิด 1 - 12 และสารมาตรฐานตามชนิดของตัวอย่าง จำนวน 12 ชนิด โดยมีชนิด mAb - 1 เป็นยาชีววัตถุคล้ายคลึงของ mAb - 2

วิธีการ

ตรวจวิเคราะห์ชนิดของไกลแคนที่ประกอบในโมเลกุลของตัวอย่างยา BTP ชนิด mAb ด้วยเทคนิค CE-LIF โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 6 ซ้ำ

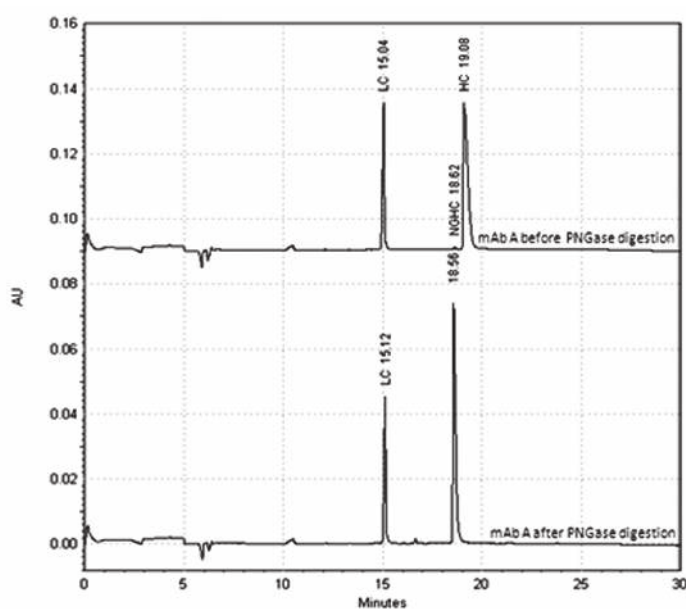
เทคนิค CE-LIF ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน⁽⁸⁾ คือ การตัดไกลแคนออกจากโมเลกุลของ mAb ด้วยเอนไซม์ PNGase F และนำไกลแคนส่วนที่ได้มาติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์ และวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ไกลแคนและสารมาตรฐานของ mAb ชนิดนั้นๆ โดยมีรายละเอียดของแต่ละขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การตัดหมู่ น้ำตาลออกจากโปรตีนด้วยเอนไซม์ เตรียมตัวอย่างโดยการกำจัดเกลือออกโดยเติมน้ำในตัวอย่างปริมาณ 300 µg ให้ครบ 500 µl ใส่ใน microcon filter device นำไปปั่นที่ 11,000 rpm นาน 30 นาที เติม 1X Glyco buffer ปริมาตร 45 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นคว่ำลงใน tube ใหม่ ไปปั่นที่ 2,000 rpm นาน 2 นาที แล้วเติม Glycoprotein Denaturing Buffer ปริมาตร 1.0 µl อุณหภูมิ 100°C นาน 3 นาที ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วเติม Nonidet® NP40 ปริมาตร 5 µl และ diluted 1 : 50 PNGase F enzyme (60U) ปริมาตร 6 µl นำไปอุ่นที่ 37°C นาน 15 - 18 ชั่วโมง จากนั้นเติม 150 µl ethanol ที่แช่เย็นผสมให้เข้ากันแล้ววางบนน้ำแข็งนาน 15 นาที นำไปปั่นที่ 10,000 rpm นาน 15 นาที และดูดส่วนใสลงใน microtube นำไปทำให้แห้งด้วย centrifugal evaporator ที่ 45°C นาน 90 นาที

ขั้นตอนที่ 2 การติดฉลากด้วย APTS นำสารที่ทำแห้งด้วย centrifugal evaporator มาเติม 1 M sodium cyanoborohydride/THF ปริมาตร 2 µl และ APTS Labeling Reagent ปริมาตร 2 µl นำไปอุ่นที่ 55°C นาน 90 นาที เติม HPLC water ปริมาตร 46 µl แล้วปิเปตปริมาตร 5 µl ผสมกับ HPLC water 195 µl ให้เข้ากัน นำไปวิเคราะห์ด้วย CE-LIF ซึ่งเตรียมท่อแคปิลลารีโดยการล้างด้วย Gel buffer นาน 3 นาที จึงฉีดตัวอย่างโดยใช้ความดัน 5.0 psi นาน 3 วินาที ใช้กระแสไฟ 30.0 kV นาน 20 นาที สารจะเคลื่อนที่แยกจากกันผ่านตัวตรวจวัด

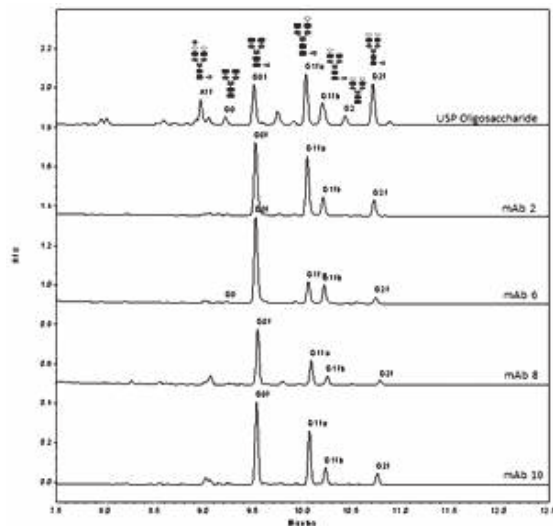
ผล

เมื่อใช้เอนไซม์ PNGase F ตัดหมู่ น้ำตาลออกจากสายโปรตีนและตรวจสอบการตัดด้วย CE - SDS แบบ reducing condition ได้พีคของ heavy chain ที่ไม่มีหมู่ น้ำตาล (non-glycosylated heavy chain: NGHC) อยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกับพีค heavy chain เดิม ในลักษณะที่เคลื่อนออกมาก่อนมี migration time (MT) ที่ 18.56 นาที และไม่ปรากฏพีคของ heavy chain ซึ่งเดิมมี MT ที่ 19.08 นาทีอีก (ภาพที่ 2)



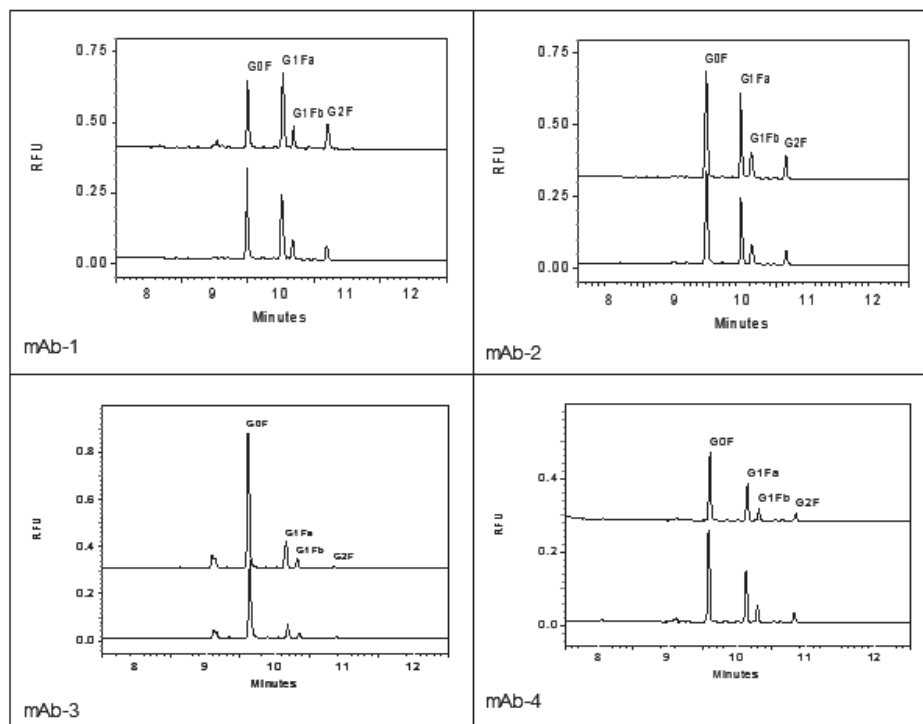
ภาพที่ 2 พีคของ mAb A ที่วิเคราะห์ด้วย CE-SDS แบบ reducing (บน) ก่อนการตัดด้วยเอนไซม์ PNGase F ปรากฏพีค NGHC (ล่าง) หลังการตัด

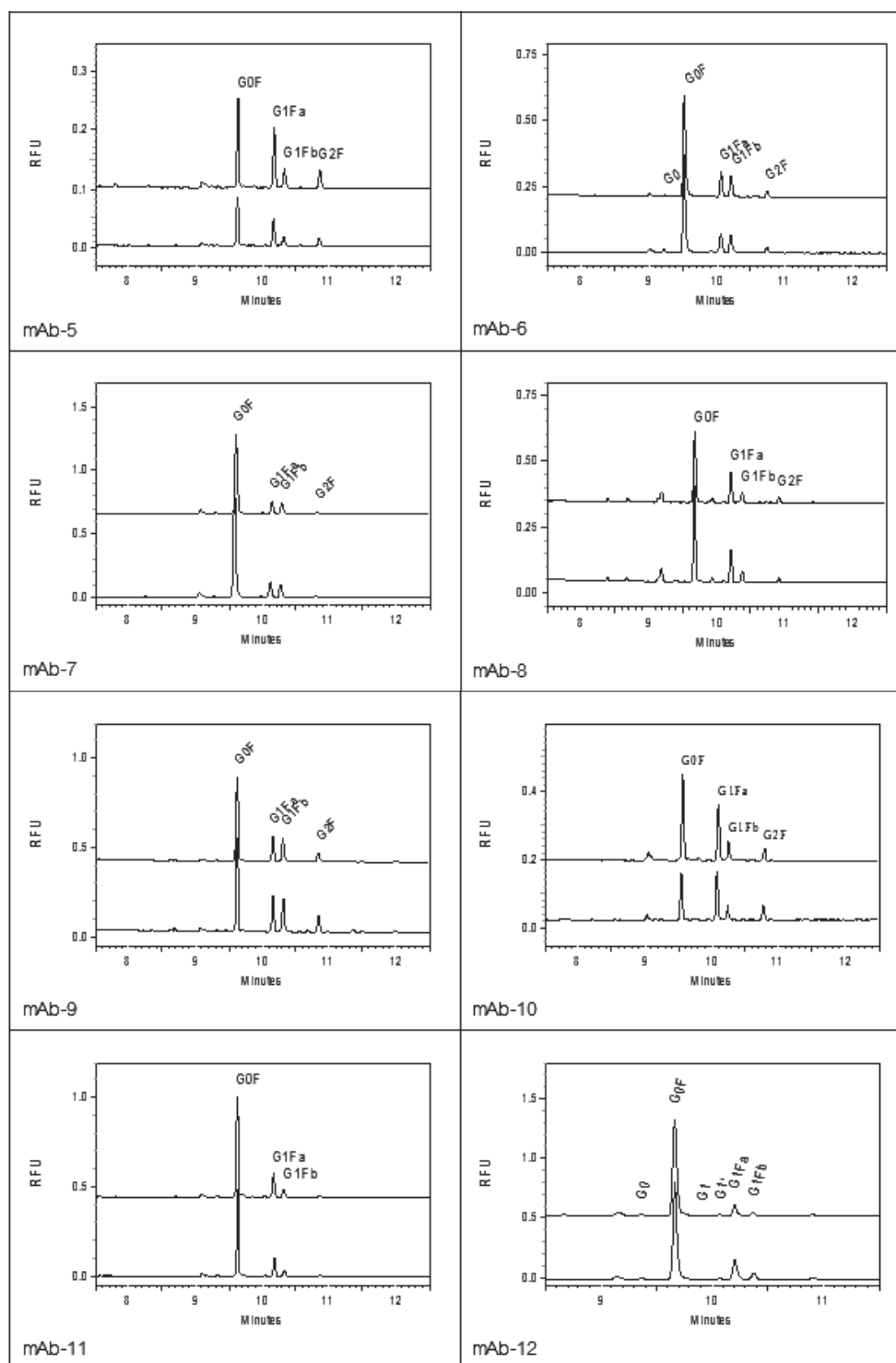
ผลการวิเคราะห์ด้วย CE - LIF เมื่อทดลองเปรียบเทียบยา mAb ชนิด 1 - 4 กับสารมาตรฐานของ USP (ภาพที่ 3) ได้อิเล็กโทรโฟโกราแกรมของยา mAb ทั้ง 4 ชนิด เป็น GoF, G1Fa, G1Fb และ G2F ซึ่งมีน้ำตาลฟิวโคสประกอบอยู่



ภาพที่ 3 อิเล็กโทรโฟโกราแกรมของตัวอย่าง mAb 4 ชนิด เปรียบเทียบกับ USP Oligosaccharide System Suitability Mixture A

ผลการวิเคราะห์ด้วย CE-LIF ได้อิเล็กโทรโฟโกราแกรมของยา mAb ทั้ง 12 ชนิดเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานของตัวเองทุกชนิดให้อิเล็กโทรโฟโกราแกรมตรงตามสารมาตรฐานชนิดนั้นๆ (ภาพที่ 4) มีลำดับก่อนหลังการเคลื่อนออกจากท่อแคปิลลารีของไกลแคนหลักทั้ง 4 ชนิด เป็น GoF, G1F (รวม G1F ทั้ง 2 ชนิด) และ G2F ตามลำดับ โดยตรวจพบไกลแคนทุกชนิดในช่วงเวลานาทีที่ 9.41 - 9.65 (migration time: MT) (ตารางที่ 1) จากการคำนวณร้อยละของพื้นที่ (% corrected peak area: % CPA) ของไกลแคนหลักที่ประกอบในตัวอย่าง mAb ทั้ง 12 ชนิด มีปริมาณของ GoF มากที่สุด คืออยู่ในช่วงร้อยละ 39.30 - 85.29 (ตารางที่ 2)





ภาพที่ 4 การเปรียบเทียบอเล็กโทรโฟโแกรมของตัวอย่าง mAb ทั้ง 12 ชนิด (เส้นบน) กับสารมาตรฐาน (เส้นล่าง) ที่วิเคราะห์โดย CE-LIF

ตารางที่ 1 ค่า MT เฉลี่ยของ mAb 12 ยี่ห้อจากการวิเคราะห์โดย CE-LIF

Brands	MT of major peak (GoF) (minute)
1	9.50
2	9.41
3	9.58
4	9.63
5	9.61
6	9.50
7	9.54
8	9.65
9	9.57
10	9.53
11	9.63
12	9.63
range	9.41 - 9.65

ตารางที่ 2 ปริมาณไกลแคนที่ประกอบในตัวอย่าง mAb วิเคราะห์โดย CE - LIF คำนวณจาก %CPA

Brands	GoF	G1Fa	G1Fb	G2F
1	39.30 ± 0.15	38.12 ± 0.16	10.79 ± 0.10	11.79 ± 0.11
2	45.33 ± 0.14	35.12 ± 0.04	10.41 ± 0.11	9.14 ± 0.10
3	80.30 ± 0.75	13.97 ± 0.46	4.47 ± 0.24	1.25 ± 0.15
4	55.61 ± 0.20	29.61 ± 0.12	9.14 ± 0.14	5.65 ± 0.17
5	49.48 ± 0.14	31.74 ± 0.23	10.05 ± 0.16	8.73 ± 0.13
6	66.10 ± 0.16	15.45 ± 0.08	12.99 ± 0.10	4.42 ± 0.10
7	78.10 ± 0.23	10.92 ± 0.11	9.20 ± 0.11	1.78 ± 0.05
8	61.38 ± 0.18	25.27 ± 0.13	9.04 ± 0.07	4.32 ± 0.12
9	61.24 ± 0.06	17.32 ± 0.07	15.50 ± 0.10	5.93 ± 0.07
10	52.23 ± 0.45	31.48 ± 0.13	9.85 ± 0.17	6.45 ± 0.30
11	77.54 ± 0.29	17.24 ± 0.32	5.22 ± 0.17	ไม่พบ
12	85.29 ± 0.16	9.77 ± 0.07	3.10 ± 0.04	ไม่พบ
range	39.30 - 85.29	13.97 - 38.12	3.10 - 15.50	0 - 11.79

วิจารณ์

ยา mAb ที่นำมาศึกษานี้ยื่นขอขึ้นทะเบียนในประเทศไทยในปี 2557 - 2559 ซึ่งเป็นยาต้นแบบ 11 ชนิด ผลการวิเคราะห์ยา mAb ทั้ง 12 ชนิด มีไกลแคนที่ประกอบอยู่เป็นชนิด N-linked เนื่องจากไกลแคนถูกตัดออกมาจากสายโปรตีนด้วยเอนไซม์ PNGase F ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนแอสพาราจีน เมื่อตรวจสอบการตัดด้วย CE-SDS แบบ reducing condition ได้พิกของ HC ที่ไม่มีหมู่น้ำตาลอย่างสมบูรณ์เป็น NGHC (ภาพที่ 2) โดยตำแหน่งของ NGHC อยู่ก่อนพิก HC ไปในลักษณะที่เคลื่อนออกมาก่อน แสดงถึงน้ำหนักที่น้อยกว่าและแสดงถึงการตัดเป็นไปอย่างสมบูรณ์ด้วยสภาวะการตัดและปริมาณเอนไซม์ที่ใช้สามารถตัดไกลแคนจากสายโปรตีนได้ทั้งหมด

จากการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานของยา mAb แต่ละชนิด และ USP mixture A ผลการวิเคราะห์ยา mAb ทั้ง 12 ชนิด เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานดังกล่าว พบไกลแคนหลัก⁽¹⁾ (major glycan) 4 ชนิด คือ GoF, G1Fa, G1Fb และ G2F ที่มีน้ำตาลฟิวโคส เป็นลักษณะของไกลแคนที่ผลิตได้จากเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ลักษณะเป็น biantennary glycan⁽⁶⁾ และสอดคล้องกับการเปรียบเทียบกับ Glucose ladder standards ในการระบุชนิดของไกลแคนโดย GoF, G1Fa, G1Fb และ G2F มีน้ำตาลทั้งหมดเป็น 8, 9 และ 10 ตัว ตามลำดับ (ไม่แสดงข้อมูล) โดยที่ G1Fa และ G1Fb มีน้ำตาลกาแลกโตสประกอบอยู่ 1 ตัวในต่างสายกัน (isomers) การวิเคราะห์นี้ใช้ท่อแคปิลลารีความยาว 50 ซม. สามารถแยก isomers ออกจากกันและเห็นพิกชัดเจนภายในการแยกสาร 12 นาที มีการศึกษาอื่นเกี่ยวกับไกลแคนในยา mAb มาแล้วหลายชนิด^(14,15) ซึ่งมีผลสอดคล้องกับการศึกษานี้แม้จะใช้ชนิดท่อแคปิลลารี สภาวะการวิเคราะห์และชนิดของฟลูออเรสเซนต์ที่ใช้ติดฉลากแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานของตัวอย่างทุกชนิดให้อิเล็กโตรโฟโกราฟีโรแกรมตรงตามสารมาตรฐานชนิดนั้นๆ (ภาพที่ 4) และตรงตามข้อกำหนดเฉพาะ (specification) ของยาแต่ละชนิดที่จัดแจ้งในการขึ้นทะเบียน (ข้อมูลจากการขึ้นทะเบียนยา) สำหรับปริมาณของไกลแคนหลักในยา mAb ที่ศึกษานี้ วิเคราะห์จากความสูงและปริมาณของพื้นที่ใต้พิก มีปริมาณของ GoF มากที่สุด (ตารางที่ 2) โดยมีความแตกต่างกันในยาแต่ละชนิด

สำหรับพิก A1F ที่ปรากฏในให้อิเล็กโตรโฟโกราฟีโรแกรมของ USP mixture A (ภาพที่ 3) คือไกลแคน Go ที่มีน้ำตาลฟิวโคส และน้ำตาลกรดไซอะลิก (sialic acid/N - acetylneuraminic acid: A) อย่างละ 1 โมเลกุล และพิก G2 ที่มีน้ำตาลกาแลกโตส 2 โมเลกุลนั้น ไม่ปรากฏชัดเจนในอิเล็กโตรโฟโกราฟีโรแกรมของตัวอย่าง ซึ่งอาจจะไม่มีหรือมีปริมาณน้อยมากจนสังเกตไม่ได้ จัดเป็นไกลแคนชนิดรอง (minor glycan) นอกจากนี้พบไกลแคนชนิดรองที่เป็น a - fucosylated forms ในปริมาณน้อยมาก (ภาพที่ 4) เช่น mAb - 6 ซึ่งเป็นไกลแคนชนิด GoF แต่พบพิกเล็ก ๆ ข้างหน้าในตำแหน่งของ Go เล็กน้อย ส่วน mAb - 12 พบ G1 และ G1' ปริมาณเล็กน้อย

แม้ตัวอย่าง mAb แต่ละชนิดจะมีไกลแคนหลักตรงตามสารมาตรฐาน แต่พบอิเล็กโตรโฟโกราฟีโรแกรมของ mAb บางยี่ห้อแตกต่างกับสารมาตรฐานในแง่ของความสูงของพิก เช่น mAb 3, 5, 6, 10 และ 11 มีพิกไกลแคนหลักสูงกว่าของสารมาตรฐาน (ภาพที่ 4) ส่วน mAb - 4 และ 8 มีพิกไกลแคนหลักต่ำกว่าของสารมาตรฐาน ซึ่งเป็นความแตกต่างเพียงเล็กน้อย (microheterogeneity) ที่อาจพบและยอมรับได้⁽¹⁶⁾ แต่ต้องมีความสม่ำเสมอของการผลิต ซึ่งควรได้รับการติดตามตรวจสอบยารุ่นอื่นๆ ด้วย เนื่องจากถ้าไม่ควบคุมการผลิตให้เหมาะสม ก็อาจได้ยาที่มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอแตกต่างจากรุ่นอื่นๆ เช่น หากมีปริมาณน้ำตาลกรดไซอะลิกและแมนโนสมากจะผลต่อการทำงานของยา เช่น น้ำตาลกรดไซอะลิกมีผลต่อการกำจัดยาออก⁽¹⁷⁾ หรือกระทบต่อการออกฤทธิ์ของยาและน้ำตาลแมนโนสมีผลต่อการทำงานของ effector และอาจมีผลต่อโครงสร้างของ Fc ของยา⁽⁵⁾ แต่การศึกษานี้ต้องการตรวจสอบเฉพาะชนิดของไกลแคนหลักที่ประกอบในยา mAb หากมีตัวอย่างยี่ห้อหลาย ๆ รุ่นจะสามารถแสดงแนวโน้มของความสม่ำเสมอของไกลแคนที่ประกอบในยาแต่ละชนิดได้

สำหรับการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของยา mAb นั้น ชนิดและปริมาณไกลแคนที่ประกอบในยาเป็นหัวข้อหนึ่งที่ต้องวิเคราะห์ ผลการเปรียบเทียบปริมาณไกลแคนของ mAb - 1 ซึ่งเป็นยาคคล้ายคลึงของ mAb - 2 มีไกลแคนหลักตรงกันทั้ง 4 ชนิด แต่ mAb - 1 มีปริมาณ GoF เพียงร้อยละ 39.30 ในขณะที่ mAb - 2 มีปริมาณ GoF ร้อยละ 45.33 ซึ่งความแตกต่างด้านปริมาณนี้สามารถตรวจพบได้ระหว่างยาต้นแบบกับยาคคล้ายคลึง รวมทั้งพบได้ในยาต้นแบบของยารุ่นก่อนและหลังการปรับเปลี่ยนกระบวนการผลิต^(13,15,18) โดยที่อาจไม่มีผลเสียด้านความปลอดภัยและประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามต้องพิจารณาในรายละเอียดเป็นรายๆ ไป และเนื่องจากยาคคล้ายคลึงชนิดที่นำมาศึกษานี้มีเพียง 1 รุ่น จึงยังไม่สามารถสรุปถึงแนวโน้มความสม่ำเสมอหรือผลกระทบได้

สรุป

ไกลแคนใน mAb ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี CE-LIF มีคุณลักษณะและองค์ประกอบตรงตามมาตรฐานและตามที่จัดแจ้งขึ้นทะเบียนในประเทศไทย ซึ่งจะเป็นฐานข้อมูลสำคัญในการควบคุมคุณภาพของยา mAb ชนิดต่างๆ ในอนาคต รวมทั้งจะเป็นข้อมูลเพื่อการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงในการขึ้นทะเบียนยาคคล้ายคลึงต่อไป และด้วยโอกาสที่จะเกิดความแตกต่างของคุณลักษณะของไกลแคนซึ่งมีความสำคัญต่อความปลอดภัยและประสิทธิภาพของยา ภาครัฐควรมีการติดตามตรวจสอบคุณภาพยา mAb หลังจำหน่ายในยาหลาย ๆ รุ่น เพื่อตรวจสอบความสม่ำเสมอในการเฝ้าระวังหลังจำหน่าย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ดำเนินการโดยใช้งบประมาณของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารอ้างอิง

1. Uçaktürk E. Analysis of glycoforms on the glycosylation site and the glycans in monoclonal antibody biopharmaceuticals. *J Sep Sci* 2012; 35(3): 341-50.
2. Beck A, Wagner-Rousset E, Ayoub D, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianféron S. Characterization of therapeutic antibodies and related products. *Anal Chem* 2013; 85(2): 715-36.
3. Raju TS, Briggs JB, Borge SM, Jones AJS Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology* 2000; 10(5): 477-86.
4. Guttman A. Capillary electrophoresis in the N-glycosylation analysis of biopharmaceuticals. *TrAc Trends Anal Chem* 2013; 48: 132-143.
5. Higel F, Seidl A, Sörgel F, Friess W. N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *Eur J Pharm Biopharm* 2016; 100: 94-100.
6. Reusch D, Tejada ML. Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes. *Glycobiology* 2015; 25(12): 1325-34.
7. Bandyopadhyay S, Mahajan M, Mehta T, Singh AK, Parikh A, Gupta AK, et al. Physicochemical and functional characterization of a biosimilar adalimumab ZRC-3197. *Biosimilars*. 2015; 5: 1-18.
8. Ma S, Nashabeh W. Carbohydrate analysis of a chimeric recombinant monoclonal antibody by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Anal Chem* 1999; 71(22): 5185-92.

9. Berkowitz¹ SA, Engen JR, Mazzeo JR, Jones GB. Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11(7): 527-40.
10. Beck A, Diemer H, Ayoub D, Debaene F, Wagner-Rousset E, Carapito C, et al. Analytical characterization of biosimilar antibodies and Fc-fusion proteins. *TrAC Trends Anal Chem* 2013; 48: 81-95.
11. The United States Pharmacopoeia 39-The National Formulary. 3rd ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention; 2016. p. 204-210, 249-260, 1165-1177.
12. Planinc A, Bones J, Dejaegher B, Van Antwerpen P, Delporte C. Glycan characterization of biopharmaceuticals: updates and perspectives. *Anal Chim Acta* 2016; 921: 13-27.
13. Kamoda S, Ishikawa R, Kakehi K. Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for detailed studies on N-linked oligosaccharide profile of therapeutic recombinant monoclonal antibodies. *J Chromatogr A* 2006; 1133(1-2): 332-9.
14. Liu J, Eris T, Li C, Cao S, Kuhns S. Assessing analytical similarity of proposed amgen biosimilar ABP 501 to adalimumab. *BioDrugs* 2016; 30(4): 321-38.
15. Jung SK, Lee KH, Jeon JW, Lee JW, Kwon BO, Kin YJ, et al. Physicochemical characterization of Remsima. *MAbs* 2014; 6(5): 1163-77.
16. Visser J, Feuerstein I, Stangler T, Schmiederer T, Fritsch C, Schiestl M. Physicochemical and functional comparability between the proposed biosimilar rituximab GP2013 and originator rituximab. *BioDrugs* 2013; 27(5): 495-507.
17. Sanchez-De Melo I, Grassi P, Ochoa F, Bolivar J, Garcia-Cozar FJ, Duran-Ruiz MC. N-glycosylation profile analysis of Trastuzumab biosimilar candidates by Normal Phase Liquid Chromatography and MALDI-TOF MS approaches. *J Proteomics* 2015; 8(127): 225-33.
18. Byrne B, Donohoe G, O'Kennedy R. Sialic acid: carbohydrate moieties that influence of biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. *Drug Discovery Today* 2007; 12(7-8): 319-26.
19. Schiestl M, Stangler T, Torella C, Cepeljnik T, Toll H, Grau R. Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol* 2011; 29(4): 310-12.

Characteristics of Glycan in Biotherapeutic Monoclonal Antibodies Marketed in Thailand

Wichuda Jariyapan Titaporn Pootipinyowat and Saiwarul Jadoonkittinan

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT Characterization of the structure and composition of glycan in biotherapeutic monoclonal antibodies (mAb) is essential for drug development and quality control. If the production process is not consistently controlled, there is a possibility to obtain mAb with different forms of glycan (glycoforms). The different glycoforms may alter the quality and safety of mAb as well as affect drug efficacy. Therefore, characterization of glycan in 12 brands of mAb registered in Thailand during 2014 - 2016 was performed with capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence (CE-LIF) method. The results of LIF detection of 9-aminopyrene - 1, 4, 6-trisulfonic acid labeled on glycan after digestion of mAb with PNGase F showed that mAb complied with their reference materials as well as USP glycan standards. All 12 brands of mAb consisted of four major types of glycoforms: G0F, G1Fa, G1Fb and G2F which complied with their registration. Glycan type G0F had the highest amount in the range of 39.30 - 85.29 % and migration time detected by CE-LIF was within 9.41 - 9.65 minutes.

Key words: Glycan, CE-LIF, Monoclonal antibody

การประเมินความเสี่ยงโลหะหนักในปลาและกุ้งจาก ทะเลสาบสงขลาต่อคนไทย

สุดชญา ศรประสิทธิ์* กิ่งแก้ว กาญจนรัตน์ และอรัญญา อัสวารีย์**

* ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอมือเมือง สงขลา 90000

** ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งเขต 6 (สงขลา) กรมประมง อำเภอมือเมือง สงขลา 90000

บทคัดย่อ ทะเลสาบสงขลาเป็นแหล่งอาหารทะเลที่สำคัญ แต่ปัญหามลพิษทางน้ำของทะเลสาบสงขลา ทำให้ผู้บริโภคมีความวิตกเรื่องความปลอดภัยจากการบริโภคสัตว์น้ำจากแหล่งนี้ ดังนั้นศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา ร่วมกับศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งเขต 6 สงขลา สุ่มเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำ ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ - พฤษภาคม 2558 รวม 179 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ปลา 38 ชนิด รวม 141 ตัวอย่าง และกุ้ง 5 ชนิด รวม 38 ตัวอย่าง วิเคราะห์การปนเปื้อนตะกั่ว และแคดเมียม ด้วย Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer และปรอทด้วย Mercury Analyzer พบอัตราการปนเปื้อนตะกั่ว แคดเมียม และปรอท ร้อยละ 34.1, 5.6 และ 88.8 ตามลำดับ ปริมาณที่พบในปลาอยู่ในช่วง 0.05 - 0.45, 0.03 - 0.05 และ 0.01 - 1.63 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนกุ้งพบในช่วง 0.05 - 0.13, 0.03 - 0.21 และ 0.01 - 0.57 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ สัตว์น้ำส่วนใหญ่ (ร้อยละ 98) มีโลหะปนเปื้อนต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน ยกเว้น ปลาสลาด ปลาหมอไทย และกุ้งหัวมัน ชนิดละ 1 ตัวอย่าง ปริมาณปรอทปนเปื้อน 1.63, 0.84 และ 0.57 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดให้มีปรอทปนเปื้อนได้ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ถึงแม้ว่าการประเมินความปลอดภัยของการบริโภคสัตว์น้ำที่ปนเปื้อนโลหะหนัก ตะกั่ว แคดเมียม และปรอท ยังอยู่ในระดับที่ปลอดภัย แต่ปริมาณได้รับปรอทจากการบริโภคปลาสูงถึงร้อยละ 82 ของค่าความปลอดภัยและระดับการปนเปื้อนปรอทในปลาค่อนข้างสูงด้วยเช่นกัน ดังนั้นการบริโภคปลาจากทะเลสาบสงขลาอย่างต่อเนื่องอาจเพิ่มความเสี่ยงต่อผู้บริโภคได้

บทนำ

ทะเลสาบสงขลาเป็นทะเลสาบกึ่งปิด เรียกว่า ลากูน (lagoon) มีเนื้อที่พื้นน้ำรวม 1,046 ตารางกิโลเมตร มีลักษณะคอคอดเป็นตอนๆ ลักษณะกายภาพแบ่งเป็น 4 ส่วน คือ ทะเลน้อย ทะเลสาบตอนในหรือทะเลหลวง ทะเลสาบตอนกลาง และทะเลสาบตอนนอก ครอบคลุม 3 จังหวัด สงขลา พัทลุง และนครศรีธรรมราช เป็นแหล่งน้ำที่มีความสำคัญด้านการประมง การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญ ทั้งยังเปรียบเหมือนอ่างน้ำขนาดใหญ่ที่เป็นแหล่งรองรับของเสียจากธรรมชาติและการกระทำจากมนุษย์ ทำให้ทะเลสาบสงขลากลายเป็นแหล่งปนเปื้อนและสะสมสารพิษ ซึ่งรวมถึงโลหะหนัก นับว่าเป็นสารพิษอันตรายร้ายแรงชนิดหนึ่งเนื่องจากมีความคงตัวสูง เมื่อเข้าสู่แหล่งน้ำจะสะสมในตะกอนและสัตว์น้ำ เมื่อประชาชนนำมาบริโภคก็อาจสะสมในร่างกายจนถึงระดับทำให้เกิดอันตรายได้ โดยพบว่าตะกั่วมีโทษต่อทุกระบบของร่างกาย ทำให้เกิดโรคโลหิตจาง ทำลายระบบประสาทโดยเฉพาะส่วน Cerebella cortex จึงปวดศีรษะรุนแรง ประสาทหลอน มีผลต่อประสาทส่วนปลายทำให้เป็นอัมพาต มีผลให้ระดับ IQ ในเด็กลดลง มีผลต่อไตทำให้ไตอักเสบหรือพิการ มีผลต่อระบบทางเดินอาหารทำให้เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ท้องผูก และมีผลต่อระบบสืบพันธุ์ทำให้เป็นหมันได้ แคดเมียมมีผลทำให้หายใจขัด หอบ ไอ เยื่อปอดถูกทำลาย ถุงลมโป่งพอง เป็นโรคโลหิตจาง มีผลต่อไตทำให้ไตบวมและพิการ และทำให้แคดเมียมถูกดูดกลับจึงเกิดกระดูกเปราะ พรุน ปวดกระดูกและสันหลัง องค์การอนามัยโลก (WHO) และองค์การระหว่างประเทศเพื่อการวิจัยมะเร็ง (IARC) จัดแคดเมียมเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ สำหรับปรอท ทำให้เหงือกและเยื่อช่องปากอักเสบ ทรงตัวลำบาก พูดไม่ชัด มีผลต่อไตทำให้ไตอักเสบ และมีเลือดออกทางปัสสาวะ นอนไม่หลับ ความจำเสื่อม ประสาทหลอน หวาดระแวง^(1,2,3)

