

วารสาร



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 57 ฉบับพิเศษ 2 กรกฎาคม - กันยายน 2558 Vol. 57 Supplement 2 July - September 2015

ISSN 0125-684X

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยและแลกเปลี่ยนความรู้ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ ที่ปรึกษาด้านบริหาร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นพ.อภิชัย มงคล พญ.วารุณี จินารัตน์	นางจุรีภรณ์ บุญยวงศ์วิโรจน์ นพ.วันชัย สัตยาวิวัฒน์พงศ์
ที่ปรึกษาด้านวิชาการ	ภญ.อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์ ภญ.ดร.จตุรนต์ ว่องพินัยรัตน์ ภญ.สุภัทรา อิ่มเอิบ ดร.ปนัดดา ชิลวา	พญ.มยุรา กุสุมภ์ นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท ภญ.ดร.สุมล ปวีตรานนท์
บรรณาธิการ	สพญ. ดร.เยาวภา พงษ์สุวรรณ	
คณะบรรณาธิการ	ศ. ดร. นพ.สมชัย บวรภิตติ ศ. ดร.อรสา สุตเธียรกุล ดร.อารี ทัดติยพงศ์ นายศิริ ศรีมนโรธ นางกนกพร อธิสุข นายสุธน วงษ์ชัย ดร.สุวรรณ ธีรธำรง ดร.วิมล เพชรกาญจนาพงศ์ ภญ.ดร.เจริญดี ปิงสุทธิวงศ์ ดร.อารีรัตน์ สง่าแสง	ศ. ดร. นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล ศ. ดร.พิไลพันธ์ พุฒินันท์ นางสาวจุไร โชติธนาทวิวงศ์ ดร.อุษาวดี ถาวระ นางวิชุดา จริยะพันธ์ นางสาวมาลินี จิตตกานต์พิชัย นางสิริภากร แสงกิจพร ดร.ประไพ วงศ์สินคงม้น ภญ.ดร.วัลย์ลักษณ์ เมธากัทร
เลขานุการ	นางไพรวรรณ บุญวงศ์	
ฝ่ายธุรการ	นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ นางสาวประสาน จุลวงศ์	
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 57 ฉบับพิเศษ 2 กรกฎาคม - กันยายน 2558

Vol. 57 Supplement 2 July - September 2015

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การทวนสอบวิธีวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมด ในอาหารทะเลด้วยเครื่องวิเคราะห์ปรอท
โดยเทคนิคการเผา 163
เชมิกา เหมโลหะ และนิรันดร์ แร่กาลีษฐ์
- การทดสอบความถูกต้องของวิธีแคปิลลารีโซนอิเล็กโทรโฟรีซิส ในการตรวจเอกลักษณ์
ของยาชีววัตถุเพื่อการรักษานิดโมโนโคลนอลแอนติบอดี 174
จิตาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์ วิชชุดา จริยะพันธุ์ สายวรุฬ จตุรจิตตินันท์
และธีรนาถ จีระไพศาลพงศ์
- วิธีวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์รวมทั้งหมดในยาสีฟัน โดยวิธี GC-FID 184
กมลลักษณ์ อินทร์ศรี และสุดธิดา หมีทอง
- การประเมินการได้รับสัมผัสของกรดเบนโซอิก ในน้ำพริกหนุ่มที่จำหน่าย
ในจังหวัดเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2553 - 2556 198
พัชรดา พิชัย และนฤมล ชันดีกุล
- การวางระบบตรวจสอบขึ้นทะเบียนหน่วยงานทดสอบหรือวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์
ซึ่งไม่ได้ทดลองในคน 208
สิตไพลฐุ เอกะจัมปะกะ และชมโฉไล สีนุสาร
- ทางเลือกใหม่ในการตรวจวิเคราะห์ ยากลุ่ม Amphetamines ในปัสสาวะ 223
อรพิน ทนันทติ สุเมธ เทียงธรรม และรุ่งทิพย์ เจือดี

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

- การปนเปื้อนเชื้อราและอะฟลาทอกซิน ในผลิตภัณฑ์ถั่วพร้อมบริโภค 244
ศศิธร จิตติเพชรกุล กนกพรรณ สมยุรทรัพย์ ก่อเกียรติ ศาสตรินทร์
ประภาศรี บุญยประภาพันธ์ และนันทวรรณ เมฆา

บทความปริทัศน์

- ผลสัมฤทธิ์ด้านประสิทธิผลและคุณภาพการให้บริการ การดำเนินงานตามภารกิจหลัก
ของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 - 2557 254
อมรรัตน์ ทศนกิจ และชมโฉไล สีนุสาร

CONTENTS

Page

Original Articles

- The Method Verification of Total Mercury Analysis in Seafood by Using Direct Mercury Analyzer Combustion Technique** 163

Khemikar Hemloha and Nirundorn Raekasin

- Method Validation of Capillary Zone Electrophoresis Technique for Identity Testing of Biotherapeutic Products: Monoclonal Antibody** 174

Titaporn Pootipinyowat Wichuda Jariyapan Saiwarul Jadoonkittinan and Teeranart Jivapaisarnpong

- Determination of Total Fluoride in Toothpaste by GC-FID** 184

Kamonluck Intharatsamee and Suthida Meethong

- Exposure Assessment of Benzoic acid in Nam Prig Noom sold in Chiang Mai since 2010 - 2013** 198

Patcharida Pichai and Naruemon Khanteekul

- Establishment of Inspection System for Non-clinical Research in Medical Sciences** 208

Sitaphaisith Ekachampaka and Chomchailai Sinthusarn

- New Approach for Analysis of Amphetamines in Urine** 223

Orapin Tanunkat Sumate Thiangthum and Rungtip Jeotee

Laboratory Findings

- Fungus & Aflatoxin Contamination in Ready to Eat Nuts Products** 244

Sasithorn Thitipetchrakul Kanokpan Somyoonsup Kokeiat Sattarin

Prapasri Boonyaprapapan and Nanthawan Mekha

Review Articles

- The Achievement of the Effectiveness of Operations and the Quality of Services Based on the Performance of the Bureau of Laboratory Quality Standards For the Fiscal Years 2011-2014** 254

Amornrat Tatsanakit and Chomchailai Sinthusarn

การทวนสอบวิธีวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมด ในอาหารทะเลด้วยเครื่องวิเคราะห์ปรอท โดยเทคนิคการเผา

เชมิกา เหมโลหะ และนิรันดร์ แร่กาสินธุ์

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84100

บทคัดย่อ ปรอทสามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี การวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ปรอทเทคนิคการเผาเป็นอีกหนึ่งวิธีที่ได้รับความสนใจ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทวนสอบวิธีวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมดในอาหารทะเลด้วยเครื่องวิเคราะห์ปรอทโดยเทคนิคการเผาตามวิธี U.S. EPA. 7473 (2007) ทำการศึกษาช่วงและความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างแม่นยำ ความแม่นยำ และความเที่ยงของการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเดียว ผลการศึกษาพบว่า วิธีดังกล่าวมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.01 – 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจมากกว่า 0.99 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.001 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างแม่นยำมีค่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 96.71 การทดสอบความแม่นยำได้ใช้วัสดุอ้างอิงที่มีใบรับรองมาตรฐานพบว่า ค่าเฉลี่ยของการทดสอบมีค่าไม่แตกต่างจากค่าอ้างอิงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ความเที่ยงของการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเดียวมีค่าอยู่ในช่วงการยอมรับ ดังนั้นวิธีนี้เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมดในอาหารทะเลในช่วงความเข้มข้น 0.01 – 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และพบว่าวิธีนี้สะดวก รวดเร็ว ลดปริมาณการใช้สารเคมีทำให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม

บทนำ

ปรอทเป็นโลหะที่พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติในชั้นเปลือกโลก มีลักษณะเป็นสีเงินวาว เป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง ปรอทเกิดจากการสลายตัวของสินแร่ที่มีปรอทเป็นองค์ประกอบ โดยอาจปะปนมากับก๊าซจากการระเบิดของภูเขาไฟ มนุษย์นำปรอทมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น การผลิตเทอร์โมมิเตอร์ การใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการทางเคมี ใช้เป็นส่วนผสมของยารักษาโรคและการอุดฟัน ใช้เป็นส่วนประกอบของสารกำจัดศัตรูพืชในอุตสาหกรรม การเกษตร เป็นต้น ปรอทที่มีอยู่ตามธรรมชาติจะอยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ และสารประกอบอนินทรีย์ โดยสารประกอบอินทรีย์ในรูปเมทิลเมอร์คิวรีจะมีความเป็นพิษต่อมนุษย์มากที่สุด มนุษย์มีโอกาสได้รับเมทิลเมอร์คิวรีจากการบริโภคปลา และหอยทะเล เนื่องจากในธรรมชาติของระบบนิเวศในทะเล แบคทีเรียสามารถเปลี่ยนปรอทให้อยู่ในรูปเมทิลเมอร์คิวรี และสัตว์ทะเลที่มีขนาดใหญ่มีแนวโน้มที่จะมีการสะสมปรอทในตัวเองเนื่องจากการบริโภคสัตว์เล็กผ่านห่วงโซ่อาหาร พิษของปรอทชนิดเฉียบพลันจะทำให้เกิดการระคายเคืองระบบทางเดินอาหาร พิษเรื้อรังจะส่งผลกระทบต่อระบบประสาทส่วนกลาง ส่งผลให้การเคลื่อนไหวผิดปกติ ไม่สามารถทรงตัวได้ ปรอททั้งหมดจะถูกดูดซึมผ่านกระเพาะและจะสะสมในตับและไต^(1, 2) การวิเคราะห์ปริมาณปรอทสามารถทำได้หลายวิธี เช่น อะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรโฟโตเมทรีเทคนิคโคลเวเปอร์ อะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรโฟโตเมทรีเทคนิคไฮโดรเจนเนอเรนซ์ และอินดักทีฟลีคอปเปิลพลาสมาแมสสเปกโตรโฟโตเมทรี เป็นต้น ซึ่งวิธีดังกล่าวต้องมีการเตรียมตัวอย่างให้อยู่ในรูปของสารละลาย⁽³⁾ และใช้สารเคมีในกระบวนการวิเคราะห์ ส่งผลให้เกิดการสูญเสียจากสารเคมี แต่พบว่ามีอีกหนึ่งวิธีวิเคราะห์ที่ไม่ต้องเตรียมตัวอย่าง ใช้สารเคมีในกระบวนการวิเคราะห์น้อย สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งตัวอย่างที่เป็นของเหลว ของแข็ง และกึ่งของเหลว ได้แก่ การวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ปรอทโดยเทคนิคการเผา ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานอ้างอิงตาม United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA.) method 7473 (2007)⁽⁴⁾ โดยมีหลักการ คือ การทำให้ตัวอย่างแห้งและเผาภายใต้บรรยากาศของออกซิเจน สารที่ได้จากการเผาทั้งหมดจะถูกส่งไปยัง catalyst ซึ่งทำหน้าที่ดักจับสารประกอบอินทรีย์ น้ำ และสารประกอบออกไซด์ รวมทั้งรีดิวซ์ปรอทให้อยู่ในรูป Hg^0 ปรอทที่ได้ทั้งหมดจะถูกดักจับไว้ที่ amalgamator เมื่อให้ความร้อนไอปรอทจะถูกปลดปล่อยออกมาแล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 253.7 นาโนเมตร ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี มีภารกิจสำคัญในการวิจัย ประเมินความเสี่ยง และการพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการอ้างอิง เพื่อนำองค์ความรู้ไปใช้ในการเฝ้าระวังคุณภาพผลิตภัณฑ์ โดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี มีพื้นที่รับผิดชอบดูแลจังหวัดภาคใต้ตอนบน ได้แก่ ชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช ซึ่งจังหวัดดังกล่าวมีพื้นที่ส่วนใหญ่ติดชายฝั่งทะเล อาหารทะเลจึงเป็นสิ่งที่ได้รับความนิยมทั้งการบริโภค และซื้อฝาก ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน กำหนดให้ในอาหารทะเลมีการปนเปื้อนปรอทได้ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี ในฐานะที่เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิง ได้ดำเนินการคัดเลือกและทวนสอบวิธีวิเคราะห์ ให้มีความเหมาะสม และถูกต้องเป็นไปตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025 การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทวนสอบวิธีวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมดในอาหารทะเลด้วยเครื่องวิเคราะห์ปรอทโดยเทคนิคการเผา โดยทำการศึกษาช่วงและความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างแม่นยำ ความแม่นยำและความเที่ยงของการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเดียว^(5, 6, 7, 8, 9) เพื่อให้ผลการทดสอบมีความน่าเชื่อถือ และเป็น การพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการให้เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปรอทได้อย่างมีความถูกต้อง สำหรับการตรวจสอบ เฝ้าระวังความปลอดภัยของอาหารทะเล ซึ่งนอกจากจะเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคแล้วหากมีข้อมูล สถานการณ์ความปลอดภัยของอาหารทะเล สามารถใช้ข้อมูลดังกล่าวร่วมกับหน่วยงานอื่นในการวางแผนการจัดการ หรือ เผยแพร่ข้อมูลเพื่อช่วยกระตุ้นส่งเสริมเศรษฐกิจในพื้นที่ด้วย

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือ

เครื่องบดป่นอาหาร (Moulinex), เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 4 ตำแหน่ง และเครื่องวิเคราะห์ปรอท โดยเทคนิคการเผา Direct mercury analyzer ยี่ห้อ Milestones รุ่น DMA-80 wide range

สารมาตรฐาน และสารเคมี

สารละลายมาตรฐานปรอท ผลิตภัณฑ์ของ FLUKA ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร, วัสดุอ้างอิง DROM-4 (Fish protein certified reference material for trace metals) ซึ่งมีความเข้มข้นของปรอททั้งหมดที่ 0.410 ± 0.055 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วัสดุอ้างอิง 1556b (Oyster tissue) ซึ่งมีความเข้มข้นของปรอททั้งหมดที่ 0.0371 ± 0.0013 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 60 AR Grade

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1. สารละลายมาตรฐานปรอทความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดย ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 1% (v/v) กรดไนตริก เป็น 100 มิลลิลิตร
2. สารละลายมาตรฐานปรอทความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดย ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 1% (v/v) กรดไนตริก เป็น 100 มิลลิลิตร
3. สารละลายมาตรฐานปรอทความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดย ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 1% (v/v) กรดไนตริก เป็น 100 มิลลิลิตร
4. สารละลายมาตรฐานปรอทความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดย ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 1% (v/v) กรดไนตริก เป็น 100 มิลลิลิตร
5. สารละลายมาตรฐานปรอทความเข้มข้น 0.001 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดย ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 1% (v/v) กรดไนตริก เป็น 100 มิลลิลิตร

ตัวอย่าง และการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างอาหารทะเล ได้แก่ ปลา หอย กุ้ง ปู และหมีก เตรียมตัวอย่างสำหรับทดสอบโดยล้างทำความสะอาด ตัวอย่างสดด้วยน้ำ เลือกละเฉพาะส่วนเนื้อที่บริโภคได้ นำมาบดป่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องบดป่นอาหาร ทำการทดสอบปริมาณปรอทในตัวอย่างทั้งหมด เลือกตัวอย่างที่มีปริมาณปรอทน้อย (ต่ำกว่า 0.001 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เป็น Sample blank สำหรับการศึกษาในครั้งนี้

การทำความสะอาดภาชนะบรรจุตัวอย่างทดสอบ

เตรียมภาชนะบรรจุตัวอย่าง (boat) วางในถาดของเครื่องวิเคราะห์ปรอทโดยเทคนิคการเผา เลือกสภาวะเครื่องสำหรับการทำความสะอาด (clean method) เพื่อให้เผาไล่ปรอทที่ตกค้างในภาชนะบรรจุตัวอย่าง Clean method

Heat & Purge

650 °C

180 Sec

การวิเคราะห์ปริมาณปรอท

ซึ่งตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์ 0.1 ± 0.05 กรัม ลงในภาชนะบรรจุตัวอย่างที่ผ่านการทำความสะอาด แล้วนำไปวางในถาดของเครื่องวิเคราะห์ปรอทโดยเทคนิคการเผา เลือกสภาวะเครื่องสำหรับการทดสอบ (test method)

Test method

- Dry	200 °C	120 Sec
- Heat & Purge	650 °C	240 Sec

ความยาวคลื่น 253.7 นาโนเมตร

การทวนสอบวิธีวิเคราะห์ (Method verification)

1. ทดสอบช่วงของความเข้มข้นเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานปรอทที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมความเข้มข้นละ 6 ข้าง นำไปวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมดด้วยเครื่องวิเคราะห์ปรอท สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นที่เตรียม (แกน x) กับสัญญาณที่ได้จากเครื่องมือ (แกน y) คำนวณสมการเส้นตรง และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination: R^2)

2. ทดสอบค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (limit of detection, LOD) และค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างแม่นยำ (limit of quantitative, LOQ) จากกราฟมาตรฐาน โดยการพิจารณาจุดตัดกราฟมาตรฐานของ y-intercept คือค่าความเข้มข้นต่ำสุด คำนวณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (xLOD) และค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างแม่นยำ (xLOQ) จากสูตร

$$^xLOD = 3 \left(\frac{S_{y/x}}{b} \right)$$

$$^xLOQ = 10 \left(\frac{S_{y/x}}{b} \right)$$

$$\text{เมื่อ } S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

โดย y_i คือ ค่าสัญญาณที่อ่านจากเครื่องมือ

$\hat{y}_i$ คือ ค่าสัญญาณที่ควรเป็น คำนวณได้จากสมการ regression
ค่า y บน regression line ที่ค่า x ระดับต่างๆ

$y_i - \hat{y}_i$ คือ y-residual

$n - 2$ คือ degree of freedom ของ linear regression line

b คือ slope

ยืนยันความแม่นยำ และความเที่ยงที่ LOQ โดยการเติมสารมาตรฐานปรอทที่ระดับความเข้มข้นที่ได้จากการคำนวณลงใน sample blank (เตรียมจำนวน 10 ข้าง) นำไปวิเคราะห์ปริมาณปรอท คำนวณค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืน (% recovery) และร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100$$

C_1 คือ ความเข้มข้นของ Sample blank ที่เติมสารละลายมาตรฐานปรอท

C_2 คือ ความเข้มข้นของ Sample blank

C_3 คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานปรอทที่เติมใน Sample blank

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

3. ทดสอบ Matrix effect โดยการวิเคราะห์ละลายสารมาตรฐาน ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และวิเคราะห์ Sample blank ที่เติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยเตรียมความเข้มข้นละ 6 ข้ำเพื่อนำไปวิเคราะห์ (ซึ่ง Sample blank 6 ครั้งต่อการทดสอบที่ 1 ระดับความเข้มข้น) สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐาน (แกน x) กับความเข้มข้นของ Sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน (แกน y) ทดสอบความเป็นเส้นตรงและทดสอบช่วงความเชื่อมั่น (confidence interval: CI) ของความชัน (slope) จากสมการ

$$\text{Confidence limits ของ slope (CI}_{\text{slope}}) = b \pm t_{(n-2)} S_b$$

$$\text{โดย } S_b \text{ คือ Standard deviation ของ slope } S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

4. ทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) โดย

4.1 ทดสอบ % recovery จากการวิเคราะห์ Sample blank ที่เติมสารละลายมาตรฐานที่เข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเตรียมความเข้มข้นละ 10 ข้ำเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมด (ซึ่ง Sample blank 10 ครั้ง ต่อการทดสอบที่ 1 ระดับความเข้มข้น) คำนวณ % recovery

4.2 ทดสอบความถูกต้อง (trueness) จากการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิง โดยซึ่งวัสดุอ้างอิงที่น้ำหนัก 0.1 ± 0.05 กรัม นำไปวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมด ทำการทดสอบจำนวน 10 ข้ำ (ซึ่งวัสดุอ้างอิง 10 ครั้ง) คำนวณค่า t จากสูตร

$$t = \frac{(\bar{X} - \mu)}{(S/\sqrt{n})}$$

$\bar{X}$ คือ ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์

μ คือ ค่าจริง หรือค่าอ้างอิง

S คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการวิเคราะห์

n คือ จำนวนครั้งที่วิเคราะห์

5. ความเที่ยง (Precision) โดย

5.1 ทดสอบความเที่ยงจากการวิเคราะห์ซ้ำ (Repeatability) จากการวิเคราะห์ Sample blank ที่เติมสารละลายมาตรฐานที่เข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเตรียมความเข้มข้นละ 10 ข้ำเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมด (ซึ่ง Sample blank 10 ครั้งต่อการทดสอบที่ 1 ระดับความเข้มข้น) คำนวณ %RSD และ HORRAT

5.2 ทดสอบความเที่ยงจากการวิเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการเดียวโดยผู้วิเคราะห์คนเดียว เครื่องมือเดียว ต่างวัน (Within-laboratory reproducibility) จากการวิเคราะห์ Sample blank ที่เติมสารละลายมาตรฐานที่เข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเตรียมความเข้มข้นละ 6 ข้ำเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมด (ซึ่ง Sample blank 6 ครั้งต่อการทดสอบที่ 1 ระดับความเข้มข้น) ทำซ้ำเหมือนเดิมแต่ต่างวันเป็นเวลา 5 วัน คำนวณ %RSD และ HORRAT

6. การประเมินผลการทวนสอบความถูกต้อง

6.1 ประเมิน matrix effect โดยทดสอบความเป็นเส้นตรงและทดสอบช่วงความเชื่อมั่น (confidential interval: CI) ของความชัน (slope) จากสมการ ถ้า CI_{slope} ผ่าน 1 แสดงว่าไม่มี matrix effect

6.2 ประเมิน %recovery ของการทดสอบความแม่นยำที่ระดับ LOQ และความแม่นยำจากการวิเคราะห์ตามเกณฑ์ AOAC กำหนด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงค่าคาดหวังของค่าร้อยละการกลับคืนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (mg/kg)	Acceptable recovery (%)
0.01	70–125
1.0	75–120
10.0	80–115

6.3 ประเมินความถูกต้องจากการวิเคราะห์หาค่าอ้างอิง เปรียบเทียบค่า t ที่ได้จากการคำนวณ (t_{cal}) กับค่า t ทางสถิติจากตาราง ($t_{critical}$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถ้าค่าที่ได้จากการคำนวณ (t_{cal}) น้อยกว่าค่า t ทางสถิติจากตาราง ($t_{critical}$) แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างค่าจากการทดสอบ กับค่าจริงหรือค่าอ้างอิง

6.4 ประเมินผลความเที่ยงจากการคำนวณ %RSD เกณฑ์การยอมรับตาม Horwitz's equation (ตารางที่ 2)

Horwitz's equation สำหรับ repeatability, %RSDr $= 0.66 \times 2C^{-0.15}$

Horwitz's equation สำหรับ within-laboratory reproducibility, %RSDi $= 2C^{-0.15}$

เมื่อ C คือค่าความเข้มข้นที่ศึกษา (Concentration of analyst)

Concentration of analyst (mg/kg)	Expected %RSDr	Expected %RSDi
0.01	21.1	32.0
0.05	16.6	25.1
0.1	14.9	22.6
0.5	11.7	17.8
1.0	10.6	16.0

ตารางที่ 2 แสดงค่าคาดหวังความเที่ยงจากการคำนวณ %RSD ตาม Horwitz's equation

6.5 ประเมินความเที่ยงจากการคำนวณค่า HORRAT

$$\text{HORRAT} = \frac{\text{RSD}_{\text{obs}}}{\text{RSD}_{\text{expected}}}$$

RSD_{obs} คือ %RSD ที่ได้จากการทดสอบ

$\text{RSD}_{\text{expected}}$ คือ %RSD ที่ได้จาก Horwitz's equation

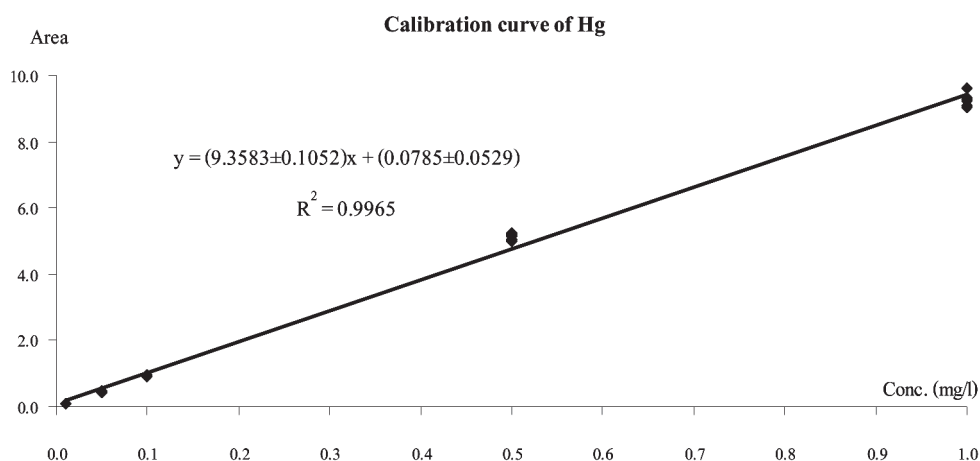
เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ที่ AOAC กำหนดไว้ คือ <2

ผล

ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์

จากการศึกษา พบว่าช่วงของการวิเคราะห์ มีค่า 0.01 ถึง 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อชั่งน้ำหนัก 0.1 กรัม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจมากกว่า 0.99; $R^2 > 0.99$

ภาพที่ 1 แสดงกราฟมาตรฐานปรอททั้งหมดในช่วง 0.01 – 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร



ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (limit of detection, LOD) และค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างแม่นยำ (limit of quantitative, LOQ)

ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) มีค่า 0.001 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างแม่นยำ (LOQ) มีค่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมี %recovery เท่ากับ 96.71 และ %RSD เท่ากับ 3.85

Matrix effect

ผลการทดสอบ matrix effect พบว่า ค่า Confidence limits ของ slope (CI_{slope}) มีค่า 1.00 – 1.03

ความแม่นยำ (Accuracy)

พบว่ามีค่าเฉลี่ย % Recovery ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 96.71, 94.29, 90.25, 94.83 และ 98.53 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนของการทดสอบความแม่นยำที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (mg/kg)	%Recovery $\pm$ SD
0.01	96.71 $\pm$ 3.73
0.05	94.29 $\pm$ 3.89
0.10	90.25 $\pm$ 2.42
0.50	94.83 $\pm$ 5.50
1.0	98.53 $\pm$ 2.12

ทดสอบความถูกต้อง (Trueness) จากการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรองทั้ง 2 ตัวอย่าง ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ พบว่า ค่า t_{cal} ที่ได้จากการคำนวณมีค่าน้อยกว่า t_{cal} ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยและ t ที่ได้จากการทดสอบวัสดุอ้างอิง

Certificate reference material	Mean $\pm$ SD (mg/kg)	t_{cal}	$t_{critical}$
DORM-4	0.406 $\pm$ 0.019	0.67	1.83
1556b	0.0370 $\pm$ 0.0006	0.312	1.83

ความเที่ยง (Precision)

Repeatability พบว่า ค่า %RSD ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ มีค่า 4.09, 4.58, 1.21, 1.50 และ 3.23 ตามลำดับ และมีค่า HORRAT เท่ากับ 0.19, 0.28, 0.08, 0.13 และ 0.31 ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์และค่า HORRAT ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของการทดสอบความเที่ยงจากการวิเคราะห์ซ้ำ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

Concentration of analyst (mg/kg)	%RSD _r	HORRAT
0.01	4.09	0.19
0.05	4.58	0.28
0.1	1.21	0.08
0.5	1.50	0.13
1.0	3.23	0.31

Within-laboratory reproducibility พบว่า ค่า %RSD ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ เป็นระยะเวลา 5 วัน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.85, 4.13, 2.68, 5.80 และ 2.15 ตามลำดับ และมีค่า HORRAT เท่ากับ 0.12, 0.16, 0.12, 0.33 และ 0.13 ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ และค่า HORRAT ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของการทดสอบความเที่ยงภายในห้องปฏิบัติการเดี่ยวโดยผู้วิเคราะห์คนเดียว เครื่องมือเดียว ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ เป็นระยะเวลา 5 วัน

Concentration of analyst (mg/kg)	%RSD _i	HORRAT
0.01	3.85	0.12
0.05	4.13	0.16
0.1	2.68	0.12
0.5	5.80	0.33
1.0	2.15	0.13

วิจารณ์

วิธีที่ทำการศึกษานี้เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว เนื่องจากลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและใช้สารเคมีน้อย ทำให้ลดของเสียที่เกิดจากกระบวนการวิเคราะห์ ปลอดภัยต่อนักวิเคราะห์และสิ่งแวดล้อม เนื่องจากปรอททั้งหมดที่ได้จากกระบวนการวิเคราะห์จะถูกดักจับไว้ที่ mercury trap ในขั้นตอนสุดท้ายของการวิเคราะห์ โดยวิธีดังกล่าวสามารถตรวจวิเคราะห์ปรอททั้งหมดได้ครอบคลุมตามเกณฑ์ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อนซึ่งกำหนดให้มีการปนเปื้อนปรอททั้งหมดในอาหารทะเลได้ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม⁽¹⁰⁾ และเมื่อทวนสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พบว่า วิธีที่ทำการศึกษามีความแม่นยำ และความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการได้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการกับ FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) ในการทดสอบ Metallic contaminants in canned crab meat; May-June 2014. พบว่า ผลการทดสอบที่ห้องปฏิบัติการรายงานโดยใช้วิธีดังกล่าวมีความน่าเชื่อถือ ($|Z| < 2$)⁽¹¹⁾ ทั้งนี้วิธีที่ทำการศึกษามีข้อควรระวัง คือใช้ตัวอย่างในการวิเคราะห์น้อย โดยคู่มือของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์แนะนำให้ชั่งตัวอย่าง 0.1 กรัม และอุปกรณ์สำหรับใส่ตัวอย่างในการวิเคราะห์มีขนาดบรรจุได้สูงสุดที่ 1.5 กรัม ดังนั้นในกระบวนการวิเคราะห์จึงควรระมัดระวังในขั้นตอนการชั่งตัวอย่าง และเนื่องจากวิธีดังกล่าวเป็นการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยตรงไม่ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่าง โอกาสการปนเปื้อนปรอทจะอยู่ในขั้นตอนกระบวนการวิเคราะห์โดยเครื่องมือทั้งหมด ดังนั้นก่อนการวิเคราะห์จะต้องทำความสะอาดอุปกรณ์สำหรับใส่ตัวอย่าง รวมทั้งระบบภายในเครื่องมือเพื่อให้มั่นใจว่าอุปกรณ์ดังกล่าวไม่มีการปนเปื้อนปรอท โดยการนำภาชนะสำหรับใส่ตัวอย่างไปทำการเผาไล่ปรอทและให้เครื่องเผาไล่ปรอททั้งหมดภายในระบบโดยไม่มีตัวอย่าง ซึ่งค่าปรอททั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ต้องมีค่าน้อยมาก การศึกษาในครั้งนี้ตั้งเกณฑ์ไว้ที่น้อยกว่า 0.1 นาโนกรัมของปรอท (น้อยกว่าค่า LOD ของการทดสอบ) ก่อนที่จะดำเนินการวิเคราะห์ตัวอย่าง และภายหลังจากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณปรอททั้งหมดสูง (ค่า Area เกิน 10) เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีปฏิบัติดังกล่าวสามารถนำมาใช้ได้กับผลิตภัณฑ์ทำการทดสอบเท่านั้น การนำผลที่ได้จากการศึกษาไปใช้ในการปฏิบัติงานประจำวัน จะต้องมีการวางแผนการควบคุมคุณภาพในการวิเคราะห์ รวมถึงกำหนดเกณฑ์ในการประเมินผลการควบคุมคุณภาพให้เหมาะสม เพื่อเป็นการประกันคุณภาพผลการทดสอบ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการศึกษาในครั้งนี้คือใช้เป็นแนวทางในการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์อื่น ๆ ต่อไป

สรุป

การตรวจวิเคราะห์ปรอททั้งหมดด้วยเครื่องปรอทเทคนิคการเผา ซึ่งอ้างอิงวิธีมาตรฐาน U.S. EPA. method 7473 (2007) สามารถใช้การตรวจวิเคราะห์ปริมาณปรอททั้งหมดในอาหารทะเลในช่วง 0.01 ถึง 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีความแม่นยำ และความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Mercury and health: fact sheet no. 361. [online]. Sep 2013; [4 screens]. Available from: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs361/en>
2. United States Environmental Protection Agency. Mercury: health effects. [online]. 2014; [3 screens]. Available from: URL: <http://www.epa.gov/mercury/effects.htm>
3. Analytical methods. In: WHO. Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects. Geneva: World Health Organization; 2003. p. 6-7.