ในปี 2554 มีการสำรวจทะเลสาบสงขลาพื้นที่ที่มีแผนจะขุดลอกตะกอน พบปรอทปนเปื้อนในตะกอนเกินมาตรฐานในบางจุดที่ตรวจวัด⁽⁴⁾ และปี 2556 สำนักสิ่งแวดล้อมภาคที่ 16 รายงานการสำรวจคุณภาพน้ำทะเลสาบสงขลาพบตะกั่วและโครเมียมเกินมาตรฐานที่ปากทะเลสาบสงขลา ทำเทียบเรือท่าสะพาน และปากคลองสำโรง⁽⁵⁾ ทำให้ผู้บริโภคมีความวิตกเรื่องความปลอดภัยจากการบริโภคสัตว์น้ำจากทะเลสาบสงขลาที่อาจมีโลหะหนักปนเปื้อน แต่ยังไม่พบข้อมูลที่เป็นปัจจุบันมายืนยันเพื่อสร้างความมั่นใจให้กับผู้บริโภคสัตว์น้ำได้ ดังนั้นเพื่อเป็นการเฝ้าระวังและคุ้มครองผู้บริโภค ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา จึงได้ศึกษาสถานการณ์การปนเปื้อนตะกั่ว แคดเมียม และปรอทในสัตว์น้ำทะเลสาบสงขลา และประเมินความเสี่ยงต่อการบริโภค เพื่อแจ้งเตือนภัยต่อผู้บริโภคและใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน (baseline data) นำไปสู่การจัดการสิ่งแวดล้อมทะเลสาบสงขลาที่มีประสิทธิภาพต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่าง

กำหนดจำนวนตัวอย่างโดยใช้สถิติกรณีไม่ทราบจำนวนประชากรของ W.G Cochran⁽⁶⁾ ได้เป้าหมายจำนวน 179 ตัวอย่าง วางแผนสุ่มตัวอย่างที่นิยมบริโภคแบบเจาะจง (Purposive sampling) ในช่วงฤดูแล้ง เดือน ก.พ. - พ.ค. 2558 โดยเก็บตัวอย่างครอบคลุมทะเลสาบทั้ง 4 ตอน คือ ทะเลน้อย ทะเลสาบตอนใน ทะเลสาบตอนกลาง และทะเลสาบตอนนอก จุดที่เก็บคือ สถานีประเมินผลผลิตสัตว์น้ำของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งเขต 6 สงขลา จำนวน 25 สถานี นำตัวอย่างมาวัดขนาด ชั่งน้ำหนัก สุ่มตัวอย่างเฉพาะเนื้อมดละเอียดเตรียมสำหรับวิเคราะห์ขั้นตอนต่อไป

เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องย่อยสารด้วยระบบเครื่อง Microwave Digestion ยี่ห้อ GEM/MARS พร้อมอุปกรณ์
- เครื่อง AAS Graphite Furnace ของ Perkin Elmers รุ่น 4110ZL
- เครื่อง Mercury Analyzer ของ Perkin Elmers รุ่น FIMS 400
- เครื่องชั่งไฟฟ้า ผลิตภัณฑ์ของ Mettler Toledo รุ่น MS204S

หมายเหตุ เครื่องแก้วและอุปกรณ์ทุกชนิดที่ใช้ในการวิเคราะห์ต้องล้างด้วย 20% กรดไนตริกและน้ำกลั่น เพื่อกำจัดการปนเปื้อนของโลหะต่างๆ

สารมาตรฐานและสารเคมี

- สารมาตรฐานปรอท ความเข้มข้น $9.98 \text{ mg/L} \pm 0.05 \text{ mg/L}$ ผลิตภัณฑ์ของ Perkin Elmers
- สารมาตรฐานตะกั่ว เข้มข้น $1000 \text{ mg/L} \pm 2.00 \text{ mg/L}$ ผลิตภัณฑ์ของ Fluka
- สารมาตรฐานแคดเมียม เข้มข้น $999 \text{ mg/L} \pm 3 \text{ mg/L}$ ผลิตภัณฑ์ของ Fluka
- วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน CRM 1566b Oyster Tissue ผลิตภัณฑ์ของ NIST

สารเคมีทุกชนิดเป็นชนิด AR grade; Nitric acid, Hydrochloric acid, Hydrogen peroxide, Sodium borohydride, Sodium hydroxide ผลิตภัณฑ์ของ Merck และ Fluka สำหรับ Magnesium nitrate และ Ammonium dihydrogenphosphate ผลิตภัณฑ์ของ Perkin Elmers

วิเคราะห์ปริมาณตะกั่ว แคดเมียม และปรอท

วิเคราะห์ปริมาณตะกั่ว แคดเมียม และปรอท การวิเคราะห์ตะกั่วและแคดเมียมใช้เทคนิค Graphite Furnace Atomic Absorption, AOAC Official Method 999.10 : 2012⁽⁷⁾ การวิเคราะห์ปรอทด้วย Mercury Analyzer, AOAC Official Method 974.14 : 2012⁽⁸⁾

ควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์

ทดสอบประสิทธิภาพวิธีวิเคราะห์หาค่า LOQ; Limit of quantitation ของตะกั่ว แคดเมียม และปรอท 0.05, 0.01 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ควบคุมคุณภาพในการวิเคราะห์ด้วยวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน CRM 1566b Oyster Tissue

วิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic for Window V.23 ใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) วิเคราะห์หาค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่ามัธยฐาน⁽⁹⁾

เกณฑ์มาตรฐาน

ตะกั่วและปรอทในอาหารทะเล ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 กำหนดให้ตรวจพบตะกั่วและปรอท ไม่เกิน 1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนแคดเมียม อ้างอิงตามมาตรฐานยุโรป EC No 1881/2006 ที่กำหนดค่าการปนเปื้อนแคดเมียมกึ่งและปู ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปลา หอย และปลาหมึก ไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม^(10,11)

การประเมินความเสี่ยง ดำเนินการประเมิน 4 ขั้นตอนคือ^(2,3,12)

1. การระบุถึงอันตราย (Hazard identification) ศึกษาจากเอกสาร
2. การอธิบายลักษณะอันตราย (Hazard characterization) ศึกษาจากเอกสาร
3. การประเมินการได้รับสัมผัสสารเคมีจากการบริโภคอาหาร (Dietary exposure assessment of chemicals in food) : การประเมินการได้รับสัมผัส ใช้ข้อมูล 2 ส่วนคือ 1) ข้อมูลการบริโภคอาหารประจำวันของคนไทย ซึ่งได้จากข้อมูลการบริโภคอาหารของประเทศไทยของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.)⁽¹²⁾ 2) ข้อมูลปริมาณตะกั่ว แคดเมียม และปรอทตกค้าง ได้จากการตรวจวิเคราะห์สัณฐานจากทะเลสาบสงขลาแล้วนำมาคำนวณปริมาณการได้รับสัมผัสของตะกั่ว แคดเมียม และปรอท ที่บริโภคสัตว์น้ำต่อคนต่อวัน โดยใช้สูตร ดังนี้

ปริมาณการได้รับสัมผัสโลหะ (μg /คน/วัน) = ปริมาณ โลหะที่ปนเปื้อน ($\mu\text{g/g}$) $\times$ ปริมาณการบริโภค (g/คน/วัน)

4. การอธิบายลักษณะความเสี่ยง (Risk characterization) ด้วยค่าความปลอดภัย Margin of Safety (MOS) ในการอธิบายลักษณะความเสี่ยงคำนวณจาก

$$\text{สูตร; MOS} = \frac{\text{Exposure}}{\text{Health-based guidance value (HBGV)}}$$

น้ำหนักตัวเฉลี่ยของคนไทยใช้น้ำหนักตัวเฉลี่ยอายุ 3 ปีขึ้นไป เท่ากับ 54.53 กิโลกรัม⁽¹²⁾

โดย $\text{MOS} < 1$ = ปริมาณสารโดยเฉลี่ยที่ร่างกายได้รับไม่ก่อผลกระทบต่อร่างกาย

$\text{MOS} > 1$ = ปริมาณสารโดยเฉลี่ยที่ร่างกายได้รับเกินค่าความปลอดภัย

ผล

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำที่จับจากทะเลสาบสงขลาตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ - พฤษภาคม 2558 จำนวน 13 ครั้ง ที่สถานีประเมินผลผลิตสัตว์น้ำของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งเขต 6 สงขลา 25 สถานี ได้สัตว์น้ำ 179 ตัวอย่าง จำแนกได้ 43 ชนิด แบ่งออกเป็น ปลา 38 ชนิด จำนวน 141 ตัวอย่าง กุ้ง 5 ชนิด จำนวน 38 ตัวอย่าง เนื่องจากสัตว์น้ำแต่ละชนิดในทะเลสาบสงขลา มีการดำรงชีวิตที่แตกต่างกัน มีธรรมชาติของถิ่นที่อยู่อาศัยแตกต่างกันไป เมื่อแบ่งประเภทสัตว์น้ำตามถิ่นที่อยู่อาศัยคือ ทะเลน้อย ทะเลสาบตอนใน ทะเลสาบตอนกลาง และทะเลสาบตอนนอก พบสัตว์น้ำต่าง ๆ⁽¹³⁾ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดและจำนวนสัตว์น้ำที่พบในทะเลสาบสงขลาแต่ละตอน (ทะเลน้อย : TN, ทะเลสาบตอนใน : IN, ทะเลสาบตอนกลาง : MD และทะเลสาบตอนนอก : OT)

No.	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	จำนวนสัตว์น้ำ (ตัวอย่าง)			
				TN	IN	MD	OT
ปลากินพืช							
1	กระบอกขาว	Valamugil cunnesius	Longarm mullet	-	2	1	-
2	ปลาเข็ม (สร้อยนกเขา)	Osteochilus hassettii	Silver Sharkninnow	1	-	2	-
ปลากินพืชและสัตว์							
3	ปลาดุก	Clarias macrocephalus	Marble walking catfish		1	-	-
4	ปลาดุกทะเล	Plotosus canius	Gray eel-catfish	-	3	6	3
5	ปลาดุกอูย (เนื้ออ่อน)	Clarias macrocephalus	Bighead catfish	2		1	
6	ปลาดตะเพียน	Barbonymus gonionotus	Thai barb	2	-	-	-
7	ปลาดตะเพียนน้ำเค็ม (โคก)	Anodontostoma chacunda	Chacunda gizzard shad	-	2	1	-
8	ปลานิล	Oreochromis niloticus	Nile tilapia	3	2	1	2
9	ปลามะลิ	Corica soborna Hamilton	Ganges river sprat	-	1	-	-
10	ปลาสลิด	Trichogaster pectoralis	Snake Skin Gourami	3	-	-	-
ปลากินสัตว์							
11	ปลากดขี้ลิง	Hexanematicthys sagor	Sagor catfish	2			3
12	ปลากดคันหลาว	Cryprarius	Longspined catfish		2	1	-
13	ปลากดเหลือง	Hemibagrus	Yellow mystus		1	2	
14	ปลากะตุงเห	Strongylura strongylura	Spottail needlefish	-	3	-	-
15	ปลากะสูบขีด (โสด)	Hampala macrolepidota	Hampala barb	1	2	3	-
16	ปลากะราย	Chitala ornata	Spotted Feather back	1	-	-	-
17	ปลากะพงขาว	Lates calcarifer	Giant seaperch	-	2	-	2
18	ปลากะพงหิน	Datnioides polota	Four-berred tigerfish	-	4	2	-
19	ปลาขี้ตัง (ตะกรับ)	Scatophagus argus	Spotted scat	-	2	3	1
20	ปลาช่อน	Channa striata	Snakehead murrel	3	3	6	-
21	ปลากะสง (ช่อนไซ)	Channa lucius	Blotched snakehead	2	-	1	-
22	ปลาชะโด	Channa micropeltes	Giant snakehead	5	1	2	-
23	ปลาทองเที้ยว (เกล็ดใหญ่)	Parapocryptes serperaster	Largescaled goby	-	-	-	1
24	ปลาเนื้ออ่อน (ชะโอน)	Ompok Krattensis	Butter catfish	2	-	-	1
25	ปลาแป้นเล็ก (บุตรี)	Leiognathus brevirostris	Shortnose ponyfish	-	-	1	-
26	ปลาบู่จุดฟ้า	Acentrogobius chlorostig matoides	Greenspot goby	-	2	-	2
27	ปลาบู่ทราย	Oxyeleotris marmorata	Marble goby	2	2	-	-
28	ปลาแมว	Thyssa hamiltonii Gray	Hamilton thyryssa	-	2	-	-
29	ปลาลิ้นควายขนดำ	Brachirus Orientalis	Oriental SOLE	-	-	1	-
30	ปลาลิ้นหมาหูดำ	Solea ovate Richardson	Ovate sole	-	-	1	-
31	ปลาสร้อย	Notopterus notopterus	Bronze featherback	3	1	1	-
32	ปลาเสือพ่นน้ำ	Toxotes chatareus	Largescale archerfish	-	3	-	-
33	ปลาหมอไทย	Anobos testudineus	Climbing perch	1	1	1	-
34	ปลาหมอช้างเหยียบ	Pristolepis fasciata	Catopra	2	-	-	-
35	ปลากดหัวแข็ง	Nemapternx caelata	Engraved catfish	-	1	-	-

ตารางที่ 1 ชนิดและจำนวนสัตว์น้ำที่พบในทะเลสาบสงขลาแต่ละตอน (ทะเลน้อย : TN, ทะเลสาบตอนใน : IN, ทะเลสาบตอนกลาง : MD และทะเลสาบตอนนอก : OT) (ต่อ)

No.	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	จำนวนสัตว์น้ำ (ตัวอย่าง)			
				TN	IN	MD	OT
36	ปลากดหัวโม่ง	<i>Arius maculatus</i>	spotted catfish	-	1	1	2
37	ปลากดหัวอ่อน	<i>Osteogeneiosus militaris</i>	Soldier catfish	-	1	3	1
38	ปลาอุบ (คางคกน้ำกร่อย)	<i>Batrachomoeus tripinosus</i>	Three - spined frogfish	-	-	1	1
รวมตัวอย่าง (141 ตัวอย่าง)				35	45	42	19
กึ่ง							
1	ก้ามกราม	<i>Microbrachium rosenbergii</i>	Giant freshwater prawn	-	7	4	-
2	หัวมัน	<i>Metapenaeus tenuipes</i>	Stork shrimp	-	2	3	6
3	หัวแข็ง	<i>Metapenaeus moyebi</i>	Moyebi shrimp.	-	-	-	3
4	แชบ้วย, หางแดง	<i>Penaeus merguensis</i>	Banana prawn	-	-	-	8
5	กุลาดำ	<i>Penaeus monodon</i>	Giant tiger prawn	-	1	3	1
รวมตัวอย่าง (38 ตัวอย่าง)				0	10	10	18
รวมตัวอย่างทั้งหมด (179 ตัวอย่าง)				35	55	52	37

ผลวิเคราะห์โลหะหนักในสัตว์น้ำ จำนวน 179 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อน ตะกั่ว 61 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 34.1% ปริมาณอยู่ในช่วง 0.05 - 0.45 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แคดเมียมปนเปื้อน 10 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 5.6 ปริมาณอยู่ในช่วง 0.03 - 0.21 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และปรอทปนเปื้อน 159 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 88.8 ปริมาณอยู่ในช่วง 0.01 - 1.63 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณเฉลี่ยของ ตะกั่ว แคดเมียม และปรอทในปลาเท่ากับ 0.10 ± 0.08 , 0.04 ± 0.01 และ 0.13 ± 0.17 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ ปริมาณเฉลี่ยของ ตะกั่ว แคดเมียม และปรอทในกุ้ง เท่ากับ 0.08 ± 0.03 , 0.08 ± 0.07 และ 0.08 ± 0.11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานพบปรอทเกินมาตรฐาน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.7 เป็นปลา 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.4) คือ ปลาสลาด ปลาหมอ ปริมาณที่พบ เท่ากับ 1.63 และ 0.84 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และกุ้ง 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.6) คือ กุ้งหัวมันปริมาณที่พบเท่ากับ 0.57 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 2)

เมื่อจำแนกสัตว์น้ำตามลักษณะอาหารที่กิน พบว่าปลามีการปนเปื้อนตะกั่วและปรอทสูงสุดในปลากินสัตว์รองลงมาคือ ปลากินพืชและสัตว์ และปลากินพืช ตามลำดับ ส่วนแคดเมียมพบเฉพาะในปลากินสัตว์ สำหรับกุ้งพบการปนเปื้อนแคดเมียมสูงกว่าโลหะอื่นและในปริมาณที่สูงกว่าในปลา (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ปริมาณเฉลี่ยและค่ามัธยฐาน ของตะกั่ว แคดเมียม และปรอทในสัตว์น้ำที่อาศัยอยู่ในทะเลสาบสงขลา

ชนิด	จำนวน ตัวอย่าง	ปริมาณโลหะหนักปนเปื้อน (มก./กก.)								
		ตะกั่ว			แคดเมียม			ปรอท		
		ต่ำสุด - สูงสุด (ร้อยละที่พบ)	เฉลี่ย $\pm$ SD	มัธยฐาน	ต่ำสุด - สูงสุด (ร้อยละที่พบ)	เฉลี่ย $\pm$ SD	มัธยฐาน	ต่ำสุด - สูงสุด (ร้อยละที่พบ)	เฉลี่ย $\pm$ SD	มัธยฐาน
สัตว์น้ำ ทั้งหมด	179	0.05 - 0.45 (34.1)	0.10 $\pm$ 0.07	0.08	0.03 - 0.21 (5.6)	0.07 $\pm$ 0.05	0.06	0.01 - 1.63 (88.8)	0.12 $\pm$ 0.16	0.08
ปลา	141	0.05 - 0.45 (34)	0.10 $\pm$ 0.08	0.08	0.03 - 0.05 (2.1)	0.04 $\pm$ 0.01	0.05	0.01 - 1.63 (92.9)	0.13 $\pm$ 0.17	0.08
กุ้ง	38	0.05 - 0.13 (34.2)	0.08 $\pm$ 0.03	0.07	0.03 - 0.21 (18.4)	0.08 $\pm$ 0.07	0.08	0.01 - 0.57 (73.7)	0.08 $\pm$ 0.11	0.04

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบค่ามัธยฐานของตะกั่ว แคดเมียม และปรอทในสัตว์น้ำจำแนกประเภทตามลักษณะอาหารที่กิน

ประเภท	จำนวนสัตว์น้ำ (ตัวอย่าง)	ค่ามัธยฐานของปริมาณโลหะหนักที่ปนเปื้อน (มก./กก.)		
		ตะกั่ว	แคดเมียม	ปรอท
ปลากินพืช	6	nd	nd	0.03
ปลากินพืชและสัตว์	33	0.06	nd	0.06
ปลากินสัตว์	102	0.08	0.05	0.10
กุ้ง	38	0.07	0.08	0.04

nd = not detected

ผลการศึกษาโลหะหนักปนเปื้อนในสัตว์น้ำแยกตามแหล่งที่อยู่อาศัยพบว่า สัตว์น้ำที่เก็บจากทะเลน้อย 35 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างปลาทั้งหมดประกอบด้วย ปลากินพืช 1 ตัวอย่าง ปลากินพืชและสัตว์ 10 ตัวอย่าง และ ปลากินสัตว์ 24 ตัวอย่าง พบค่าเฉลี่ยของตะกั่ว แคดเมียม และปรอทในปลา เท่ากับ 0.09 ± 0.04 , 0.05 และ 0.13 ± 0.16 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ พบปลากินสัตว์คือปลาหมอ มีปรอทปนเปื้อนเกินมาตรฐาน 1 ตัวอย่าง ปริมาณเท่ากับ 0.84 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังตารางที่ 4

สัตว์น้ำจากทะเลสาบตอนใน มีทั้งตัวอย่างปลาและกุ้ง รวมทั้งสิ้น 55 ตัวอย่าง แบ่งเป็นปลา 45 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ปลากินพืช 2 ตัวอย่าง ปลากินพืชและสัตว์ 9 ตัวอย่าง ปลากินสัตว์ 34 ตัวอย่าง และกุ้ง 10 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบปลามีค่าเฉลี่ยของตะกั่ว แคดเมียม และปรอท เท่ากับ 0.10 ± 0.08 , 0.05 และ 0.11 ± 0.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และกุ้งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.06 ± 0.01 , 0.12 ± 0.08 และ 0.06 ± 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ สัตว์น้ำทุกตัวมีค่าตะกั่ว แคดเมียม และปรอทอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ปริมาณเฉลี่ยและค่ามัธยฐาน ของตะกั่ว แคดเมียม และปรอทในสัตว์น้ำที่อาศัยอยู่ในทะเลน้อย ทะเลสาบตอนใน ทะเลสาบตอนกลางและทะเลสาบตอนนอก

แหล่งที่อยู่ ประเภทสัตว์น้ำ	จำนวน ตัวอย่าง	ปริมาณโลหะหนักปนเปื้อน (มก./กก.)								
		ตะกั่ว			แคดเมียม			ปรอท		
		ต่ำสุด - สูงสุด (ร้อยละที่พบ)	เฉลี่ย $\pm$ SD	มัธยฐาน	ต่ำสุด - สูงสุด (ร้อยละที่พบ)	เฉลี่ย $\pm$ SD	มัธยฐาน	ต่ำสุด - สูงสุด (ร้อยละที่พบ)	เฉลี่ย $\pm$ SD	มัธยฐาน
ทะเลน้อย	35									
ปลา	35	0.05 - 0.19 (28.6)	0.09 $\pm$ 0.04	0.08	0.05 (2.9)	0.05	0.05	0.02-0.84 (97.1)	0.13 $\pm$ 0.16	0.07
ทะเลสาบตอนใน	55									
ปลา	45	0.05 - 0.34 (37.8)	0.10 $\pm$ 0.08		0.05 (2.2)	0.05	0.05	0.01 - 0.39 (93.3)	0.11 $\pm$ 0.08	0.08
กุ้ง	10	0.05 - 0.06 (20.0)	0.06 $\pm$ 0.01	0.06	0.08 - 0.21 (30.0)	0.12 $\pm$ 0.08	0.08	0.02 - 0.17 (70.0)	0.06 $\pm$ 0.05	0.05
ทะเลสาบตอนกลาง	52									
ปลา	42	0.06 - 0.45 (38.1)	0.11 $\pm$ 0.10	0.08	0.03 (2.4)	0.03	0.03	0.01 - 1.63 (92.9)	0.16 $\pm$ 0.26	0.08
กุ้ง	10	0.05 - 0.10 (30.0)	0.07 $\pm$ 0.02	0.07	0.06 - 0.09 (20.0)	0.08 $\pm$ 0.02	0.08	0.01 - 0.11 (60.0)	0.05 $\pm$ 0.04	0.04
ทะเลสาบตอนนอก	37									
ปลา	19	0.04 - 0.34 (21.1)	0.08 $\pm$ 0.11	0.06	nd	nd	nd	0.02 - 0.16 (78.9)	0.04 $\pm$ 0.05	0.08
กุ้ง	18	0.04 - 0.13 (44.4)	0.08 $\pm$ 0.03	0.08	0.03 - 0.04 (11.1)	0.04 $\pm$ 0.01	0.04	0.01 - 0.57 (88.9)	0.09 $\pm$ 0.14	0.04

nd = not detected

สัตว์น้ำจากทะเลสาบสงขลาตอนกลาง มีทั้งตัวอย่างปลา และกุ้งรวมทั้งสิ้น 52 ตัวอย่าง แบ่งเป็นปลา 42 ตัวอย่าง ประกอบด้วยปลากินพืช 3 ตัวอย่าง ปลากินพืชและสัตว์ 9 ตัวอย่าง ปลากินสัตว์ 30 ตัวอย่าง และกุ้ง 10 ตัวอย่าง มีค่าเฉลี่ยของ ตะกั่ว แคดเมียม และปรอทในปลาเท่ากับ 0.11 ± 0.10 , 0.03 และ 0.16 ± 0.26 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับและ ในกุ้งเท่ากับ 0.07 ± 0.02 , 0.08 ± 0.02 และ 0.05 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ พบปลากินสัตว์คือ ปลาสาครมีปรอทปนเปื้อน 1.63 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเกินมาตรฐานถึง 3.26 เท่า (ตารางที่ 4)

สำหรับ ทะเลสาบตอนนอก มีทั้งตัวอย่างปลา และกุ้ง รวมทั้งสิ้น 37 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ปลา 19 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็น ปลากินพืชและสัตว์ 5 ตัวอย่าง ปลากินสัตว์ 14 ตัวอย่างและกุ้ง 18 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบปลา มีค่าเฉลี่ยของตะกั่วและปรอท เท่ากับ 0.08 ± 0.11 และ 0.04 ± 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ สำหรับ แคดเมียมตรวจไม่พบในปลาทุกตัวอย่าง ส่วนกุ้งมีค่าเฉลี่ยของ ตะกั่ว แคดเมียม และปรอทเท่ากับ 0.08 ± 0.03 , 0.04 ± 0.01 และ 0.09 ± 0.14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ พบกุ้ง 1 ตัวอย่าง มีค่าปรอท 0.57 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเกินมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) (ตารางที่ 4)

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการปนเปื้อน ตะกั่ว แคดเมียม และปรอทในปลาและกุ้งที่จับจากทะเลสาบสงขลา ทั้ง 4 ตอน พบปรอทปนเปื้อนในปลาที่จับจากทะเลน้อย ทะเลสาบตอนใน ทะเลสาบตอนกลาง และทะเลสาบตอนนอกสูงถึงร้อยละ 97.1, 93.3, 92.9 และ 78.9 ตามลำดับ ตะกั่วปนเปื้อนร้อยละ 28.6, 37.8, 38.1 และ 21.1 ตามลำดับ ส่วนแคดเมียมพบปนเปื้อนเพียง ร้อยละ 2.9, 2.2, 2.4 และ 0 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างกุ้งพบอัตราการปนเปื้อน ปรอทสูงที่สุดที่ทะเลสาบตอนนอก ร้อยละ 88.9 รองมาคือทะเลสาบตอนใน ทะเลสาบตอนกลางโดยพบ ร้อยละ 70.0 และ 60.0 ตามลำดับ ตะกั่วพบอัตราการปนเปื้อนสูงที่สุดที่ทะเลสาบตอนนอก ร้อยละ 44.4 รองลงมาคือทะเลสาบตอนกลาง และทะเลสาบตอนใน โดยพบ ร้อยละ 30.0 และ 20.0 ตามลำดับ ส่วนแคดเมียมพบอัตราการปนเปื้อนในกุ้งจากทะเลสาบตอนใน ทะเลสาบตอนกลาง และทะเลสาบตอนนอก ร้อยละ 30.0, 20.0 และ 11.1 ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

การประเมินความเสี่ยงต่อการบริโภค โดยศึกษาความเป็นอันตราย ลักษณะของอันตรายและค่าความปลอดภัยจากเอกสารทั้งในประเทศและต่างประเทศ พบว่าตะกั่วมีอันตรายต่อระบบประสาททำให้เป็นอัมพาต ไตอักเสบ โลหิตจาง ล่าสุด Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) ยกเลิกค่าความปลอดภัยที่กำหนดคือ $PTWI = 25 \mu\text{g/kg.bw./week}$ เนื่องจากมีผลให้ IQ เด็กลดลง 3 จุด และความดันโลหิตในผู้ใหญ่เพิ่มขึ้น 3 มิลลิเมตรปรอท^(2,14) และไม่กำหนดค่าใหม่ คณะกรรมการ FAO/WHO มีความเห็นว่าการที่ได้รับสัมผัสตะกั่ว $1.2 \mu\text{g/kg.bw./day}$ ทำให้ความดันโลหิตสูง ขึ้น 1 mmHg นั้นถือว่าทำให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของประชากร ดังนั้นผู้วิจัยและคณะ พิจารณาแล้วมีความเห็นว่าเหมาะสมที่จะใช้ค่านี้เป็น end point และ ใช้ค่า uncertainty factor เท่ากับ 2 (จากข้อมูลการเพิ่มขึ้นของความดันโลหิตในผู้ใหญ่เป็น end point (LOEL) เท่ากับ 1 และ ความแตกต่างระหว่างมนุษย์ เท่ากับ 1) ได้ค่าความปลอดภัย เท่า $0.6 \mu\text{g/kg.bw/day}$ หรือ $32.72 \mu\text{g/คน/วัน}$ ซึ่งผู้วิจัยจะใช้อ้างอิงในการประเมินความเสี่ยงในรายงานฉบับนี้ สำหรับแคดเมียมมีผลทำให้กระดูกพรุน หักง่าย มีผลต่อไต โลหิตจางเรื้อรัง WHO จัดเป็นสารก่อมะเร็งและกำหนดค่า $PTMI = 25 \mu\text{g/kg.bw/month}$ ⁽²⁾ หรือ $45.44 \mu\text{g/คน/วัน}$ สำหรับปรอทที่มีความจำเพาะสูงในการจับกับ หมู่ Sulfhydryl ในโปรตีนของปลา⁽¹⁵⁾ โดยปรอทในปลาส่วนใหญ่สะสมอยู่ในรูปเมทิลเมอร์คิวรี ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่เป็นพิษมากที่สุดและการปรุงอาหารไม่ทำลายพิษได้⁽¹⁶⁾ มีพิษต่อระบบประสาท ไต การพัฒนาตัวอ่อน ระบบทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร ระบบหมุนเวียน โลหิต ระบบภูมิคุ้มกันและสืบพันธุ์ JECFA กำหนดค่าความปลอดภัย, $PTWI$ ของ Methyl mercury = $1.6 \mu\text{g/kg.bw/week}$ ⁽³⁾ หรือ $12.46 \mu\text{g/คน/วัน}$

ผลการคำนวณการได้รับสัมผัส ตะกั่ว แคดเมียมและปรอท และประเมินความปลอดภัยจากการบริโภค ปลาและกุ้ง ได้จากการนำค่ามัธยฐานของปริมาณโลหะหนัก ตะกั่ว แคดเมียมและปรอทที่ตรวจพบคูณกับปริมาณการบริโภคปลาและกุ้งทะเลของคนไทยที่มีอายุ 3 ปีขึ้นไป และเฉพาะผู้ที่บริโภค (eater only) ใช้ระดับการบริโภคสูงสุดคือ 97.5 Percentile เพื่อให้สามารถคุ้มครองประชากรที่บริโภคปริมาณมากได้ ซึ่ง เท่ากับ 128 และ 72 กรัมต่อคนต่อวันสำหรับปลาและกุ้งตามลำดับ (อ้างอิงจากข้อมูลการบริโภคอาหารของประเทศไทย 2549)⁽¹²⁾ ได้ปริมาณสัมผัสตะกั่ว แคดเมียมและปรอทดังตารางที่ 5 พบผู้บริโภคได้รับตะกั่วและปรอทสูงที่สุดเท่ากับ 10.24 และ $10.24 \mu\text{g/คน/วัน}$ ตามลำดับ แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่าความปลอดภัยของโลหะหนักแต่ละชนิดแล้ว พบว่ามีค่า Margin of safety (MOS) ของตะกั่ว แคดเมียม และปรอทในปลาเท่ากับ 0.31, 0.17 และ 0.82 ตามลำดับ และในกุ้งเท่ากับ 0.15, 0.13 และ 0.23 ตามลำดับซึ่งทุกค่ามีค่าน้อยกว่า 1 ทั้งหมด อธิบายลักษณะความเสี่ยงได้ว่าผู้บริโภคปลาและกุ้งที่จับจากทะเลสาบสงขลา ยังคงปลอดภัยจาก ตะกั่ว แคดเมียม และปรอทเนื่องจากปริมาณโลหะที่ได้รับจากการบริโภคปลาและกุ้งยังคงต่ำกว่าค่าความปลอดภัย

ตารางที่ 5 การประเมินการได้รับสัมผัส ตะกั่ว แคดเมียม และปรอท และความปลอดภัย จากการบริโภคปลา และกุ้งจากทะเลสาบสงขลา

ประเภทสัตว์น้ำ	โลหะ	ปริมาณที่พบ ค่ามัธยฐาน ($\mu\text{g/g}$)	ปริมาณที่บริโภค (g/person/day)*	ปริมาณที่ได้รับสัมผัส ($\mu\text{g/person/day}$)**	MOS (margin of safety)
ปลา	ตะกั่ว	0.08		10.24	0.31
	แคดเมียม	0.05	128	7.68	0.17
	ปรอท	0.08		10.24	0.82
กุ้ง	ตะกั่ว	0.07		5.04	0.15
	แคดเมียม	0.08	72	5.76	0.13
	ปรอท	0.04		2.88	0.23

*ปริมาณการบริโภคกลุ่ม eater only ที่ Percentile 97.5, **น้ำหนักเฉลี่ยของคนไทย = 54.53 Kg

วิจารณ์

การศึกษาเกี่ยวกับการปนเปื้อนตะกั่ว ปรอท และแคดเมียมในสัตว์น้ำจากทะเลสาบสงขลาที่ผ่านมายังมีน้อย และเป็นการศึกษาในปลาบางชนิด และส่วนใหญ่ศึกษาเฉพาะปรอทในทะเลสาบตอนนอก สำหรับการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำได้ครบทุกชนิดเช่นกัน เนื่องจากเก็บได้เฉพาะปลาและกุ้งที่มีปริมาณมากและนิยมบริโภค ไม่สามารถเก็บปูและหอยได้ เพราะมีปริมาณที่จับได้น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบค่าปรอทที่ตรวจพบในสัตว์น้ำจากทะเลสาบสงขลาทั้ง 4 ตอนในครั้งนี มีปริมาณเฉลี่ย 0.12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งสูงกว่าที่พบ ในปี 2549 ที่มีค่าปรอทปนเปื้อนเฉลี่ย 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม⁽¹⁷⁾ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณตะกั่วและปรอทกับเกณฑ์มาตรฐานอาหารปนเปื้อนตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 และแคดเมียมตามมาตรฐานสหภาพยุโรป EC No 1881/2006 พบว่าสัตว์น้ำมีโลหะปนเปื้อนอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานร้อยละ 98 การศึกษาในครั้งนี้พบปรอทในปลามากที่สุด ทั้งนี้สาเหตุอาจเนื่องจากการกำจัดปรอทออกจากตัวปลาเป็นไปได้ช้ามาก เมื่อเทียบกับอัตราการรับเข้าไปจึงเป็นผลให้ปรอทเพิ่มขึ้นตามอายุหรือขนาดของปลานั้น⁽¹⁵⁾ นอกจากนี้ขึ้นกับลักษณะการกินอาหารของปลา ปลากินสัตว์ เช่น ปลาตัวเล็กเป็นอาหารจะมีโลหะสะสมสูงกว่าปลาหรือสัตว์น้ำที่กินพืชเป็นอาหาร⁽¹⁷⁾ ผู้บริโภคปลา และผลิตภัณฑ์ที่ทำจากปลาเป็นประจำ จึงมีโอกาสได้รับพิษจากเมทิลเมอร์คิวรีได้ อย่างไรก็ตามการได้รับปรอทเข้าสู่ร่างกายผ่านการบริโภคปลานั้นขึ้นอยู่กับอัตราการบริโภคปลาของแต่ละบุคคลและชนิดของปลาด้วย⁽¹⁸⁾ ผู้บริโภคปลาปริมาณสูงและปลาที่มีการปนเปื้อนปรอทในปริมาณสูงจะมีโอกาสได้รับอันตรายจากพิษปรอทได้ ส่วนแคดเมียมพบในกุ้งสูงกว่าปลา เพราะแคดเมียมมีความจำเพาะกับโปรตีนในสัตว์ที่มีเปลือกหุ้ม (shellfish)⁽¹⁹⁾ เมื่อจำแนกสัตว์น้ำตามถิ่นที่อยู่อาศัยคือ ทะเลน้อย ทะเลสาบตอนใน ทะเลสาบตอนกลาง และทะเลสาบตอนนอก พบอัตราการปนเปื้อนปริมาณปรอทในสัตว์น้ำที่เก็บจากทะเลน้อยมากที่สุดถึงร้อยละ 97.14 ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ที่ตรวจพบอัตราการปนเปื้อนปรอทในสัตว์น้ำที่เก็บจากทะเลน้อยมากที่สุดเช่นเดียวกัน สาเหตุจากทะเลน้อยมีตะกอนสารอินทรีย์สะสมอยู่มาก จึงเป็นสาเหตุให้มีการสะสมสารปรอทในตะกอนสูงกว่าทะเลสาบสงขลาตอนอื่นอย่างมีนัยสำคัญ⁽²⁰⁾ ส่วนกุ้งพบปรอทและตะกั่วปนเปื้อนในกุ้งที่เก็บจากทะเลสาบสงขลาตอนนอกมากกว่าส่วนอื่น ๆ อาจเนื่องมาจากทะเลสาบสงขลาตอนนอกมีตะกอนสะสมปริมาณสูงเช่นเดียวกันและจากการสำรวจเพื่อขุดลอกตะกอนในทะเลสาบสงขลาตอนนอกได้ตรวจพบบางจุดของทะเลสาบสงขลาตอนนอกมีปรอทเกินเกณฑ์กำหนด⁽⁶⁾