4. United States Environmental Protection Agency. Method 7473 mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation, and atomic absorption spectrophotometry (CAS No. 7439-97-6). Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency; 2007.
5. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. [online]. 2002; [38 screens]. Available from: URL: http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf
6. AOAC official methods of analysis. Appendix F: guidelines for standard method performance requirements. Rockville, MD: AOAC International; 2012.
7. Eurachem guide. The fitness for purpose of analytical methods a laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: Eurachem; 1998. p. 5-24.
8. Miller JN, Miller JC. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. 5th ed. Harlow, England: Pearson Education; 2005.
9. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
10. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน. ราชกิจจานุเบกษาฉบับพิเศษ เล่มที่ 103 ตอนที่ 23 (ลงวันที่ 16 กุมภาพันธ์ 2529).
11. The Food and Environment Research Agency. FAPAS 07213: canned crab meat, arsenic (total), arsenic (inorganic), cadmium, lead & mercury (total). Sand Hutton, York: FAPAS; 2014.

The Method Verification of Total Mercury Analysis in Seafood by Using Direct Mercury Analyzer Combustion Technique

Khemikar Hemloha and Nirundorn Raekasin

Regional Medical Sciences Center 11 Surat Thani, Amphoe Muang, Surat Thani 84100. Thailand.

ABSTRACT Nowadays, mercury contaminated in food could be analyzed by several techniques. Direct mercury analyzer combustion technique was now in attention. This study aimed to verify of total mercury analysis in seafood by using direct mercury analyzer combustion technique according U.S. EPA. Method 7473 (2007). The analysis was subjected on range and linearity, the limit of detection, the limit of quantitation, accuracy, and precision within single laboratory. The results were shown the linear range from 0.01 to 1.00 mg/kg. The determination coefficient was greater than 0.99, limit of detection was 0.001 mg/kg and limit of quantitation was 0.01 mg/kg related to 96.71 of average percentage recovery. Accuracy test using certified reference materials were found that average test value was not different than reference value significantly at 95% confidence level. The analysis precision in single laboratory was accepted. Thus, this method appropriate to apply in the determination of total mercury in seafood was concentration range of 0.01 to 1.0 mg/kg. However, in comparison this method is faster than other method, because sample preparation procedure was not required and could be chemical reduced, environmentally friendly and safe for human.

Key words: Mercury, Seafood, Method verification, Direct mercury analyzer combustion technique

การทดสอบความถูกต้องของวิธีแคปิลลารีโซน อิเล็กโทรโฟรีซิสในการตรวจเอกลักษณ์ของยาชีววัตถุ เพื่อการรักษาชนิดโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ฐิตาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์ วิชชุดา จริยะพันธุ์ สายารุฬ จตุรภิตตินันท์ และธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ แคปิลลารีโซนอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary zone electrophoresis: CZE) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของยาชีววัตถุเพื่อการรักษา (biotherapeutic products: BTP) ที่ผลิตจากเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น โมโนโคลนอลแอนติบอดี ฮอโมน และไซโตไคน์ การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี CZE โดยใช้เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแคปิลลารี PA 800 plus (Beckman Coulter) แคปิลลารีแบบ neutral coated และเครื่องตรวจวัดแบบ UV ที่ความยาวคลื่น 214 nm ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของยาชีววัตถุเพื่อการรักษา (BTP) พบว่าวิธีนี้มีความจำเพาะดี ความเที่ยงของวิธีมีค่าร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของสารที่แยกได้ออกมาในพีคหลักน้อยกว่า 0.2 มีความคงทนที่ดีจากการทดสอบโดยเปลี่ยนผู้วิเคราะห์และสารละลายบัฟเฟอร์หรือเปลี่ยนแคปิลลารีก็ไม่มีผลกระทบต่อความถูกต้องของวิธี ซึ่งได้ค่า %RSD ของพีคหลักเพียง 0.2 แสดงให้เห็นว่าวิธี CZE เป็นวิธีที่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการตรวจเอกลักษณ์ของ BTP ร่วมกับวิธีอื่นเพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนตำรับยาของประเทศไทย

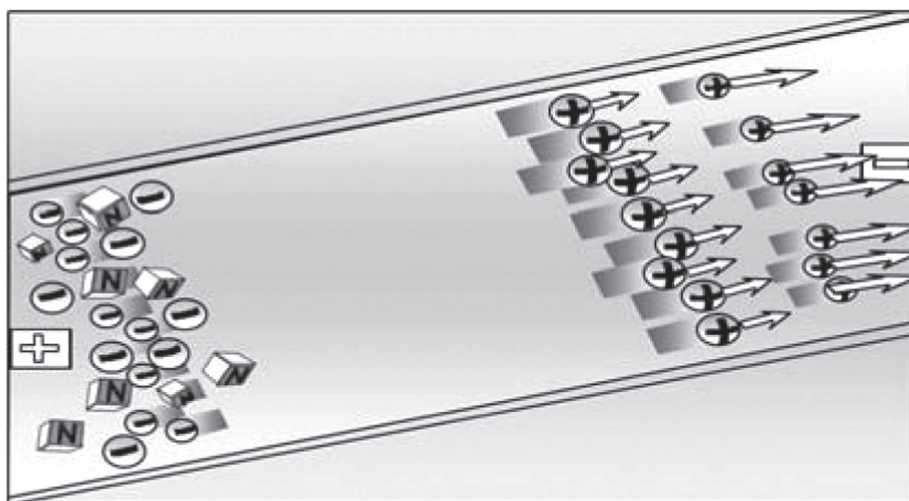
Accepted for publication, 19 June 2015



บทนำ

เทคนิคแคปิลลารีโซนอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary zone electrophoresis: CZE) เป็นวิธีการแยกสาร โดยอาศัยความแตกต่างตามชนิดของประจุของสาร เมื่อเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าในท่อแคปิลลารีที่บรรจุบัฟเฟอร์ หรือสารละลายอิเล็กโทรไลต์ สารที่มีประจุบวก ประจุลบ และสารที่เป็นกลางทางไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ออกจากแคปิลลารี ด้วยความเร็วที่แตกต่างกัน โดยสารประจุบวกจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูงสุดไปยังขั้วแคโทดโดยอาศัยการไหลแบบ อิเล็กโทรออสโมติก (Electroosmotic flow) และแรงดึงดูดจากขั้วแคโทด สารประจุลบจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วต่ำ สุดเนื่องจากมีแรงดึงดูดจากขั้วแอโนดในทิศทางตรงกันข้าม ส่วนสารที่เป็นกลางทางไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็ว ระหว่างความเร็วของสารประจุบวกและประจุลบ สารที่มีประจุแตกต่างกันในตัวอย่างจะเคลื่อนที่ออกจากแคปิลลารี โดยอาศัยการไหลแบบอิเล็กโทรออสโมติก⁽¹⁾ โดยมี UV detector เป็นตัวตรวจวัดปริมาณสาร และแสดงผลเป็น อิเล็กโทรโฟโรแกรม (electropherogram) ที่แสดงผลการแยกสารตามประจุไฟฟ้าประกอบด้วยพีคหลักและพีคอื่นที่ มีความแตกต่างทางประจุ และปริมาณสารที่แตกต่างกันตามความสูงของพีค โดยแสดงเวลาที่สารเคลื่อนออกมา (migration time: MT) เป็นนาที่ เทคนิคนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์สารประเภทโปรตีนชนิด ต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ ยังสามารถนำมาใช้เป็นหนึ่งในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของยาชีววัตถุเพื่อการรักษา (Biotherapeutic Products: BTP) โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดที่ผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพซึ่งเป็นยาโปรตีน^(2, 3)

Capillary Zone Electrophoresis (CZE) in neutral coated capillary



ภาพที่ 1 หลักการแยกสารโดยวิธีแคปิลลารีโซนอิเล็กโทรโฟรีซิส⁽⁴⁾

BTP ได้แก่ โมโนโคลนอลแอนติบอดี ไซโตไคน์ ฮอร์โมน เช่น granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) มีข้อดีคือสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคได้อย่างจำเพาะโดยผู้ที่ได้รับยาจะมีอาการข้างเคียงน้อย ขณะเดียวกันยาดังกล่าวซึ่งเป็นสารโปรตีนมีกระบวนการผลิตหลายขั้นตอน โมเลกุลซับซ้อนและโครงสร้างโมเลกุลมีการปรับเปลี่ยนได้ง่ายซึ่งมีผลกระทบจากปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นตั้งแต่การผลิตจนถึงระหว่างการเก็บ จึงทำให้ยาแต่ละรุ่นมี โอกาสที่จะมีโมเลกุลที่มีลักษณะแตกต่างกันซึ่งปรากฏเป็นหลายรูปแบบ (isoforms) โดยเฉพาะความแตกต่างของประจุ (charge heterogeneity)⁽⁵⁾ ซึ่งมีผลกระทบต่อการออกฤทธิ์และความคงตัวของยา การตรวจเอกลักษณ์ของยาแต่ละ รุ่นจึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง วิธีที่นิยมใช้วิเคราะห์โมเลกุลที่แตกต่างกันโดยอาศัยหลักการแยกสารโดยประจุ เช่น Isoelectric Focusing (IEF) แบบเจล⁽⁶⁾ แต่มีข้อด้อยคือใช้เวลานาน ผู้วิเคราะห์ต้องมีทักษะที่ดีในการทดสอบ

และวิเคราะห์ผล จึงได้ประยุกต์ใช้วิธี CZE โดยการใช้แคปิลลารีแบบ neutral coated ที่เคลือบด้วย polyacrylamide⁽⁷⁾ และมีสารที่ทำให้เกิด cross link ใน running buffer เกิดเป็นร่างแหทำให้การแยก mAb เป็นแบบ sieving mechanism ที่อาศัยขนาดของโมเลกุลร่วมกับประจุรวมที่แตกต่างกัน เป็นวิธีอัตโนมัติที่นิยมใช้มากในปัจจุบัน⁽⁶⁾ เพื่อแยกและวิเคราะห์โปรตีนที่มีความแตกต่างแม้เพียงเล็กน้อยของประจุบนโมเลกุลในการตรวจเอกลักษณ์ของยาโปรตีนเพื่อให้ทราบถึงคุณภาพของ BTP และความสม่ำเสมอของการผลิตซึ่งเป็นสิ่งสำคัญและจำเป็นเพื่อให้ได้ยามีคุณภาพตามข้อกำหนด⁽⁸⁻⁹⁾ ซึ่งมีการใช้เทคนิคนี้ทั้งในโรงงานผลิตยาและงานวิจัยที่ใช้วิธี CZE ทดสอบคุณภาพของยา mAb หลายชนิด เช่น rituximab, infliximab, trastuzumab, tocilizumab^(5, 10)

ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อประยุกต์วิธี CZE และทำการทดสอบความถูกต้อง ความเที่ยง และความคงทนของวิธีโดยทดลองเปลี่ยนท่อแคปิลลารี และทดสอบด้วยนักวิเคราะห์ 2 คน รวมทั้งการใช้สารละลายที่เตรียมต่างวันกัน

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแคปิลลารี (capillary electrophoresis: CE) รุ่น PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System (Beckman Coulter, USA) ประกอบด้วยชุดคอมพิวเตอร์ และโปรแกรมประมวลผล 32 Karat Software version 9.1 patch และ PA 800 plus Software version 1.1 patch มีเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิด UV 214 nm และแคปิลลารีแบบ neutral coated ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 50 μm ยาว 50 cm เครื่องเขย่าสาร (Vortex Genie II, Scientific Industries)

สารละลาย และสารมาตรฐาน

Washing/Running buffer: 40 mM ϵ -Amino-n-Caproic Acid (EACA: Sigma # A-7824), 0.2% Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC: Sigma # H-7509) pH 4.5

Blank: Formulation buffer (trisodium citrate dehydrate (Fluka # 71403) 7.35 g, sodium chloride (Sigma # S9888) 8.77 g, 0.7% tween-80 100 ml, ultrapure water)

สารมาตรฐาน : BTP ที่เป็น mAb ชนิดต่างๆ จำนวน 5 ชนิด สำหรับทดสอบ mAb ชนิด A B C D และ E จากผู้ผลิตตามลำดับ ที่ตรงกับชนิดของตัวอย่างยาที่จะทดสอบ

ตัวอย่าง

ตัวอย่างยา BTP ชนิด mAb ชนิดต่างๆ จำนวน 5 ชนิด คือ mAb ชนิด A B C D และ E ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ส่งตรวจเพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนตำรับยา

สารผสมระหว่างสารมาตรฐานและตัวอย่างชนิดเดียวกัน (Co-mix) ที่มีปริมาณโปรตีนแต่ละชนิดเท่ากัน ที่ความเข้มข้นละ 0.5 mg/ml

การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐานโดยการเจือจางสารมาตรฐานและตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 0.5 mg/ml ด้วย ultrapure water

เตรียม Co-Mix โดยการผสมสารมาตรฐานและตัวอย่างชนิดเดียวกันที่เจือจางให้มีความเข้มข้นโปรตีน 0.5 mg/ml ด้วย ultrapure water แล้วปิเปตมาปริมาตรอย่างละ 100 μl

วิธีวิเคราะห์

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

กำหนดสภาวะของเครื่องมือในการแยกสาร และบันทึกลงในโปรแกรมการวิเคราะห์โปรแกรมประมวลผล 32 Karat Software version 9.1 patch (Beckman Coulter, USA) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 สภาวะของเครื่อง CE (PA 800 plus, Beckman Coulter) ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ CZE ในขั้นตอนการแยกสาร

step#	event	value	duration	comments
1	rinse-pressure	40.0 psi	2.00 min	ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์
2	inject-pressure	1.0 psi	10.0 sec	ฉีดตัวอย่าง
4	separation- voltage	30.0 kV	15.00 min	ขั้นตอนการแยก
5	stop data			สิ้นสุดขั้นตอนการแยก
6	rinse-pressure	40.0 psi	2.00 min	ล้างด้วยน้ำ
7	end		20.0 sec	จบขั้นตอนการวิเคราะห์

psi หมายถึง หน่วยที่ใช้ในการฉีดโดยใช้ความดัน

การทดสอบความถูกต้องของวิธี (Method Validation)

1. การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

ทดสอบสารมาตรฐาน mAb ชนิด A ตัวอย่าง mAb ชนิด A และ Co-Mix ของสารมาตรฐานและตัวอย่าง mAb ชนิด A ที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 0.5 mg/ml โดยฉีดที่ความดัน 1 psi เป็นเวลา 10 วินาที ตามสภาวะที่กำหนด (ตารางที่ 1) ชนิดละ 6 ข้ำ แล้วเปรียบเทียบผลอิเล็กโทรโฟรีแกรม และ MT ของสารที่ฉีดทั้ง 3 ชนิด ซึ่งอิเล็กโทรโฟรีแกรมของตัวอย่างและ MT ของตัวอย่างควรเหมือนกับสารมาตรฐาน และทดสอบ blank ที่สภาวะเดียวกัน ซึ่งจะไม่ปรากฏพีคใดๆ ในอิเล็กโทรโฟรีแกรม

2. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

2.1 การทดสอบซ้ำในวันเดียวกัน (Repeatability)

ทดสอบสารมาตรฐาน mAb ชนิด A ตัวอย่าง mAb ชนิด A และ Co-Mix ของสารมาตรฐานและตัวอย่าง mAb ชนิด A ตามข้อ 1

2.2 การวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (Intermediate precision)

ทดสอบตัวอย่าง mAb ชนิด A ตามข้อ 1 เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบความสอดคล้องของผลวิเคราะห์จากแต่ละวัน

3. การทดสอบความคงทนของวิธี (Robustness)

3.1 ศึกษาผลกระทบของวิธีเมื่อเปลี่ยนท่อแคปิลลารี

ทำการทดสอบตัวอย่าง mAb ชนิด A จำนวน 6 ข้ำ โดยใช้แคปิลลารีจำนวน 2 ท่อ ที่เป็นยี่ห้อเดียวกัน แต่ต่างรุ่นการผลิต ผลที่ได้ต้องไม่มีความแตกต่างของค่า MT ที่ได้จากข้อ 2 เมื่อมีการเปลี่ยนท่อแคปิลลารี

3.2 ศึกษาผลกระทบของวิธีเมื่อเปลี่ยนนักวิเคราะห์

ทำการทดสอบตัวอย่าง mAb ชนิด A จำนวน 6 ซ้ำ โดยนักวิเคราะห์ 2 คน ผลที่ได้ต้องไม่มีความแตกต่างของค่า MT ที่ได้จากข้อ 2 เมื่อมีการเปลี่ยนนักวิเคราะห์

3.3 ศึกษาผลกระทบของวิธีเมื่อเปลี่ยนสารละลายที่ใช้ทดสอบ

ทำการทดสอบตัวอย่าง mAb ชนิด A จำนวน 6 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบผลของการใช้สารละลาย washing/running buffer ที่เตรียมจำนวน 2 ชุด ผลที่ได้ต้องไม่มีความแตกต่างของค่า MT ที่ได้จากข้อ 2 เมื่อมีการใช้สารละลายต่างกัน

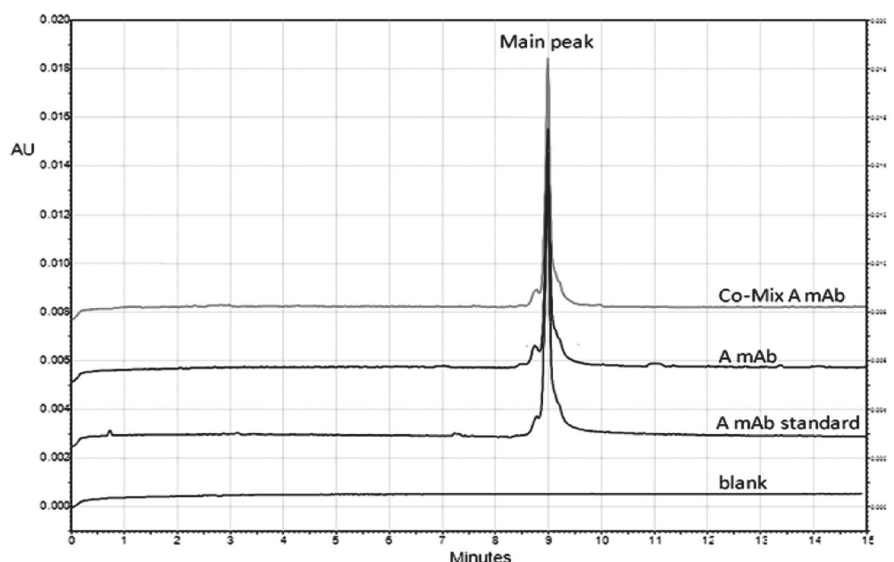
4. การทดสอบตัวอย่าง

วิเคราะห์เอกลักษณ์ของตัวอย่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 4 ชนิด คือ mAb ชนิด B, C, D และ E

ผล

ความจำเพาะ

จากการตรวจสอบ blank พบว่าไม่มีพีคใดๆ ปรากฏ ในขณะที่สารมาตรฐาน ตัวอย่าง และ Co-Mix ของ mAb ชนิด A มีอิเล็กโทรโฟโแกรมไม่แตกต่างกัน และมีค่า MT ตรงกันคือที่ 8.98 นาที (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 อิเล็กโทรโฟโแกรมของการทดสอบความจำเพาะซึ่งแสดงผลของ blank, สารมาตรฐาน, ตัวอย่าง และ Co-mix ของ mAb ชนิด A โดยมีแกนตั้งเป็นค่าการดูดกลืนแสงและแกนนอนเป็นค่า migration time

ความเที่ยง

ผลตรวจสอบตัวอย่าง mAb ชนิด A ซ้ำ 6 ครั้ง ภายในวันเดียวกันและการตรวจสอบซ้ำ เป็นเวลา 3 วัน วันละ 6 ครั้ง พบว่า %RSD ของพีคหลักมีค่าเพียง 0.06 และ 0.13 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเที่ยงโดยการตรวจสอบตัวอย่าง mAb ชนิด A ซ้ำ 6 ครั้ง ภายในวันเดียวกันและ 3 วัน

ครั้งที่	Main peak migration time (min)			
	วันเดียวกัน	ตรวจสอบซ้ำ 3 วัน		
		วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
1	8.96	8.98	8.97	9.01
2	8.96	8.98	9.00	9.00
3	8.97	8.99	8.98	9.00
4	8.96	8.99	9.00	9.00
5	8.97	8.98	9.00	9.00
6	8.97	8.98	8.97	9.00
Mean	8.97		8.99	
SD*	0.005		0.012	
%RSD**	0.06		0.13	

* SD = standard deviation

** %RSD = percent relative standard deviation

จากการทดสอบสารมาตรฐาน ตัวอย่าง และ Co-Mix ซ้ำ 6 ครั้ง และนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกัน พบว่าค่า MT ของพีคหลักในแต่ละครั้งของการทดสอบสารมาตรฐาน ตัวอย่าง และ Co-Mix มีความแตกต่างกันไม่เกิน 0.02 นาที (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความเที่ยงโดยการเปรียบเทียบผลการตรวจสอบสารมาตรฐาน (mAb std.) ตัวอย่าง (mAb ชนิด A) และ Co-Mix ซ้ำ 6 ครั้ง แสดงค่าความแตกต่างของ migration time (Diff)

ครั้งที่	Main peak migration time (min)								
	mAb std.	mAb A	Diff	mAb std.	Co-mix	Diff	mAb A	Co-mix	Diff
1	9.00	8.98	0.02	9.00	8.98	0.02	8.98	8.98	0.00
2	8.99	8.98	0.01	8.99	8.98	0.01	8.98	8.98	0.00
3	8.98	8.99	0.01	8.98	8.99	0.01	8.99	8.99	0.00
4	8.98	8.99	0.01	8.98	8.98	0.00	8.99	8.98	0.01
5	8.98	8.98	0.00	8.98	8.98	0.00	8.98	8.98	0.00
6	8.98	8.98	0.00	8.98	8.98	0.00	8.98	8.98	0.00
Mean			0.01	Mean		0.01	Mean		0.00

ความคงทน

ตรวจสอบตัวอย่าง mAb ชนิด A จำนวน 6 ซ้ำ กับแคปิลลารีจำนวน 2 ท่อ นักวิเคราะห์ 2 คน และสารละลาย 2 ชุด พบว่าค่า MT ที่ได้ไม่ต่างกัน ได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน MT ของพีคหลักน้อยกว่า 0.02 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบความคงทนเมื่อตรวจสอบตัวอย่าง mAb ชนิด A ซ้ำ 6 ครั้ง เมื่อเปลี่ยนท่อแคปิลลารี 2 ท่อ โดยนักวิเคราะห์ 2 คน และโดยใช้สารละลาย 2 ชุด

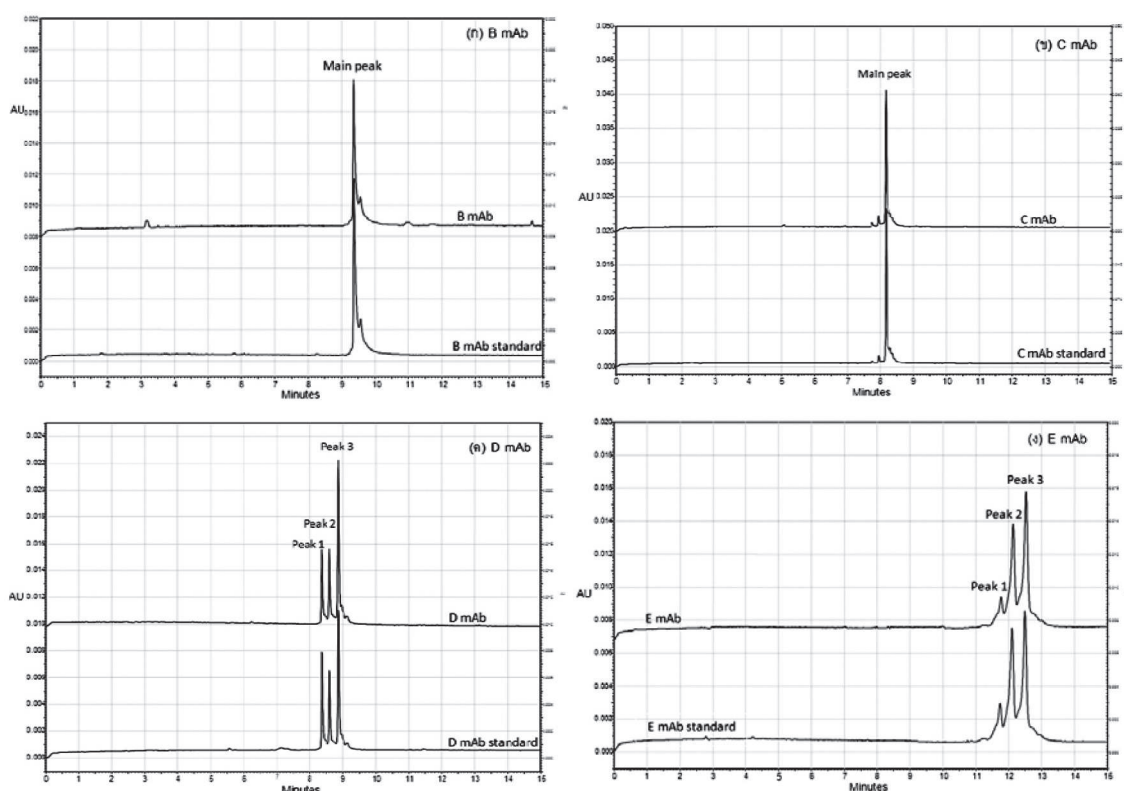
ครั้งที่	Main peak migration time (min)					
	แคปิลลารี 1	แคปิลลารี 2	นักวิเคราะห์ 1	นักวิเคราะห์ 2	สารละลาย 1	สารละลาย 2
1	8.96	8.98	8.96	9.00	8.96	9.01
2	8.96	8.98	8.96	9.00	8.96	9.00
3	8.97	8.99	8.97	8.99	8.97	8.99
4	8.96	8.99	8.96	9.00	8.96	8.99
5	8.97	8.98	8.97	8.99	8.97	8.98
6	8.97	8.98	8.97	8.99	8.97	8.99
Mean	8.97		8.98		8.98	
SD	0.011		0.017		0.017	
%RSD	0.12		0.18		0.19	

* SD = standard deviation

** %RSD = percent relative standard deviation

การตรวจสอบตัวอย่าง Biotherapeutic products

ผลการตรวจสอบตัวอย่าง BTP ชนิดโมโนโคลนอลแอนติบอดี 4 ชนิด พบว่าตัวอย่าง mAb ชนิด B, C, D และ E แสดงอิเล็กโทรโฟโกราแกรมและค่า MT ตรงกับสารมาตรฐานของตัวอย่างแต่ละชนิด (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 อิเล็กโทรโฟโกราแกรมของการทดสอบสารมาตรฐานและตัวอย่าง mAb ชนิด B, C, D และ E ตามลำดับ

วิจารณ์

ในตำราฯ เช่น USP⁽⁸⁾, Ph Eur⁽⁹⁾ ได้มีการระบุการใช้เทคนิค CZE สำหรับการตรวจเอกลักษณ์ของยาโปรตีนที่ผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพไว้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงทำการศึกษาความถูกต้องของวิธีโดยทดสอบสภาวะของเครื่องมือตามที่กำหนดในด้านความจำเพาะ ความเที่ยงของวิธีรวมทั้งความคงทนของสภาวะเมื่อเปลี่ยนแปลงปัจจัยบางอย่าง ตัวอย่าง mAb ที่นำมาทดสอบทั้ง 5 ชนิดเป็นตัวอย่างยานำเข้าจากต่างประเทศส่งมาเพื่อขอรับการตรวจวิเคราะห์คุณภาพและนำผลไปประกอบการขึ้นทะเบียนตำรับยาซึ่งทั้งหมดเป็น BTP ชนิดต้นแบบ (originator) มีทั้งชนิดที่เป็นโปรตีนและไกลโคโปรตีนที่มีโมเลกุลมีขนาดน้ำหนักประมาณ 145 – 150 kDa ใช้รักษาโรคต่างๆ เช่น โรคลูปัส (Systemic Lupus Erythematosus) โรครูมาตอยด์ มะเร็งกระดุก มะเร็งเม็ดเลือดขาว และมะเร็งเต้านม และถึงแม้ว่า mAb จะมีน้ำหนักใกล้เคียงกันดังกล่าว การแยกสารในท่อแคปิลลารีชนิด neutral coated ซึ่งไม่มีประจุบนผิวท่อที่จะมีปฏิกิริยากับประจุบนโมเลกุลของสารนี้ แต่อาศัยการแยกโดยใช้ทั้งน้ำหนักและประจุรวมบนโมเลกุลในการวิ่งไปยังปลายขั้ว จึงสามารถใช้ตรวจสอบเอกลักษณ์ได้

การศึกษาก่อนหน้าได้ทดสอบหาปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมแล้ว พบว่าที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml โดยฉีดที่ความดัน 1 psi เป็นเวลา 10 วินาที ตามสภาวะที่กำหนดนี้สามารถมองเห็นพีคที่เล็กที่สุดได้อย่างชัดเจน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นนี้ตลอดการศึกษา และเนื่องจากยา mAb แต่ละชนิดมีจำนวนน้อยและราคาสูง จึงทำการสุ่มเลือกเพียง 1 ชนิด คือ mAb ชนิด A เป็นตัวแทนสำหรับทดสอบสภาวะของเทคนิคในการศึกษานี้ ผลการทดสอบสภาวะของวิธีที่กำหนดนี้ให้ผลในด้านความจำเพาะ ความเที่ยง และความคงทนของวิธีที่เหมาะสม จากการตรวจสอบความจำเพาะโดยใช้ตัวอย่าง mAb ชนิด A สารมาตรฐาน และ Co-mix ของ mAb ชนิด A ได้อิเล็กโทรโฟโกราแกรมและค่า MT ไม่แตกต่างกัน วิธีมีความเที่ยงจากการวิเคราะห์ในวันเดียวกันและต่างวัน ได้ค่า MT ของพีคหลักมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเพียง 0.01 และน้อยกว่า 0.02 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) นอกจากนี้ผลการตรวจสอบความเที่ยงโดยการเปรียบเทียบค่า MT ระหว่างพีคหลักของสารมาตรฐานกับ mAb ชนิด A และสารมาตรฐานกับ Co-Mix รวมทั้งตัวอย่าง mAb ชนิด A กับ Co-mix ทั้ง 6 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างกันโดยมีค่า MT แตกต่างกันไม่เกิน 0.02 นาที (ตารางที่ 3) ส่วนผลการตรวจสอบความคงทน (ตารางที่ 4) จากการใช้แคปิลลารียี่ห้อเดียวกันแต่ต่างรุ่นการผลิต การทดสอบโดยนักวิเคราะห์ 2 คน รวมทั้งการใช้ elution buffer ที่เตรียมแต่ละครั้งพบว่า การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ไม่มีผลกระทบต่อสภาวะของวิธี CZE นี้ เนื่องจากส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า MT ของพีคหลักมีน้อยกว่า 0.02 นอกจากนี้ อิเล็กโทรโฟโกราแกรมที่ได้มีลักษณะเป็น sharp peak แสดงให้เห็นว่าไม่เกิดการดูดซับ (protein adsorption) โปรตีนกับผนังแคปิลลารีหรือเกิดน้อยมาก