แม้ผลการศึกษานี้พบว่าความเสี่ยงของโลหะหนักในสัตว์ทะเลที่เก็บจากทะเลสาบสงขลาต่อคนไทยที่บริโภคยังอยู่ในเกณฑ์ปลอดภัยก็ตาม แต่ปริมาณปรอทที่ปนเปื้อนในปลาบางชนิดค่อนข้างสูงและปริมาณปรอทที่ได้รับจากการบริโภคปลาในแต่ละวันคิดเป็นร้อยละ 82 ของค่าความปลอดภัย ซึ่งจัดอยู่ในระดับค่อนข้างสูง หากผู้บริโภคเป็นเด็กหรือสตรีมีครรภ์ และมีการบริโภคอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานอาจได้รับอันตรายจากสารปรอทได้ จากค่ามัธยฐานของปรอทในปลาเท่ากับ 0.08 ไมโครกรัมต่อกรัม และประมาณว่าร้อยละ 90 ของปรอทที่ปนเปื้อนในปลาอยู่ในรูปปรอทอินทรีย์⁽²⁰⁾ พบว่าผู้บริโภคไม่ควรบริโภคปลาที่จับจากทะเลสาบสงขลาเกิน 1,200 กรัม ต่อคนต่อสัปดาห์ หรือไม่เกิน 170 กรัม ต่อคนต่อวัน (คิดในรูปปลาสด) จากข้อมูลนี้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องอาจให้คำแนะนำแก่ประชาชนที่อาศัยอยู่บริเวณทะเลสาบสงขลาและบริโภคปลาที่จับจากทะเลสาบสงขลาเป็นประจำ ให้บริโภคอาหารให้หลากหลายชนิด และควรบริโภคเนื้อสัตว์อื่นร่วมด้วย เช่น ไข่ เนื้อ เป็นต้น ก็ช่วยลดการได้รับสารปรอทให้ต่ำลงได้ การประเมินความเสี่ยงของโลหะหนักครั้งนี้ใช้ข้อมูลการบริโภคของคนไทยในการคำนวณซึ่งไม่ใช่ข้อมูลปริมาณบริโภคสัตว์น้ำจากทะเลสาบสงขลา ผู้วิจัยมีความเห็นว่าควรศึกษาข้อมูลปริมาณบริโภคสัตว์น้ำจากทะเลสาบสงขลาของประชาชนที่อยู่รอบทะเลสาบสงขลา เพื่อนำมาคำนวณหาปริมาณที่ได้รับสัมผัสและแนะนำปริมาณบริโภคสัตว์น้ำได้ถูกต้องกว่าข้อมูลการบริโภคของคนไทยซึ่งไม่ได้ระบุเจาะจงว่าเป็นสัตว์น้ำจากทะเลสาบสงขลา แต่นำมาประเมินความปลอดภัยในการบริโภคสัตว์น้ำจากทะเลสาบสงขลา ดังนั้นในการป้องกันมิให้เกิดปัญหาในอนาคต จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องพิจารณาจัดทำข้อมูลปริมาณการบริโภคสัตว์น้ำจากทะเลสาบสงขลาเพื่อนำมาประเมินความเสี่ยงตะกั่ว แคดเมียมและปรอทจากการบริโภคสัตว์น้ำจากทะเลสาบสงขลา และเร่งรัดหาแนวทางในการจัดการสิ่งแวดล้อมและควบคุมการปนเปื้อน ตะกั่ว แคดเมียม และปรอท ในพื้นที่ลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลาอย่างเป็นรูปธรรมต่อไป

สรุป

การปนเปื้อน ตะกั่ว แคดเมียมและปรอท ในปลาและกุ้งจากทะเลสาบสงขลา ส่วนใหญ่ร้อยละ 98 อยู่ในระดับไม่เกินเกณฑ์มาตรฐาน เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในอดีตพบปรอทเพิ่มขึ้นประมาณ 20% แต่เมื่อประเมินความปลอดภัยจากการบริโภคพบว่าอยู่ในระดับปลอดภัย แม้ว่าการปนเปื้อนตะกั่ว แคดเมียมและปรอท ที่สะสมในสัตว์น้ำที่จับจากทะเลสาบสงขลาจะยังไม่อยู่ในระดับที่เป็นพิษเฉียบพลันต่อการบริโภค แต่การปนเปื้อนปรอทในปลาค่อนข้างสูง และปรอทจะสะสมผ่านห่วงโซ่อาหารจะเพิ่มความเสี่ยงต่อผู้บริโภค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กและสตรีมีครรภ์ที่บริโภคปลาที่ปนเปื้อนปรอทอย่างต่อเนื่องอาจมีความเสี่ยงได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางลัดดาวัลย์ โรจนพรหมทิพย์ ที่ปรึกษาสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และนางสาวธาริยา เสาวรัญ ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา ที่ให้คำปรึกษาและให้การสนับสนุนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. จิราภา อุณหเลขกะ, และคณะ. การศึกษาปริมาณตะกั่ว แคดเมียม ดีบุก และปรอท ที่ปนเปื้อนในหอยแครงและหอยแมลงภู่วิเวณอ่าวไทยตอนใน ปี 2552. วารสารอาหารและยา 2552; 18(2): 15-22.
2. JECFA. Evaluation of certain food additives and contaminants. Seventy-third report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives, Technical report series 960. Geneva: World Health Organization; 2011.

3. JECFA. Evaluation of certain food additives and contaminants: Sixty-seventh report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives, Technical report series 940. Geneva: World Health Organization, 2007.
4. จงจิตร นีรนาทเมธิกุล. บันทึกทะเลสาบ ผลการศึกษาโครงการชุดลอกร่องน้ำทางเรือเดินในทะเลสาบสงขลา (ร่องใน). วารสารเมืงทราย 2554; 7(1): 6-7.
5. สำนักสิ่งแวดล้อมภาคที่ 16. คุณภาพน้ำแหล่งน้ำผิวดินในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างฝั่งตะวันออก ครั้งที่ 1 ประจำปีงบประมาณ 2556. [ออนไลน์]. 2558; [สืบค้น 9 ม.ค.2558]; [19 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://www.reo16.mnre.go.th/reo16/doc_announce/list.
6. กัลยา วานิชย์บัญชา. การวิเคราะห์สถิติ : สถิติสำหรับการบริหารและวิจัย พิมพ์ครั้งที่ 7. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2546.
7. Ihnat M., Determination of lead, cadmium, zinc, copper and iron in foods. Atomic absorption spectrophotometry after microwave digestion. In: George W.L., editor. Official Methods of Analysis of AOAC International. 19th ed. Gaithersburg: AOAC International; 2012. AOAC Official Method 999.10, p. 16-19.
8. Ihnat M., Mercury in fish. In: George W.L., editor. Official Methods of Analysis of AOAC International. 19th ed. Gaithersburg: AOAC International; 2012. AOAC Official Method 974.14, p. 37.
9. กัลยา วานิชย์บัญชา. การใช้ SPSS for Windows ในการวิเคราะห์ข้อมูล. พิมพ์ครั้งที่ 6. กรุงเทพฯ : คณะพาณิชยศาสตร์และการบัญชี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2547.
10. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529). ราชกิจจานุเบกษา ฉบับพิเศษ เล่มที่ 103 ตอนที่ 23 (วันที่ 16 กุมภาพันธ์ 2529).
11. European Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union 2006; L 364/5-24.
12. สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. ข้อมูลการบริโภคอาหารของประเทศไทย. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การแห่งประเทศไทย; 2549.
13. ศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยตอนล่าง กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. ปลาในลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลา. กรุงเทพฯ : โอดีโซน์; 2552.
14. World Health Organization. Evaluations of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA) LEAD. [online]. 2015; [cited 2015 Jun 11]; [1 screen]. Available from: URL: <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=3511>
15. Spry D.J., Wiener J.G. Metal bioavailability and toxicity to fish in low-alkalinity lakes: a critical review. Environ Pollut 1991; 71(2-4): 243-304.
16. UNEP and WHO. Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. Geneva, Switzerland: Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases; 2008.
17. สุทาร์ตน์ สุขพันธ์. ปริมาณปรอทในเนื้อเยื่อสัตว์น้ำในทะเลสาบสงขลา. [วิทยานิพนธ์]. สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม, คณะบัณฑิตวิทยาลัย. สงขลา : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2549.
18. Boischio A.A., Henshel D. Fish consumption, fish lore and mercury pollution-risk communication for the Madeira River people. Environ Res Section A 2000; 84(2): 108-26.
19. Koli A.K., Sandhu S.S., Whitmore R., Disher A., Lagroon H. Comparative study of cadmium levels of shellfish and Finfish species. Environment international 1980; 4(5-6): 439-41.
20. Sompongchaiyakul P., Sirinawin W. Arsenic, chromium and mercury in surface sediment of Songkhla Lake system, Thailand. Asian J Water Environ Pollution 2007; 4(1): 17-24.

Risk Assessment of Heavy Metals in Fish and Shrimp from Songkhla Lake to Thais

Sudchada Sornprasit* Kingkeaw Kanchanarat* and Aranya Assava-aree**

*Regional Medical Sciences Center 12 Songkhla, Department of Medical Sciences Amphoe Maung, Songkhla 90000, Thailand.

**Coastal Aquaculture Research and Development Center Region 6 Songkhla, Department of Fisheries Amphoe Maung, Songkhla 90000, Thailand.

ABSTRACT The Songkhla Lake (SKL) is an important source of seafood. However, the water pollution of SKL makes people aware about the safety for seafood consumption. Hence, in February–May 2015 The Regional Medical Sciences Center 12 Songkhla co-operate with Coastal aquaculture research and development center region 6 Songkhla collected 179 samples of aquatic animals, including 38 species (141 samples) of fish and 5 species (38 samples) of shrimp. All of samples were analyzed for lead (Pb) and cadmium (Cd) content by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer, and mercury (Hg) by Mercury Analyzer. The results showed that the contamination of Pb, Cd and Hg in seafood were 34.1%, 5.6% and 88.8%, respectively, the amount of metals were ranging from 0.05 – 0.45, 0.03 – 0.05 and 0.01 – 1.63 mg/kg, respectively for fishes and ranging from 0.05 – 0.13, 0.03 – 0.21 and 0.01 – 0.57 mg/kg, respectively for shrimps. The level of Pb, Cd and Hg in most samples (98%) were within regulatory limits, except Bronze feather back, Climbing perch and Stork shrimp (one sample per species) contained 1.63, 0.84 and 0.57 mg/kg of mercury respectively, which higher than Thai regulatory limit (≤ 0.5 mg/kg). Although the exposure assessment of heavy metals in aquatic animal still safe to Thais but the level of Hg exposure was 82 percent of safety level and the level of Hg content in fishes were rather high. Therefore, the continuous consumption of fish from SKL may increase the risk to consumers.

Key words: Lead, Cadmium, Mercury, Aquatic animals, Songkhla Lake

ความสัมพันธ์ของค่านับวัดกับค่าพลังงาน สำหรับงานรังสีวินิจฉัย

ยุทธนา บางม่วง และสิริชัย เขียวรัตนกุล

สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ปัจจุบันมีการนำรังสีมาใช้อย่างแพร่หลายในงาน รวมถึงด้านการแพทย์ที่มีการนำรังสีมาใช้ในการวินิจฉัยและรักษาผู้ป่วย ดังนั้นการวัดปริมาณรังสีจึงมีความสำคัญต่อการเฝ้าระวังอันตรายจากรังสีต่อทั้งผู้ปฏิบัติงานและผู้ป่วย โดยแผ่นวัดรังสีไอออนอสแตทรุ่น InLight-LDR Model 2 เป็นแผ่นวัดรังสีบุคคล ประกอบด้วยผลึก Al_2O_3 ที่เจือด้วยสาร C ทั้งหมด 4 ผลึก ที่อยู่ในช่องบรรจุที่มีตัวกรองในการวัดปริมาณรังสี ซึ่งมีหน้าที่ในการกรองรังสีแตกต่างกันในแต่ละช่อง เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณรังสีบุคคลในเทอมของปริมาณรังสียังผล (effective dose), ปริมาณรังสีสมมูลที่ผิวหนัง และปริมาณรังสีสมมูลที่เลนส์ตา รวมถึงแยกแยะชนิดของรังสีจากค่านับวัดจากผลึก Al_2O_3 ในแต่ละช่อง ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ของค่านับวัดและพลังงานของรังสีเอกซ์จากรังสีทั้งแบบ N-Series และ RQR แล้วนำมาเปรียบเทียบค่านับวัดในช่วงระดับพลังงานของงานรังสีวินิจฉัย ซึ่งจากการศึกษาพบว่าความสัมพันธ์ของอัตราส่วนของค่านับวัดที่ E2/E1 จะมีค่าใกล้เคียงกัน ประมาณ 1.0 ตามพลังงานเฉลี่ยของเอกซเรย์ แต่จะมีการเปลี่ยนแปลงมากที่อัตราส่วนของค่านับวัดที่ E3/E1 และ E4/E1 ที่จะเพิ่มขึ้นตามพลังงานของเอกซเรย์ ซึ่งสามารถนำผลที่ได้มาใช้ในการจำแนกพลังงาน โดยเทียบจากกราฟความสัมพันธ์ของค่าอัตราส่วนของค่านับวัดที่ E3/E1 และ E4/E1 กับพลังงานเฉลี่ยของคุณภาพรังสีที่ต้องการศึกษา ซึ่งสามารถบ่งบอกถึงค่าพลังงานเฉลี่ยและสามารถนำไปใช้ร่วมกับการศึกษาค่าปริมาณรังสีที่ผู้ป่วยได้รับจากงานรังสีวินิจฉัย และการศึกษาปริมาณรังสีที่เลนส์ตาสำหรับบุคลากรในงานรังสีร่วมรักษา ต่อไป

Accepted for publication, 19 August 2016

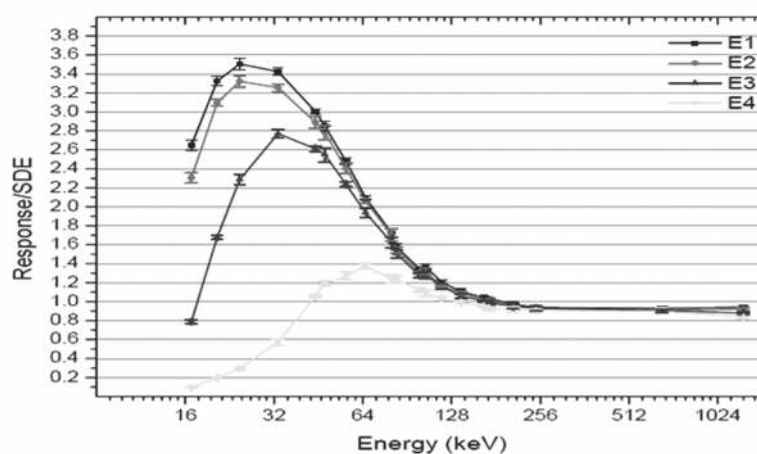
บทนำ

ในปัจจุบันมีการนำรังสีมาใช้ประโยชน์ในงานหลายๆ ด้าน รวมถึงด้านการแพทย์ที่นำรังสีมาใช้ในการตรวจวินิจฉัย และรักษา ซึ่งในงานรังสีวินิจฉัยจะนำเครื่องกำเนิดรังสีที่ปล่อยรังสีเอกซ์ในการวินิจฉัยโรค เช่น เครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ (CT) เครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป เครื่องเอกซเรย์ฟลูออโรสโคป เป็นต้น รวมถึงการร่วมในการรักษาในงานรังสีร่วมรักษา (interventional radiology) ซึ่งการได้รับรังสีของผู้ปฏิบัติงานส่วนใหญ่เกิดจากรังสีกระเจิงจากตัวผู้ป่วยในการรักษา ซึ่งไม่ใช่การได้รับรังสีโดยตรง ดังนั้นในการศึกษาค่าปริมาณรังสีในงานรังสีวินิจฉัยจะต้องมีการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ รวมถึงพลังงานของรังสีเอกซ์ที่กระเจิงออกมา วิธีการวัดปริมาณรังสีในงานรังสีวินิจฉัยจะมีการสอบเทียบเครื่องมือวัด และเครื่องมือตรวจสอบคุณภาพเครื่องที่ฉายด้วยลำรังสีแบบ RQR แตกต่างจากการสอบเทียบแผ่นวัดรังสีบุคคลที่ฉายรังสีแบบ N-Series

การวัดค่าปริมาณรังสีสมมูลที่บุคลากรด้านรังสีได้รับเป็นส่วนหนึ่งในการป้องกันไม่ให้เกิดผลกระทบที่ปฏิบัติงานด้านรังสีได้รับปริมาณรังสีเกินค่าขีดจำกัดจนเป็นอันตรายต่อสุขภาพ ทั้งนี้เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดโดยคณะกรรมการป้องกันอันตรายจากรังสีระหว่างประเทศ (International Commission on Radiation Protection: ICRP) ใน ICRP Publication 103⁽¹⁾ การวัดปริมาณรังสีที่บุคคลได้รับประเมินจากการใช้แผ่นวัดรังสีโอเอสแอล (Optically Stimulated Luminescence Dosimeter: OSLD) ซึ่งสามารถประเมินค่าปริมาณสมมูลจากสนามรังสีเอกซ์แกมมา ปีตา และนิวตรอนได้ โดยขึ้นอยู่กับรุ่นของแผ่นวัดรังสีที่ใช้ และยังสามารถนำแผ่นวัดรังสีโอเอสแอลมาใช้ในการวิจัย หรือศึกษาค่าปริมาณรังสีที่บุคลากรและผู้ป่วยได้รับจากการวินิจฉัยและรักษาได้