เมื่อทดลองใช้วิธี CZE ตามสภาวะที่ได้ทดสอบแล้วมาตรวจสอบเอกลักษณ์ของ mAb ชนิด B, C, D และ E พบว่าอิเล็กโทรโฟโกราแกรมที่ได้เป็นไปตามชนิดของยา (ภาพที่ 3) ซึ่งประกอบด้วยพีคขนาดเล็กและใหญ่ โดยพีคที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดเป็นพีคหลัก พีคที่ออกมาก่อนเป็น basic peak โดยมี acid peak ออกมาภายหลัง ตัวอย่าง mAb ชนิด B และ C ให้อิเล็กโทรโฟโกราแกรมที่มีพีคหลักชัดเจนและมีพีคเล็กอยู่ด้านซ้ายและขวาของพีคหลัก ส่วนอิเล็กโทรโฟโกราแกรมของ mAb ชนิด D และ E มีพีคใหญ่ที่เห็นชัดเจนอย่างน้อย 3 พีค รวมทั้งพีคหลักมี basic peak 2 พีค และมีพีคขนาดเล็กเป็น acid peak ด้านขวา ตัวอย่าง mAb ทุกชนิดที่ทดสอบได้อิเล็กโทรโฟโกราแกรมที่มีค่า MT และจำนวนพีคที่ปรากฏตรงกับสารมาตรฐาน ซึ่งในการขึ้นทะเบียนจะถือว่าผ่านเกณฑ์การตรวจเอกลักษณ์ตามข้อกำหนด^(8, 9)

นอกจากนี้วิธี CZE ยังมีข้อดีคือใช้เวลาทำการทดสอบสั้นเพียง 30 นาที (ตารางที่ 1) เมื่อเทียบกับวิธีอื่นที่ใช้วิเคราะห์โมเลกุลโปรตีนจากความแตกต่างของประจุ เช่น IEF แบบเจลที่ต้องใช้เวลาทำการทดสอบถึง 180 นาที ส่วน Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) ใช้เวลาทำการทดสอบมากกว่า 60 นาที นอกจากนั้น CZE ยังสามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างได้ถึง 4 ตัวอย่าง ภายในเวลาเพียง 1 ชั่วโมง

สรุป

วิธี CZE ตามสภาวะที่ใช้นี้มีความจำเพาะ ความเที่ยง และความคงทนที่ดี มีประสิทธิภาพในการแยกโปรตีนและไกลโคโปรตีนสูง ใช้เวลาน้อยจึงเหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพด้านเอกลักษณ์ของยาชีววัตถุเพื่อการรักษาร่วมกับวิธีอื่นๆ ตามข้อกำหนด⁽¹¹⁾ เพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนตำรับยาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ดำเนินการโดยใช้งบประมาณของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารอ้างอิง

1. ลีณา สุนทรสุข. ตำราแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2550.
2. Moritz B, Schnaible V, Kiessig S, Heyne A, Wild M, Finkler C, et al. Evaluation of capillary zone electrophoresis for charge heterogeneity testing of monoclonal antibodies. *J Chromatogr B* 2015; 983-984: 101-10.
3. Nuchtavorn N, Suntornsuk L. Simultaneous analysis of biologically active pyridines in pharmaceutical formulations by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr Sci* 2012; 50(2): 151-6.
4. Majors RE. Basics of capillary electrophoresis. [online].[cited 2015 Jul 10]; [58 screens]. Available from: URL: http://matematicas.udea.edu.co/~carlopez/cnq533/CE_Basics.pdf.
5. Espinosa-de la Garza CE, Perdomo-Abúndez FC, Padilla-Calderón J, Uribe-Wiechers JM, Pérez NO, Flores-Ortiz LF, et al. Analysis of recombinant monoclonal antibodies by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 2013; 34(8): 1133-40.
6. Shi Y, Li Z, Qiao Y, Lin J. Development and validation of a rapid capillary zone electrophoresis method for determining charge variants of mAb. *J Chromatogr B* 2012; 906: 63-8.
7. Place setter CE in biotechnology. The Newsletter for Capillary Electrophoresis. [online]. 1998 [cited 2015 Jul 10]; 2(2): [13 screens]. Available from: URL: [http://www.beckmancoulter.com/products/CELeader/newsletters/\[vol02no2\]paceset2_2.pdf](http://www.beckmancoulter.com/products/CELeader/newsletters/[vol02no2]paceset2_2.pdf).
8. USP 37-NF 32. The United States pharmacopoeia 37 - The national formulary 32. 32nd ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention; 2014. p. 723-9.
9. European Pharmacopoeia. 8th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2014. p. 79-82, 753-5.
10. Taga A, Kita S, Nishiura K, Hayashi T, Kinoshita M, Sato A, et al. Analysis of an antibody pharmaceutical, tocilizumab, by capillary electrophoresis using a carboxylated capillary. *J Sep Sci* 2008; 31(5): 853-8.
11. ICH harmonised tripartite guideline. Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products (Q6B). London: European Medicines Agency; 2006.

Method Validation of Capillary Zone Electrophoresis Technique for Identity Testing of Biotherapeutic Products: Monoclonal Antibody

**Titaporn Pootipinyowat Wichuda Jariyapan Saiwarul Jadoonkittinan
and Teeranart Jivapaisarnpong**

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

ABSTRACT Capillary zone electrophoresis (CZE) is one of the analytical techniques for identity testing of biotherapeutic products (BTP) produced by biotechnological techniques for example: monoclonal antibody, hormones and cytokines. Therefore, this study was aimed to validate CZE by using PA 800 plus capillary electrophoresis system (Beckman Coulter), neutral coated capillary and UV detector at 214 nm. The proposed CZE condition showed high specificity and percent relative standard deviation (%RSD) of precision of main peak was less than 0.2. Moreover, the method was robust as shown in results of 0.2 %RSD when tested by two different analysts and different lots of elution buffers or capillary tubes. The obtained data suggested that CZE is potential for using as one of analytical methods for identity testing of BTP for marketing authorization in Thailand.

Key words: CZE, biotherapeutic products, monoclonal antibody

วิธีวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์รวมทั้งหมดในยาสีฟัน โดยวิธี GC-FID

กมลลักษณ์ อินทร์ศรี และสุดิศา หมีทอง

สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ วิธีวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์รวมทั้งหมดในยาสีฟัน โดยวิธี GC-FID ภายใต้สภาวะคอลัมน์ชนิด capillary HP-1 ขนาด 15 เมตร $\times$ 0.53 มิลลิเมตร $\times$ 1.5 ไมโครเมตร carrier gas เป็นแก๊สฮีเลียมโดยใช้แก๊สไฮโดรเจนและอากาศเป็น make-up gas โปรแกรมของอัตราการไหลของแก๊สเริ่มต้นที่ 3 มิลลิตรต่อนาที และปรับเป็น 45 มิลลิตรต่อนาที เครื่องตรวจวัดชนิด Flame ionization (FID) ปริมาตรที่ฉีด 3 ไมโครลิตร อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้นที่ 80 องศาเซลเซียส และเพิ่มจนถึง 280 องศาเซลเซียส คงที่นาน 2.5 นาที อุณหภูมิของ injector และเครื่องตรวจวัดเท่ากับ 280 และ 300 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากการทดสอบความถูกต้องของวิธี โดยใช้ตัวอย่างยาสีฟันที่มีสารโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟตและยาสีฟันที่มีสารโซเดียมฟลูออไรด์โดย hydrolyse สารโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟตด้วย hydrochloric acid ได้ฟลูออไรด์และทำให้ฟลูออไรด์เกิดปฏิกิริยากับสาร triethylchlorosilane (TECS) ภายใต้สภาวะกรดเกิดเป็นอนุพันธ์ คือ สาร triethylfluorosilane (TEFS) โดยใช้ cyclohexane เป็น internal standard สกัดด้วย xylene แล้วฉีดเข้าเครื่อง GC พบว่าค่า retention time ของ internal standard และ TEFS เท่ากับ 2.6 และ 4.3 นาที ตามลำดับ มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของฟลูออไรด์กับ peak area ratio ตลอดช่วงความเข้มข้น 0.05 ถึง 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร โดยมีค่า r เท่ากับ 0.9993 และค่า r แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่เติมกับปริมาณที่ตรวจพบเท่ากับ 0.9868 และ 0.9898 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์รวมทั้งหมดในตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด วิเคราะห์ภายในวันเดียวกันได้ค่า %RSD เท่ากับ 0.56 และ 0.68 ตามลำดับ พบว่าไม่มีความแตกต่างของผลวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวัน 5 วัน โดยมีค่า p -value เท่ากับ 0.93 และ 0.36 ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ ผลวิเคราะห์ spiked sample ได้ค่า recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 80.2 – 118.5 และ 81.4 – 106.9 ตามลำดับ ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 30 และ 330 ส่วนในล้านส่วนตามลำดับ ค่าความไม่แน่นอนขยายสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 6.0 ซึ่งผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์รวมทั้งหมดในยาสีฟันได้



บทนำ

ฟลูออไรด์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในยาสีฟันทำหน้าที่เคลือบฟันให้แข็งแรงขึ้นทนต่อการกร่อนทำให้ป้องกันฟันผุได้ นอกจากนี้ฟลูออไรด์ยังมีผลต่อแบคทีเรียโดยจะลดการสร้างกรดของแบคทีเรีย ลดการเกาะติดของจุลินทรีย์บนผิวฟันด้วย อย่างไรก็ตาม การที่ร่างกายได้รับปริมาณฟลูออไรด์ที่มากเกินไปจะทำให้เกิดฟันตกกระ (fluorosis) ในกรณีที่รุนแรงฟันจะเกิดเป็นรอยสีน้ำตาล ผิวฟันจะขรุขระเป็นจุดและทำความสะอาดได้ยาก อาจมีการปวดข้อมือข้อเท้า ถ้าเป็นมากลูกกลามไปยังกระดูกสันหลังจนไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ ความเข้มข้นของฟลูออไรด์ที่แนะนำให้ใช้ในการป้องกันฟันผุคือ 1,000–1,500 ส่วนในล้านส่วนโดยน้ำหนัก ในต่างประเทศ เช่น ประเทศอังกฤษ ประเทศแคนาดา แนะนำให้ใช้ยาสีฟันผสมฟลูออไรด์ปริมาณน้อยกว่า 600 ส่วนในล้านส่วนในยาสีฟันสำหรับเด็กอายุน้อยกว่า 6 ปี^(1, 2) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขกำหนดปริมาณสูงสุดของฟลูออไรด์ในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปไม่เกินร้อยละ 0.11 โดยน้ำหนัก⁽³⁾ สารประกอบของฟลูออไรด์ที่นิยมใช้ในยาสีฟัน เช่น โซเดียมฟลูออไรด์ (sodium fluoride), โซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟต (sodium monofluorophosphate), สแตนนัสฟลูออไรด์ (stannous fluoride) และเอมีนฟลูออไรด์ (amine fluoride) เป็นต้น ในยาสีฟันประกอบด้วยสารขัดฟัน (abrasives) ช่วยขัดคราบอาหารและคราบหินปูนที่เกาะอยู่บนฟัน สารขัดฟันที่นิยมใช้ เช่น แคลเซียมฟอสเฟต, แคลเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต (Calcium monohydrogenphosphate dihydrate), แคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate), ซิลิกอนไดออกไซด์ (Silicon dioxide) เป็นต้น นอกจากนี้มีสารช่วยลดปัญหาการเสียวฟัน เช่น โพแทสเซียมไนเตรด (Potassium nitrate), สแตนนัสฟลูออไรด์ (stannous fluoride), โพแทสเซียมออกซาเลต (Potassium oxalate), สตรอนเตียม คลอไรด์ (Strontium chloride) เป็นต้น ซึ่งปัจจุบันมีการแนะนำสารตัวใหม่สำหรับการลดภาวะเนื้อฟันไวเกิน โดยกลไกการอุดตันท่อเนื้อฟัน ได้แก่ สตรอนเตียม อะซิเตต (Strontium acetate), แคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate) และอะจินีน (arginine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่ง^(4, 5) วิธีวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์ในยาสีฟันมีหลายเทคนิค เช่น วิธี fluoride ion selective electrode (ISE) โดยละลายยาสีฟันในน้ำและเติมกรดเปอร์คลอริก เพื่อทำให้โมโนฟลูออโรฟอสเฟตไอออน (monofluorophosphate ion) แตกตัวเป็นฟลูออไรด์ไอออน (fluoride ion) และวัดปริมาณฟลูออไรด์ไอออนด้วยเครื่อง Ion analyser โดยใช้หลักการของ potentiometry และใช้สารละลายบัฟเฟอร์ชนิด total ionic strength adjustment buffer (TISAB IV) ที่มีค่า pH 8.5 เพื่อช่วยควบคุมการรบกวนที่เกิดจาก ion อื่นๆ เช่น hydroxide ion เป็นต้น⁽⁶⁾ การวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์ไอออนและโมโนฟลูออโรฟอสเฟตไอออนในยาสีฟัน โดยวิธี ion chromatography ภายใต้สภาวะคอลัมน์ชนิด Ion Pac AS 18 analytical, 4 × 280 mm ใช้ potassium hydroxide เป็น eluent และเครื่องตรวจวัดชนิด suppresser conductivity วิธี ion chromatography สามารถวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์และโมโนฟลูออโรฟอสเฟตได้ในการวิเคราะห์คราวเดียวกัน⁽⁷⁾ วิธี capillary electrophoresis สามารถวัดปริมาณฟลูออไรด์และโมโนฟลูออโรฟอสเฟตได้ในการวิเคราะห์คราวเดียวกัน โดยใช้คอลัมน์ชนิด capillary ความยาว 52 cm เส้นผ่านศูนย์กลาง 75 ไมโครเมตร electrolyte ประกอบด้วย 10 mM sodium chromate และ 0.1 mM cetyltrimethyl ammonium bromide มีค่า pH 9.7 ค่า voltage -15 kv และเครื่องตรวจวัดชนิดยูวีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (indirect detection)⁽⁸⁾ วิธี gas chromatography (GC) เตรียมตัวอย่างโดยวิธี head space solid-phase micro extraction (HS-SPME) โดยเตรียมอนุพันธ์ของฟลูออไรด์ด้วยสาร triethylchlorosilane (TECS) และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC ภายใต้สภาวะ capillary column ชนิด HP-1 ขนาด 40 เมตร × 0.53 มิลลิเมตร (I.D.), เคลือบหนา 5 ไมโครเมตร ใช้ splitless mode อุณหภูมิของ injector 200 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม 1.3 มิลลิเมตรต่อนาที เครื่องตรวจวัดชนิด flame ionization detector (FID) อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส และกำหนดโปรแกรมอุณหภูมิของ oven ที่ช่วงเวลาต่างๆ วิธีนี้สามารถวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์ในยาสีฟันที่มีสารประกอบฟลูออไรด์ต่างๆ เช่น เอมีนฟลูออไรด์ และโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟตได้ด้วย⁽⁹⁾ นอกจากนี้

มีวิธีมาตรฐานของประชาคมยุโรปในการวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์ในยาสีฟัน โดยเตรียมอนุพันธ์ของฟลูออไรด์ด้วยสาร triethylchlorosilane (TECS) ในสภาวะกรดและสกัดอนุพันธ์ของฟลูออไรด์ด้วยไซลีน (xylene) แล้ววิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์ด้วย GC-FID ภายใต้สภาวะคอลัมน์ stainless steel ความยาว 1.8 เมตร $\times$ 3 มิลลิเมตร (I.D.) support ด้วย Gaschrom Q 10 ถึง 100 mesh ใช้ silicone oil DC 200 เป็น stationary phase เก็บคอลัมน์ ค้างคืนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 35 มิลลิตรต่อนาที เครื่องตรวจวัดชนิด FID อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของคอลัมน์และ injector เท่ากับ 70 และ 150 องศาเซลเซียสตามลำดับ คณะวิจัยจึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์รวมทั้งหมดในยาสีฟัน โดยดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานของประชาคมยุโรป โดยวิธี GC-FID ซึ่งได้ดัดแปลงสภาวะของ GC เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์รวมทั้งหมดในยาสีฟันได้ ในการศึกษาครั้งนี้คณะวิจัยได้ใช้ตัวอย่างยาสีฟันที่มีสารประกอบของฟลูออไรด์ทั้งชนิดโซเดียมฟลูออไรด์และโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟตในการทดสอบความถูกต้องของวิธีและประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ด้วย เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่ดีมีประสิทธิภาพ สำหรับใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการในการให้บริการและเฝ้าระวังคุณภาพผลิตภัณฑ์ทางกฎหมาย

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐาน : สารละลาย fluoride 0.1 M พร้อมใบรับรอง ผลิตภัณฑ์ของ Thermo Fisher Scientific, cyclohexane ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 99.99 ผลิตภัณฑ์ของ Fisher Scientific

สารเคมี : hydrochloric acid (AR grade) ผลิตภัณฑ์ของ Merck, xylene (AR grade) ผลิตภัณฑ์ของ Merck, triethylchlorosilane (TECS) ผลิตภัณฑ์ของ Sigma – Aldrich, น้ำกลั่นหรือน้ำปราศจากไอออน (deionized water)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) ผลิตภัณฑ์ของ Agilent รุ่น 6890 N ประกอบด้วยเครื่องฉีดสารอัตโนมัติ รุ่น 7683B Series และเครื่องตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID), Capillary column HP-1 (100% dimethyl siloxane), 15 เมตร $\times$ 0.53 มิลลิเมตร $\times$ 1.5 ไมโครเมตร, เครื่องชั่งความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม ผลิตภัณฑ์ของ METTLER TOLEDO, เครื่องเขย่าผสมสาร (shaker) ควบคุมการเขย่าได้ในช่วง 10–300 stroke ต่อนาที ผลิตภัณฑ์ของ IKA รุ่น HS 500, เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 3,000–6,000 รอบต่อนาที ผลิตภัณฑ์ของ Hettich รุ่น EBA 12, vortex mixer ผลิตภัณฑ์ของ Scientific Industries, volumetric flask พลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร, vial ขนาด 2 มิลลิลิตร และ dropper พลาสติก

สภาวะของเครื่อง GC

Column	: Capillary column HP-1 ขนาด 15 เมตร $\times$ 0.53 มิลลิเมตร $\times$ 1.5 ไมโครเมตร
อุณหภูมิของ column	: เริ่มต้นที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที อัตราเพิ่มอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 280 องศาเซลเซียส คงไว้ที่นาน 2.5 นาที
อุณหภูมิของ injector	: 280 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ detector	: 300 องศาเซลเซียส
Carrier gas	: แก๊สฮีเลียม ใช้แก๊สไฮโดรเจนและอากาศเป็น make-up gas

Flow rate : เริ่มต้นที่ 3 มิลลิลิตรต่อนาที นาน 4 นาที อัตราเพิ่ม 100 มิลลิลิตรต่อนาที จนถึง 45 มิลลิลิตรต่อนาที คงไว้นาน 2.5 นาที

Injection volume : 3 ไมโครลิตร

การเตรียมสารละลาย Internal standard solution

ปิเปต cyclohexane 1.0 มิลลิลิตร และ xylene 5.0 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

การเตรียมสารละลายผสมของ triethylchlorosilane internal standard solution

ปิเปต triethylchlorosilane (TECS) 0.6 มิลลิลิตร และสารละลาย internal standard solution 0.12 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย xylene เขย่าให้เข้ากัน (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน stock standard solution

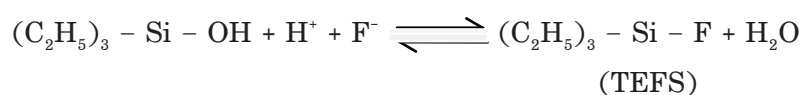
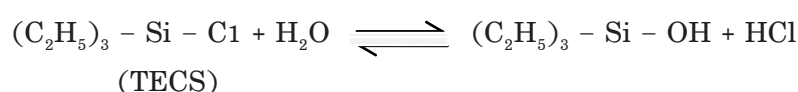
ปิเปตสารละลายมาตรฐาน fluoride 0.1 M (1.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 0.7 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask พลาสติกขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน fluoride 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตัวอย่าง

ทดสอบความถูกต้องของวิธี โดยใช้ยาสีฟันที่มีส่วนผสมของโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟต 0.76 %w/w และยาสีฟันที่มีส่วนผสมของโซเดียมฟลูออไรด์ 0.22 %w/w คำนวณเป็นฟลูออไรด์ไอออน 1,000 ไมโครกรัมต่อกรัม ทั้ง 2 ตัวอย่าง และยาสีฟันที่ไม่มีฟลูออไรด์เพื่อศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

หลักการ

สารโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟตจะถูก hydrolyse ด้วย hydrochloric acid ได้ฟลูออไรด์และฟลูออไรด์จะถูกเปลี่ยนเป็นสาร triethylfluorosilane (TEFS) ที่ระเหยได้ โดยเกิดปฏิกิริยากับสาร triethylchlorosilane (TECS) ในสภาวะกรด และใช้ cyclohexane เป็น internal standard สกัดด้วย xylene (เป็น liquid – liquid extration) แล้วนำชั้น xylene ไปวิเคราะห์ด้วย GC ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ดังนี้



การวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์ในตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างประมาณ 0.15 กรัม ลงในหลอด centrifuge พลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 5.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้ vortex mixer เติม xylene 1.0 มิลลิลิตร เติม hydrochloric acid 5.0 มิลลิลิตร และเติมสารละลายผสมของ triethylchlorosilane/internal standard solution 0.5 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดแล้วนำไปเขย่าด้วย shaker ควบคุมการเขย่าที่ 150 strokes ต่อนาทีนาน 45 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดชั้น xylene ด้วย dropper ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์⁽¹¹⁾

การทดสอบความจำเพาะ (Specificity/Selectivity)

ฉีดสารสกัดอนุพันธ์ TEFS ที่เตรียมจากสารละลายมาตรฐานที่มีปริมาณฟลูออไรด์ 0.050 มิลลิกรัม และเตรียมจากสารละลายตัวอย่างยาสีฟันชนิดครีมที่มีโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟตและยาสีฟันที่มีโซเดียมฟลูออไรด์เข้าเครื่อง GC ภายใต้สภาวะที่กำหนดเพื่อตรวจสอบการแยกพีคของฟลูออไรด์จากการรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง โดยค่า retention time ของอนุพันธ์ TEFS จะแตกต่างจากสารอื่นและพีคแยกกันอย่างชัดเจน

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของระบบ (System linearity)

เปิดสารละลาย stock standard solution จำนวน 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด centrifuge พลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด ตามลำดับ ได้สารละลายมาตรฐาน 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เติมน้ำกลั่น 5.0 มิลลิลิตร เติม xylene 1.0 มิลลิลิตร เติม hydrochloric acid 5.0 มิลลิลิตร และเติมสารละลายผสมของ triethylchlorosilane/internal standard solution 0.5 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดเขย่าให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer แล้วนำไปเขย่าด้วย shaker ควบคุมการเขย่าที่ 150 strokes ต่อนาทีนาน 45 นาที ดูดชั้น xylene ด้วย dropper ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

สร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟลูออไรด์กับ peak area ratio ของสารมาตรฐานและ internal standard คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ซึ่งควรมีค่าใกล้เคียง 1

$$\text{Peak area ratio} = \text{peak area ของ triethylfluorosilane} / \text{peak area ของ cyclohexane}$$

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของวิธี (Method linearity)

นำข้อมูลจากการทดสอบร้อยละการคืนกลับของวิธี (Percent recovery) มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟลูออไรด์ที่เติมในตัวอย่าง spiked sample ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 50, 100 และ 150 ของความเข้มข้นที่มีในยาสีฟันกับความเข้มข้นที่ตรวจพบ ค่าสัมประสิทธิ์สัมพันธ์ (r) ควรใกล้เคียง 1

การทดสอบความเที่ยง (precision)

การทดสอบความเที่ยงของการวิเคราะห์ทั้งการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน และการวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวัน

repeatability

ฉีดสารสกัดอนุพันธ์ TEFS ที่เตรียมจากสารมาตรฐานที่มีปริมาณฟลูออไรด์ 0.05 มิลลิกรัม และเตรียมจากสารละลายตัวอย่างยาสีฟันที่มีโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟตและยาสีฟันที่มีโซเดียมฟลูออไรด์ซ้ำ 5 ครั้ง เพื่อศึกษา

ความซ้ำได้ของระบบโครมาโตกราฟี คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของ peak area ratio ซึ่งไม่ควรเกินร้อยละ 3

การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน การวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์รวมทั้งหมดในตัวอย่างยาเสพติดที่มีโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟตและยาเสพติดที่มีโซเดียมฟลูออไรด์ โดยวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 5 ครั้ง คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของปริมาณฟลูออไรด์ที่ตรวจพบ %RSD ไม่ควรเกินร้อยละ 3

Intermediate precision : between - days

การวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวัน วิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์รวมทั้งหมดในยาเสพติดที่มีโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟตและยาเสพติดที่มีโซเดียมฟลูออไรด์ โดยวิเคราะห์ซ้ำเป็นเวลา 5 วัน ประเมินความแตกต่างของผลวิเคราะห์ทั้ง 5 วัน ด้วยสถิติ ANOVA ค่า p-value ต้องมากกว่า 0.05

การทดสอบร้อยละของการคืนกลับ (percent recovery)

วิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์รวมทั้งหมดในสารละลาย spiked sample ดังนี้ ซึ่งตัวอย่างยาเสพติดที่มีโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟตและยาเสพติดที่มีโซเดียมฟลูออไรด์ ประมาณ 0.05 กรัม แยกใส่ลงในหลอด centrifuge พลาสติก ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐาน stock standard solution 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในตัวอย่างที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือ เติมปริมาตร 0.8, 1.6 และ 2.4 มิลลิลิตรตามลำดับ นำมาสกัดและวิเคราะห์ตามวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนา คำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับควรอยู่ในช่วงร้อยละ 90-110

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD)

คำนวณค่าประมาณของ LOD จากการสร้างกราฟมาตรฐาน ดังนี้

$$\text{LOD (mg/mL), estimated} = 3 \times \text{standard error/slope}$$

$$\text{LOD (}\mu\text{g/g), estimated} = \frac{\text{LOD (mg/mL)} \times 1 \text{ mL} \times 100\%}{1000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$$

เตรียมสารละลายมาตรฐานฟลูออไรด์และสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานฟลูออไรด์ลงในตัวอย่างที่ไม่มีฟลูออไรด์ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOD ดำเนินการเช่นเดียวกันและนำสารสกัดด้วย xylene มาฉีดเข้าเครื่อง GC สัญญาณจากเครื่องตรวจวัดจะต้องสังเกตเห็นได้ คำนวณความเข้มข้นของฟลูออไรด์ในตัวอย่างเป็นไมโครกรัมต่อกรัม

การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

คำนวณค่าประมาณของ LOQ จากการสร้างกราฟมาตรฐาน ดังนี้

$$\text{LOQ (mg/mL), estimated} = 10 \times \text{standard error/slope}$$

$$\text{LOQ (}\mu\text{g/g), estimated} = \frac{\text{LOQ (mg/mL)} \times 1 \text{ mL} \times 100\%}{1000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$$

เตรียมสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานฟลูออไรด์ลงในยาเสพติดที่ไม่มีฟลูออไรด์ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOQ แล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์ในตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง คำนวณค่า %RSD ต้องไม่เกินร้อยละ 3 และค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 90-110 คำนวณความเข้มข้นของฟลูออไรด์ในตัวอย่างเป็นไมโครกรัมต่อกรัม

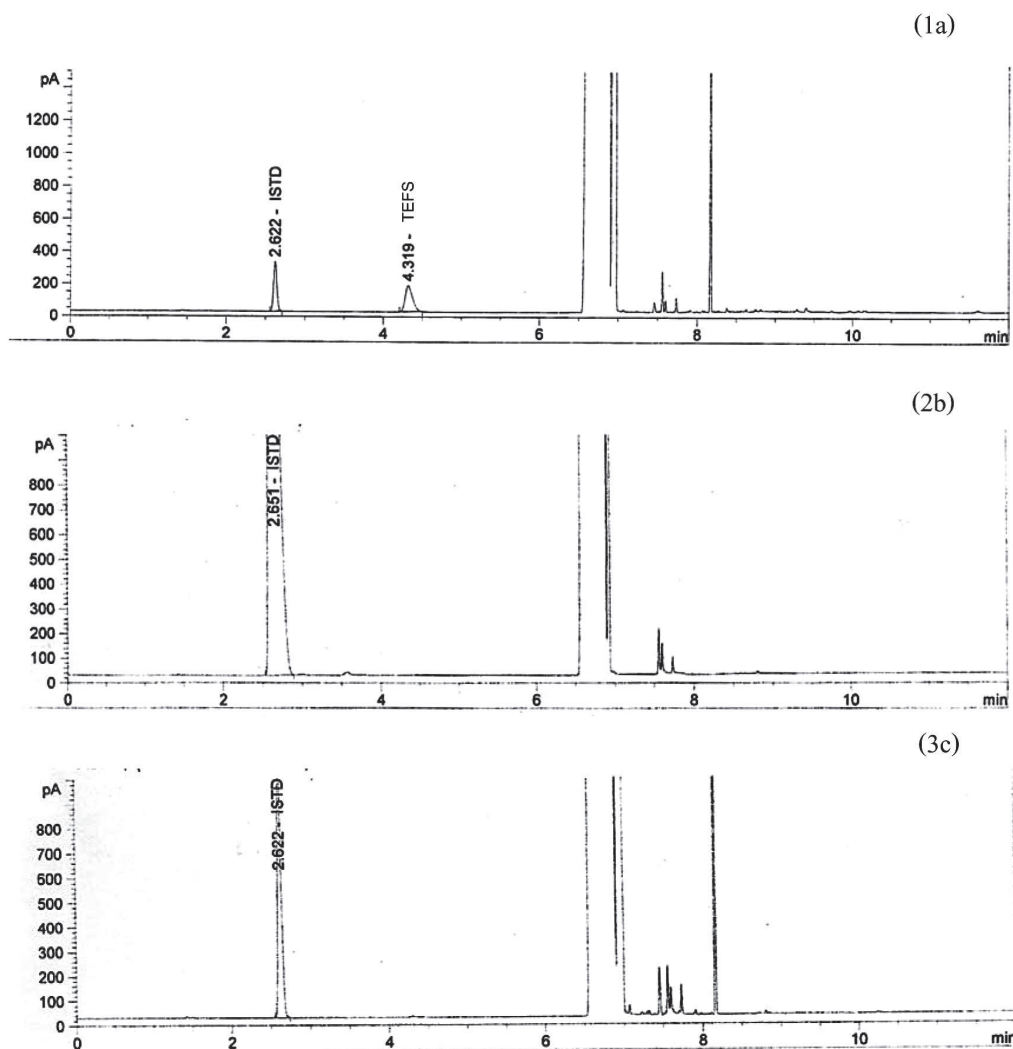
ค่าความไม่แน่นอนของการวัด⁽¹²⁾

แหล่งที่มาของค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์ในยาสีฟัน โดยวิธี GC เช่น ความไม่แน่นอนจากความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน การสอบเทียบเครื่องซึ่ง อุปกรณ์ที่ใช้เตรียม สารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้นของฟลูออไรด์ในสารละลายตัวอย่างที่อ่านได้จากเครื่อง GC การวิเคราะห์ซ้ำ (precision) ร้อยละของการคืนกลับ (percent recovery) ของการทดสอบความถูกต้องของวิธี นำมาคำนวณค่าความไม่แน่นอนรวม (combined uncertainty, uc) แล้วคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty, U) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า coverage factor (k) เท่ากับ 2

ผล

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง

จากการฉีดสารสกัดอนุพันธ์ TEFS ที่เตรียมจากสารมาตรฐานฟลูออไรด์ (1a) และเตรียมจากสารละลายตัวอย่าง ยาสีฟันชนิดครีมที่มีโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟต (2b) และยาสีฟันที่มีโซเดียมฟลูออไรด์ (3c) พบว่าภายใต้สภาวะเครื่อง GC สามารถแยกสาร TEFS ออกจากสารอื่นในตัวอย่างได้โดยค่า retention time ของ internal standard และสาร TEFS ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของฟลูออไรด์เท่ากับ 2.6 และ 4.3 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 1)

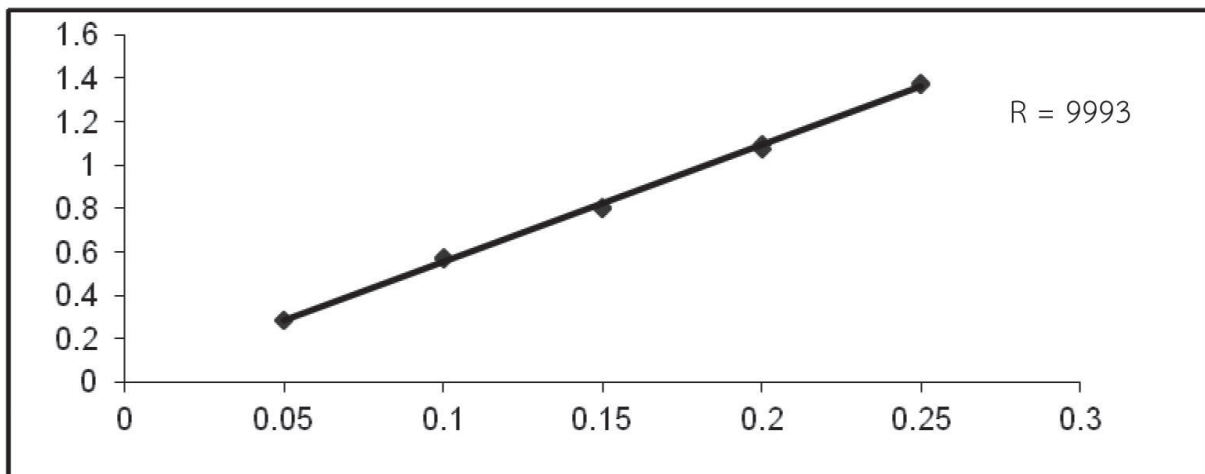


ภาพที่ 1 โครมาโทกราฟของสาร triethylfluorosilane (TEFS) และ internal standard solution ในสารละลายมาตรฐานฟลูออไรด์ (1a) สารละลายตัวอย่างที่มีสารโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟต (2b) และสารโซเดียมฟลูออไรด์ (3c)

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์

ความเป็นเส้นตรงของระบบ

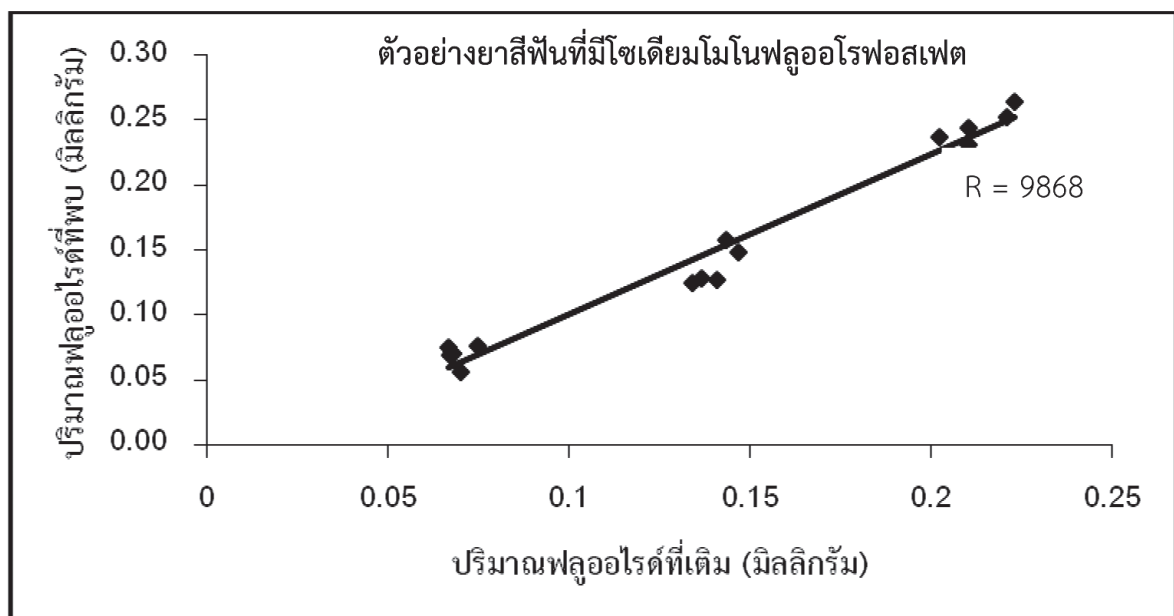
จากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและ peak area ratio พบว่าในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับ peak area ratio โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9993 (ภาพที่ 2)

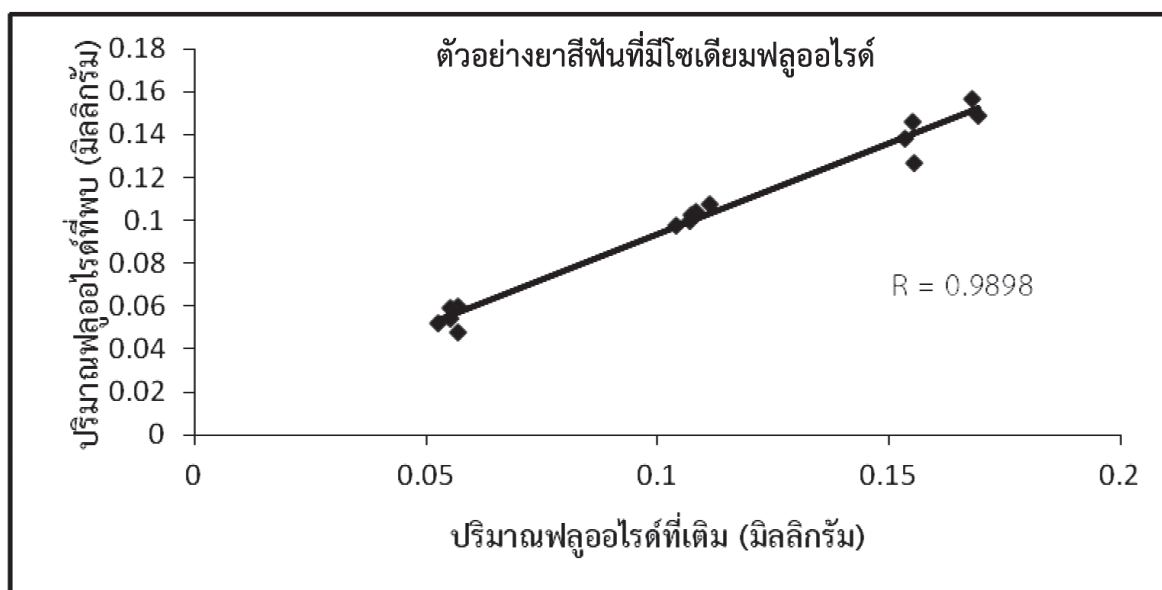


ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ความเป็นเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟลูออไรด์ และ peak area ratio

ความเป็นเส้นตรงของวิธี

แสดงด้วยความสัมพันธ์ของปริมาณที่เติมฟลูออไรด์ในยาสีฟันที่มีโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟต และยาสีฟันที่มีโซเดียมฟลูออไรด์กับปริมาณฟลูออไรด์ที่ตรวจพบ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9868 และ 0.9898 ตามลำดับ (ภาพที่ 3)





ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ความเป็นเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟลูออไรด์ เมื่อเติมลงในตัวอย่างยาสีฟัน และปริมาณฟลูออไรด์ที่ตรวจพบ

การทดสอบความเที่ยง

จากการฉีดสารสกัดอนุพันธ์ TEFS ที่เตรียมจากสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างยาสีฟันที่มีโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟตและยาสีฟันที่มีโซเดียมฟลูออไรด์ซ้ำ 2 ครั้ง พบว่ามีความสามารถทำซ้ำได้ของระบบโครมาโทกราฟี โดยมีค่า %RPD ของ peak area ratio เท่ากับร้อยละ 1.18, 0.01 และ 1.36 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ร้อยละของความแตกต่างสัมพันธ์ของ peak area ratio จากการฉีดซ้ำ 2 ครั้ง

ฉีดครั้งที่	peak area ratio		
	สารละลายมาตรฐาน	ละลายตัวอย่างที่มีโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟต	ละลายตัวอย่างที่มีโซเดียมฟลูออไรด์
1	0.7574	0.8680	0.6889
2	0.7664	0.8621	0.6796
เฉลี่ย	0.7619	0.8621	0.6842
%RPD	1.18	0.01	1.36

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์ในตัวอย่างยาสีฟันที่มีสารโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟตและยาสีฟันที่มีสารโซเดียมฟลูออไรด์ ซ้ำ 5 ครั้งในวันเดียวกัน ได้ค่า %RSD เท่ากับ 0.56 และ 0.68 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

และพบว่าไม่มีความแตกต่างของผลวิเคราะห์จากการวิเคราะห์ซ้ำ 5 วัน โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.93 และ 0.36 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวของวิธีวิเคราะห์ฟลูออไรด์ในยาสีฟัน

วิเคราะห์ซ้ำที่	ปริมาณฟลูออไรด์ (ไมโครกรัมต่อกรัม)	
	ยาสีฟันที่มีโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟต	ยาสีฟันที่มีโซเดียมฟลูออไรด์
1	1082	985
2	1089	988
3	1083	999
4	1093	998
5	1096	999
เฉลี่ย	1089	994
SD	6.11	6.76
%RSD	0.56	0.68

ตารางที่ 3 ความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวันของวิธีวิเคราะห์ฟลูออไรด์ในยาสีฟัน

วันที่	ปริมาณฟลูออไรด์ (ไมโครกรัมต่อกรัม)									
	ยาสีฟันที่มีโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟต					ยาสีฟันที่มีโซเดียมฟลูออไรด์				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5
1	1082	1089	1083	1093	1096	985	998	994	991	999
2	1099	1086	1094	1085	1095	988	999	997	989	995
3	1093	1080	1096	1088	1098	999	992	985	993	994
4	1086	1094	1083	1096	1097	998	997	988	996	992
5	1089	1092	1095	1087	1090	999	993	983	997	988
p-value	0.93	0.36								

การทดสอบร้อยละของการคืนกลับ

จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง spiked sample พบว่าร้อยละของการคืนกลับของฟลูออไรด์ที่เติมในตัวอย่างยาสีฟันชนิดครีมีที่มีสารโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟตและยาสีฟันที่มีสารโซเดียมฟลูออไรด์ อยู่ในช่วงร้อยละ 80.2 - 118.5 และ 81.4 - 106.9 ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ร้อยละของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ฟลูออไรด์ในยาสีฟัน

ความเข้มข้นที่เติม สารมาตรฐาน (มิลลิกรัม)	ยาสีฟันที่มีโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟต		ยาสีฟันที่มีโซเดียมฟลูออไรด์	
	ความเข้มข้นที่ ตรวจพบ (มิลลิกรัม)	% recovery	ความเข้มข้นที่ ตรวจพบ (มิลลิกรัม)	% recovery
0.04	0.1764	80.2-112.3	0.1521	83.8-106.9
0.08	0.2445	90.3-110.4	0.1998	92.9-96.4
0.12	0.3530	110.1-118.5	0.2409	81.4-94.1

ขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ

จากการใช้สมการ regression คำนวณค่า estimated IDL ได้เท่ากับ 0.008 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อฉีด spiked sample พบว่า IDL เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อคำนวณเป็นความเข้มข้นในตัวอย่างได้ค่า LOD เท่ากับ 30 ไมโครกรัมต่อกรัม

จากการใช้สมการ regression คำนวณค่า estimated LOQ ได้เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อคำนวณเป็นความเข้มข้นในตัวอย่างเท่ากับ 330 ไมโครกรัมต่อกรัม โดยมีค่าร้อยละของการคืนกลับเท่ากับ 90 และ %RSD เท่ากับ 3 ซึ่งอยู่ในช่วงยอมรับได้คือความเข้มข้น 330 ไมโครกรัมต่อกรัม ค่าร้อยละของการคืนกลับควรอยู่ในช่วง 80–120 และ % RSD ต้องไม่เกิน 3

ค่าความไม่แน่นอนของการวัด

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์รวมทั้งหมดในยาสีฟัน โดยวิธี GC ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และค่า k เท่ากับ 2 พบว่าค่าความไม่แน่นอนขยายสัมพัทธ์ (relative expanded uncertainty) เท่ากับ 0.06 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แหล่งที่มาและการคำนวณค่าความไม่แน่นอนในการวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์ในยาสีฟัน โดยวิธี GC-FID

แหล่งของความไม่แน่นอน	Value	Unit	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty
ความบริสุทธิ์ของสารละลายมาตรฐาน	1903.8	ug/mL	5.48483	0.002881
น้ำหนักตัวอย่าง	0.1505	g	0.00007	0.00048
ความเข้มข้นของฟลูออไรด์ในสารละลายตัวอย่าง	0.1432	mg/mL	0.00169	0.01183
ความเที่ยง	100	%	0.2190	0.00219
Recovery	104.85	%	1.0540	0.01005
ความไม่แน่นอนรวม				0.03
k				2
ความไม่แน่นอนขยาย				0.06

วิจารณ์

วิธีวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์รวมทั้งหมดในยาสีฟัน โดยวิธี GC-FID ที่พัฒนาขึ้นนี้ดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์มาตรฐานของประชาคมยุโรปเพื่อแก้ไขปัญหา กรณียาสีฟันที่มีสารขัดฟันหรือส่วนประกอบอื่นเมื่อทำปฏิกิริยากับโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟตหรือโซเดียมฟลูออไรด์แล้วเกิดเป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้การวิเคราะห์โดยวิธี ion selective electrode และวัดปริมาณฟลูออไรด์ด้วย potentiometer จะได้ปริมาณน้อยกว่าปริมาณที่มีจริง วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สารโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟตจะถูก hydrolysed ด้วย hydrochloric acid ได้ฟลูออไรด์ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยากับ triethylchlorosilane ได้อนุพันธ์ triethylfluorosilane และใช้ cyclohexane เป็น internal

standard ซึ่งถูกสกัดด้วย xylene แล้วฉีดเข้าเครื่อง GC ภายใต้สภาวะที่พัฒนาขึ้น ทั้งนี้สภาวะของ GC ที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานประชาคมยุโรป ได้แก่ ชนิดของคอลัมน์จาก packed column เป็น capillary column แก๊สตัวพาและอัตราการไหลดัดแปลงจากแก๊สไนโตรเจน 35 มิลลิลิตรต่อนาทีเป็นแก๊สฮีเลียม และใช้แก๊สไฮโดรเจนและอากาศเป็น make-up gas โดยปรับอัตราการไหลจาก 3 มิลลิลิตรต่อนาที เป็น 45 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์จาก 70 องศาเซลเซียส เป็นโปรแกรมอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 80 องศาเซลเซียส และเพิ่มเป็น 280 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิของ injector จาก 150 องศาเซลเซียส เป็น 280 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของเครื่องตรวจวัดดัดแปลงจาก 250 องศาเซลเซียส เป็น 300 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ปริมาตรที่ฉีดเท่ากันคือ 3 ไมโครลิตร ซึ่งสามารถแยกสาร triethylfluorosilane ได้โดยค่า retention time ของ internal standard และ triethylfluorosilane เท่ากับ 2.6 และ 4.3 นาที ตามลำดับ จากการทดสอบความถูกต้องของวิธีเรื่อง repeatability จากการวิเคราะห์ตัวอย่างยาสีฟันที่มีสารโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟต 0.76 %w/w และยาสีฟันที่มีสารโซเดียมฟลูออไรด์ 0.22 %w/w คิดเป็นฟลูออไรด์ 1,000 ส่วนในล้านส่วน โดยน้ำหนักพบว่าค่า %RSD เท่ากับร้อยละ 0.56 และ 0.68 ตามลำดับ ซึ่งตามวิธีมาตรฐานของประชาคมยุโรปให้ค่าความแตกต่างสัมพัทธ์ (%RSD) จากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ เท่ากับร้อยละ 8 นอกจากนี้ค่าร้อยละของการคืนกลับในการวิเคราะห์ spiked sample ในตัวอย่างที่มีโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟตและตัวอย่างที่มีโซเดียมฟลูออไรด์ เท่ากับร้อยละ 80.2 – 118.5 และ 81.4 – 106.9 ตามลำดับ ซึ่งไม่เกินเกณฑ์ยอมรับ⁽¹¹⁾ คือความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม เกณฑ์ยอมรับของ %RSD และ %recovery คือต้องไม่เกินร้อยละ 3 และร้อยละ 80-120 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีคุณสมบัติของการทดสอบความถูกต้องของวิธีอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ มีความสะดวก รวดเร็ว สามารถแยกพีคได้ภายใน 10 นาที เหมาะสมสำหรับการใช้ในการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

สรุป

วิธีวิเคราะห์ปริมาณฟลูออไรด์รวมทั้งหมดในยาสีฟัน โดยใช้เครื่อง GC ภายใต้สภาวะที่กำหนดจากการทดสอบความถูกต้องของวิธีพบว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับค่า peak area ratio ตลอดช่วงความเข้มข้น 0.05-0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกันให้ค่า %RSD น้อยกว่า 1 และไม่มี ความแตกต่างของผลวิเคราะห์ในการวิเคราะห์ซ้ำ 5 วัน พบว่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องมือสามารถตรวจวัดเชิงคุณภาพ (IDL) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ในตัวอย่างเท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 30 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งสามารถวิเคราะห์ปริมาณของฟลูออไรด์ได้ตั้งแต่ 330 ไมโครกรัมต่อกรัม มีค่าความไม่แน่นอนขยายสัมพัทธ์ (Relative expanded uncertainty) น้อยกว่า 0.1 วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อให้บริการตรวจวิเคราะห์และการเฝ้าระวังคุณภาพผลิตภัณฑ์ยาสีฟันที่มีส่วนประกอบของโซเดียมโมโนฟลูออโรฟอสเฟต และโซเดียมฟลูออไรด์ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณนภาพร อนันตสินกุล ที่ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะการศึกษาวิจัยจนบรรลุผลสำเร็จในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. ผลการันัน นิตสิริ. สรรพคุณยาสีฟัน. ว.การส่งเสริมคุณภาพและอนามัยสิ่งแวดล้อม 2546; 26(3): 22-34.
2. McCaffery K. Fluoride and dermatitis. J Am Dent Assoc 2003; 134(9): 1166.
3. พระราชบัญญัติเครื่องสำอาง พ.ศ. 2535 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดชื่อและปริมาณของวัตถุที่อาจใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 125 ตอนพิเศษ 162 ง (ลงวันที่ 9 ตุลาคม 2551).

4. นราวัลภ์ เชี่ยววิทย์. ฟลูออไรด์. งานทันตกรรม โรงพยาบาลศิริราช. [ออนไลน์]. 2553; [สืบค้น 27 พ.ค. 2558]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://www.si.mahidol.ac.th/sidoctor/e-pl/articledetail.asp?id=91>.
5. ฟลูออไรด์ในยาสีฟัน. [ออนไลน์]. 2554; [สืบค้น 27 พ.ค. 2558]; [2 หน้า] เข้าถึงได้จาก : URL: <http://blog.eduzones.com/fluorine/81408>.
6. Perez_Olmos R, Soto JC, Zarate N, Diez I. Simultaneous determination of potassium and total fluoride in toothpastes using a SIA system with two potentiometric detectors. *J Pharm Biomed Anal* [online]. 2008; [cited 2015 May 22]; 47(1): [7 screens]. Available from: URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708507006966>.
7. Dionex. Determination of anions in toothpaste by ion chromatography. Application note 156. [online]. 2003; [cited 2015 May 22]; [6 screens]. Available from: URL: http://www.dionex.com/en-us/webdocs/6522-AN156_LPN1548.pdf.
8. Wang P, Li SFY, Lee HK. Simultaneous determination of monofluorophosphate and fluoride in toothpaste by capillary electrophoreses. *J Chromatogr A* 1997; 765(2): 353-9.
9. Wejnerowska G, Karczmarek A, Gaca J. Determination of fluoride in toothpaste using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-flame ionization detection. *J Chromatogr A* 2007; 1150(1-2): 173-7.
10. Third Commission Directive 83/514/EEC. Determination of total fluorine in dental creams. In: *The rules governing cosmetic products in the European union Vol.2 methods of analysis cosmetic products*. European commission; 1999. p. 95-98.
11. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
12. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550.

Determination of Total Fluoride in Toothpaste by GC-FID

Kamonluck Intharatsamee and Suthida Meethong

Bureau of Cosmetics and Hazardous Substances, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi, 11000 Thailand.

ABSTRACT Determination of total fluoride in toothpaste was developed by using GC-FID technique under the condition i.e. HP-1 capillary column of 15 m × 0.53 mm × 1.5 μm. Carrier gas consist of helium together with hydrogen and air as make-up gas. Flowrate program starts from 3 ml/min and increase to 45 ml/min. Using flame ionization detector and inject volume is 3 μl. Temperature program of column is started at 80 °C and increase to 280 °C. The injector and detector temperature are 280 °C and 300 °C, respectively. Sodium monofluorophosphate is acid hydrolysed to be fluoride. Fluoride is converted to triethylfluorosilane (TEFS) by direct reaction with triethylchlorosilane (TECS) in acid solution and simultaneously extracted with xylene containing cyclohexane as an internal standard, then inject to GC. The method validation result show the retention time of internal standard and TEFS of 2.6 and 4.3 minutes, respectively. The linear relationship between concentration of fluoride and peak area ratio over the concentration range of 0.05 – 0.25 mg/ml with correlation coefficient (r) of 0.9993. The r of relationship between added concentration of fluoride and found concentration is 0.9868 and 0.9898 respectively, Repretability was tested by replicate analysis of fluoride in toothpastes containing sodium monofluorophosphate and sodium fluoride show %RSD of 0.56 and 0.68, respectively. There is no different of analytical results between five days which p-value is 0.93 and 0.36 respectively, show the precision of the method. Analysis of spiked sample showed percent recovery of 80.2 – 118.5% and 81.4 – 106.9%, respectively. Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were 30 and 330 μg/g, respectively. Relative expanded uncertainty was 6.0 %.The developed method with acceptable validation results could be routinely used to analyse total fluoride in toothpaste.

Key words: Total fluoride in toothpaste, GC-FID

การประเมินการได้รับสัมผัสของกรดเบนโซอิก ในน้ำพริกหนุ่มที่จำหน่ายในจังหวัดเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2553 – 2556

พัชริดา พิชัย* และนฤมล ชันดีกุล**

*ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ อำเภอแมริม เชียงใหม่ 50180

**สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเชียงใหม่ อำเภอเมือง เชียงใหม่ 50000

บทคัดย่อ กรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอต เป็นวัตถุกันเสียที่นิยมใช้ในการยืดอายุของน้ำพริกหนุ่ม กรดและเกลือนี้ จัดเป็นวัตถุกันเสียตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 281 พ.ศ. 2547 เรื่องวัตถุเจือปนอาหาร และ Codex อนุญาต ให้นำมาใช้ในการผลิตอาหารได้ไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่ออาหารหนึ่งกิโลกรัม ผลสำรวจในปี 2552 พบว่า น้ำพริกหนุ่มที่วาง จำหน่ายในจังหวัดเชียงใหม่มากกว่าร้อยละ 60 มีกรดเบนโซอิกสูงเกินกว่ากำหนด ดังนั้นเพื่อคุ้มครองผู้บริโภค ศูนย์วิทยาศาสตร์ การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ ร่วมกับสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเชียงใหม่ ทำการสำรวจการใช้กรดเบนโซอิกในน้ำพริกหนุ่ม ในช่วงปี พ.ศ. 2553-2556 พบว่าน้ำพริกหนุ่มที่วางจำหน่ายในจังหวัดเชียงใหม่ มีกรดเบนโซอิกเกินเกณฑ์กำหนด ร้อยละ 47.7, 40.0, 30.0 และ 23.5 ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลทั้ง 4 ปี มาประเมินการได้รับสัมผัสกรดเบนโซอิก ทั้งชนิดค่าเฉลี่ยของปริมาณอาหาร ที่บริโภคเฉพาะผู้ที่บริโภค และค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 97.5 ของปริมาณอาหารที่บริโภคสำหรับประชากรทั้งหมด ในกลุ่มอายุ 19-35, 35-65 และมากกว่า 65 ปี และคำนวณการได้รับสัมผัส เพื่อประเมินความปลอดภัยของผู้บริโภค 3 ช่วงอายุ ผลการประเมิน พบว่าทั้ง 3 ช่วงอายุ ได้รับกรดเบนโซอิกจากการบริโภคน้ำพริกหนุ่มในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค

Accepted for publication, 28 August 2015

บทนำ

น้ำพริกหนุ่มเป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นในแถบภาคเหนือของประเทศไทย โดยทำมาจากพริกเม็ดใหญ่ที่ยังไม่แก่จัด และมีส่วนผสมสำคัญ คือ หอม กระเทียม เกลือ น้ำปลา วัตถุดิบปรุงรสอื่นๆ ผู้ผลิตบางรายอาจจะลดความเผ็ดโดยเติมมะเขือเทศลงไป ทำให้มีรสชาติถูกปากคนไทย ประชาชนจึงนิยมบริโภค รวมทั้งนำไปเป็นของฝากสำหรับนักท่องเที่ยว แต่เนื่องจากส่วนผสมของน้ำพริกหนุ่มเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่เน่าเสียง่าย ผู้ผลิตจึงมักยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ระหว่างรอจำหน่ายโดยใช้กรดเบนโซอิก หรือโซเดียมเบนโซเอต ซึ่งเป็นวัตถุกันเสียที่มีการวางจำหน่ายอย่างแพร่หลาย หาซื้อได้ง่ายตามท้องตลาด และร้านขายสารเคมี ในที่นี้การวิเคราะห์โซเดียมเบนโซเอตจะคำนวณเป็นกรดเบนโซอิก ดังนั้นจะกล่าวถึงแต่กรดเบนโซอิกเท่านั้น ซึ่งกรดเบนโซอิกนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารได้สูงสุดในช่วงความเป็นกรดต่าง (pH) ระหว่าง 2.5 ถึง 4.0⁽¹⁾ ซึ่งกรดเบนโซอิกจัดเป็นวัตถุกันเสียตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 281 พ.ศ. 2547 เรื่องวัตถุเจือปนอาหาร⁽²⁾ และมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex) อนุญาตให้นำมาใช้ในการผลิตอาหารได้ เพราะผ่านการประเมินความปลอดภัยทางพิษวิทยาแล้วว่ามีความเป็นพิษต่ำ โดย The Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives (JECFA) ได้กำหนดค่าความปลอดภัยไว้เป็นค่า Acceptable Daily Intake (ADI) เป็นปริมาณที่ร่างกายสามารถได้รับสารนั้นต่อวันตลอดชั่วชีวิตโดยที่ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบใดๆ ต่อสุขภาพ⁽³⁾ สำหรับกรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอตกำหนดอยู่ที่ 0–5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน แต่ถ้าได้รับกรดเบนโซอิกในปริมาณที่สูงมากอาจทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย เลือดตกใน อัมพาต กรณีที่ได้รับเกิน 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม อาจทำให้เสียชีวิตได้⁽⁴⁾ แต่เนื่องจากไม่มีกฎหมายที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับน้ำพริกหนุ่ม ดังนั้นสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดจึงให้ใช้กรดเบนโซอิกได้ไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อน้ำพริกหนุ่ม 1 กิโลกรัม โดยอ้างอิงจากมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex) หัวข้อ Seasonings and condiments⁽⁵⁾ และเพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภค สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเชียงใหม่ ได้เก็บตัวอย่างน้ำพริกหนุ่มส่งตรวจปริมาณกรดเบนโซอิกที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2553 ถึง 2556 โดยการสำรวจพบว่าน้ำพริกหนุ่มบางตัวอย่างมีปริมาณกรดเบนโซอิกสูงถึง 7,406 มิลลิกรัมต่อน้ำพริกหนุ่ม 1 กิโลกรัม ทำให้ผู้บริโภคอาจมีความเสี่ยงต่อการได้รับสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพได้ ดังนั้นศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ จึงได้รวบรวมข้อมูลน้ำพริกหนุ่มนี้ มาประเมินการได้รับสัมผัสของการใช้กรดเบนโซอิกในน้ำพริกหนุ่ม เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำพริกหนุ่มจำนวน 188 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างส่งโดยกลุ่มงานคุ้มครองผู้บริโภค สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเชียงใหม่ ในช่วงเดือนตุลาคม 2553 – กันยายน 2556 เพื่อตรวจวิเคราะห์หาปริมาณกรดเบนโซอิก และค่าความเป็นกรดต่าง

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง, pH-meter, Magnetic stirrer with TFE-coated stirring bar, เครื่องปั่น, กระดาษกรองชนิด Nylon 66 ที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร ขนาด 13 และ 47 มิลลิเมตร, กระดาษกรองเบอร์ 42

HPLC: Agilent 1100 Series, Column: ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm × 4.6 mm × 5 μm), Column temperature: 30 °C, Injection volume: 10 μL, Flow rate: 1.0 mL/min, UV detector wavelength: 235 nm

Mobile phase: Solvent A: 0.01 M Ammonium acetate buffer pH 4.5 – 4.6, Solvent B: Methanol

Gradient condition:

No.	Time (min)	% solvent (A)	% solvent (B)
1.	0.00	82	18.0
2.	10.00	55	45.0
3.	12.00	55	45.0
4.	12.50	82	18.0
5.	15.00	82	18.0

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: Methanol, Ammonium acetate, Potassium ferro cyanide, Zinc acetate, Acetic acid

สารมาตรฐาน: Sodium benzoate (SIGMA-ALDRICH®), purity 99.7%

วิธีเตรียมสารละลาย

1. 0.01 M Ammonium acetate buffer pH 4.5–4.6

ละลาย Ammonium acetate 0.77 กรัม ด้วยน้ำประมาณ 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วยกรดอะซิติก เข้มข้น ให้ได้ pH 4.5–4.6 ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 1,000 มิลลิลิตร กรองด้วย membrane filter

2. Extracting solution

นำสารละลายในข้อ 1 มา 60 ส่วน ผสมให้เข้ากันกับ Methanol จำนวน 40 ส่วน

3. Carrez I solution

ละลาย Potassium ferro cyanide 150 กรัม ด้วยน้ำ ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

4. Carrez II solution

ละลาย Zinc acetate 230 กรัม ด้วยน้ำ ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

วิธีการตรวจวิเคราะห์กรดเบนโซอิก⁽⁶⁾

ซึ่งตัวอย่าง 5–10 กรัม ในปิ๊กเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม extracting solution ประมาณ 80 มิลลิลิตร, carrez I solution และ carrez II solution อย่างละ 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ถึงขีดด้วย extracting solution เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 และกระดาษกรองชนิด Nylon 66 ที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำสารละลายที่ได้ไปทดสอบปริมาณกรดเบนโซอิก ด้วยเทคนิค HPLC โดยวิธีวิเคราะห์นี้มีการทดสอบค่าความถูกต้องของวิธีดังนี้

คุณสมบัติของวิธี	ค่าที่ได้
LOD, มิลลิกรัม/กิโลกรัม	5.0
LOQ, มิลลิกรัม/กิโลกรัม	10.0
Accuracy, %	95.35 – 100.00
Precision % RSDr	2.25 (ที่ระดับความเข้มข้น 10.42 มิลลิกรัม/กิโลกรัม)
% PRSDR	7.42 (ที่ระดับความเข้มข้น 10.42 มิลลิกรัม/กิโลกรัม)
Linearity, มิลลิกรัม/ลิตร	1.0 – 60.0 ($r = 1.00000$)
Working range, มิลลิกรัม/ลิตร	0.5 – 60.0
Uncertainty, มิลลิกรัม/กิโลกรัม	4.90 (ที่ระดับความเข้มข้น 166 มิลลิกรัม/กิโลกรัม)

การประเมินการได้รับสัมผัส

ข้อมูลการบริโภค ปี พ.ศ. 2549⁽⁷⁾

ข้อมูลการบริโภคน้ำพริกหนุ่มที่นำมาใช้ประเมินการได้รับสัมผัส นำมาจากหนังสือ ข้อมูลการบริโภคอาหารของประเทศไทย (FOOD CONSUMPTION DATA OF THAILAND) จัดทำโดย สำนักมาตรฐานสินค้าและระบบคุณภาพ สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยนำข้อมูลการบริโภค (น้ำพริกคลุกข้าว) จากค่าเฉลี่ยของปริมาณอาหารที่บริโภคเฉพาะผู้ที่บริโภค (eater only) และค่าเปอร์เซ็นต์ที่ 97.5 ของปริมาณอาหารที่บริโภคสำหรับประชากรทั้งหมด (per capita) ในกลุ่มอายุ 19-35, 35-65 และมากกว่า 65 ปี มาใช้เป็นข้อมูลในการประเมินการได้รับสัมผัส และนำปริมาณกรดเบนโซอิกมาใช้ในการคำนวณการได้รับสัมผัส

การประเมินการได้รับสัมผัสกรดเบนโซอิก⁽⁸⁾

1. นำข้อมูลปริมาณของกรดเบนโซอิกที่เจือปนอยู่ในน้ำพริกหนุ่มที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ และข้อมูลการบริโภคน้ำพริกหนุ่ม (อ้างอิงจากน้ำพริกคลุกข้าว) จากหนังสือข้อมูลการบริโภคอาหารของประเทศไทย มาคำนวณปริมาณการได้รับสัมผัส ประมวลผลจากข้อมูลรายตัวอย่าง และแปลผลการประเมิน ที่ระดับความน่าจะเป็นต่างๆ ซึ่งการประเมินนี้ ใช้การคำนวณปริมาณการได้รับสัมผัสจากสมการดังต่อไปนี้

$$\sum \text{Exposure} = \sum (\text{Food consumption} \times \text{concentration})$$

$$\text{Exposure} = \text{ปริมาณการได้รับสัมผัสกรดเบนโซอิก จากการบริโภคน้ำพริกหนุ่มใน 1 วัน (มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน)}$$

$$\text{Food consumption} = \text{ปริมาณการบริโภคน้ำพริกหนุ่ม (กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน)}$$

$$\text{Concentration} = \text{ปริมาณของกรดเบนโซอิกในน้ำพริกหนุ่ม (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)}$$

2. การประเมินลักษณะความเสี่ยง โดยนำข้อมูลการได้รับสัมผัสกรดเบนโซอิกไปประเมินความเสี่ยงเปรียบเทียบกับค่า ADI คำนวณจากสมการ

$$\text{Risk} = \frac{\text{Exposure}}{\text{ADI}}$$

ในที่นี้ค่า ADI = 5 ซึ่งมาจากการกำหนดค่า ADI ของ JECFA คือกรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอต อยู่ที่ 0-5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน จึงนำค่าสูงสุดมาใช้คำนวณ และถ้า Risk ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่า 1 หมายถึง มีความเสี่ยงที่จะเกิดผลเสียต่อสุขภาพผู้บริโภค

3. คำนวณโดยแปลงปริมาณการได้รับสัมผัสเป็นร้อยละของค่า ADI ดังนั้นถ้าการได้รับสัมผัสสารนั้นมีค่าสูงกว่า 100% ADI แสดงว่ามีความเสี่ยงที่จะก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพผู้บริโภค

ผล

ผลการทดสอบ ปริมาณกรดเบนโซอิกในน้ำพริกหนุ่ม (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิกในน้ำพริกหนุ่มที่เก็บจากเชียงใหม่ พ.ศ. 2553 - พ.ศ. 2556 ทั้งหมด 188 ตัวอย่าง

ปี พ.ศ.	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ไม่เข้ามาตรฐาน	คิดเป็นร้อยละ
2553	86	41	47.7
2554	45	18	40.0
2555	40	12	30.0
2556	17	4	23.5

ผลของการประเมินการได้รับสัมผัสปริมาณกรดเบนโซอิกในน้ำพริกหนุ่ม (ตารางที่ 2 - 4)

ตารางที่ 2 ปริมาณการได้รับสัมผัสกรดเบนโซอิกโดยเฉลี่ย คำนวณจากค่าเฉลี่ยของปริมาณอาหารที่บริโภคเฉพาะผู้ที่บริโภค (eater only) รายงานเป็น margin of safety (MOS) หรือ Risk

ปี พ.ศ.	วัยหนุ่มสาว (19-35 ปี) น้ำหนักเฉลี่ย 58.28 กก.		วัยผู้ใหญ่ (35-65 ปี) น้ำหนักเฉลี่ย 60.37 กก.		วัยชรา (>65 ปี) น้ำหนักเฉลี่ย 54.53 กก.	
	ช่วงปริมาณการได้รับสัมผัส	ค่าเฉลี่ย	ช่วงปริมาณการได้รับสัมผัส	ค่าเฉลี่ย	ช่วงปริมาณการได้รับสัมผัส	ค่าเฉลี่ย
2553	0.00 - 0.22	0.05	0.00 - 0.25	0.06	0.00 - 0.19	0.04
2554	0.00 - 0.10	0.03	0.00 - 0.11	0.04	0.00 - 0.08	0.03
2555	0.00 - 0.36	0.03	0.00 - 0.40	0.04	0.00 - 0.30	0.03
2556	0.00 - 0.08	0.02	0.00 - 0.09	0.02	0.00 - 0.07	0.02

ตารางที่ 3 ปริมาณการได้รับสัมผัสกรดเบนโซอิกจากการบริโภคน้ำพริกหนุ่ม ที่ 97.5 เปอร์เซ็นไทล์คิดจากค่าเฉลี่ย การบริโภคสำหรับประชากรทั้งหมด (per capita) รายงานเป็น margin of safety (MOS) หรือ Risk

ปี พ.ศ.	วัยหนุ่มสาว (19-35 ปี) น้ำหนักเฉลี่ย 58.28 กก.		วัยผู้ใหญ่ (35-65 ปี) น้ำหนักเฉลี่ย 60.37 กก.		วัยชรา (>65 ปี) น้ำหนักเฉลี่ย 54.53 กก.	
	ช่วงปริมาณการ ได้รับสัมผัส	ค่าเฉลี่ย	ช่วงปริมาณการ ได้รับสัมผัส	ค่าเฉลี่ย	ช่วงปริมาณการ ได้รับสัมผัส	ค่าเฉลี่ย
2553	0.00 – 2.16	0.49	0.00 – 2.09	0.48	0.00 – 1.85	0.42
2554	0.00 – 1.15	0.37	0.00 – 1.11	0.36	0.00 – 0.99	0.32
2555	0.00 – 3.51	0.34	0.00 – 3.39	0.33	0.00 – 3.00	0.29
2556	0.00 – 0.81	0.21	0.00 – 0.79	0.20	0.00 – 0.70	0.18

ตารางที่ 4 ปริมาณการได้รับสัมผัสกรดเบนโซอิกจากการบริโภคน้ำพริกหนุ่ม เมื่อเทียบเป็นร้อยละของค่า ADI โดยจำแนกตามกลุ่มอายุของประชากร

ปี พ.ศ.	วัยหนุ่มสาว (19-35 ปี)		วัยผู้ใหญ่ (35-65 ปี)		วัยชรา (>65 ปี)	
	เฉลี่ย (eater only)	97.5 pctl (per capita)	เฉลี่ย (eater only)	97.5 pctl (per capita)	เฉลี่ย (eater only)	97.5 pctl (per capita)
2553	1.02	9.89	1.14	9.55	0.86	8.45
2554	0.63	7.46	0.71	7.20	0.53	6.38
2555	0.70	6.78	0.78	6.55	0.59	5.80
2556	0.43	4.17	0.48	4.03	0.36	3.57

เฉลี่ย (eater only) หมายถึง ปริมาณการได้รับสัมผัสกรดเบนโซอิกโดยเฉลี่ย คำนวณจากค่าเฉลี่ยของปริมาณอาหารที่บริโภค เฉพาะผู้ที่บริโภค (eater only)

97.5 pctl (per capita) หมายถึง ปริมาณการได้รับสัมผัสกรดเบนโซอิก ที่ 97.5 เปอร์เซ็นไทล์คำนวณจากค่าเฉลี่ยการบริโภค สำหรับประชากรทั้งหมด (per capita)

ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิกในตัวอย่างน้ำพริกหนุ่มทั้งหมด 188 ตัวอย่างที่จำหน่ายในจังหวัด เชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2553-2556 พบว่ามีการใช้กรดเบนโซอิกเกินจากมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex) กำหนด คิดเป็นร้อยละ 47.7, 40.0, 30.0 และ 23.5 ตามลำดับ การประเมินการได้รับสัมผัสกรดเบนโซอิกจากการบริโภคน้ำ พริกหนุ่ม (ตารางที่ 2) พบว่า การประเมินที่ระดับการได้รับสัมผัสเฉลี่ยจากค่าเฉลี่ยของปริมาณอาหารที่บริโภคเฉพาะ ผู้ที่บริโภค (eater only) กลุ่มประชากรอายุ 19-35 ปี มีค่า margin of safety (MOS) หรือ Risk คือ 0.05, 0.03, 0.03, และ 0.02 ช่วงอายุ 35-65 ปี มีค่า 0.06, 0.04, 0.04 และ 0.02 สำหรับช่วงอายุมากกว่า 65 ปี มีค่า 0.04, 0.03, 0.03 และ 0.02 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) การประเมินการได้รับสัมผัสที่ 97.5 เปอร์เซ็นไทล์ โดยคิดจากการบริโภค สำหรับประชากรทั้งหมด (per capita) ในกลุ่มประชากรอายุ 19-35 ปี มีค่า Risk คือ 0.49, 0.37, 0.34, และ 0.21 ช่วงอายุ 35-65 ปี มีค่า 0.48, 0.36, 0.33 และ 0.20 สำหรับช่วงอายุมากกว่า 65 ปี มีค่า 0.42, 0.32, 0.29 และ 0.18 ตามลำดับ และนำค่าที่ได้มา เปรียบเทียบกับค่า ADI คิดเป็นร้อยละค่า ADI (ตารางที่ 4) พบว่าการได้รับสัมผัสเฉลี่ย

ของผู้บริโภคเฉพาะผู้ที่บริโภค (eater only) ในปี พ.ศ. 2553-2556 มีร้อยละของค่า ADI ในช่วงอายุ 19-35 ปี คือ 1.02, 0.63, 0.70 และ 0.43 ในช่วงอายุ 35-65 ปี คือ 1.14, 0.71, 0.78 และ 0.48 สำหรับในช่วงอายุมากกว่า 65 ปี คือ 0.86, 0.53, 0.59 และ 0.36 ตามลำดับ สำหรับที่ 97.5 เปอร์เซ็นไทล์ ค่าเฉลี่ยการบริโภคประชากรทั้งหมด (per capita) มีร้อยละของค่า ADI ดังนี้ ในช่วงอายุ 19-35 ปี คือ 9.89, 7.46, 6.78 และ 4.17 ช่วงอายุ 35-65 ปี คือ 9.55, 7.20, 6.55 และ 4.03 โดยที่ช่วงอายุมากกว่า 65 ปี คือ 8.45, 6.38, 5.80 และ 3.57 ตามลำดับ

วิจารณ์

เนื่องจากผู้ประกอบการนิยมใช้กรดเบนโซอิก และโซเดียมเบนโซเอต (คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก) ใน น้ำพริกหนุ่มอย่างแพร่หลาย แต่กรดเบนโซอิกนี้ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร ได้สูงสุดในช่วงความเป็นกรดต่าง (pH) ระหว่าง 2.5 ถึง 4.0 ในการตรวจวิเคราะห์จึงเพิ่มการวัดค่าความเป็นกรดต่าง ของน้ำพริกหนุ่ม พบว่าผลิตภัณฑ์น้ำพริกหนุ่มมีค่าความเป็นกรดต่างอยู่ระหว่าง 5 ถึง 7 ฉะนั้น การใช้กรดนี้จึงไม่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์น้ำพริกหนุ่ม เพราะช่วงความเป็นกรดต่างของน้ำพริกหนุ่มไม่เหมาะสมให้กรดเบนโซอิกยับยั้ง การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงไม่อาจป้องกันการเน่าเสียได้ แต่ผู้ประกอบการไม่ได้คำนึง ถึงจุดนี้ หรือไม่มีองค์ความรู้เพียงพอ ทำให้ยังมีการใช้กรดเบนโซอิกในน้ำพริกหนุ่มต่อไป และการประเมินการได้รับ สัมผัสในปี 2553-2556 นี้ พบว่าทั้งกลุ่มผู้บริโภคที่บริโภคน้ำพริกหนุ่มในระดับเฉลี่ยเฉพาะผู้ที่บริโภค (eater only) และกลุ่มระดับที่ 97.5 เปอร์เซ็นไทล์ การบริโภคสำหรับประชากรทั้งหมด (per capita) มีค่าการประเมินการได้รับ สัมผัส (MOS หรือ Risk) น้อยกว่า 1 ซึ่งหมายถึงไม่มีความเสี่ยงที่จะเกิดผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค เพราะมีความ เสี่ยงการได้รับสัมผัสกรดเบนโซอิกในระดับที่ต่ำกว่าค่า ADI มาก

การประเมินการได้รับสัมผัสทั้งสองกลุ่มเทียบกับ 100% ADI มีค่าน้อยกว่า 100% แสดงว่าไม่มีความเสี่ยง ที่จะก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพผู้บริโภค การที่ Codex อนุญาตให้นำกรดเบนโซอิกมาใช้ในการผลิตอาหารได้เพราะ นำไปประเมินความปลอดภัยทางพิษวิทยาแล้วว่าเป็นพิษต่ำ และได้กำหนดความปลอดภัยไว้เป็นค่า Acceptable Daily Intake (ADI) ซึ่งเป็นปริมาณที่ร่างกายสามารถรับสารนั้นได้ต่อวันตลอดชั่วชีวิตโดยไม่ก่อให้เกิดผลกระทบ ใดๆ ต่อสุขภาพ ค่าความปลอดภัย ADI ของกรดเบนโซอิกคือ 0-5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวต่อวัน ฉะนั้นถ้าคิดจาก ค่าสูงสุดคือ 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวต่อวัน ผู้บริโภคที่มีน้ำหนักตัว 50 กิโลกรัม สามารถรับสัมผัสกรดเบนโซอิกได้โดย ไม่มีความเสี่ยงถึง 250 มิลลิกรัมต่อวัน ฉะนั้นการประเมินการได้รับสัมผัสการบริโภคน้ำพริกหนุ่มในครั้งนี้เห็นได้ว่าไม่มี ความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้บริโภค และจากข้อมูลปี 2553-2556 พบว่าการใช้กรดเบนโซอิกในน้ำพริกหนุ่มเกินมาตรฐาน มีปริมาณลดลง คือร้อยละ 47.7, 40.0, 30.0 และ 23.5 ตามลำดับ สาเหตุเพราะเมื่อพบว่ามีการใช้กรดเบนโซอิกใน น้ำพริกหนุ่มเกินมาตรฐาน สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเชียงใหม่ และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ ได้ ร่วมมือกันจัดอบรมให้ความรู้ผู้ประกอบการถึงสุขลักษณะที่ดีในการผลิต การใช้สารเคมีที่ถูกต้องและเหมาะสม ตามมาตรฐานกำหนด รักษาสภาพการวางจำหน่ายผลิตภัณฑ์น้ำพริกหนุ่มโดยวิธีแช่เย็น และกระตุ้นให้มีการพัฒนารักษา คุณภาพผลิตภัณฑ์น้ำพริกหนุ่ม โดยให้ป้ายอาหารปลอดภัยแก่ผู้ประกอบการที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์ 3 ครั้งติดต่อกัน สำหรับผู้มีผลการตรวจวิเคราะห์ไม่ผ่านทั้ง 3 ครั้ง สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเชียงใหม่จะเข้าไปว่ากล่าวตักเตือน ให้ คำแนะนำ และติดตามอย่างต่อเนื่อง โดยเก็บตัวอย่างส่งตรวจหาสาเหตุและวิธีแก้ไข เพื่อให้ผู้บริโภคได้บริโภคน้ำพริกหนุ่มที่ปลอดภัยต่อไป และจากการติดตามในปี พ.ศ. 2557 พบว่า ผลการตรวจวิเคราะห์น้ำพริกหนุ่มจำนวน 23 ตัวอย่าง มี 5 ตัวอย่าง ที่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (คิดเป็นร้อยละ 21.74) โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 1,005-1,268 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม เห็นได้ว่าตั้งแต่ปี พ.ศ. 2552-2557 กรดเบนโซอิกในน้ำพริกหนุ่มมีปริมาณและจำนวนลดลง แต่เนื่องจาก ในชีวิตประจำวันผู้บริโภคไม่ได้บริโภคเฉพาะน้ำพริกหนุ่ม อาจจะบริโภคอาหารอื่นๆ ที่มีกรดเบนโซอิกเป็นส่วนผสม เช่น ก๋วยเตี๋ยว ลูกชิ้น หมูยอ เครื่องดื่ม เป็นต้น ทำให้มีโอกาสได้รับกรดเบนโซอิกเพิ่มขึ้น ดังเช่นผลการดำเนินงาน

คุ้มครองผู้บริโภคด้านสาธารณสุขประจำปี 2554 ของสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเชียงใหม่ พบว่ามีการใช้วัตถุกันเสียในลูกชิ้นและหมุยอ จากจำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจ 43 ตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณกรดเบนโซอิกมากกว่า 1,000–5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 38 ตัวอย่าง ซึ่งไม่ผ่านตามเกณฑ์กำหนดคิดเป็นร้อยละ 88.4⁽⁹⁾ ดังนั้นผู้บริโภคควรมีความระมัดระวังในการเลือกบริโภคอาหารชนิดต่างๆ และบริโภคอาหารที่หลากหลายหมุนเวียน เพื่อไม่ให้เกิดการสะสมของสารพิษในร่างกาย ถ้าร่างกายได้รับสารพิษในปริมาณที่ไม่สูงเกินไปจะสามารถกำจัดสารพิษออกมาได้บางส่วน เช่น กรดเบนโซอิกที่บริโภคเข้าไปจะถูก conjugated ที่ตับ โดยจะไปรวมกับโคเอนไซม์เอ (coenzyme A) เกิดเป็นเบนโซอิลโคเอนไซม์เอ (bensoyl coenzyme A) โดยมีเอนไซม์ซินทีเทส (synthetase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้นเบนโซอิลโคเอนไซม์เอจะรวมกับกลัยซีน (glycine) เกิดเป็นกรดฮิปปูริก (hippuric acid) โดยมีเอนไซม์เอซิลทรานเฟอร์เรส (acyltransferase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และสามารถขับถ่ายออกทางปัสสาวะได้ การขับถ่ายของกรดฮิปปูริกทางปัสสาวะ ในคนอยู่ประมาณ 1.0–2.5 กรัมต่อวัน ซึ่งเท่ากับกรดเบนโซอิกที่บริโภคเข้าไป 0.7–1.7 กรัม กรณีที่ได้รับเกิน 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว อาจทำให้เสียชีวิตได้ เพราะร่างกายไม่สามารถขับออกได้ทัน⁽⁴⁾ ฉะนั้นศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ และสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเชียงใหม่ จึงได้เฝ้าระวังน้ำพริกหนุ่มเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคให้มีความปลอดภัยในการบริโภคต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณวิทยาคม ผาพิศาล และคุณนงคราญ เรืองประพันธ์ ที่กรุณาช่วยตรวจทานเนื้อหา และให้คำแนะนำเรื่องการประเมินการได้รับสัมผัสกรดเบนโซอิกในน้ำพริกหนุ่ม ขอขอบคุณ คุณปณิธิ ขวลิตรำรง ที่ช่วยแก้ไขเนื้อหาให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น รวมถึงเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้บทความนี้ได้เผยแพร่ในวารสาร

สรุป

การประเมินการได้รับสัมผัสของกรดเบนโซอิกในน้ำพริกหนุ่ม ที่จำหน่ายในจังหวัดเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2553–2556 พบว่าผู้บริโภคมีความปลอดภัย เนื่องจากปริมาณกรดเบนโซอิกที่ได้รับต่ำกว่าค่า ADI ที่ JECFA กำหนด แต่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ และสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเชียงใหม่ ยังคงดำเนินการตรวจติดตามการใช้กรดเบนโซอิกในน้ำพริกหนุ่ม เพื่อเฝ้าระวังและคุ้มครองผู้บริโภคต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Chipley JR. Sodium benzoate and benzoic acid. In: Davidson PM, Branen AL, editors. Antimicrobial in foods. New York: Marcel Dekker; 1993. p. 11–48.
2. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 281 (พ.ศ. 2547) ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 121 ตอนพิเศษ 97 ง (ลงวันที่ 6 กันยายน 2547).
3. WHO. Benzoic acid and sodium benzoate (Concise international chemical assessment document 26). Geneva: World Health Organization; 2000.
4. วีรยา การพานิช. กรดเบนโซอิก วัตถุกันเสียที่นิยมใช้ในอาหาร. กรุงเทพฯ: สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล. [ออนไลน์]. [สืบค้น 9 ก.ค. 2558]; [7 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <http://www.thaitox.org/media/upload/file/Benzoic-Acid.pdf>.
5. Codex alimentarius. GSFA provisions for BENZOATES. [online]. 2015 [cited 2015 Jul 9]; [3 screens]. Available from: URL: <http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/groups/details.html?id=162>.
6. Benzoic acid, sorbic acid and saccharin in food & beverage high performance liquid chromatographic method. In: Compendium of methods for food analysis. Nonthaburi: DMS& ACFS; 2003. p. 12–4.

7. สำนักงานมาตรฐานสินค้าและระบบคุณภาพ. ข้อมูลการบริโภคอาหารของประเทศไทย. กรุงเทพฯ : สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ; 2549. หน้า 66, 87, 106.
 8. พจนา วงษาพรหม, เวณิกา เบ็ญจพงษ์, วีรยา การพานิช, ปราณี พัฒนกุลอนันต์. การประเมินความเสี่ยงของการได้รับสัมผัสกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก จากการบริโภคเครื่องแกงเผ็ดของประชากรในเขตกรุงเทพมหานคร และสุพรรณบุรี. วารสารพิษวิทยาไทย 2552; 24(1): 17-26.
 9. สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเชียงใหม่. ผลการดำเนินงานคุ้มครองผู้บริโภคด้านสาธารณสุข ประจำปี2554. เชียงใหม่: งานพัฒนาระบบงานคุ้มครองผู้บริโภคและบริการวิชาการ; 2555. หน้า 41.
-

Exposure Assessment of Benzoic acid in Nam Prig Noom Sold in Chiang Mai since 2010 – 2013

Patcharida Pichai* and Naruemon Khanteekul**

**Regional Medical Sciences Center 1 Chiang Mai Amphur Mae Rim Chiang Mai 50180, Chiangmai*

***Provincial Public Health office Amphur Muang, Chiang Mai, 50000 Thailand.*

ABSTRACT Benzoic acid and sodium benzoate are most popular preservatives used in Nam Prig Noom (Green chilli dip). They are permitted to use in ready-to-eat foods, in from of benzoic acid, for not more than 1,000 mg/kg. In 2009, it is found that more than 60% of Nam Prig Noom sold in Chiang Mai contained benzoic acid higher than the maximum allowance. In order to protect the consumer, Regional Medical Sciences Center 1 Chiang Mai together with Chiang Mai Provincial Public Health office surveyed the use of benzoic acid in Nam Prig Noom between 2010 and 2013. The results show that Nam Prig Noom contained benzoic acid higher than maximum allowance, in percentage of 47.7, 40.0, 30.0 and 23.5 respectively. All data are used to estimate the exposure assessment from the intake of benzoic acid at the average of eater only and 95 percentile of per capita in 3 spans of age, 19-35, 35-65 and more than 65 years. The estimation shows that all spans of age are safe from consumption of Nam Prig Noom.

Key words: Exposure Assessment, benzoic acid, preservative, Nam prig noom

การวางระบบตรวจสอบขึ้นทะเบียนหน่วยงาน ทดสอบหรือวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งไม่ได้ทดลองในคน

สตีฟลิฐ เอกะจัมปะกะ และชมไลไล สินธุสาร

สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ปัจจุบันประเทศไทยได้สมัครเข้าร่วมเป็นภาคีภาคสมทบในการยอมรับร่วมข้อมูลการประเมินสารเคมีขององค์การเพื่อความร่วมมือและการพัฒนาทางเศรษฐกิจ จัดเป็นความท้าทายระดับประเทศ จึงต้องมีการวางระบบการตรวจสอบขึ้นทะเบียนหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนาด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์และสาธารณสุข ซึ่งไม่ได้ทดลองในคนตามหลักเกณฑ์ OECD GLP ขึ้นในประเทศไทย โดยใช้การดำเนินงานวิจัยเชิงพัฒนา คือกำหนดปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญต่อการจัดวางระบบ ได้แก่ กฎหมาย เกณฑ์กำหนดของ OECD และความเป็นไปได้ของหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนาในประเทศ ซึ่งปัจจัยทั้งหมดนี้ได้นำมาใช้ในการจัดวางขั้นตอนการดำเนินงาน จากผลการวางระบบดังกล่าว ทำให้ได้โปรแกรมการตรวจสอบ และจากการตรวจสอบขึ้นทะเบียนตามหลักเกณฑ์ OECD GLP ของประเทศ และมีหน่วยทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนาเป็นไปตามเกณฑ์ OECD GLP ได้รับการขึ้นทะเบียนทั้งหมดจำนวน 16 แห่ง เป็นหน่วยงานในประเทศไทยจำนวน 7 แห่ง หน่วยงานที่ประเทศอินเดียจำนวน 9 แห่ง ส่งผลให้ผู้ประกอบการสามารถนำข้อมูลไปขึ้นทะเบียนตำรับยาได้ อย่างไรก็ตามการดำเนินการดังกล่าว ยังเป็นเรื่องใหม่ของประเทศ ที่ต้องมีการพัฒนาระบบให้เหมาะสมยิ่งขึ้น รวมทั้งส่งเสริมบทบาทภาครัฐและเอกชนในการเข้าไปมีส่วนร่วมและผลักดันให้ประเทศไทยได้รับการยอมรับเป็นสมาชิกภาคสมทบแบบสมบูรณ์ต่อไป

Accepted for publication, 19 June 2015

บทนำ

ปัจจุบันแม้ว่าหลายประเทศในโลกมีความพยายามเจรจาเขตเสรีการค้ามากขึ้นเพื่อลดกำแพงภาษีและกำจัดอุปสรรคทางการค้า แต่ในขณะเดียวกันประเทศเหล่านี้มีความพยายามเอามาตรการกีดกันทางการค้ามาใช้มากขึ้นเช่นกัน เพื่อปกป้องอุตสาหกรรมภายในประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่พัฒนาแล้ว ปัจจุบันการค้าระหว่างประเทศได้มีการนำเอาผลการวิเคราะห์หรือคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ เป็นดัชนีวัดคุณภาพสินค้ามาใช้ เป็นเครื่องมือในการกีดกันทางการค้า ทำให้ประเทศไทยไม่สามารถส่งสินค้าไปขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ยังหน่วยกำกับดูแลตามกฎหมายต่างประเทศได้ อาทิ การออกกฎระเบียบของ REACH (Registration Evaluation and Authorization of Chemicals) กำหนดให้สินค้าทุกชนิดที่ใช้สารเคมีต้องจดทะเบียน/ประเมิน/อนุญาต และจำกัดการใช้สารเคมีกว่า 30,000 ชนิด ในผลิตภัณฑ์ที่นำเข้าใน European Union (EU) ได้นั้น ต้องมาจากการศึกษาวิจัยที่ดำเนินการจากห้องปฏิบัติการที่มีระบบคุณภาพ Organization for Economic Cooperation and Development Principles of Good Laboratory Practice (OECD GLP) เท่านั้น ดังนั้น การพัฒนาระบบหน่วยศึกษาวิจัยของประเทศอย่างมีประสิทธิภาพเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อส่งผลให้ผลการวิจัยที่น่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับ หน่วยศึกษาวิจัยดังกล่าวจะต้องมีระบบคุณภาพตามหลักการ OECD GLP เป็นทางหนึ่งในการแก้ปัญหาการส่งออกของแต่ละหน่วยงานเท่านั้น แต่อย่างไรก็ดีการเป็นสมาชิกภาคสมทบในระบบการยอมรับร่วมในข้อมูลการประเมินสารเคมีของ OECD ต่างหากที่เป็นกลไกสำคัญในการกำกับดูแลที่แท้จริงของแต่ละประเทศ ที่จะมีส่วนกำหนดทิศทางการดำเนินงาน การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญของข้อกำหนด OECD จัดเป็นความท้าทายในระดับประเทศ ที่จะสร้างความเข้มแข็งทางเศรษฐกิจและการค้าในระดับโลกได้ โดยอาศัยหน่วยตรวจสอบของประเทศในการกำกับดูแลตามขอบข่ายของ OECD ซึ่งขอบข่ายหลัก ได้แก่ ผลิตภัณฑ์เภสัชกรรม (pharmaceutical product) ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (cosmetic product) ผลิตภัณฑ์กำจัดศัตรูพืช (pesticide product) ยาสำหรับสัตว์ (veterinary drug) สารปรุงแต่งอาหารคน (food additive) สารปรุงแต่งอาหารสัตว์ (feed additive) และสารเคมีในอุตสาหกรรม (industrial chemical)