แผ่นวัดรังสีโอเอสแอลเป็นผลึกของ Al_2O_3 ที่เจือด้วย C ซึ่งมีคุณสมบัติในการตอบสนองต่อรังสี และเมื่อนำมากระตุ้นด้วยแสงสีเขียวจากหลอด LED (ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร) ก็จะมีการเปลี่ยนแปลงพลังงานภายในและปลดปล่อยออกมาในรูปของการเรืองแสง เรียกปฏิกิริยานี้ว่า Optical Stimulated luminescence⁽²⁾ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการประเมินค่าปริมาณรังสีบุคคล โดยทั่วไปจะมีอยู่ 2 รุ่น ที่ใช้ในงานรังสีวินิจฉัย คือ รุ่น InLight - LDR Model 2 ใช้สำหรับการประเมินค่าปริมาณรังสีในเทอมของ Hp(10), Hp(0.07) และ Hp(3) ส่วนรุ่น nanoDot ใช้สำหรับการประเมินค่าปริมาณรังสีเฉพาะตำแหน่งในเทอมของ Hp(0.07) หรือ Absorbed dose

ผลึก Al_2O_3 ที่เจือด้วย C มีคุณสมบัติการตอบสนองต่อรังสี ตั้งแต่ช่วงพลังงาน 5 keV ถึง 20 MeV สำหรับโฟตอน⁽²⁾ (ภาพที่ 1) โดยแสดงการตอบสนองต่อพลังงานของผลึก Al_2O_3 ที่เจือด้วย C ที่ผ่านตัวกรองแต่ละตัว โดยเฉพาะช่วงพลังงานต่ำจะมีการเปลี่ยนแปลงสูง และตั้งแต่ช่วงพลังงานสูงกว่า 120 keV ค่าการตอบสนองของผลึก Al_2O_3 ที่เจือด้วย C จะเป็นเริ่มเป็นเส้นตรง ซึ่งเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการวัดค่าปริมาณรังสีบุคคล



ภาพที่ 1 กราฟแสดงการตอบสนองต่อพลังงานของผลึก Al_2O_3 ที่เจือด้วย C ที่ผ่านตัวกรองแต่ละตัว⁽²⁾

หมายเหตุ E1 คือ คำนับวัดของผลึก Al_2O_3 ที่เจือด้วย C ผ่านตัวกรองที่เป็น Open window (OW)

E2 คือ คำนับวัดของผลึก Al_2O_3 ที่เจือด้วย C ผ่านตัวกรองที่เป็นพลาสติก (PL)

E3 คือ คำนับวัดของผลึก Al_2O_3 ที่เจือด้วย C ผ่านตัวกรองที่เป็นอะลูมิเนียม (Al)

E4 คือ คำนับวัดของผลึก Al_2O_3 ที่เจือด้วย C ผ่านตัวกรองที่เป็นทองแดง (Cu)

โดยในช่วงพลังงานต่ำเป็นช่วงที่ใช้ในงานรังสีวินิจฉัยเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเป็นเครื่องกำเนิดรังสีที่ให้พลังงานอยู่ในช่วง 15 keV ถึง 100 keV ในการสอบเทียบแผ่นวัดรังสีส่วนใหญ่จะใช้ลำรังสีแบบ N-Series ซึ่งมีลักษณะสเปกตรัมของพลังงานแคบ ซึ่งแตกต่างการสอบเทียบเครื่องวัดทางรังสีวินิจฉัยที่มีการใช้ลำรังสีแบบ RQR มีลักษณะสเปกตรัมของพลังงานกว้าง ซึ่งมีความใกล้เคียงกับสเปกตรัมของการใช้งานจริงในงานรังสีวินิจฉัย

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์กันของค่านับวัดและพลังงานของรังสีเอกซ์จากลำรังสีทั้งสองแบบ และเปรียบเทียบค่านับวัดตามระดับพลังงานของรังสีเอกซ์ ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาค่าปริมาณรังสีสมมูลที่บุคลากรด้านรังสี และผู้ป่วยได้รับ

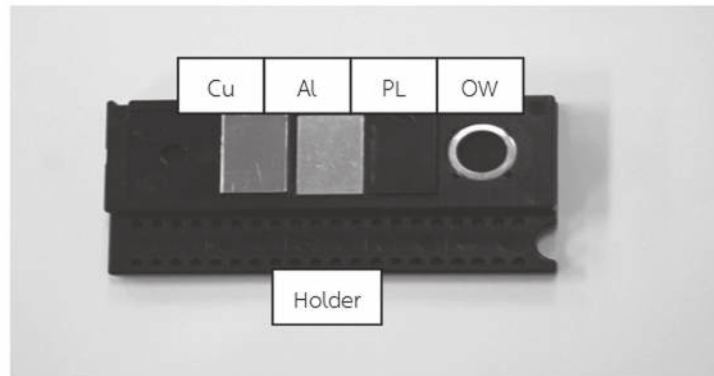
วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือ

1. แผ่นวัดรังสีไอเอสแอลรุ่น InLight-LDR Model 2 (ภาพที่ 2) ประกอบด้วย ผลึกของ Al_2O_3 ที่เจือด้วย C จำนวน 4 ผลึก และช่องบรรจุ (holder) ที่มีตัวกรองจำนวน 4 ช่อง (ภาพที่ 3) ซึ่งมีความหนาแน่นต่อพื้นที่ และการมีหน้าที่ในการประเมินรังสีแตกต่างกันตามคุณสมบัติของวัสดุที่นำมาใช้เป็นตัวกรอง ซึ่งสามารถประเมินปริมาณรังสีเอกซ์, แกมมา และบีตาได้ (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 2 แผ่นวัดรังสีไอเอสแอล รุ่น InLight-LDR Model 2



ภาพที่ 3 ตัวกรองที่อยู่บนช่องบรรจุผลึกของ Al_2O_3 ที่เจือด้วย C จำนวน 4 ผลึกที่อยู่ด้านใน

ตารางที่ 1 รายละเอียดของตัวกรองทั้ง 4 ช่อง บนช่องบรรจุแผ่นวัดรังสีไอเอสแอล รุ่น InLight - LDR Model 2

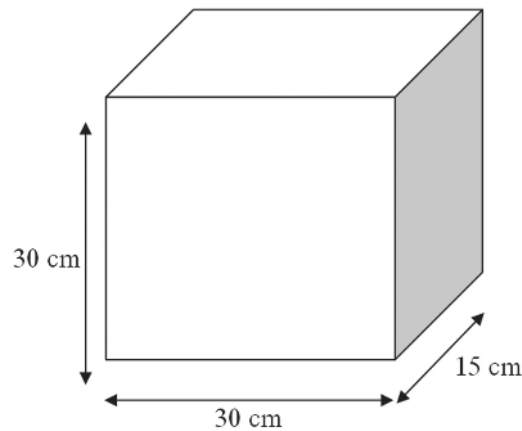
Position (primary filter)	Filtration (approx $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Use
OW (open window)	29	Beta response
PL (plastic)	275	Beta characterization photon response
Al (aluminum)	375	Photon characterization
Cu (copper)	545	Photon response and characterization

2. เครื่องอ่านรุ่นอัตโนมัติรุ่น InLight 200A (ภาพที่ 4) มีระบบควบคุมการทำงานในการอ่านแผ่นวัดรังสี ซึ่งประกอบด้วย หลอด LED สีเขียว เพื่อใช้ในการประเมินปริมาณรังสี โดยใช้ 6 หลอด สำหรับค่าปริมาณรังสี สูงกว่า 150 มิลลิซีเวิร์ต และ 36 หลอด สำหรับค่าปริมาณรังสีต่ำกว่า 150 มิลลิซีเวิร์ต รวมถึงหลอดทวีคูณแสง (PMT) เพื่อขยายสัญญาณแสงสีน้ำเงินที่ปล่อยออกมา และแปรผลสัญญาณออกมาในหน่วยของ Counts



ภาพที่ 4 เครื่องอ่านแผ่นวัดรังสี ไอ เอส แอล ชนิดอัตโนมัติ รุ่น InLight 200A ที่ใช้ในการศึกษา

3. หุ่นจำลอง ขนาด $30 \times 30 \times 15$ cm ทำจากวัสดุ PMMA สำหรับการสอบเทียบแผ่นวัดรังสีบุคคล (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 PMMA slab phantom สำหรับการสอบเทียบแผ่นวัดรังสีบุคคล

4. เครื่องกำเนิดรังสีเอกซ์มาตรฐานยี่ห้อ GE รุ่น Isovolt Triton ที่คุณสมบัติของลำรังสีแบบ N-Series และ RQR (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 รายละเอียดของลำรังสีแบบ N-Series และ RQR ที่ใช้ในการฉายรังสีแผ่นวัดรังสีไอเอสแอล รุ่น-LDR Model 2^(3,4)

Hp(d)	RQ	Tube potential (kV)	Mean Energy (keV)	Conversion Coefficient
Hp(10)	N-60	60	48	1.65
	N-80	80	65	1.88
	N-100	100	83	1.88
	N-120	120	100	1.81
	N-150	148	118	1.73
	RQR4	60	34.44	0.79
	RQR6	80	41.64	0.91
	RQR8	100	48.64	1.06
	RQR9	120	56.2	1.24
	RQR10	150	66.56	1.55
Hp(0.07)	N-60	60	48	1.55
	N-80	80	65	1.72
	N-120	120	100	1.67
	RQR4	60	34.44	1.29
	RQR6	80	41.64	1.36
	RQR9	120	56.2	1.5

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่านับวัดของแผ่นวัดรังสีโอเอสแอล รุ่น InLight-LDR Model 2 บนหุ่นจำลอง PMMA จากลำรังสีแบบ N-Series และ RQR

จัดวาง หุ่นจำลอง PMMA บนแท่นวางสำหรับฉายรังสี แล้วตั้งระยะและตำแหน่งโดยใช้เลเซอร์ด้านข้าง ในการกำหนดระยะ และใช้เลเซอร์ด้านหลังที่จุดกึ่งกลางของหุ่นจำลอง PMMA (ภาพที่ 6) นำแผ่นวัดรังสีติดที่บริเวณ จุดกึ่งกลางของหุ่นจำลอง PMMA จำนวน 4 แผ่น ต่อการฉายรังสี 1 พลังงาน แล้วฉายรังสีด้วยลำรังสีแบบ N-Series และ RQR จากเครื่องกำเนิดรังสีเอกซ์มาตรฐาน พลังงานละ 2,000 μSv (ตารางที่ 2)

โดยคำนวณหาเวลาของการฉายในแต่ละลำรังสีจากสูตร

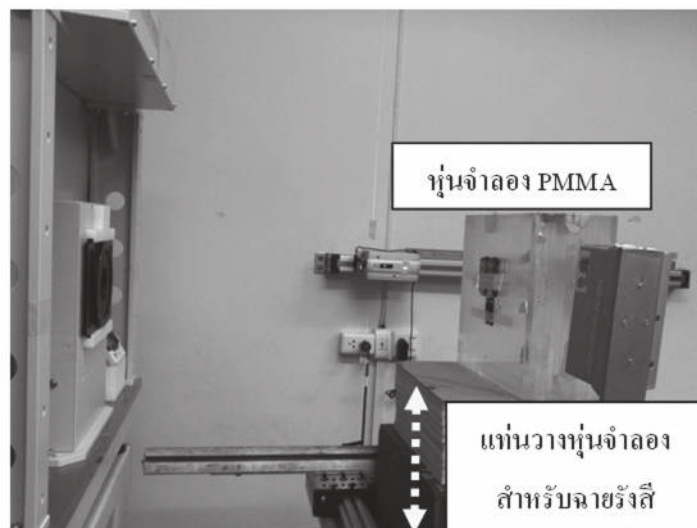
$$t = \text{Hp}(d)/h.K^0 \quad \dots\dots\dots(1)$$

เมื่อ $\text{Hp}(d)$ คือ ปริมาณรังสีสมมูลที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อ ที่ระดับความลึก d มิลลิเมตร ใช้ในการประเมิน ปริมาณรังสีบุคคล ประกอบด้วย $\text{Hp}(10)$, $\text{Hp}(0.07)$ และ $\text{Hp}(3)$

h คือ Conversion Coefficient (Sv/Gy)

t คือ เวลาสำหรับการฉายรังสี (sec)

K^0 คือ Air Kerma Rate (Gy/sec)



ภาพที่ 6 การตั้งระยะ และตำแหน่งของหุ่นจำลอง PMMA บนแท่นฉาย

หลังจากฉายรังสีเอกซ์ 24 ชั่วโมง นักกลับมาอ่านค่าปริมาณรังสี $\text{Hp}(d)$ ด้วยเครื่องอ่านแผ่นวัดรังสี โอเอสแอล แบบอัตโนมัติ รุ่น 200A นำผลที่ได้มาหาความสัมพันธ์ระหว่าง $\text{Hp}(d)$ จากลำรังสีแบบ N-Series และ RQR โดยนำค่านับวัดที่ประเมินได้มาเปรียบเทียบกับกระหว่างค่านับวัดจากแต่ละผลึกในเทอมของ $E2/E1$, $E3/E1$ และ $E4/E1$ และศึกษาความสัมพันธ์ของแผ่นวัดรังสีโอเอสแอลที่ผ่านตัวกรองทั้ง 4 ชนิด

ผล

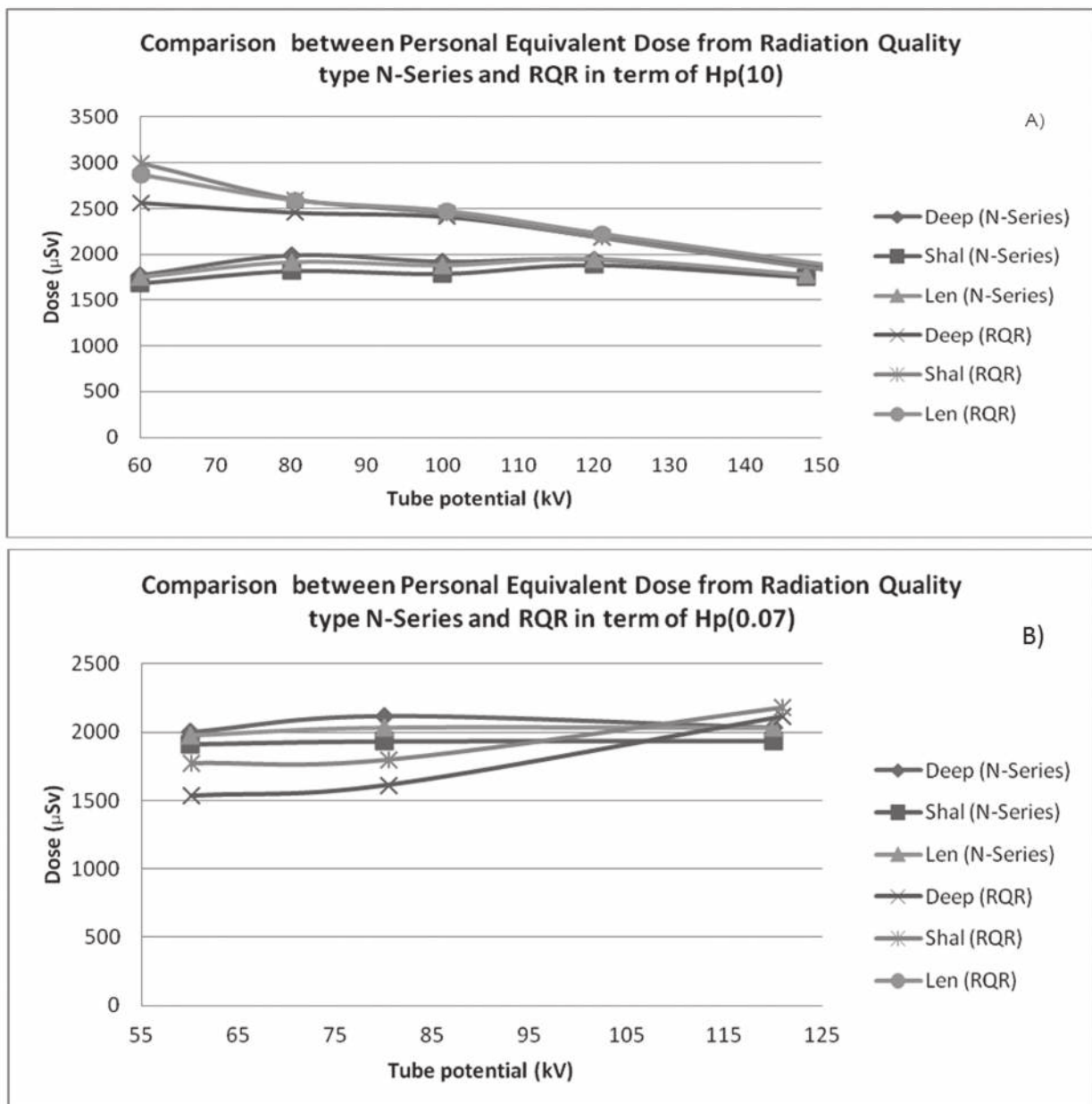
ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณรังสีที่วัดได้จากลำรังสีแบบ N - Series และ RQR ในทอม Hp(10) และ Hp(0.07) จากแผ่นวัดรังสีไอเอสแอล รุ่น InLight-LDR Model 2 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ปริมาณรังสีที่ประเมินได้จากแผ่นวัดรังสีไอเอสแอล รุ่น InLight-LDR Model 2 ที่ฉายในทอม Hp(10) และ Hp(0.07)