จากเหตุผลดังกล่าวประเทศไทยสมัครเข้าร่วมเป็นภาคีภาคสมทบในการยอมรับร่วมข้อมูลการประเมินสารเคมีขององค์การเพื่อความร่วมมือและพัฒนาทางเศรษฐกิจ (OECD) ซึ่งประกอบด้วยสมาชิก 34 ประเทศ ได้แก่ ออสเตรเลีย ออสเตรีย เบลเยียม แคนาดา สาธารณรัฐเช็ก เดนมาร์ก ฟินแลนด์ ฝรั่งเศส เยอรมนี กรีซ ฮังการี ไอร์แลนด์ ไอร์แลนด์ อิตาลี ญี่ปุ่น สาธารณรัฐเกาหลี ลักเซมเบิร์ก เม็กซิโก เนเธอร์แลนด์ นิวซีแลนด์ นอร์เวย์ โปแลนด์ โปรตุเกส สาธารณรัฐสโลวัก สเปน สวีเดน สวิตเซอร์แลนด์ ตุรกี สหราชอาณาจักร สหรัฐอเมริกา อิสราเอล สโลวีเนีย ชิลี และเอสโตเนีย มีวัตถุประสงค์หลักในการเป็นเวทีสำหรับการเจรจา หรือเพื่อพัฒนากลั่นกรองนโยบายทางเศรษฐกิจของประเทศสมาชิก เป็นเวทีแลกเปลี่ยนข้อคิดเห็นระหว่างประเทศสมาชิกเกี่ยวกับการจัดการปัญหาต่างๆ บนพื้นฐานของการศึกษาวิจัย เพื่อนำไปสู่ข้อสรุปพร้อมระดับนโยบายในลักษณะ guidelines for best practices และการปรับเปลี่ยนนโยบายภายในประเทศสมาชิกให้สอดคล้องกับแนวทางการยอมรับร่วมในข้อมูลการประเมินสารเคมี (Mutual Acceptance of Data-MAD) คือการที่กลุ่มประเทศ OECD จะยอมรับข้อมูลการประเมินสารเคมีของกันและกัน โดยไม่ต้องตรวจสอบซ้ำ และ OECD กำหนดให้การยอมรับข้อมูลการประเมินสารเคมีต้องดำเนินการโดยห้องปฏิบัติการหรือที่เรียกว่า Test Facility ที่เป็นไปตามหลักปฏิบัติที่ดีของห้องปฏิบัติการ (Good Laboratory Practice – GLP) และ Test Facility นั้นถูกตรวจสอบและขึ้นทะเบียนว่าได้ดำเนินการสอดคล้องกับหลักการ OECD GLP โดยหน่วยตรวจสอบ (Compliance Monitoring Authority – CMA) ซึ่งตามข้อกำหนดของ OECD ประเทศที่ไม่ได้เป็นสมาชิกของ OECD สามารถเข้าร่วมอยู่ในระบบการยอมรับร่วมข้อมูลการประเมินสารเคมีของ OECD ได้โดยต้องผ่านการตรวจประเมินจากผู้เชี่ยวชาญของ OECD⁽¹⁾ การดำเนินการดังกล่าวจะประสบความสำเร็จได้จะต้องขับเคลื่อนด้วย 3 เสาหลักของประเทศ ได้แก่ หน่วยตรวจสอบ หน่วยประเมินสารเคมี และกฎหมายของประเทศในการกำกับดูแล

ดังนั้น กระทรวงสาธารณสุขโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ซึ่งเป็นผู้นำด้านการวิจัยสู่มาตรฐานในระดับโลก ได้ตระหนักถึงปัญหาดังกล่าว จึงจำเป็นต้องเร่งดำเนินการนำหลักที่ดีของห้องปฏิบัติการวิจัยของ OECD มาใช้ ภายใต้แนวความคิด Mutual Acceptance of Data โดยมีการวางแผนยุทธศาสตร์ในการเป็นหน่วยตรวจสอบของประเทศในการขึ้นทะเบียนหน่วยศึกษาวิจัยสอดคล้องกับ OECD GLP ที่ดูแลว่าผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม การใช้ข้อมูลดังกล่าวให้เป็นไปตามกฎหมายของแต่ละประเทศในการคุ้มครองผู้บริโภคในประเทศ ซึ่งแตกต่างจากการรับรองห้องปฏิบัติการ (Laboratory Accreditation) ซึ่งเป็นภาคสมัครใจของห้องปฏิบัติการ การจัดตั้งหน่วยตรวจสอบของประเทศ (National Compliance Monitoring Authority – CMA) ขึ้นในประเทศไทย ขณะที่ยังมิได้มีหน่วยงานใดใช้ระบบคุณภาพของหลักปฏิบัติที่ดีของห้องปฏิบัติการของ OECD มาก่อน ทำให้การดำเนินงานดังกล่าวจะต้องทำภายใต้ข้อจำกัดหลายประการ ที่ต้องมีการดำเนินการที่เป็นระบบ ในการกำหนดขอบข่ายของประเทศ และต้องทำการศึกษาระบบการตรวจสอบที่เหมาะสม สำหรับการให้การยอมรับ และขึ้นทะเบียนหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนาภายใต้บริบทของกระทรวงสาธารณสุข เพื่อใช้เป็นหลักเกณฑ์ เงื่อนไข การดำเนินงานที่เป็นมาตรฐานทัดเทียมกับหน่วยตรวจสอบที่เป็นสมาชิก OECD มาใช้ในการกำกับดูแลหน่วย ประเมินสารเคมีในประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

1. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องทั้งในและต่างประเทศ ได้แก่ ระบบการตรวจสอบขึ้นทะเบียน โปรแกรม การตรวจสอบของหน่วยงานตรวจสอบกำกับ GLP ในกลุ่มประเทศสมาชิก OECD และกฎระเบียบ กฎหมาย ในการขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ของประเทศไทย และอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง
2. จัดทำระบบคุณภาพการตรวจสอบขึ้นทะเบียนหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนาของหน่วย ตรวจสอบ (Compliance Monitoring Authority) ตามหลักเกณฑ์ OECD
3. ดำเนินการพัฒนาศักยภาพหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัยของประเทศไทย
4. ตรวจสอบและติดตามประเมินผลหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัยทั้งในและต่างประเทศ

ผลการดำเนินงาน

เนื่องจากประเทศไทยยังมิได้มีระบบตรวจสอบขึ้นทะเบียนหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนาตาม หลักการ OECD GLP มาก่อน ผู้วิจัยทำการกำหนดระบบตรวจสอบขึ้นทะเบียนหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนา ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์และสาธารณสุข ซึ่งไม่ได้ทดลองในคน ดังนี้

1. ผลการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องทั้งในและต่างประเทศ

จากการวิเคราะห์โครงสร้างหน่วยตรวจสอบของประเทศสมาชิก OECD ทั้ง 34 ประเทศ นั้น พบว่า หน่วยตรวจสอบจะเป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานระหว่างประเทศได้นั้น ต้องมีกฎหมายรองรับในการดำเนินการ ที่จะสามารถเข้าไปตรวจสอบและเรียกดูข้อมูลจาก test facility ได้ เนื่องจากหลักการของการบังคับใช้ OECD GLP เป็นเรื่องที่กำหนดโดยกฎหมายที่มี Regulator กำกับใช้ ดังนั้นประเทศสมาชิก OECD ส่วนใหญ่จึงมี National GLP Compliance Monitoring Authority อยู่ภายใต้กระทรวง หรืออยู่ภายใต้หน่วยงานของ Regulator บางประเทศ จะเป็นในลักษณะของภาคบังคับ (mandates) ไม่ใช่ voluntary เช่น ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา แต่ในอีกหลายประเทศ ที่ดำเนินการเป็นหน่วยตรวจสอบของประเทศได้นั้น จะได้รับการแต่งตั้งเป็นหน่วยตรวจสอบของประเทศอย่างเป็นทางการให้มีอำนาจหน้าที่ตามกฎหมาย ดังเช่น ประเทศนิวซีแลนด์ เป็นต้น โดยแต่ละประเทศมีหน่วยตรวจสอบเพียง 1-2 แห่งเท่านั้น จะมีบางประเทศ เช่น ประเทศญี่ปุ่น มีหน่วยตรวจสอบถึง 4 แห่ง ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้วิเคราะห์ กฎระเบียบ กฎหมายในการขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ของประเทศไทย และกฎหมายในการกำกับดูแลหน่วยประเมิน

สารเคมี เพื่อกำหนดขอบข่ายของประเทศ พบว่า มีกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับหลักการปฏิบัติที่ดีของห้องปฏิบัติการ (GLP) มี 2 ขอบข่าย ดังนี้

1.1 ด้านผลิตภัณฑ์เภสัชกรรม สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข มีประกาศ เกี่ยวกับการขึ้นทะเบียนตำรับยา ลงวันที่ 26 ธันวาคม 2551 กำหนดให้ข้อมูลรายงานผลการศึกษาชีวสมมูล สถานที่ ที่ทำการตรวจวิเคราะห์ต้องปฏิบัติตามหลักของ GLP หรือ ISO/IEC 17025⁽²⁾

1.2 ด้านผลิตภัณฑ์กำจัดศัตรูพืช

1.2.1 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ออกประกาศเรื่อง การขึ้นทะเบียนวัตถุอันตราย วันที่ 1 ธันวาคม พ.ศ. 2551 กำหนดให้ข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษของสารเข้มข้นและผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป ต้องได้มาจาก ห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน GLP (Good Laboratory Practice) ตามมาตรฐาน OECD⁽³⁾

1.2.2 ประกาศกรมวิชาการเกษตร วันที่ 14 ตุลาคม 2552 เรื่อง กำหนดรายละเอียด หลักเกณฑ์ และวิธีการขึ้นทะเบียน การออกใบสำคัญและการต่ออายุใบสำคัญ การขึ้นทะเบียนวัตถุอันตราย กำหนดให้ข้อมูล เกี่ยวกับความเป็นพิษของสารเข้มข้นและผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป ต้องได้มาจากห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน GLP (Good Laboratory Practice) ตามมาตรฐาน OECD⁽⁴⁾

อย่างไรก็ตามยังไม่มีกฎหมายให้หน่วยงานราชการใดมีอำนาจหน้าที่ ดำเนินการตรวจสอบขึ้นทะเบียน ตามหลักการ OECD GLP จึงได้ประสานความร่วมมือกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ที่มีกฎหมายบังคับใช้ GLP ในเรื่องการศึกษาชีวสมมูล ในการพัฒนาปรับปรุงกฎหมาย กฎระเบียบที่สำคัญของหน่วยตรวจสอบ เพื่อบริการอำนาจหน้าที่ให้กับกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในการเข้าไปตรวจสอบหน่วยทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนา และ ข้อมูลการศึกษาวิจัยที่จะนำมาขึ้นทะเบียน ในขอบเขตผลิตภัณฑ์เภสัชกรรม โดยได้แก้ไขประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง แต่งตั้งพนักงานเจ้าหน้าที่ให้ปฏิบัติตามพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 เพิ่มเติม ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2556⁽⁵⁾

2. ผลการจัดทำระบบคุณภาพการตรวจสอบขึ้นทะเบียนหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนาของ หน่วยตรวจสอบ (Compliance Monitoring Authority) ตามหลักเกณฑ์ OECD

คุณสมบัติหน่วยตรวจสอบของประเทศ (Compliance Monitoring Authority) ที่จะเป็นที่ยอมรับ ได้นั้น ต้องมีระบบการตรวจสอบขึ้นทะเบียนให้มีผลสำเร็จครบถ้วนตามหลักเกณฑ์ Council Acts ครอบคลุม ข้อกำหนดที่สำคัญของ OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring: Number 2 (Revised): Guidance for GLP Monitoring Authorities, Revised Guides for Compliance Monitoring Procedures for Good Laboratory Practice⁽⁶⁾ ที่สำคัญ รวมทั้งการตรวจสอบที่ได้มีการนำข้อกำหนด Number 3: Guidance for GLP Monitoring Authorities, Revised Guidance for the Conduct of Laboratory Inspections and Study Audits⁽⁷⁾ และ Number 9: Guidance for GLP Monitoring Authorities, Guidance for the Preparation of GLP Inspection Reports⁽⁸⁾ มาใช้กำหนด ในรายละเอียด และได้ดำเนินการวิเคราะห์ปัจจัยต่างๆ เทียบเคียงกับโปรแกรม National GLP Compliance Monitoring Authority ของประเทศสมาชิก OECD เพื่อหาแนวทางที่เหมาะสม จัดทำข้อเสนอในเชิงนโยบาย ทางด้านการเป็นหน่วยตรวจสอบระหว่างประเทศที่สำคัญและมีความเกี่ยวข้องกับนโยบายต่างประเทศในการเข้าร่วมเป็น ภาควิชา การยอมรับร่วมแบบสมบูรณของประเทศไทย และจัดวางระบบการตรวจสอบขึ้นทะเบียนของหน่วยตรวจสอบดังนี้

2.1 การพัฒนาเอกสารระบบบริหารการตรวจสอบที่สำคัญ

การพัฒนาเอกสารคุณภาพระบบบริหารที่ใช้ในการตรวจสอบเพื่อขึ้นทะเบียน ตามหลักการ OECD GLP ได้จัดทำสำเร็จเป็นครั้งแรก ทั้งหมด 34 ฉบับ เป็นภาษาอังกฤษ ประกอบด้วย 1) เอกสารคู่มือโปรแกรม การตรวจสอบ (GLP Compliance Monitoring Programme Manual) แบ่งเป็นหมวดหมู่ตามข้อกำหนดของ OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring Number 2

(Revised): Guidance for GLP Monitoring Authorities, Revised Guides for Compliance Monitoring Procedures for Good Laboratory Practice ประกอบด้วย บทต่างๆ กล่าวถึง นโยบายของกรม หน้าที่และขอบข่ายโปรแกรมการตรวจสอบความสอดคล้องกับหลักการ OECD GLP หลักฐานแสดงความเป็นตัวตน สถานะทางกฎหมาย โครงสร้างองค์กร การป้องกันความลับ ขั้นตอนการเข้าร่วมโปรแกรม คุณสมบัติผู้ตรวจสอบ และการฝึกอบรม เอกสารที่ใช้ในการตรวจสอบ การดำเนินการตรวจ Test facility และ Study Audit การดำเนินการใน กรณีที่พบความไม่สอดคล้องกับหลักเกณฑ์ OECD GLP การจัดการเรื่องการอุทธรณ์ การเก็บรักษาข้อมูลการตรวจ เป็นต้น 2) ข้อกำหนด และเงื่อนไขการตรวจสอบขึ้นทะเบียน (R) ประกอบด้วย คุณสมบัติของหน่วยงานที่ต้องการ เข้าโปรแกรมการตรวจสอบ และข้อกำหนดอื่น ๆ ทางวิชาการของหน่วยงานที่ขอการตรวจสอบขึ้นทะเบียนต้องถือปฏิบัติ ข้อปฏิบัติหลังได้รับการขึ้นทะเบียน และการใช้ข้อความแสดงการขึ้นทะเบียน 3) มาตรฐานการปฏิบัติงาน (SOP) ต่าง ๆ 10 ฉบับ 4) Worksheet (WS) 13 ฉบับ 5) φόρμ 9 ฉบับ รวมทั้งได้กำหนดมาตรฐานการตรวจสอบตามขอบข่าย Bioanalytics โดยนำเอาข้อกำหนดทางวิชาการการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ยอมรับกันทั่วโลก ได้แก่ Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation ฉบับปี 2001 ขององค์การอาหารและยา ของสหรัฐอเมริกา (US FDA) มาวิเคราะห์และจัดทำเป็น checklist การตรวจด้านชีววิเคราะห์ (Bioanalytical) ให้กับผู้ตรวจสอบดำเนินการได้ดำเนินการเป็นมาตรฐานเดียวกัน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เอกสารคุณภาพที่ใช้ในการตรวจสอบเพื่อขึ้นทะเบียนตามข้อกำหนดของ OECD ของหน่วยตรวจสอบ

มาตรฐานการปฏิบัติงานและแบบฟอร์มที่เกี่ยวข้อง	ข้อกำหนดที่สำคัญ
1. GLP Compliance Monitoring Programme Manual	- OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring: Number 2 (Revised): Guidance for GLP Monitoring Authorities, Revised Guides for Compliance Monitoring Procedures for Good Laboratory Practice
2. Requirements and Conditions for GLP compliance test facility	
3. SOP for Registration of GLP Compliance Test Facility	
4. SOP for Monitoring and Training of GLP Inspector	- OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring: Number 3 (Revised): Guidance for GLP Monitoring Authorities, Revised Guidance for the Conduct of Laboratory Inspections and Study Audit
5. SOP for Preparation of Inspection Report	
6. SOP for Appointment of Inspectors	
7. SOP for Withdrawal of Registration	- OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring: Number 9: Guidance for GLP Monitoring Authorities, Guidance for the Preparation of GLP Inspection Reports
8. SOP for Complaint of Registration	
9. SOP for Pre-inspection	
10. SOP for Bioanalytical Study Audit	
11. SOP for assignment test facility registration and code number	
12. SOP for the conduct of test facility inspections and study audits	
13. Worksheet for GLP application review	
14. Worksheet for Document sending for test facility inspection and study audit	
15. Worksheet for GLP inspection Checklist	
16. Worksheet for Document for inspection	
17. Worksheet for Monitoring Inspector's Performance	
18. Worksheet for Inspector Evaluation	
19. Worksheet for Planning of Inspector's Training	
20. Report Format of Inspection Report	

ตารางที่ 1 เอกสารคุณภาพที่ใช้ในการตรวจสอบเพื่อขึ้นทะเบียนตามข้อกำหนดของ OECD ของหน่วยตรวจสอบ (ต่อ)

มาตรฐานการปฏิบัติงานและแบบฟอร์มที่เกี่ยวข้อง	ข้อกำหนดที่สำคัญ
21. Worksheet for A Subject for Withdrawl of Registration	- OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring: Number 2 (Revised): Guidance for GLP Monitoring Authorities, Revised Guides for Compliance Monitoring Procedures for Good Laboratory Practice
22. Worksheet for Report of Withdrawl of Registration	
23. Worksheet for Declaration of Withdrawl of Registration	
24. Worksheet for Complaint of Registration	
25. Complaint Log Form	- OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring: Number 3 (Revised): Guidance for GLP Monitoring Authorities, Revised Guidance for the Conduct of Laboratory Inspections and Study Audit
26. Form for Consent of Appointment of Inspector	
27. Form for Financial and Conflict of Interest	
28. Application Form No.5 Application for GLP compliance test facility	
29. Application Form No.6 Specific information for GLP compliance test facility	- OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring: Number 9: Guidance for GLP Monitoring Authorities, Guidance for the Preparation of GLP Inspection Reports
30. Application Form No.7 Self evaluation complying with OECD GLP	
31. Form for Record of Inspection	
32. Form for Inspection/Study Audit Visit Report	
33. Form for Summary Report of Inspection	
34. Form for Opening and Closing Meeting	

2.2 การพัฒนาระบบการตรวจสอบขึ้นทะเบียน มีการวางขั้นตอนการดำเนินงานที่เหมาะสมทั้งระบบดังภาพที่ 1 ประกอบด้วย

2.2.1 การสมัครขอเข้าร่วมโปรแกรม หน่วยงานที่มีสิทธิยื่นคำขอเป็นหน่วยทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนาทั้งในประเทศและต่างประเทศ ที่มีจัดตั้งและดำเนินการตามกฎหมายและข้อบังคับของประเทศนั้น ๆ และดำเนินการทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนาเสร็จสิ้นแล้วอย่างน้อย 1 โครงการ ทำได้ 3 ทาง คือ 1) การยื่นขอโดยความสมัครใจจากหน่วยทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนา หรือ 2) หน่วยงานที่มีอำนาจหน้าที่ตามกฎหมายขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ร้องขอให้ดำเนินการตรวจ หรือ 3) หน่วยตรวจสอบต่างประเทศร้องขอให้ดำเนินการตรวจเป็นกรณีพิเศษ โดยหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนาดังกล่าวต้องยื่นคำขอตรวจสอบ และเอกสารประกอบคำขอตามแบบ Application form no 5: Application for GLP compliance test facility และ Application form no 6: Specification information for GLP Compliance test facility และ Application form no 7: Self evaluation complying with OECD GLP และมอบอำนาจให้มีผู้แทน 1 คน ในระดับอาวุโส จากสายงานบริหารหรือวิชาการ ในการติดต่อกับหน่วยตรวจสอบ และรับการตรวจสอบในวันที่มีการเปิดการประชุมและการปิดการประชุม

2.2.2 การพิจารณารับคำขอ จะดำเนินการได้ต่อเมื่อหน่วยงานดังกล่าวมีรายละเอียดระบบคุณภาพ และการดำเนินงานครบถ้วนตามข้อกำหนดและเงื่อนไขของหน่วยตรวจสอบ หากไม่สามารถปฏิบัติได้ภายใน 180 วัน สามารถแจ้งยกเลิกคำขอได้

2.2.3 การทบทวนเอกสาร เป็นการตรวจสอบเอกสารทางวิชาการเบื้องต้น เช่น คู่มือคุณภาพ (Quality Manual หรือ Site Master File) มาตรฐานการปฏิบัติงาน (SOP) แบบฟอร์ม แผนการศึกษาวิจัย รายงานการศึกษาวิจัย โครงสร้างหน่วยงาน แผนผังหน่วยงาน บุคลากร เป็นต้น เพื่อพิจารณาความพร้อมของหน่วยงานที่ยื่นขอถึงความสอดคล้องกับหลักเกณฑ์ OECD GLP

2.2.4 การตรวจสอบเบื้องต้น (Pre Inspection) จะดำเนินการต่อเมื่อหน่วยงานแสดงความประสงค์ไว้เท่านั้น โดยใช้เวลาตรวจสอบเบื้องต้น 1 วัน ทั้งนี้จะดำเนินการแต่งตั้งคณะผู้ตรวจสอบ ประกอบด้วย หัวหน้าผู้ตรวจสอบ ผู้ตรวจสอบ และผู้เชี่ยวชาญทางวิชาการ (หากจำเป็น) โดยจะแจ้งรายชื่อคณะผู้ตรวจสอบ วันเวลา ขอบข่ายที่ถูกรวบรวม ให้หน่วยงานดังกล่าวทราบล่วงหน้า 14 วันก่อนวันที่ตรวจ

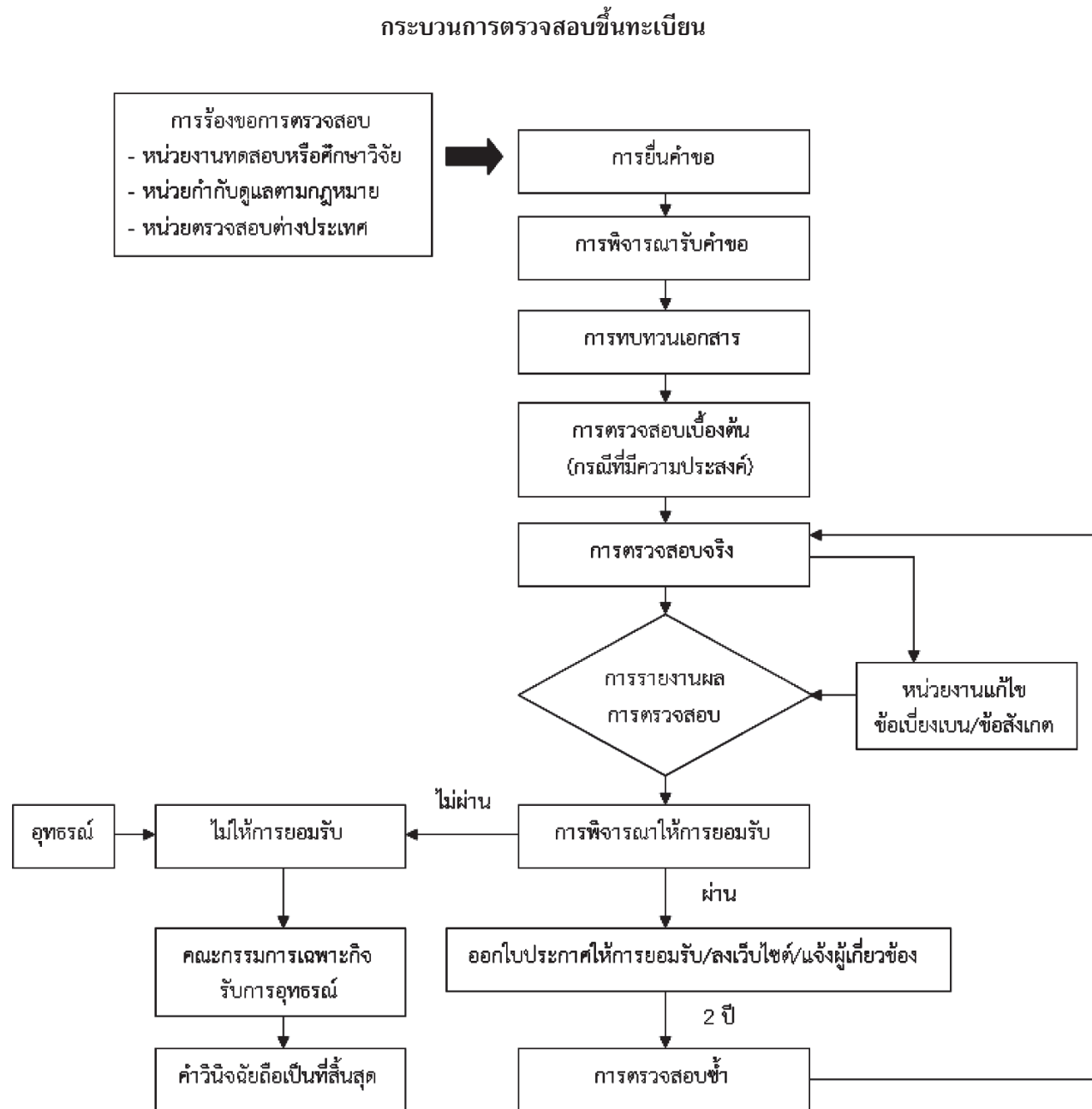
2.2.5 การตรวจสอบจริง (Onsite Inspection) ใช้เวลา 2-4 วัน ขึ้นกับขนาดของ test facility และความสลับซับซ้อนของโครงการวิจัย กรณีที่เป็นการขอตรวจสอบเพื่อขึ้นทะเบียน หน่วยตรวจสอบจะดำเนินการตรวจทั้ง test facility inspection และ study audit โดยผู้ตรวจสอบจะดำเนินการตรวจตามข้อกำหนดของ OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring Number 3: Guidance for GLP Monitoring Authorities, Revised Guidance for the Conduct of Laboratory Inspections and Study Audits⁽⁷⁾ ในการทวนสอบความสอดคล้องกับหลักเกณฑ์ OECD GLP และบันทึกสิ่งที่ตรวจพบ

2.2.6 การรายงานผลการตรวจ ผู้ตรวจสอบจะจัดทำรายงานการตรวจตามข้อกำหนดของ OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring Number 9: Guidance for GLP Monitoring Authorities, Guidance for the Preparation of GLP Inspection Reports⁽⁸⁾ ภายใน 15 วัน โดยระบุรายละเอียดว่าเป็นการตรวจ Test facility Inspection หรือ Study Audit และเขียนสิ่งที่ตรวจพบ ทั้งสอดคล้องและไม่สอดคล้องกับข้อกำหนด รวมถึงข้อเบี่ยงเบนและข้อสังเกตต่างๆ ที่อาจมีผลกระทบต่อระบบคุณภาพ และความถูกต้อง ความสมบูรณ์ของข้อมูล

2.2.7 การแก้ไขข้อเบี่ยงเบน และ/หรือ ข้อสังเกต กรณีขึ้นทะเบียนใหม่ หน่วยงานจะต้องดำเนินการแก้ไข เมื่อมีข้อเบี่ยงเบน และ/หรือ ข้อสังเกต ภายใน 90 วัน กรณีเป็นการตรวจต่ออายุ ภายใน 30 วัน ทั้งนี้หน่วยตรวจสอบอาจดำเนินการตรวจสอบซ้ำอีก ณ สถานที่ปฏิบัติการ เพื่อมั่นใจว่าหน่วยงานดังกล่าวได้ดำเนินการแก้ไขเป็นไปตามข้อกำหนดของ OECD GLP

2.2.8 การออกไปประกาศให้การยอมรับ กรณีที่ไม่พบข้อเบี่ยงเบน หรือข้อเบี่ยงเบนที่ไม่ร้ายแรง และหน่วยงานได้แก้ไขเป็นที่ยอมรับแล้ว หน่วยตรวจสอบจะออกไปประกาศนียบัตรให้หน่วยงานดังกล่าว มีอายุ 2 ปี หากครบ 2 ปี และมีความประสงค์จะขอขึ้นทะเบียนใหม่ ต้องยื่นขอต่ออายุอย่างน้อย 120 วัน ก่อนไปประกาศหมดอายุ สำหรับกรณีที่พบข้อเบี่ยงเบนที่ร้ายแรงต่อความถูกต้องสมบูรณ์ของผลการศึกษาวิจัย หน่วยตรวจสอบต้องออกข้อความระบุถึงความไม่สอดคล้องกับหลักเกณฑ์ OECD GLP ในสรุปรายงานการตรวจ และเพิกถอนหน่วยงานดังกล่าว ออกจากการขึ้นทะเบียน

2.2.9 การอุทธรณ์กรณีไม่เห็นด้วยกับผลการตรวจ สามารถดำเนินการได้โดยยื่นอุทธรณ์ ต่อคณะกรรมการเฉพาะกิจรับการอุทธรณ์ภายใน 15 วัน หลังทราบผลการตรวจ คำวินิจฉัยจากคณะกรรมการดังกล่าวถือเป็นที่สุด (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 กระบวนการตรวจสอบขึ้นทะเบียนหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนาตามหลักเกณฑ์ OECD GLP

2.3 ด้านการพัฒนาศักยภาพบุคลากรของหน่วยตรวจสอบ

OECD ให้ความสำคัญเป็นอย่างมากกับบุคลากรที่จะมาทำหน้าที่เป็นผู้ตรวจสอบ ซึ่งหน่วยตรวจสอบของประเทศต้องกำหนดคุณสมบัติของผู้ตรวจสอบให้เป็นไปตามเกณฑ์ของ OECD โดยได้กำหนดให้มีความรอบรู้ในหลักการ OECD GLP เป็นอย่างดี นอกเหนือจากด้านวิชาการและมีประสบการณ์ในการทดสอบที่เกี่ยวข้องกับการไปตรวจ หรือในสาขาที่เกี่ยวข้องเฉพาะด้าน และมีประสบการณ์ในการตรวจประเมิน และได้ส่งบุคลากรไปอบรม OECD Training Course for GLP Inspector ที่ OECD จัดขึ้น รวมทั้งการไปสังเกตการณ์การตรวจหน่วยงานที่เป็น GLP test facility ของประเทศสมาชิก OECD จำนวน 3 คน และได้จัดการอบรมระดับชาติ ให้กับเจ้าหน้าที่ผู้ตรวจสอบ และผู้เชี่ยวชาญด้านวิชาการ จำนวน 23 คน เพื่อพัฒนาความรู้อย่างต่อเนื่อง โดยมีวิทยากรเป็นผู้ตรวจสอบ

จากประเทศสมาชิก OECD อาทิ ประเทศสหรัฐอเมริกา ประเทศเนเธอร์แลนด์ และประเทศมาเลเซีย รวมทั้งได้มีการจัดทำฐานข้อมูลผู้ตรวจสอบ ผู้เชี่ยวชาญทางวิชาการ ในการตรวจสอบหน่วยงานทดสอบและศึกษาวิจัย/พัฒนาอย่างเป็นระบบ

3. ดำเนินการพัฒนาศักยภาพหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัยของประเทศไทย

จากการวิเคราะห์ข้อมูลหน่วยงานในไทยที่เกี่ยวข้องกับ OECD ในปี 2551-2552 จำแนกผลิตภัณฑ์เภสัชกรรม ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ยาสำหรับสัตว์ สารปรุงแต่งอาหารสัตว์ พบว่า ในขอบข่ายผลิตภัณฑ์เภสัชกรรม⁽⁹⁻¹¹⁾ มีหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ประกอบด้วย สถานที่ผลิตยาแผนปัจจุบัน 167 แห่ง สถานที่นำหรือส่งยาแผนปัจจุบัน 647 แห่ง ผู้รับอนุญาตผลิตยาแผนปัจจุบันสำหรับสัตว์ 64 แห่ง ผู้รับอนุญาตนำส่งยาแผนปัจจุบันสำหรับสัตว์ 73 แห่ง ผู้ผลิตยาแผนโบราณ 1117 แห่ง และห้องปฏิบัติการชีวสมมูล 19 แห่ง ขอบข่ายผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง⁽¹²⁾ มีผู้ประกอบการกลุ่มควบคุมเครื่องสำอาง 1704 แห่ง ขอบข่ายสารปรุงแต่งอาหารสัตว์⁽¹³⁾ มีโรงงานผลิตอาหารสัตว์ที่มีสารผสมล่วงหน้า 131 แห่ง สำหรับห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุข ในประเทศไทย มีจำนวนมากกว่า 10,000 แห่งทั่วประเทศ ในจำนวนนี้ ยังไม่มีหน่วยงานหรือห้องปฏิบัติการใดได้รับการตรวจสอบขึ้นทะเบียนตามระบบคุณภาพของหลักปฏิบัติที่ดีของห้องปฏิบัติการของ OECD ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องพัฒนาหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนา ให้มีระบบการปฏิบัติการตามหลักปฏิบัติที่ดีของห้องปฏิบัติการ คือ OECD Principles on Good Laboratory Practice (OECD GLP) รวมถึงเอกสารคำแนะนำและความเห็นที่เกี่ยวข้อง (Associated consensus and advisory documents) ที่หน่วยงานจะต้องสามารถนำมาปรับใช้ได้อย่างเหมาะสม ครอบคลุมถึงข้อกำหนดที่สำคัญ 10 ข้อ⁽¹⁴⁾ ประกอบด้วย 1) ผู้บริหารองค์กร บุคลากร 2) ระบบประกันคุณภาพ 3) สถานที่ 4) เครื่องมือ อุปกรณ์ และรีเอเจนต์ที่ใช้ 5) ระบบคุณภาพที่จะทดสอบ เช่น ฟิสิกส์ เคมี และชีววิทยา 6) วัสดุทดสอบ และวัสดุอ้างอิง 7) มาตรฐานการปฏิบัติงานที่ใช้ในการวิจัยและทดลอง รวมถึงเครื่องมือและระบบคอมพิวเตอร์ 8) การดำเนินการศึกษาวิจัย 9) การรายงานผลการศึกษาวิจัย 10) การเก็บรักษาน้ำทิ้ง และวัสดุ อย่างเป็นระบบ และได้ออกข้อกำหนดและเงื่อนไขการตรวจสอบขึ้นทะเบียน (R) ให้กับหน่วยงานที่ต้องการเข้าโปรแกรมการตรวจสอบ ต้องถือปฏิบัติ

การที่ประเทศไทยได้ประกาศใช้ GLP เป็นกฎหมายสำหรับการศึกษาชีวสมมูล ทำให้ห้องปฏิบัติการศึกษาวิจัยชีวสมมูลจำนวนมากเกิดความกังวลว่าจะสามารถปฏิบัติตาม GLP ได้หรือไม่ แม้ว่าทางสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา จะให้ทางเลือกที่จะดำเนินการตาม ISO/IEC 17025 ได้ แต่แนวโน้มในอนาคตคงหลีกเลี่ยงไม่ได้ที่จะปฏิบัติตาม GLP เนื่องจากห้องปฏิบัติการชีวสมมูลต่างประเทศ เช่น ประเทศอินเดีย ประเทศแคนาดา ต้องดำเนินการตามหลักการ GLP ทั้งสิ้น ที่ผ่านมามีได้สร้างความตระหนักรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับระบบการยอมรับร่วมในข้อมูลการประเมินสารเคมีของ OECD เพื่อเตรียมความพร้อมการเป็นภาคีของ OECD อาทิ การจัดประชุม OECD GLP ระดับชาติ และส่งเสริมให้หน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนาทั้งภาครัฐและเอกชน เข้าใจข้อกำหนดของหลักการ OECD GLP ตั้งแต่ปี 2550 เพื่อที่จะพัฒนาหลักการ OECD GLP ในหน่วยศึกษาวิจัยของตนอย่างเต็มที่ตามศักยภาพที่มี โดยจัดให้มีการประชุม OECD GLP ระดับชาติขึ้น มาอย่างต่อเนื่อง ทั้งหมด 7 โครงการ ในการผลักดัน ส่งเสริม และสนับสนุนให้ประเทศไทยมีหน่วยศึกษาวิจัยสารเคมีที่มีระบบการจัดการเป็นไปตาม GLP ของ OECD ตามภาระผูกพันที่ประเทศไทยต้องดำเนินการ โดยได้เชิญผู้เชี่ยวชาญจากประเทศสมาชิก OECD เป็นวิทยากรในการประชุม ได้แก่ International Accreditation New Zealand (IANZ) ประเทศนิวซีแลนด์ Pharmaceutical and Medical Device Agency (PMDA) ประเทศญี่ปุ่น National Product Control Agency for Welfare and Health (STTV) ประเทศฟินแลนด์ United States Environmental Protection Agency (USEPA) ประเทศสหรัฐอเมริกา Department of Standards Malaysia ประเทศมาเลเซีย และ Japan Society of Quality Assurance (JSQA) ประเทศญี่ปุ่นรวมทั้งผู้เชี่ยวชาญจากประเทศเนเธอร์แลนด์ มีผู้เข้าร่วมสัมมนาทั้งภาครัฐ รัฐวิสาหกิจและเอกชน จากหน่วยงานที่ศึกษาทดสอบผลิตภัณฑ์วิจัย ยา สมุนไพร ชีววัตถุ อาหาร

เครื่องสำอาง อาหารสัตว์ สารเคมีในอุตสาหกรรม รวมทั้งหน่วยศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง สมาคมต่างๆ จากทุกผลิตภัณฑ์ ตลอดจนหน่วยรับรองของประเทศและหน่วยกำกับดูแลตามกฎหมาย ทั้งสิ้น 856 คน จาก 104 หน่วยงาน เพื่อให้การสนับสนุนผู้ประกอบการไทยในการเพิ่มขีดความสามารถในอุตสาหกรรมในประเทศ

4. ผลการตรวจสอบและติดตามประเมินผลหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนาทั้งในและต่างประเทศ

จากการเปิดโปรแกรมตรวจสอบขึ้นทะเบียนหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนาตามหลักการ OECD ในปี 2550 เป็นต้นมา ได้ดำเนินการตรวจสอบหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนาตามหลักการ OECD GLP ณ วันที่ 22 มิถุนายน 2558 ทั้งหมด 21 แห่ง เป็นหน่วยงานประเทศไทย 9 แห่ง หน่วยงานประเทศอินเดีย 10 แห่ง และหน่วยงานประเทศแคนาดา 2 แห่ง ซึ่งต้องตรวจ test facility inspection และตรวจ study audit พบดังนี้

- ผ่านการขึ้นทะเบียนตามหลักการ OECD GLP 16 แห่ง
(ตรวจทั้ง test facility inspection และ study audit)
- อยู่ในระหว่างดำเนินการปรับปรุงระบบ หลังจากไปตรวจสอบเบื้องต้น 2 แห่ง
- ผ่านการตรวจเฉพาะ study audit 3 แห่ง

อย่างไรก็ดีถึงแม้มีหน่วยงานถึง 16 แห่ง ได้รับการขึ้นทะเบียนเป็นหน่วยงานที่ดำเนินการตามหลักเกณฑ์ OECD ในขอบข่าย Bioanalytics ของผลิตภัณฑ์เภสัชกรรม และมีโครงการชีวสมมูลได้ถูกตรวจสอบไปแล้วกว่า 90 โครงการ ซึ่งส่งผลให้ผู้ประกอบการสามารถนำข้อมูลไปขึ้นทะเบียนตำรับยาตามข้อตกลง ASEAN Harmonization Product on Pharmaceutical Registration กับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และประชาชนสามารถเข้าถึงยาสามัญใหม่ (New Generic Drugs) อย่างเสมอภาคทั่วถึง และทันกาล ในราคาที่เหมาะสมกับความสามารถในการจ่ายทั้งของสังคมและประชาชน ตลอดจนฐานะเศรษฐกิจของประเทศได้ อย่างไรก็ตามจากการขึ้นทะเบียนดังกล่าวพบว่า เป็นหน่วยงานประเทศอินเดีย 9 แห่ง และเป็นหน่วยงานในประเทศไทยเพียง 7 แห่ง ในส่วนของหน่วยงานประเทศไทยใช้เวลานานในการปรับปรุงระบบ เพื่อแก้ไขข้อบกพร่องจากการตรวจสอบเบื้องต้น ก่อนเข้าสู่การตรวจจริง (onsite-inspection) ในการประเมินความสอดคล้องกับ GLP อย่างเต็มรูปแบบ บางหน่วยงานใช้เวลาถึง 16 เดือนเนื่องจากผู้ปฏิบัติยังไม่เข้าใจแนวคิด และความหมายของศัพท์ด้าน GLP ที่หน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนาส่วนใหญ่ต้องใช้เวลาในการทำความเข้าใจ และต้องใช้ความพยายามเป็นอย่างมาก เนื่องจากข้อกำหนดของ GLP เขียนอย่างกว้าง ๆ ซึ่งผู้รับการตรวจประเมิน จำเป็นต้องมีการศึกษาถึงเอกสารที่เป็นข้อแนะนำและเอกสารที่เกี่ยวข้อง (Associated consensus and advisory document)⁽¹⁵⁻²⁴⁾ อีกด้วย เพื่อที่จะสามารถวางแผน ทดสอบ กำกับ บันทึก รายงานผล รวมทั้งการจัดเก็บได้อย่างเป็นระบบ

วิจารณ์

การวางระบบการพัฒนาตรวจสอบขึ้นทะเบียนหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนาด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์และสาธารณสุข ซึ่งไม่ได้ทดลองในคนในด้านการเป็นหน่วยตรวจสอบของประเทศ (GLP Compliance Monitoring Authority) ตามเกณฑ์ของ OECD เป็นเรื่องเร่งด่วน ที่ต้องเร่งพัฒนา เพื่อให้มีภาพพจน์ดีของประเทศชาติ และสถานะเศรษฐกิจที่ต้องการส่งออกสินค้าไปต่างประเทศ ซึ่งต้องอาศัยผลการศึกษาวิจัยจากหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนา ที่ได้รับการตรวจสอบจากหน่วยตรวจสอบของประเทศว่ามีการดำเนินการตามหลักเกณฑ์ OECD GLP จึงจะมีความน่าเชื่อถือ และเป็นที่ยอมรับ สามารถนำไปขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ กับหน่วยงานที่มีอำนาจหน้าที่ตามกฎหมาย (Receiving Authority) ทั้งในประเทศและต่างประเทศ การดำเนินงานดังกล่าวจะต้องทำภายใต้ข้อจำกัดหลายประการ อีกทั้งเป็นศาสตร์ที่ประเทศไทยเรายังไม่คุ้นเคย และต้องมีการดำเนินการที่เป็นระบบ ในหลาย

กระทรวงที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ กระทรวงอุตสาหกรรม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กระทรวงสาธารณสุข รวมทั้งหน่วยรับรองของประเทศไทย ในการกำหนดขอบข่ายของประเทศ และต้องทำการศึกษาหากระบวนการตรวจสอบที่เหมาะสมของประเทศไทย สำหรับการให้การยอมรับและขึ้นทะเบียนหน่วยงานทดสอบและศึกษาวิจัย/พัฒนาที่เหมาะสมของประเทศ และมีมาตรฐานทัดเทียมกับหน่วยตรวจสอบที่เป็นสมาชิก OECD อีกทั้งกฎหมายของประเทศที่บังคับใช้ OECD GLP อย่างจริงจัง มีเพียงฉบับเดียว คือประกาศการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ทำให้ต้องอาศัยความพยายามเป็นอย่างมากในการที่จะนำหลักการ OECD GLP มาประยุกต์ใช้ในประเทศ

จากการวางระบบของหน่วยตรวจสอบดังกล่าว มีส่วนส่งเสริมสำคัญให้ประเทศไทยสมัครเข้าร่วมเป็นภาคีสมาชิกในการยอมรับร่วมข้อมูลการประเมินสารเคมีขององค์การเพื่อความร่วมมือและการพัฒนาทางเศรษฐกิจ ประเทศไทย เมื่อวันที่ 12 กรกฎาคม 2553 และ OECD ได้มาตรวจประเมิน (Mutual Joint Visit, MJV) ในขอบข่าย Bioanalytics ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ให้การขึ้นทะเบียนหน่วยศึกษาชีวสมมูล ตามหลักการ OECD GLP อย่างไรก็ตามกฎหมายรองรับการดำเนินงานของหน่วยตรวจสอบ ให้มีอำนาจหน้าที่ตามกฎหมายในการเข้าไปตรวจสอบหน่วยทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนา และข้อมูลการศึกษาวิจัยที่จะนำมาขึ้นทะเบียน ยังไม่มีความชัดเจน จำเป็นต้องมีการดำเนินการที่เป็นระบบต่อไป ระหว่างผู้บริหารทั้งในระดับกระทรวงที่เกี่ยวข้อง เป็นนโยบายระดับประเทศ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบขึ้นทะเบียนในขอบข่ายอื่นๆ นอกเหนือจาก Bioanalytics ได้แก่ การศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง (toxicity test) ยังไม่สามารถดำเนินการขยายขอบข่ายได้ เนื่องจากยังไม่มีหน่วยศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลองในประเทศสามารถพัฒนาระบบให้สอดคล้องตามหลักเกณฑ์ OECD ได้ แม้ว่าจะมีกฎหมายบังคับให้ข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษของวัตถุอันตรายทางการเกษตรต้องได้มาจากห้องปฏิบัติการที่มีระบบ OECD GLP อย่างไรก็ตามหน่วยตรวจสอบเอง ยังจำเป็นต้องพัฒนาศักยภาพอย่างต่อเนื่องและเตรียมความพร้อมสำหรับขอบข่ายอื่นๆ ครบถ้วนทุกสาขา (area of expertise) ที่จะขอการตรวจสอบขึ้นทะเบียนในอนาคต รวมทั้งรองรับตามข้อกำหนดการขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ทั้งในประเทศและต่างประเทศ สุดท้ายย่อมส่งผลในการยกระดับคุณภาพชีวิตคนไทยให้ทัดเทียมมาตรฐานสากล

นอกจากนี้ในส่วนของหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนา สามารถประมวลปัญหาและประสบการณ์ที่สำคัญได้ดังนี้ ปัญหาการใช้ระบบคุณภาพ OECD GLP เป็นการเปลี่ยนวิธีความคิดการทำงานจากเดิมอย่างสิ้นเชิงที่ต้องมีการวางแผนล่วงหน้า โดยต้องมีการจัดทำเป็นแผนการศึกษาวิจัย และถือเป็นความยุ่งยากจากเดิมที่ยังไม่มีระบบคุณภาพเลย ที่ต้องเริ่มต้นตั้งแต่การเขียน SOP ซึ่งทุกหน่วยงานมีการแก้ไขวิธีปฏิบัติและเอกสารการปฏิบัติงานและปรับระบบหลายครั้ง ให้เป็นไปตามข้อกำหนด OECD GLP เนื่องจากเมื่อนำไปใช้แล้วยังพบข้อบกพร่องอยู่ หรือบางหน่วยงานมีระบบคุณภาพอื่นๆ ได้แก่ ระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025 หรือระบบคุณภาพ ISO 15189 ผู้ปฏิบัติไม่สามารถแยกความแตกต่างของระบบคุณภาพที่หน่วยงานตัวเองที่ใช้อยู่เดิม กับระบบคุณภาพ OECD GLP ดังนี้

1. การจัดทำเอกสารขั้นตอนการปฏิบัติงานในระบบ GLP ที่ต้องมีรายละเอียดทุกขั้นตอนว่าใครทำอะไรที่ไหน อย่างไร ทุกกิจกรรมที่เกี่ยวข้อง เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นว่า แม้จะเปลี่ยนผู้ปฏิบัติแล้ว แต่วิธีการยังเหมือนเดิม นอกจากนี้การบันทึกเป็นสิ่งที่สำคัญในระบบ GLP ดังนั้นการออกแบบ worksheet หรือ form ให้เหมาะกับระบบงานของหน่วยงานตนเองเป็นเรื่องจำเป็นในการบันทึกข้อมูลให้ได้รายละเอียดมากที่สุด เพื่อแสดงให้เห็นว่าทุกขั้นตอนมีการปฏิบัติตามที่กำหนดโดยแผนการศึกษาวิจัย และวิธีการปฏิบัติงาน ที่สำคัญ คือผู้เขียนต้องเข้าใจระบบคุณภาพก่อน จึงจะสามารถเขียนมาตรฐานการปฏิบัติงานได้ด้วยตนเอง ในบางหน่วยงานที่เป็น GLP มี SOP มากถึง 500 กว่า SOP ซึ่ง SOP ทุกฉบับจะต้องได้รับการอนุมัติใช้โดยผู้บริหารสูงสุดขององค์กร

2. การขาดความมั่นใจในการปฏิบัติ ในเรื่องระบบคุณภาพ OECD GLP เนื่องจากยังไม่มีดำเนินการมาก่อนในประเทศไทย และไม่มีการเขียนตำราภาษาไทยเกี่ยวกับการนำระบบมาใช้ปฏิบัติ เพราะเป็นเรื่องที่ต้องทำความเข้าใจในวัตถุประสงค์ของข้อกำหนด GLP และทดลองปฏิบัติที่ละขั้นตอน และปรับปรุงจะได้สอดคล้องกับ

หลักการ OECD GLP ให้มากที่สุด ทำให้การดำเนินการในระยะแรกเป็นไปอย่างช้า การจัดหาวิทยากรต่างประเทศมาบรรยาย การไปดูการปฏิบัติงานของ GLP test facility และการมีที่ปรึกษาที่มาจากประเทศที่มีระบบ GLP จึงมีประโยชน์มากสำหรับผู้รับผิดชอบและผู้บริหารในการพัฒนาระบบ

3. การขาดแคลนบุคลากรที่จะมาทำหน้าที่เป็นเจ้าหน้าที่ประกันคุณภาพในการตรวจประเมินการประกันคุณภาพโครงการว่าปฏิบัติตาม GLP ซึ่งต้องเป็นบุคลากรหลักในระบบคุณภาพ GLP ซึ่งต้องมีคุณสมบัติเป็นที่ยอมรับ และจะต้องเป็นผู้เข้าใจงาน มีความรู้ในหลักการ OECD GLP เป็นอย่างดี นอกเหนือจากทางวิชาการ และมีประสบการณ์ในการทดสอบที่เกี่ยวข้องการไปตรวจ หรือในสาขาที่เกี่ยวข้องเฉพาะด้าน รวมทั้งเทคนิคในการตรวจสอบ และต้องไม่เกี่ยวข้องและไม่มีส่วนได้ส่วนเสียกับงานที่ประเมิน ทำหน้าที่รายงานผลการตรวจสอบในแต่ละโครงการ รวมถึงการตรวจ Test Facility และปัญหาที่เกิดจากการใช้ระบบต่อผู้บริหารองค์กร

4. ข้อกำหนดด้านระบบคอมพิวเตอร์ (computerized systems) ในการดำเนินการศึกษาวิจัยในการเก็บและประมวลผลข้อมูลศึกษาวิจัยความปลอดภัย มีรายละเอียดที่สำคัญที่ต้องดำเนินการ จำเป็นต้องให้สอดคล้องตาม OECD Number 10: GLP Consensus Document – The Application of the Principles of GLP to Computerized Systems (1995)⁽²⁰⁾ โดยเรื่องของ computerized systems จะรวมถึงเครื่องมือต่างๆ ที่เป็น automated instruments for direct/indirect capture of data (ได้แก่ digital temperature data logger), operational/control of automated instruments (ได้แก่ setting of data logger temperature limits using software), personal computer และระบบ Laboratory Information Management System (LIMS) โดยต้องมีระบบรักษาความปลอดภัย ได้แก่ Physical Security, Logical Security, Data Integrity และ Back-up และการทวนสอบตามเกณฑ์ที่ test facility กำหนดก่อนที่จะนำไปใช้งาน ซึ่งยังคงเป็นเรื่องใหม่ที่หน่วยงานทดสอบและศึกษาวิจัยต้องดำเนินการ

ข้อเสนอแนะเชิงนโยบาย

1) ปรับปรุงกฎหมายรองรับให้กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เป็นหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียน (CMA) ของประเทศที่มีอำนาจหน้าที่ตามกฎหมาย ตามพระราชบัญญัติ ยา อาหาร เครื่องสำอางและวัตถุอันตรายที่ใช้ในบ้านเรือนและสาธารณสุข

2) ผลักดันให้มีหน่วยงานรองรับการขึ้นทะเบียนหน่วยศึกษาวิจัยให้เป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานสากล (OECD) ครอบคลุมขอบข่ายอื่น ๆ ของ OECD ประกอบด้วย ขอบข่ายสารเคมีกำจัดศัตรูพืช และขอบข่ายสารเคมีในอุตสาหกรรมซึ่งไม่ได้อยู่ในความรับผิดชอบของกระทรวงสาธารณสุข

3) ส่งเสริมความร่วมมือหน่วยงานทุกภาคส่วน ประกอบด้วยหน่วยงานที่ศึกษาทดสอบผลิตภัณฑ์วิจัย ยา สมุนไพร ชีววัตถุ อาหาร เครื่องสำอาง อาหารสัตว์ สารเคมีในอุตสาหกรรม รวมทั้งหน่วยศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง ตลอดจนหน่วยกำกับดูแลตามกฎหมายขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ให้มีการดำเนินงานอย่างเป็นระบบ บรรลุตามเป้าหมายของการเป็นสมาชิกภาคสมทบแบบสมบูรณ์ของประเทศไทย (non – member countries adherence to OECD Council Acts related to MAD)

สรุป

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์โดยสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการได้วางแผนยุทธศาสตร์ในการเป็นหน่วยตรวจสอบ (GLP Compliance Monitoring Authority) ตามเกณฑ์ของ OECD ของประเทศไทย ในการขึ้นทะเบียนหน่วยศึกษาวิจัยให้มีการดำเนินการสอดคล้องกับหลักการ OECD GLP ที่ดูแลผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม และได้ดำเนินการพัฒนาระบบการตรวจสอบขึ้นทะเบียนหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนา

ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์และสาธารณสุข ซึ่งไม่ได้ทดลองในมนุษย์เป็นผลสำเร็จ และให้การตรวจสอบขั้นทะเบียนหน่วยงานทดสอบหรือศึกษาวิจัย/พัฒนาที่ดำเนินการสอดคล้องตาม OECD GLP ในขอบข่าย Bioanalytics ของผลิตภัณฑ์เภสัชกรรม ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ทั้งหมด 16 แห่ง เป็นหน่วยงานในประเทศไทย 7 แห่ง หน่วยงานที่ประเทศอินเดีย 9 แห่ง สำหรับในการพัฒนาในระยะ (phase) ต่อไปจะเป็นการพัฒนาต่อยอดไปสู่ขอบข่ายอื่นๆ ของ OECD อาทิ การทดสอบความเป็นพิษ (toxicity studies) เพื่อให้ดำเนินการเข้าร่วมภาคีของประเทศไทย เป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานระหว่างประเทศ และได้รับการยอมรับเป็นสมาชิกภาคสมทบแบบสมบูรณ์ระบบยอมรับร่วมกับองค์การเพื่อความร่วมมือและการพัฒนาทางเศรษฐกิจ (full non member country adherence to OECD Council Act to MAD) อันจะส่งผลให้ ผลงานศึกษาวิจัยการประเมินความปลอดภัยสารเคมีของประเทศไทย มีความน่าเชื่อถือ และเป็นที่ยอมรับร่วมกันในกลุ่มประเทศสมาชิก OECD ทั่วโลก โดยไม่ต้องทดลองซ้ำ

เอกสารอ้างอิง

1. Organization for Economic Cooperation and Development. Non-member adherents to the OECD system for mutual acceptance of chemical safety data [online]. 2015 [cited 2015 Aug 18]; [1 screen]. Available from: URL: [http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/non-member adherents to the oecd system for mutual acceptance of chemical safety data.htm](http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/non-member-adherents-to-the-oecd-system-for-mutual-acceptance-of-chemical-safety-data.htm)
2. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (พ.ศ. 2551) ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 125 ตอนพิเศษ 86 ง (ลงวันที่ 23 พฤษภาคม 2551).
3. พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (พ.ศ. 2551) ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 126 ตอนพิเศษ 9 ง (ลงวันที่ 20 มกราคม 2551).
4. พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 ประกาศกรมวิชาการเกษตร (พ.ศ. 2552) ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 126 ตอนพิเศษ 166 ง (ลงวันที่ 13 พฤศจิกายน 2552).
5. พระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 2 (พ.ศ. 2556) ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 130 ตอนพิเศษ 149 ง (ลงวันที่ 4 พฤศจิกายน 2556).
6. OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Number 2 (revised): Guidance for GLP monitoring authorities, revised guides for compliance monitoring procedures for good laboratory practice. Paris: OECD; 1995.
7. OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Number 3 (revised): Guidance for GLP monitoring authorities, revised guidance for the conduct of laboratory inspections and study audits. Paris: OECD; 1995.
8. OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Number 9: Guidance for GLP monitoring authorities, guidance for the preparation of GLP inspection reports. Paris: OECD; 1995.
9. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. รายนามสถานที่ผลิตยาแผนปัจจุบันทั่วประเทศ [ออนไลน์]. [สืบค้น 25 ก.พ. 2552]; [12 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: http://wwwapp1.fda.moph.go.th/drug/zone_search/manu.htm
10. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. รายนามสถานที่นำหรือสั่งยาแผนปัจจุบันเข้ามาในราชอาณาจักรทั่วประเทศ [ออนไลน์]. [สืบค้น 13 ก.พ. 2552]; [46 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: http://wwwapp1.fda.moph.go.th/drug/zone_search/ny12.htm
11. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. รายชื่อโครงการศึกษาชีวสมมูล ของสถาบัน/ห้องปฏิบัติการ ชีวสมมูลที่ได้รับอนุมัติ [ออนไลน์]. [สืบค้น 5 ก.พ. 2552]; [79 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: http://drug.fda.moph.go.th/zone_bioequivalence/be6.asp



12. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. รายนามผู้ประกอบการ กลุ่มควบคุมเครื่องสำอาง [ออนไลน์]. [สืบค้น 5 ก.พ. 2552]; [15 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://www2.fda.moph.go.th/cosmetic/company.asp?LcnsID=45186>
13. กองควบคุมอาหารและยาสัตว์ กรมปศุสัตว์. รายชื่อโรงงานผลิตอาหารสัตว์ [ออนไลน์]. [สืบค้น 5 ก.พ. 2552]; [26 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://afvc.dld.go.th/forum.php?mod=viewthread & tid=157&extra=page%3D1>
14. OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Number 1: OECD principles of good laboratory practice. Paris: OECD; 1998.
15. OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Number 4 (revised): GLP consensus document quality assurance and GLP. Paris: OECD; 1999.
16. OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Number 5 (revised): GLP consensus document compliance of laboratory suppliers with GLP principles. Paris: OECD; 1999.
17. OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Number 6 (revised): GLP consensus document the application of the GLP principles to field studies. Paris: OECD; 1999.
18. OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Number 7 (revised): GLP consensus document the application of the GLP principles to short-term studies. Paris: OECD; 1999.
19. OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Number 8 (revised): GLP consensus document the role and responsibilities of the study director in GLP studies. Paris: OECD; 1999.
20. OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Number 10: GLP consensus document the application of the principles of GLP to computerised systems. Paris: OECD; 1995.
21. OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Number 13: consensus document of the working group on good laboratory practice the application of the OECD principles of GLP to the organization and management of multi-site studies. Paris: OECD; 2002.
22. OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Number 14: advisory document of the working group on GLP the application of the principles of GLP to in-vitro studies. Paris: OECD; 2004.
23. OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Number 15: advisory document of the working group on good laboratory practice establishment and control of archives that operate in compliance with the principles of GLP. Paris: OECD; 2007.
24. OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Number 16: advisory document of the working group on good laboratory practice guidance on the GLP requirements for peer review of histopathology. Paris: OECD; 2014.

Establishment of Inspection System for Non-clinical Research in Medical Sciences

Sitaphaisith Ekachampaka and Chomchailai Sinthusarn

*Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road,
Nonthaburi, 11000 Thailand.*

ABSTRACT Nowadays Thailand has joined in the Mutual Acceptance of Data (MAD) system in the assessment of chemicals as provisional adherence to Organization for European Economic Co-operation and Development-OECD System. Facing its national challenges, Thailand has established the inspection system for non-clinical research and development test facility regarding all public health (health products) and medical studies according to OECD GLP. However, many factors effecting the system has been considered seriously such as Thai law, OECD requirements and possibility of the quality system developement of the facilities in Thailand. Therefore, the Thailand GLP Compliance Monitoring Programme was set up. It was found that 16 facilities, 7 in Thailand and 9 in India have met OECD GLP which made the registration of drug possible. However, this is still new for the country. The system should be further developed and the participation of government and private sectors should be promoted so that Thailand can become full non member country adherence to OECD Council Act on MAD.