Hp(d)	RQ	Tube voltage (kV)	Mean Energy (keV)	Hp(10) (μSv)	Hp(0.07) (μSv)	Hp(3) (μSv)	%Diff Hp(10)	%Diff Hp(0.07)	%Diff Hp(3)
Hp(10)	N-60	60.0	48.0	1773	1683	1745	-11.38	-15.88	-12.75
	N-80	80.0	65.0	1993	1818	1910	-0.38	-9.13	-4.50
	N-100	100.0	83.0	1923	1788	1875	-3.88	-10.63	-6.25
	N-120	120.0	100.0	1945	1883	1945	-2.75	-5.88	-2.75
	N-150	148.0	118.0	1773	1750	1773	-11.38	-12.50	-11.38
	RQR4	60.1	34.4	2563	2993	2868	28.13	49.63	43.38
	RQR6	80.4	41.6	2455	2600	2588	22.75	30.00	29.38
	RQR8	100.6	48.6	2408	2443	2470	20.38	22.13	23.50
	RQR9	121.0	56.2	2185	2180	2220	9.25	9.00	11.00
	RQR10	151.6	66.6	1863	1822	1870	-6.85	-8.90	-6.50
Hp(0.07)	N-60	60.0	48.0	1998	1910	1978	-0.13	-4.50	-1.13
	N-80	80.0	65.0	2115	1935	2033	5.75	-3.25	1.63
	N-120	120.0	100.0	2030	1938	2030	1.50	-3.13	1.50
	RQR4	60.1	34.4	1533	1775	1705	-23.38	-11.25	-14.75
	RQR6	80.4	41.6	1613	1800	1733	-19.38	-10.00	-13.38
	RQR9	121.0	56.2	2113	2178	2190	5.63	8.88	9.50

ค่าปริมาณรังสีที่ประเมินได้จากแผ่นวัดรังสีไอเอสแอล รุ่น InLight-LDR Model 2 ที่ฉายด้วยลำรังสีแบบ N-Series และ RQR ในทอม Hp(10) จะมีความแตกต่างกัน โดยค่าปริมาณรังสีที่ฉายด้วยลำรังสีแต่ละ RQR ที่ Hp(10) มีค่าเท่ากับ 2,563, 2,455, 2,408, 2,185 และ 1,863 μSv ตามลำดับ ส่วนค่าปริมาณรังสีที่ฉายด้วยลำรังสีแต่ละ N-series ที่ Hp(10) มีค่าเท่ากับ 1,773, 1,993, 1,923, 1,945 และ 1,773 μSv ตามลำดับ ซึ่งพบว่าค่าปริมาณรังสีที่ฉายในทอม Hp(10) ด้วยลำรังสีแบบ RQR จะมีค่าลดลงตามค่าความต่างศักย์ที่ป้อนให้กับหลอดเอกซเรย์ แต่ค่าปริมาณรังสีที่ฉายด้วยลำรังสีแบบ N - series จะมีค่าใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 7 (A))

ค่าปริมาณรังสีที่ฉายด้วยลำรังสีแบบ N-Series และ RQR ในเทอม Hp(0.07) จะมีลักษณะใกล้เคียงกัน โดยค่าปริมาณรังสีที่ฉายด้วยลำรังสีแต่ละ RQR ที่ Hp(0.07) มีค่าเท่ากับ 1,775, 1,800 และ 2,178 μSv ตามลำดับ ส่วนค่าปริมาณรังสีที่ฉายด้วยลำรังสีแต่ละ N-series ที่ Hp(0.07) มีค่าเท่ากับ 1,910, 1,935 และ 1,938 μSv ตามลำดับ ซึ่งพบว่าค่าปริมาณรังสีที่ด้วยลำรังสีในเทอม Hp(0.07) ทั้งแบบ RQR และ N-series จะมีค่าเพิ่มขึ้นตามค่าความต่างศักย์ที่ป้อนให้กับหลอดเอกซเรย์ (ภาพที่ 7 (B))



ภาพที่ 7 การเปรียบเทียบค่าปริมาณรังสีในเทอมต่างๆ จากการฉายรังสีแบบ N-Series และ RQR ในเทอม A) Hp(10) และ B) Hp(0.07)

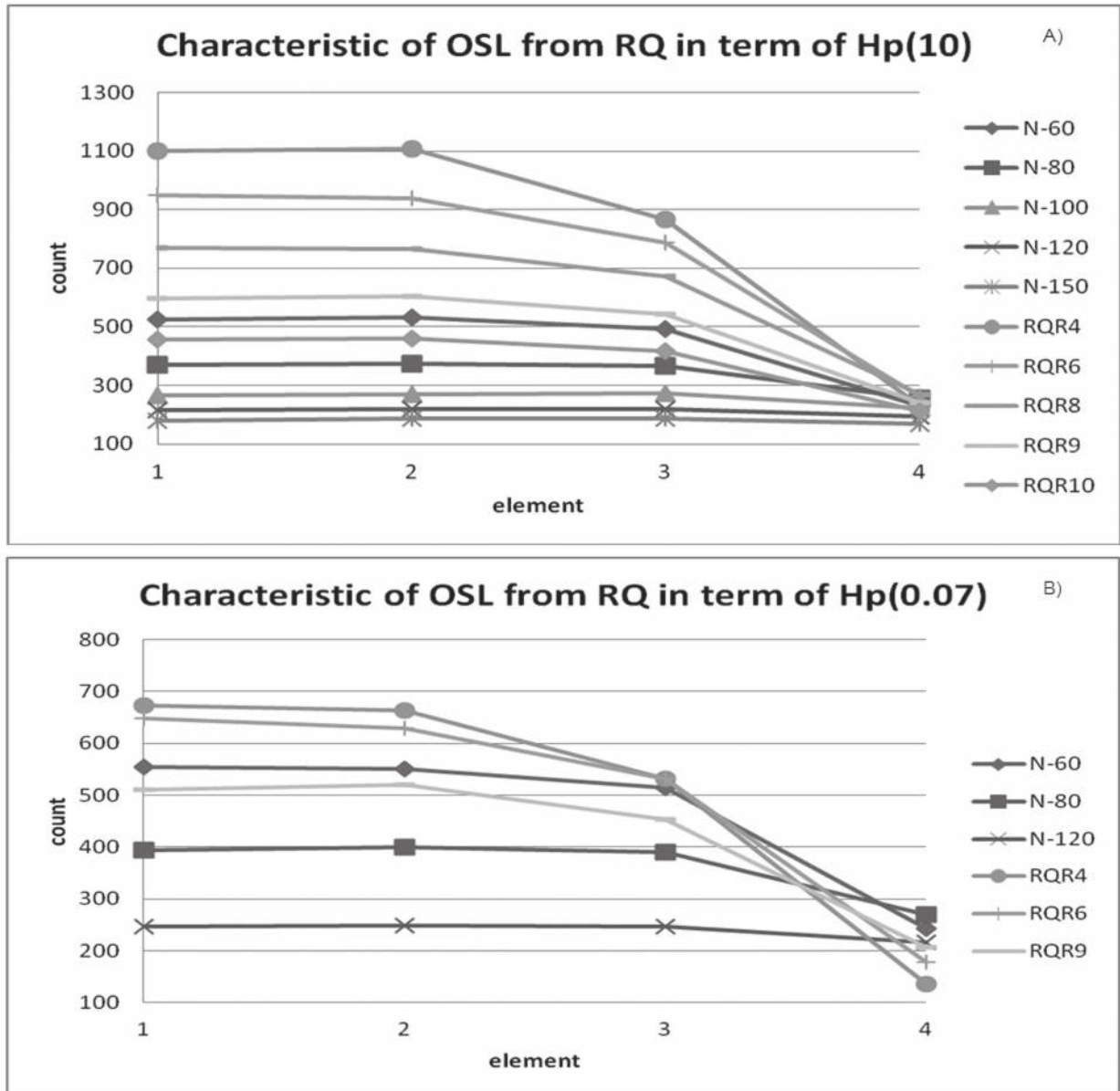
ส่วนการประเมินค่านับวัดจากแผ่นวัดรังสีไอเอสแอล รุ่น InLight-LDR Model 2 จากการ การฉาย ด้วยลำรังสีแบบ RQR และ N-series ในทอม Hp(10) และ Hp(0.07) พบว่ามีตอบสนองแต่ละพลังงาน ดัง (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ค่านับวัดแผ่นวัดรังสีไอเอสแอลรุ่น InLight-LDR Model 2 และอัตราส่วนระหว่างค่านับวัดแต่ละผลึก

Hp(d)	RQ	Tube Voltage (kV)	Mean Energy (keV)	E1	E2	E3	E4	E2/E1	E3/E1	E4/E1
Hp(10)	N-60	60.0	48.0	526	532	491	231	1.01	0.95	0.44
	N-80	80.0	65.0	370	374	365	255	1.01	1.00	0.70
	N-100	100.0	83.0	267	270	272	221	1.01	1.03	0.84
	N-120	120.0	100.0	217	219	220	195	1.01	1.03	0.91
	N-150	148.0	118.0	179	186	186	171	1.04	1.05	0.97
	RQR4	60.1	34.4	1102	1109	866	229	1.01	0.80	0.21
	RQR6	80.4	41.6	951	940	787	264	0.99	0.84	0.28
	RQR8	100.6	48.6	771	765	672	270	0.99	0.88	0.35
	RQR9	121.0	56.2	597	603	541	242	1.01	0.92	0.41
	RQR10	151.6	66.6	458	460	416	213	1.01	0.92	0.47
Hp(0.07)	N-60	60.0	48.0	554	550	514	244	0.99	0.94	0.45
	N-80	80.0	65.0	394	400	390	270	1.02	1.00	0.70
	N-120	120.0	100.0	247	250	248	216	1.02	1.02	0.89
	RQR4	60.1	34.4	674	664	531	137	0.99	0.80	0.21
	RQR6	80.4	41.6	648	630	532	178	0.97	0.83	0.28
	RQR9	121.0	56.2	510	520	453	207	1.02	0.90	0.41

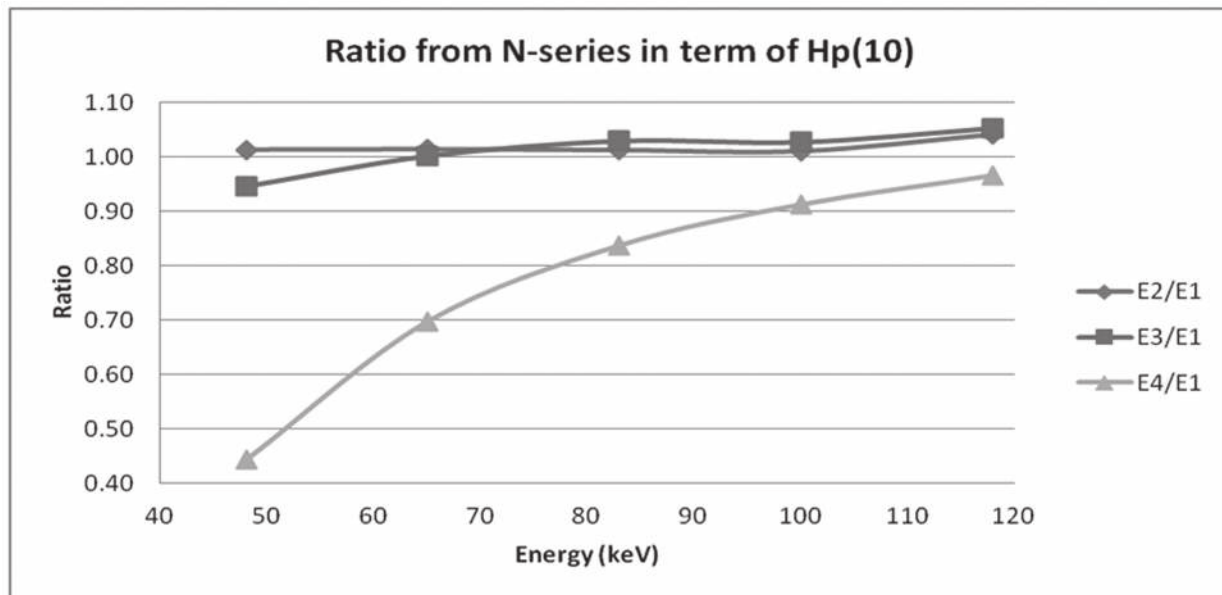
ค่าอัตราส่วนค่านับวัด E2/E1 ของทั้งกรณีฉายด้วยลำรังสีแบบ RQR และ N-series มีค่าใกล้เคียง 1 ทั้งหมด โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.97 - 1.04 เนื่องจากพลังงานของรังสีเอกซ์สามารถผ่านตัวกรองช่องที่เป็น OW และ PL ได้จึงทำให้ค่านับวัด E1 และ E2 มีค่าใกล้เคียงกัน ส่วนอัตราส่วนค่านับวัด E3/E1 มีค่าอยู่ในช่วง 0.80 - 1.05 เนื่องจากช่อง E3 มีตัวกรองที่เป็นอะลูมิเนียม ซึ่งสามารถกรองพลังงานเอกซเรย์ต่ำ ทำให้ค่านับวัดมีค่าลดลงไป และที่อัตราส่วนค่านับวัด E4/E1 มีค่าที่มีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด มีค่าอยู่ในช่วง 0.21 - 0.47 สำหรับการฉาย ด้วยลำรังสีแบบ RQR และ 0.44 - 0.97 สำหรับการฉายด้วยลำรังสีแบบ N-series จากอัตราส่วนค่านับวัดที่ได้ ที่ฉายด้วยลำรังสีทั้งแบบ RQR และ N-series ที่ฉายในทอม Hp(10) จะมีค่าใกล้เคียงกับการฉายในทอม Hp(0.07)

ความสัมพันธ์ระหว่างค่านับวัดของแต่ละผลึกที่ฉายจากลำรังสีแบบ N-Series และ RQR ในเทอม Hp(10) และ Hp(0.07) (ภาพที่ 8) มีลักษณะเหมือนกันเนื่องมาจากตัวกรองที่ใช้มีความหนาสมมูลแตกต่างกันโดยเฉพาะ อะลูมิเนียม และทองแดงจะสามารถกรองรังสีเอกซ์ได้ทำให้ค่านับวัดในช่องที่ 3 และ 4 มีค่าลดลงจากการถูกตัวกรองกั้นรังสีไว้ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์พลังงานที่แผ่นวัดรังสีไอเอสแอลได้รับการฉายรังสี

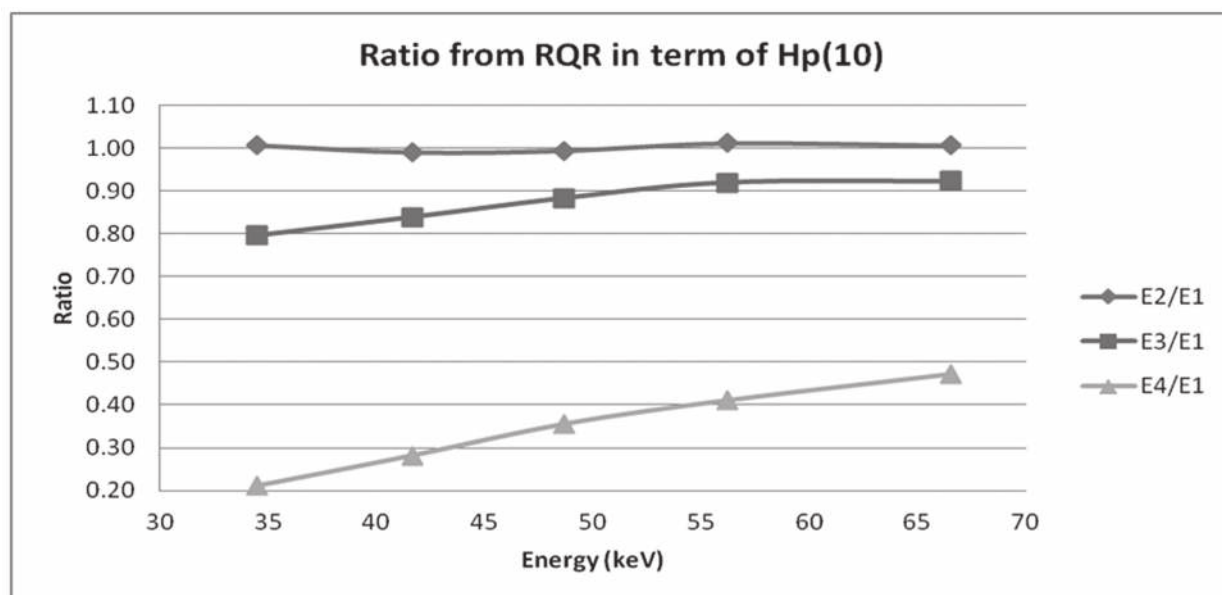


ภาพที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่านับวัดของแต่ละผลึก Al_2O_3 ที่เจือด้วย C ของแผ่นวัดรังสีไอเอสแอลกับลำรังสีแบบ N-Series และ RQR ที่ฉายในเทอมของ A) Hp(10) และ B) Hp(0.07)

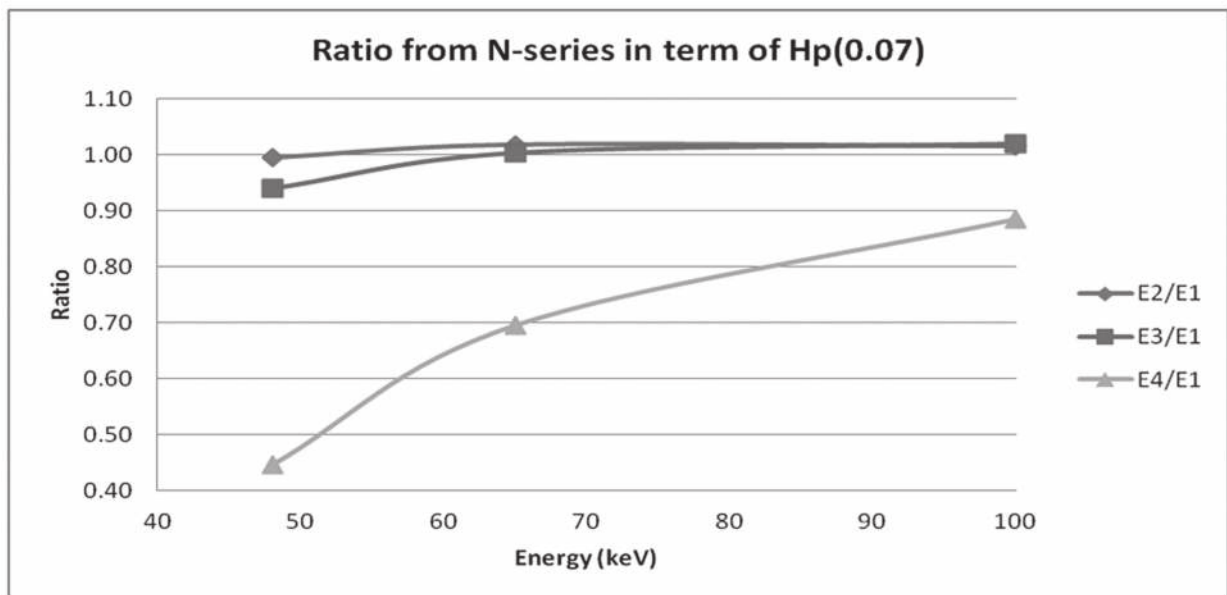
อัตราส่วนระหว่าง $E2/E1$, $E3/E1$ และ $E4/E1$ ของลำรังสีแบบ N-Series (ภาพที่ 9, 10) และ RQR (ภาพที่ 11, 12) ที่ฉายในทอม Hp(10) และ Hp(0.07) พบว่ามีลักษณะคล้ายกันตามแบบของลำรังสีที่ฉาย ซึ่งอัตราส่วน $E2/E1$ จะมีค่าใกล้เคียง 1.0, $E3/E1$ จะมีค่าใกล้เคียงกับ $E2/E1$ โดยเพิ่มขึ้นค่าประมาณ 0.9 จนใกล้เคียง 1 ตามพลังงาน ส่วน $E4/E1$ มีลักษณะเพิ่มขึ้นตามพลังงาน แต่มีค่าน้อยกว่า $E2/E1$ และ $E3/E1$ (ภาพที่ 13)



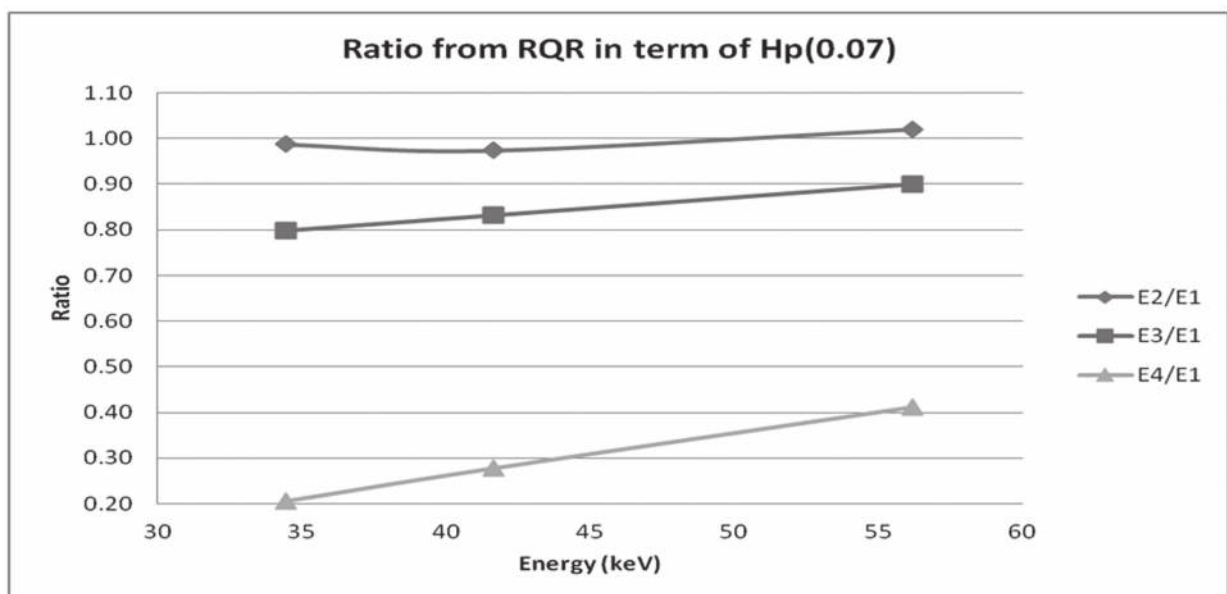
ภาพที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของอัตราส่วนของแผ่นวัดรังสีไอเอสแอลกับลำรังสีแบบ N - Series ที่ฉายในทอมของ Hp(10)



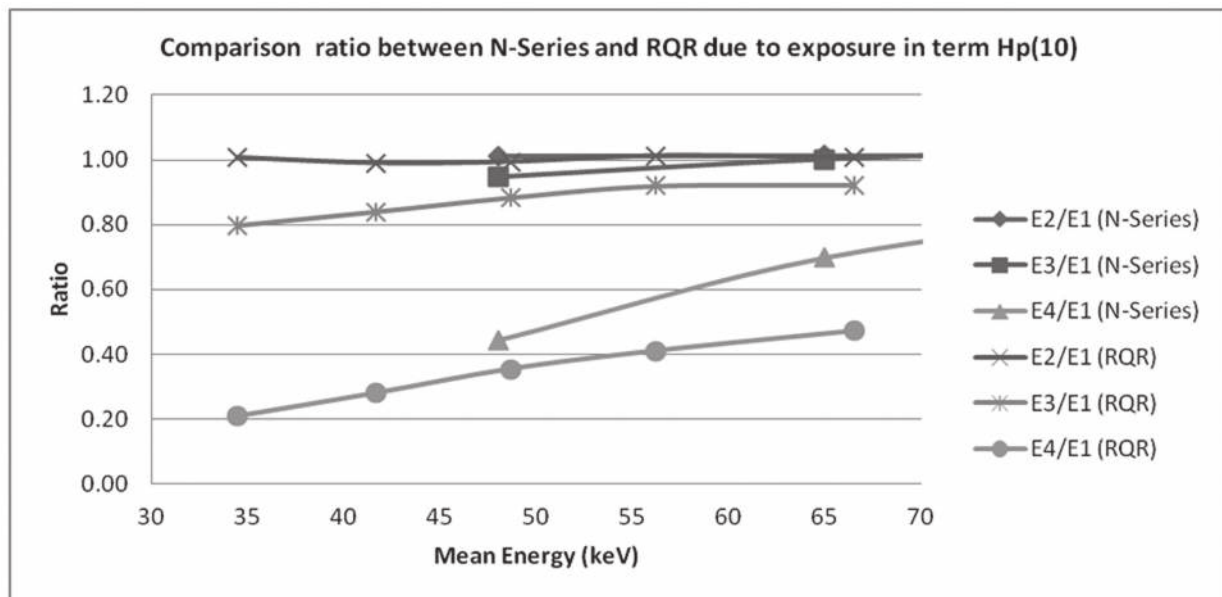
ภาพที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของอัตราส่วนของแผ่นวัดรังสีไอเอสแอลกับลำรังสีแบบ RQR ที่ฉายในทอมของ Hp(10)



ภาพที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของอัตราส่วนของของแผ่นวัดรังสีไอเอสแอลกับลำรังสีแบบ N - Series ที่ฉายในเทอมของ Hp(0.07)



ภาพที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของอัตราส่วนของแผ่นวัดรังสีไอเอสแอลกับลำรังสีแบบ RQR ที่ฉายในเทอมของ Hp(0.07)



ภาพที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของอัตราส่วนของแผ่นวัดรังสีไอเอสแอลกับลำรังสีแบบ N-Series และ RQR ที่ฉายในเทอมของ Hp(10)

วิจารณ์

การสอบเทียบแผ่นวัดรังสีโดยทั่วไปจะใช้ค่ามาตรฐานลำรังสีแบบ N-Series ที่มีสเปกตรัมพลังงานอยู่ในช่วงที่แคบ ที่ใช้เป็นตัวกำหนดลำรังสีของแต่ละพลังงาน ซึ่งจะแตกต่างกับลำรังสีของเอกซเรย์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย รวมถึงงานรังสีร่วมรักษา ซึ่งมีช่วงสเปกตรัมพลังงานที่กว้าง โดยขึ้นอยู่กับชนิดของพลังงานและตำแหน่งที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย ซึ่งผลการศึกษาที่ได้พบว่าค่า Hp(10) จากลำรังสีแบบ N-Series และ RQR อยู่ในช่วง 1,773 - 1,993 และ 1,863 - 2,563 μSv ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้จากลำรังสี N-Series มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่กำหนดในการฉายรังสีที่ 2,000 μSv โดยเฉพาะช่วงค่าความต่างศักย์ที่ตั้งให้กับหลอดเอกซเรย์ต่ำกว่า 60 kV สำหรับ N-Series และต่ำกว่า 100 kV สำหรับ RQR ซึ่งจะมีค่าความแตกต่างเกินจากค่าปริมาณรังสีที่ฉาย $\pm 10\%$ ที่ Hp(10), Hp(0.07) และ Hp(3) (ตารางที่ 3) ซึ่งหากจะนำไปใช้งานในการศึกษาวัดค่าปริมาณรังสีในงานรังสีวินิจฉัยจะต้องพิจารณาช่วงค่าพลังงานและค่าความต่างศักย์ของหลอดที่ใช้ในการศึกษาให้เหมาะสม

สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์กันระหว่างค่านับวัดของผลึก Al_2O_3 ที่เจือด้วย C ของแผ่นวัดรังสีไอเอสแอลที่ฉายด้วยลำรังสีแบบ N-Series และ RQR พบว่าจะมีลักษณะใกล้เคียงกัน เมื่อเทียบตามค่าเฉลี่ยพลังงานที่ใช้ในการฉาย โดยอัตราส่วนของ E2/E1, E3/E1 และ E4/E1 ของ N-Series จะมีค่าสูงกว่า RQR (ภาพที่ 13) โดยเฉพาะอัตราส่วนของ E3/E1 และ E4/E1 ที่มีค่าอยู่ในช่วง 0.80 - 1.05 และ 0.21 - 0.47 ตามลำดับ ซึ่งเราสามารถนำข้อมูลเหล่านี้มาใช้ในการศึกษาค่าปริมาณรังสีในงานด้านรังสีวินิจฉัย และงานรังสีร่วมรักษา เพื่อจำแนกพลังงานที่แผ่นวัดรังสีได้รับ จากการใช้แผ่นวัดรังสีไอเอสแอล รุ่น InLight-LDR Model 2 นำมานับวัดค่านับวัดในแต่ละช่องมาพิจารณาตามอัตราส่วน ซึ่งจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของการฉายจากเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยที่ใช้จริง ซึ่งมีหลายประเภท ซึ่งจะมีลักษณะของสเปกตรัมพลังงานที่แตกต่างกัน รวมถึงรูปแบบเอกซเรย์ที่ใช้ในการฉาย เพื่อนำมาข้อมูลในการศึกษาความสัมพันธ์ของแผ่นวัดรังสีไอเอสแอลที่ใช้ในงาน และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับรังสีที่ใช้ในการวินิจฉัย และร่วมรักษาต่อไป

สรุป

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่านับวัดและลักษณะของลำรังสีทั้งแบบ N-Series และ RQR เป็นไปตามวัตถุประสงค์ในการนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการกำหนดขอบเขตการศึกษาปริมาณรังสีในงานรังสีวินิจฉัย โดยสามารถนำมาใช้วัดปริมาณรังสีเอกซ์ได้ดีตั้งแต่พลังงานมากกว่า 50 keV ซึ่งมีค่าความแตกต่างไม่เกินค่าปริมาณรังสีที่ฉาย $\pm 10\%$ พร้อมทั้งยังสามารถระบุถึงระดับพลังงานของรังสีเอกซ์ที่ได้รับได้จากลักษณะค่านับวัดจากแผ่นวัดรังสีโอเอสแอล รุ่น InLight-LDR Model 2 เทียบกับกราฟอัตราส่วนค่านับวัด E3/E1 และ E4/E1 ที่ฉายด้วยลำรังสีแบบ RQR (ภาพที่ 9 และ 10) ซึ่งจะมีประโยชน์ในการศึกษาค่าปริมาณรังสีสำหรับบุคลากรด้านรังสีทั้งในงานรังสีวินิจฉัย และงานรังสีร่วมรักษา ร่วมกับการใช้แผ่นวัดรังสี โอเอสแอล ชนิด nanoDot ซึ่งเหมาะจะนำไปใช้ในการศึกษาวิจัยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนักฟิสิกส์รังสี กลุ่มมาตรวิทยาทางรังสีที่ให้ความอนุเคราะห์ในการคำนวณเวลาและฉายรังสีเอกซ์ในการศึกษา และนักฟิสิกส์รังสี งานรังสีบุคคลที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเตรียมและวิเคราะห์ค่าปริมาณรังสีจากแผ่นวัดรังสีโอเอสแอล

เอกสารอ้างอิง

1. International Commission on Radiological Protection (ICRP). Statement on tissue reactions, approved by the commission on. [online]. April 21, 2011; [2 screens]. Available from: URL: <http://www.icrp.org/docs/2011%20Seoul.pdf>.
2. Whole body Dose. Algorithm for the landauer. InLight basic-OSLN dosimeter. Revision: InLight_Basic_OSNL_N_2008 09/19/08. Gaithersburg, MD: Validated by National Voluntary Laboratory Accreditation Program: (NVLAP); 2008.
3. International Atomic Energy Agency. Calibration of radiation protection monitoring instruments, Safety reports series No.16. Vienna: IAEA; 2000.
4. International Electrotechnical Commission, IEC-61267: 2005, Medical diagnostic X-ray equipment-radiation conditions for use in the determination of characteristics. Geneva: IEC; 2005.

Relationship between Count and Energy for Diagnostic Radiology

Yootthana Bangmuang and Sirichai Theirrattanakul

Bureau of Radiation and Medical device, Department of Medical Science, Tiwanon Road, Nonthaburi 11000

ABSTRACT At present, radiation is used in many fields including medical diagnosis and treatment. Thus the radiation measurement is necessary for monitoring hazardous for occupational workers and patients due to radiation. OSL dosimeter InLight-LDR model 2 composes of four $\text{Al}_2\text{O}_3 : \text{C}$ elements with different filters is used for estimating the personal dose. It is used to evaluate the personal dose from the different radiation and energies in term of effective dose, equivalent dose at skin and equivalent dose at lens of eye along with analyzing radiation energy.

In this study, OSL dosimeters were exposed with x-ray for calibration in radiation protection level and diagnostic quality control level by using radiation beam in term N-Series and RQR, respectively. Tube voltages in both radiation beams qualities were similar for studying relationship between count and x-ray energies. From the result, the ratio of E_2/E_1 was approximate to 1.0 in all range of x-ray energies. However, the ratio of E_3/E_1 and E_4/E_1 increased numerously by x-ray energies. The result can be used to determine the diagnostic radiation energies by comparison with the graph between E_3/E_1 and E_4/E_1 with mean energy of each radiation quality. Moreover, the mean energy determined from this study can be used as reference for further studies for determination of mean energy of the dose in diagnostic radiology and the study in lens dose for interventional radiology worker.

Key words: Optically Stimulated Luminescence, Diagnostic Radiology



ใบสมัครเป็นสมาชิก วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ชื่อ.....

ที่อยู่.....

อาชีพ.....

โทรศัพท์.....

ต้องการรับ วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เวลา 1 ปี (4 ฉบับ) เป็นเงิน 200.- บาท

ตั้งแต่ปี.....

พร้อมนี้ได้ส่ง

☐ ธนาณัติ

☐ ตัวแลกเงินไปรษณีย์

☐ เงินสด

ส่งจ่าย

นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ

ห้องสมุดกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ซอยโรงพยาบาลบำรุงราศนราดูล ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

โทร. 0-2589-9850-8 ต่อ 99339

E-mail.....

ส่งจ่าย ปลณฝ. กระทรวงสาธารณสุข รหัสไปรษณีย์ 11000

THE BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

The bulletin of the Department of Medical Sciences is an official publication of the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. It is devoted to the dissemination of knowledge concerning medical sciences and the facilitation of co-operation among scientists.

Owner	Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health	
Administrative Advisor	Sukhum Karnchanapimai	Phichet Banyati
	Worawit Kittiwongsunthorn	Somlerk Jeungsamarn
Technical Advisor	Prasert Thongcharoen	Panadda Silva
	Amara Vongbuddhapitak	Mayura Kusum
	Jongdee Wongpinairat	Pimjai Naigowit
	Supatra Im-Erb	Sumol Pavittranon
Editor	Teeranart Jivapaisarnpong	Department of Medical Sciences
Assistant Editor	Laojana Chowanadisai	Independent scholar
Editorial Board	Prasert Auewarakul	Siriraj Hospital, Mahidol University
	Orasa Suthienkul	Thammasart University
	Pilaipan Puthavathana	Siriraj Hospital, Mahidol University
	Punnee Pitisuttithum	Mahidol University
	Pintip Pongpech	Chulalongkorn University
	Suchada Chaisawadi	King Mongkut's Institute of Technology Thonburi
	Danai Tiwawech	Naresuan University
	Suwanna Charunut	Huachiew Chalermprakiet University
	Hansa Chaivanit	Independent scholar
	Pathom Sawanpanyalert	Office of the Permanent Secretary, Ministry of Public Health
	Usavadee Thavara	Independent scholar
	Salakchit Chutipongvivate	Office of the Permanent Secretary, Ministry of Public Health
	Duanthanorm Promkhatkaew	Department of Medical Sciences
	Punthip Teeyapant	Department of Medical Sciences
	Busarawan Sriwanthana	Department of Medical Sciences
	Kanokporn Atisook	Department of Medical Sciences
	Siri Srimanoroth	Department of Medical Sciences
	Wichuda Jariyapan	Department of Medical Sciences
	Supanee Duangteraprecha	Department of Medical Sciences
Administration	Namfon Noiprasert	Department of Medical Sciences
	Prasan Julwong	Department of Medical Sciences
Subscription Rate	The Bulletin of the Department of Medical Sciences is published quarterly. Annual subscription rate is ฿ 200.00 for domestic and US.\$ 50.00 for all other countries.	
Office	Department of Medical Sciences 88/7 Soi Tiwanond 14, Tiwanond Rd., Nonthaburi 11000, Thailand. Tel. 0-2951-0000 Fax: 0-2951-1297	
Printed by	Aroonkarnpim Ltd., Part. 457/6-7 Phra Sumen Road, Bangkok 10200 Tel. 0-2282-6033-4	



มุ่งมั่นพัฒนา คำนึงวิจัย จับไวบริการ มาตรฐานสากล

www.dmsc.moph.go.th