Key words: Inspection system, Provisional adherence to OECD system, MAD, OECD GLP

ทางเลือกใหม่ในการตรวจวิเคราะห์ ยากลุ่ม Amphetamines ในปัสสาวะ

อรพิน ทนันทติ สุเมธ เทียงธรรม และรุ่งทิพย์ เจือดี

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ รายงานผลการตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะ ใช้เป็นหลักฐานสำคัญทางอรรถคดี ดังนั้นวิธีการตรวจวิเคราะห์จึงต้องเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง และมีต้นทุนต่อหน่วยต่ำ สำนักยาและวัตถุเสพติดได้พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว สำหรับตรวจคุณภาพและหาปริมาณยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดยเทคนิค แก๊สโครมาโทกราฟี ตัวตรวจวัดชนิด แมส (GC-MS) เตรียมตัวอย่างโดยเทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง (SPE) และเทคนิค โครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง ตัวตรวจวัดชนิดแมส (LC-MS) เตรียมตัวอย่างโดยเทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งแบบออนไลน์ (online SPE) จากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี พบว่าเทคนิค GC-MS ช่วงการใช้งาน amphetamine และ methamphetamine มีค่า 100-4,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ มากกว่า 0.99 เปอร์เซ็นต์ recovery เฉลี่ย ของ amphetamine และ methamphetamine มีค่า 75.40 และ 76.80 ตามลำดับ ค่าความแม่นยำระหว่างวัน มีค่า ในช่วง 0.34 -17.23 %RD ค่าความเที่ยงระหว่างวันมีค่าอยู่ในช่วง 3.84-12.57 % CV ค่าความไม่แน่นอนของการวัด ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มีค่า 2.00 ± 0.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 2.00 ± 0.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับเทคนิค LC-MS ช่วงการใช้งาน amphetamine และ methamphetamine มีค่า 300-2,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ มีค่ามากกว่า 0.99 ค่าความแม่นยำระหว่างวัน มีค่าในช่วง 2.22-16.11 %RD ค่าความเที่ยงมีค่าในช่วง 2.36-10.43 %CV ค่าความไม่แน่นอนของการวัด ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มีค่า 2.00 ± 0.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า 2.00 ± 0.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ต้นทุนต่อหน่วยเฉพาะค่าวัสดุ (material cost) ของการตรวจวิเคราะห์โดย GC-MS และ LC-MS มีค่า 628 บาท และ 438 บาท วิธีการตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines โดย GC-MS และ LC-MS เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มดังกล่าวได้ครอบคลุมตามกฎหมายกำหนด ดังนั้นหน่วยงานที่เกี่ยวข้องสามารถนำวิธีการตรวจวิเคราะห์ทั้งสองเทคนิคไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะ ตามความเหมาะสมและความพร้อมของแต่ละหน่วยงาน

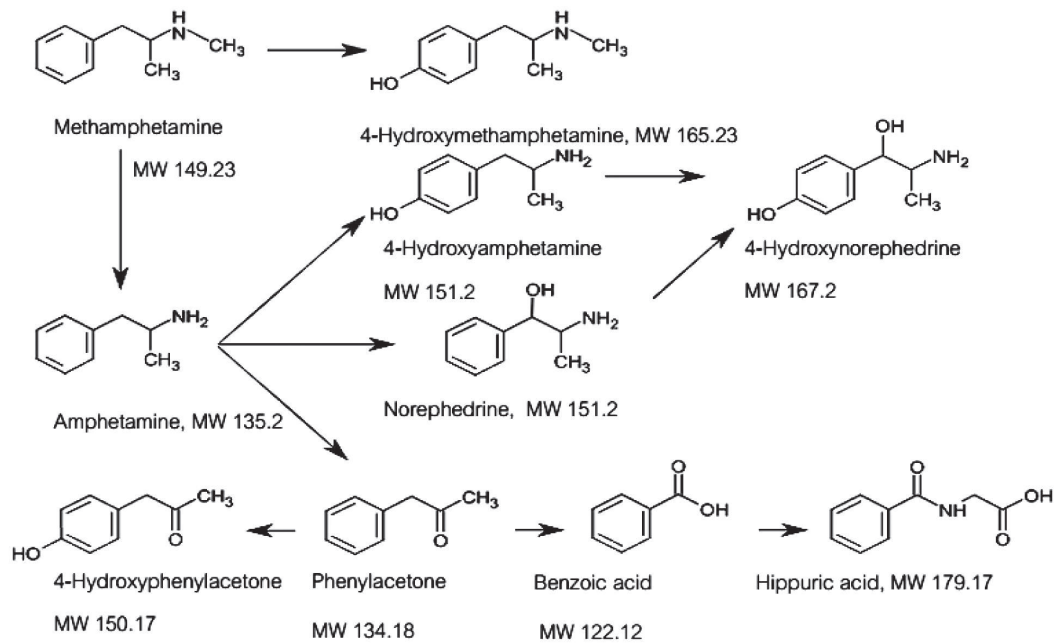
บทนำ

ปัจจุบันสถานการณ์ยาเสพติดเป็นปัญหาสำคัญของประเทศ และมีแนวโน้มที่จะขยายตัวมีความรุนแรงมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะในกลุ่มเด็กและเยาวชน ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีโอกาสเข้าไปใช้ยาเสพติดได้ง่าย ยุทธศาสตร์การป้องกันกลุ่มผู้มีโอกาสเข้าไปเกี่ยวข้องกับยาเสพติด พ.ศ. 2558 - 2562 จึงมุ่งเน้นการสร้างภูมิคุ้มกันและป้องกันยาเสพติด⁽¹⁾ จากสถิติผลการปราบปรามยาเสพติดในปี 2556 พบว่า ชนิดยาเสพติดที่สำคัญยังเป็นกลุ่มเดิมคือ ยาบ้า ยาไอซ์ และเฮโรอีน⁽²⁾ สอดคล้องกับผลการตรวจสารเสพติดในปัสสาวะของ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในตัวอย่างที่ตรวจพบสารเสพติด มากกว่าร้อยละ 90 คือ เมทแอมเฟตามีน (methamphetamine) ซึ่งเป็นสารสำคัญของยาบ้าและยาไอซ์

พระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 จัดให้ สารกลุ่มแอมเฟตามีน (amphetamines) เป็นยาเสพติดให้โทษประเภท 1⁽³⁾ พระราชบัญญัติป้องกันและปราบปรามยาเสพติด พ.ศ. 2519⁽⁴⁾ และประกาศคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด เรื่องกำหนดหลักเกณฑ์ วิธีการและเงื่อนไขการตรวจหรือทดสอบว่าบุคคลหรือกลุ่มบุคคลใดมีสารเสพติดอยู่ในร่างกายหรือไม่ กำหนดวิธีการตรวจมี 2 ขั้นตอน คือ การตรวจเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบเบื้องต้น เมื่อปรากฏว่าให้ผลบวก ให้ส่งตรวจยืนยันผล ณ สถานตรวจพิสูจน์ตามคำสั่งคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด เรื่องกำหนดสถานตรวจพิสูจน์ และให้ถือเกณฑ์ตัดสินผลการตรวจพิสูจน์ว่าเป็นผู้มีสารเสพติดอยู่ในร่างกาย เมื่อตรวจพบว่ามีสารดังกล่าวอยู่ในปัสสาวะตั้งแต่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป

Methamphetamine และ amphetamine เป็นสารกระตุ้นประสาทในกลุ่ม amphetamines ออกฤทธิ์ทำให้ร่างกายตื่นตัวอยู่ตลอดเวลา และลดความอยากอาหาร มีผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด คือเพิ่มความดันโลหิต และทำให้หัวใจเต้นไม่เป็นจังหวะ อาการผิดปกติที่เกิดจากการเสพ methamphetamine ผู้เสพจะมีอาการปวดมาก อารมณ์ดี ครั่นแค้นกว่าปกติ น้ำหนักตัวลด มีเหงื่อออกมากกว่าเดิม ได้ยินและเห็นภาพหลอน นอนไม่หลับ ใจสั่น คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย ตื่นเต้น กระวนกระวาย มีพฤติกรรมก้าวร้าวและทำลาย ควบคุมสติไม่ได้ ในกรณีที่เสพเกินขนาดอาจมีอาการหัวใจเต้นผิดปกติ ความดันโลหิตสูง สับสน ชัก หรือหมดสติได้ อาการติดยา (addiction) พบในผู้ที่เสพในปริมาณมาก เป็นระยะเวลานานๆ จะมีความผิดปกติทางสมอง เกิดอาการทางจิตประสาทหลอน หูแว่ว มีอาการหวาดระแวงจนต้องทำร้ายตัวเองหรือผู้อื่น อาการเหล่านี้จะหายไปได้ต้องใช้เวลหลายสัปดาห์ หรือหลายเดือน โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่เสพมาอย่างเรื้อรัง การเสพ methamphetamine จะทำให้เกิดอาการติ้อย่างได้ ผู้เสพจะต้องเพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ เพื่อให้เกิดผลที่พึงพอใจ อาการถอนยา (withdrawal symptoms) จะเกิดขึ้นเมื่อหยุดเสพในทันทีทันใด โดยจะมีอาการหงุดหงิด รู้สึกไม่สบาย ฝันร้าย ออยากอาหารมากขึ้น ซึม เบื่อ ชี้อ่อน ไม่มีเรี่ยวแรง จนอาจมีผลกระทบต่อนานที่การทำงานหรือไม่มีสมาธิในการเรียน อาการเหล่านี้จะมีมาน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับจำนวนครั้งและปริมาณที่เสพ การรักษา (treatment) โดยใช้ยาในกลุ่มต้านอาการซึมเศร้า (antidepressant) ได้แก่ imipramine, desipramine, amitriptyline, trazodone หรือ fluoxetine ซึ่งยาเหล่านี้จะเข้าจับกับสาร serotonin ในสมองเพื่อลดอาการซึมเศร้า และอาการอยากยา กลุ่มยาระงับประสาท (sedatives) ได้แก่ flurazepam, chloral hydrate, chlordiazepoxide, phenobarbital หรือ diazepam ถูกใช้รักษาอาการวิตกกังวล หรืออาการนอนไม่หลับ และกลุ่มรักษาอาการทางจิต (antipsychotic) ได้แก่ haloperidol, chlorpromazine ที่ช่วยปรับความสมดุลให้กับสาร dopamine เพื่อบรรเทาอาการทางจิต และรู้สึกพึงพอใจโดยให้การบำบัดรักษาทั้งทางร่างกาย และจิตใจควบคู่กันไปด้วย⁽⁵⁾

Methamphetamine เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะอยู่ในร่างกาย 1-4 วัน หรืออาจเป็นสัปดาห์ ขึ้นกับความถี่ของการเสพ เมื่อเสพโดยรับประทาน ถูกขับออกทางปัสสาวะในรูป methamphetamine ร้อยละ 30-54 และสาร metabolite ที่สำคัญคือ amphetamine ร้อยละ 10-23 หากเสพโดยการฉีดเข้าหลอดเลือดถูกขับออกทางปัสสาวะในรูป methamphetamine ร้อยละ 45 และ amphetamine ร้อยละ 7⁽⁶⁾ การเกิด metabolite ของ methamphetamine (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 metabolite ของ methamphetamine

กระบวนการตรวจสารเสพติดในร่างกาย ต้องตรวจทั้งสารตั้งต้นและสาร metabolite ดังนั้นวิธีการตรวจที่ดีและมีประสิทธิภาพ ต้องสามารถแยกสารดังกล่าว ซึ่งมีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกันมากออกจากกันได้ และต้องมีความไวสูงสามารถตรวจได้ในปริมาณต่ำ เนื่องจากผลการตรวจจากห้องปฏิบัติการนำไปใช้เป็นหลักฐานสำคัญในทางอรรถคดี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยสำนักยาและวัตถุเสพติด ได้ให้ความสำคัญในประเด็นดังกล่าว จึงได้พัฒนาวิธีการสำหรับตรวจคุณภาพและหาปริมาณยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS) และลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (LC-MS) รวมทั้งประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด ประเมินค่าต้นทุนต่อหน่วย เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากตัวอย่างจริง และตัวอย่างที่ทราบค่าสรุปข้อดีข้อด้อยของทั้งสองเทคนิค เพื่อเป็นข้อมูลทางเลือกให้ผู้เกี่ยวข้องได้เลือกใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในตัวอย่างปัสสาวะตามความเหมาะสมและความพร้อมของแต่ละหน่วยงาน

วัสดุและวิธีการ

1. การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS และ LC-MS

ทำการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines เพื่อให้ได้วิธีที่มีประสิทธิภาพสูง โดยปรับเปลี่ยนสภาวะการทดสอบในหัวข้อต่างๆ เช่น ชนิด column ชนิด SPE สภาวะการสกัดสาร ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ชนิดสารและสภาวะการ derivatize และสภาวะการทดสอบของเครื่องเป็นต้น

2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS และ LC-MS

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะ

ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ methamphetamine และ amphetamine โดยมี phentermine เป็น internal standard ตามแนวทางการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีสำหรับตัวอย่างชีววัตถุ^(7, 8, 9)

หัวข้อการตรวจสอบประกอบด้วย ความเฉพาะเจาะจง (selectivity) ความแม่นยำและความเที่ยง (accuracy and precision) carry over การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and range) matrix effect ความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง (stability of standard solution and sample solution)

สารมาตรฐานและสารเคมี (Standards and Reagents)

สารมาตรฐาน : methamphetamine HCl; DMSc reference standard; Control No. 04A54164; ความบริสุทธิ์ร้อยละ 100.08, amphetamine sulfate; DMSc reference standard; Control No. 01A55202; ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.78 และ phentermine HCl; DMSc reference standard; Control No. 01A53158; ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.90

สารเคมี : AR grade ประกอบด้วย methanol, phosphoric acid, ethyl acetate, ammonium hydroxide, pentafluoropropionic acid anhydride (PFPA), trifluoroacetic anhydride (TFAA) heptafluorobutyric acid (HFBA), ammonium formate, formic acid, certified drugs free urine, negative urine จาก 6 แหล่ง

HPLC grade ประกอบด้วย methanol, ethyl acetate, acetonitrile, purified water

Matrix blank (negative urine): ปัสสาวะจากผู้ที่มีสุขภาพดี ไม่รับประทานยาทุกชนิดเป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน และไม่เสฟสารเสพติด

เครื่องมือและอุปกรณ์ (Equipment and Supplies)

เครื่องชั่ง 6 ตำแหน่ง ผลิตภัณท์ของ Mettler-Toledo ประเทศสหรัฐอเมริกา รุ่น MT5, เครื่อง GC-MS ผลิตภัณท์ของ Bruker Daltonics Inc ประเทศสหรัฐอเมริกา รุ่น scion SQ และ GC 436 เครื่อง LC-MS ระบบ 2 dimension (SPE online) ผลิตภัณท์ของ Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา รุ่น ultimate 3000 และ MSO plus เครื่องเตรียมตัวอย่างอัตโนมัติ (automate SPE) ผลิตภัณท์ของ Aurora Biomed Inc. ประเทศแคนาดา รุ่น Versa 1100 SPE, vertex mixer, evaporator, heating box, micropipette และ micropipette tips ขนาด 50-200 ไมโครลิตร และ 1-5 มิลลิลิตร, positive pipette และ pipette tips ขนาด 10, 50, 100, 250, 1000 ไมโครลิตร, solid phase extraction (SPE) ชนิด OASIS HLB cartridge 3 มิลลิลิตรต่อ 60 มิลลิกรัม และ ชนิด strong cation-exchange cartridge 3 มิลลิลิตรต่อ 60 มิลลิกรัม column GC ชนิด HP-5 ms ขนาด 30 m × 0.25 mm ID DF=0.25, analytical column ชนิด Acclaim trinity P1 ขนาด 3 µm 3.0 × 100 mm และ Acclaim polar advantage II ขนาด 3 µm 3.0 × 100 mm, guard column ชนิด Acclaim trinity P1 ขนาด 3 µm 3.0 × 10 mm, SPE Online ชนิด Dionex Solex HRP ขนาด 2.1 × 20 mm และ Acclaim trinity P1 ขนาด 2.1 × 20 mm

2.1 การตรวจสอบความถูกต้องวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS

2.1.1 การเตรียมสารมาตรฐาน : เติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank 1 มิลลิลิตร เติม internal standard (phentermine) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ไมโครลิตร และ 1 มิลลิลิตร ของ 4% phosphoric acid สกัดโดย solid phase extraction และ derivatize ด้วย PFPA

2.1.2 การเตรียมตัวอย่าง : ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติม internal standard ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร จำนวน 10 ไมโครลิตร และ 1 มิลลิลิตร ของ 4% H_3PO_4 สกัดโดย solid phase extraction และ derivatize ด้วย PFPA

2.1.3 สภาวะของเครื่อง : Column: HP-5ms 30 M $\times$ 0.25 mm ID DF = 0.25 หรือเทียบเท่า, Flow rate: 1.0 ml/minute He, Injection: 1 μ l, split mode 1:10, MS mode: EI scan 50–300 amu, Oven temperature: 90 °C – 280 °C

2.1.4 การทดสอบความถูกต้องของวิธี (Method validation)

2.1.4.1 การทดสอบความเฉพาะเจาะจง (Selectivity)

วิเคราะห์ตัวอย่าง matrix blank จำนวน 6 แหล่ง และ ตัวอย่าง matrix blank ที่เติมสารมาตรฐาน methamphetamine และ amphetamine ที่ระดับ lower limit of quantitation (LLOQ: 100 นาโนกรัม ต่อ มิลลิลิตร) โดยพิจารณาค่า response ที่ตำแหน่ง retention time เดียวกันกับ methamphetamine และ amphetamine ต้องไม่มากกว่าร้อยละ 20 ของ response ที่ระดับ LLOQ และ ค่า response ที่ตำแหน่ง retention time เดียวกันกับ phentermine ต้องไม่มากกว่าร้อยละ 5 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร

2.1.4.2 Carry over

วิเคราะห์ matrix blank ก่อนและหลัง การฉีด upper limit of quantitation (ULOQ: 4,000 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร) โดยพิจารณาค่า response ที่ตำแหน่ง retention time เดียวกันกับ methamphetamine และ amphetamine ต้องไม่มากกว่าร้อยละ 20 ของ response ที่ระดับ LLOQ และ ค่า response ที่ตำแหน่ง retention time เดียวกันกับ phentermine ต้องไม่มากกว่าร้อยละ 5 ของ response ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร

2.1.4.3 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and range)

เติมสารมาตรฐาน methamphetamine และ amphetamine ใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้น 100, 300, 500, 1,000, 1,500, 3,000 และ 4,000 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร และ phentermine ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร วิเคราะห์การถดถอยแบบกำลังสองน้อยที่สุด (least squares regression analysis) ของ calibration curve ที่ plot ระหว่าง peak area ratio ของ สารที่วิเคราะห์ และ internal standard กับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ คำนวณค่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) สมการ linear regression และ back-calculated value ของแต่ละระดับความเข้มข้น โดยค่า r ต้องไม่น้อยกว่า 0.990 และ ค่า back-calculated value ของแต่ละระดับความเข้มข้น ต้องไม่เกินร้อยละ 15 ของค่าจริง ยกเว้นที่ระดับ LLOQ ไม่เกินร้อยละ 20 ของค่าจริง

2.1.4.4 การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง (Accuracy and precision) (intra-day และ inter-day)

ทดสอบความแม่นยำ และความเที่ยงในช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรง โดยเติมสารมาตรฐาน methamphetamine และ amphetamine ที่ระดับความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร (LLOQ) 250 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร (QCL) 2,500 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร (QCM) 4,000 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร (QCH) และ phentermine ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร ลงใน matrix blank วิเคราะห์ระดับละ 5 ซ้ำ ทำการทดสอบ 3 วัน พิจารณาค่าความแม่นยำโดยคำนวณค่า %relative deviation (%RD) ไม่เกินร้อยละ ± 15 ในทุกระดับความเข้มข้น ยกเว้น ที่ระดับ LLOQ ไม่เกินร้อยละ ± 20 ส่วนค่าความเที่ยง แสดงด้วยค่า % coefficient of variation (%CV) ไม่เกินร้อยละ 15 ในทุกระดับความเข้มข้น ยกเว้น ที่ระดับ LLOQ ไม่เกินร้อยละ 20

2.1.4.5 การคืนกลับ (Recovery)

เติมสารมาตรฐาน methamphetamine และ amphetamine ที่ระดับความเข้มข้น 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 2,500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 4,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ phentermine ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน matrix blank เปรียบเทียบ response ก่อนสกัด (response in standard) และหลังการสกัด (response in extract sample) ค่า % recovery ที่ได้อาจมีค่ามากกว่าร้อยละ 75

2.1.4.6 ความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง (Stability of standard solution and sample solution)

วิเคราะห์ตัวอย่าง QCL และ QCH จำนวน 3 ขั้ว ภายใต้สภาวะในการเก็บรักษาต่าง ๆ ได้แก่ short term stability, autosampler stability, long term stability และ dry extract stability

Short term stability: เตรียมตัวอย่าง QCL และ QCH และตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 ชั่วโมง สกัดตัวอย่างและวิเคราะห์ตัวอย่างตามขั้นตอน คำนวณค่าความเข้มข้นของ QCL และ QCH เทียบกับ calibration curve โดยค่า % RD และ % CV ของความเข้มข้นที่คำนวณได้ ต้องไม่เกินร้อยละ 15

Autosampler stability: เตรียมตัวอย่าง QCL และ QCH ทำการสกัดจนได้สารละลายพร้อมฉีด ตั้งทิ้งไว้ใน autosampler เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วิเคราะห์ตัวอย่างตามขั้นตอน คำนวณค่าความเข้มข้นของ QCL และ QCH เทียบกับ calibration curve โดยค่า % RD และ % CV ของความเข้มข้นที่คำนวณได้ ต้องไม่เกินร้อยละ 15

Long term stability: เตรียมตัวอย่าง ตัวอย่าง QCL และ QCH เก็บไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิระหว่าง 2-8 °C) เป็นเวลา 90 วัน สกัดตัวอย่างและวิเคราะห์ตัวอย่างตามขั้นตอน คำนวณค่าความเข้มข้นของ QCL และ QCH เทียบกับ calibration curve โดยค่า % RD และ % CV ของความเข้มข้นที่คำนวณได้ จะต้องไม่เกินร้อยละ 15

Dry extract stability: เตรียมตัวอย่าง QCL และ QCH ทำการสกัดและเก็บตัวอย่างในรูปแบบ dry extract ไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิ ระหว่าง 2-8 °C) เป็นระยะเวลา 1 วัน ทำการวิเคราะห์ตามขั้นตอน คำนวณค่าความเข้มข้นของ QCL และ QCH เทียบกับ calibration curve โดยค่า % RD และ % CV ของความเข้มข้นที่คำนวณได้ จะต้องไม่เกินร้อยละ 15

Stock solution stability: โดยการเปรียบเทียบค่า response ระหว่างสารละลายมาตรฐานที่เตรียมใหม่กับสารละลายมาตรฐานที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง 12 ชั่วโมง และสารละลายมาตรฐานที่เก็บไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิ ระหว่าง 2-8 °C) ระยะเวลา 3 เดือน แตกต่างจากสารละลายมาตรฐานที่เตรียมใหม่ไม่เกินร้อยละ 20

2.1.4.7 Dilution integrity

เติมสารมาตรฐาน methamphetamine และ amphetamine ใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้นที่ 10,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจาง ตัวอย่างดังกล่าวด้วย matrix blank ที่ระดับ 1:1, 1:9 และ 1:39 คำนวณค่าความเข้มข้นเทียบกับ calibration curve ค่า % RD และ % CV ของความเข้มข้นที่คำนวณได้ จะต้องไม่เกินร้อยละ 15

2.1.4.8 Matrix effect

เตรียม matrix blank, QCL และ QCH จากแต่ละ matrix blank จำนวน 6 แหล่ง และเตรียม spiked extracted sample คำนวณหาค่า Matrix factor (MF) และค่า Absolute matrix factor จะต้อง มีค่า % CV ไม่เกินร้อยละ 15

2.2 การตรวจสอบความถูกต้องวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย LC-MS

2.2.1 การเตรียมสารมาตรฐาน : เติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank 1 มิลลิลิตร เติม internal standard (phentermine) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ไมโครลิตร ปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วไม่ต่ำกว่า 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใส 200 ไมโครลิตร ใส่ใน insert vial

2.2.2 การเตรียมตัวอย่าง : ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติม internal standard ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ไมโครลิตร ปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วไม่ต่ำกว่า 4,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใส 200 ไมโครลิตร ใส่ใน insert vial

2.2.3 สภาวะของเครื่อง LC-MS: Analytical column: Acclaim Trinity P1 3 μ m 3.0 $\times$ 100 mm, Guard column: Acclaim Trinity P1 3 μ m 3.0 $\times$ 10 mm, SPE Online: Dionex Solex HRP Cartridge 2.1 $\times$ 20 mm, Column oven: 35 $^{\circ}$ C, Injection: 0.5 μ l, Flow rate: 0.40 ml/min for transferring and 0.50 ml/min. for loading, Mobile phase for transferring: water/acetonitrile/50 mM ammonium formate pH 4.0, gradient, Mobile phase for loading: 0.20% HFBA in water/acetonitrile (90/10), MS Mode: positive ESI SIM, Probe temperature ($^{\circ}$ C): 600.00, Cone: 45.00 volts ตั้งค่ามวลของสาร sim no. 1 ที่มวลต่อประจุ (m/z) 136.20 ± 0.3 สำหรับ amphetamine และ sim no. 2 ที่ มวลต่อประจุ (m/z) 150.20 ± 0.3 สำหรับ methamphetamine และ phentermine โดยตั้งโปรแกรมสำหรับ transferring programme (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 Transferring programme ของการตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines โดย LC-MS

time (min)	flow rate (ml/min)	transferring ratio (%)			activity
		water	acetonitrile	50 mM CH ₃ NO ₂ pH 4.0	
0.00	0.40	12	80	8	inject sample
1.00	0.40	12	80	8	valve switch 1_2
1.50	0.40	16	80	4	
1.80	0.40	16	80	4	
2.30	0.40	12	80	8	
3.50	0.40	12	80	8	valve switch 6_1
10.00	0.40	12	80	8	end

2.2.4 การทดสอบความถูกต้องของวิธี (Method validation)

2.2.4.1 การทดสอบความเฉพาะเจาะจง (Selectivity)

วิเคราะห์ตัวอย่าง matrix blank จำนวน 6 แหล่ง และตัวอย่าง matrix blank ที่เติมสารมาตรฐาน methamphetamine และ amphetamine ที่ระดับ lower limit of quantitation (LLOQ: 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ประเมินผลเช่นเดียวกับเทคนิค GC-MS

2.2.4.2 Carryover

วิเคราะห์ matrix blank ก่อนและหลัง การฉีด upper limit of quantitation (ULOQ: 2,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ประเมินผลเช่นเดียวกับเทคนิค GC-MS

2.2.4.3 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and range)

เติมสารมาตรฐาน methamphetamine และ amphetamine ใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้น 300, 700, 1,000, 1,300, 1,700 และ 2,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ phentermine ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ประเมินผลเช่นเดียวกับเทคนิค GC-MS

2.2.4.4 การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง (Accuracy and precision) (intra-day และ inter-day)

ทดสอบความแม่นยำ และความเที่ยงในช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรง โดยเติมสารมาตรฐาน methamphetamine และ amphetamine ที่ระดับความเข้มข้น 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (LLOQ) 800 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (QCL) 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (QCM) 1,500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (QCH) และ phentermine ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน matrix blank ประเมินผลเช่นเดียวกับเทคนิค GC-MS

2.2.4.5 ความคงสภาพ (Stability) และ Matrix effect

ดำเนินการ เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วย GC-MS โดยการศึกษาความคงสภาพดำเนินการในหัวข้อ autosampler stability ที่ 35 ชั่วโมง

3. การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด

คำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัดตามแนวทางของ EURACHEM⁽¹⁰⁾ แบบบนลงล่าง (top down approach) โดยคำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนทุกแหล่ง เช่น จากเครื่องมือ สารมาตรฐาน เครื่องแก้ว และ standard curve รวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด และคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($k=2$)

4. การเปรียบเทียบผลกับตัวอย่างจริง และตัวอย่างที่ทราบปริมาณ โดย GC-MS และ LC-MS

วิเคราะห์ตัวอย่างจริงที่สำนักงานและวัตถุเสพติดได้รับจากหน่วยงานราชการและเอกชน จำนวน 35 ตัวอย่าง และตัวอย่างทดสอบความชำนาญจาก United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) ที่ทราบค่าจำนวน 2 ตัวอย่าง คือ 2014/2 sample BS-1 และ 2013/2 sample BS-3 ตรวจวิเคราะห์ตามวิธีและสภาวะการทดสอบ วิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS เปรียบเทียบผลที่ได้จากการทดสอบตัวอย่างเดียวกันโดยวิธีการและสภาวะการทดสอบตามวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย LC-MS

5. การคำนวณต้นทุนต่อหน่วย

เป็นการศึกษาเชิงพรรณนาแบบย้อนหลัง (retrospective descriptive study) ในมุมมองผู้ให้บริการ (provider perspective) เก็บข้อมูลในปีงบประมาณ 2557 (1 ตุลาคม 2556 – 30 กันยายน 2557) ซึ่งเป็นข้อมูลจากฐานข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์และแบบฟอร์มเก็บข้อมูล และประมาณการเป้าหมายตัวอย่างในปี 2558 จำนวน 4,700 ตัวอย่าง ด้วยวิธีต้นทุนจุลภาค (micro-costing)⁽¹¹⁾

ต้นทุนที่วิเคราะห์ประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่

1. ต้นทุนค่าแรง (labor cost, LC) หมายถึงผลได้ในรูปตัวเงินทั้งหมดที่บุคลากรได้รับ เช่น เงินเดือน สวัสดิการ ค่ารักษาพยาบาล การใช้จ่ายในการอบรม ค่าปฏิบัติงานล่วงเวลา รวมถึงเงินเดือนลูกจ้างที่โรงพยาบาลจ่ายเอง
2. ต้นทุนค่าวัสดุ (material cost, MC) ประกอบด้วย ค่าวัสดุสำนักงาน ค่าใช้สอยทั่วไป วัสดุการแพทย์ ค่าสาธารณูปโภค (เช่น ค่าไฟฟ้า น้ำประปา โทรศัพท์)

3. ต้นทุนค่าลงทุน (capital cost, CC) ประกอบด้วยค่าเสื่อมราคาครุภัณฑ์ และค่าเสื่อมราคาสั่งก่อสร้าง คำนวณค่าเสื่อมราคาด้วยวิธีทางเศรษฐศาสตร์ (economic approach) ใช้อัตราดอกเบี้ยร้อยละ 3 อายุการใช้งานของ ครุภัณฑ์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันโดยยึดตามที่กำหนดไว้ในฐานข้อมูลครุภัณฑ์ของสำนักงานและวัตถุประสงค์

6. การเปรียบเทียบวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS และ LC-MS

เปรียบเทียบข้อดีและข้อด้อยของวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS และ LC-MS ในแง่มุมต่างๆ เช่น ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ช่วงของการวิเคราะห์ ความยุ่งยากในการ เตรียมตัวอย่างค่าความไม่แน่นอนในการวัด และต้นทุนต่อหน่วยเป็นต้น

ผล

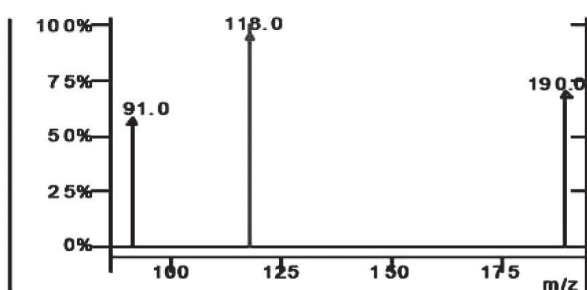
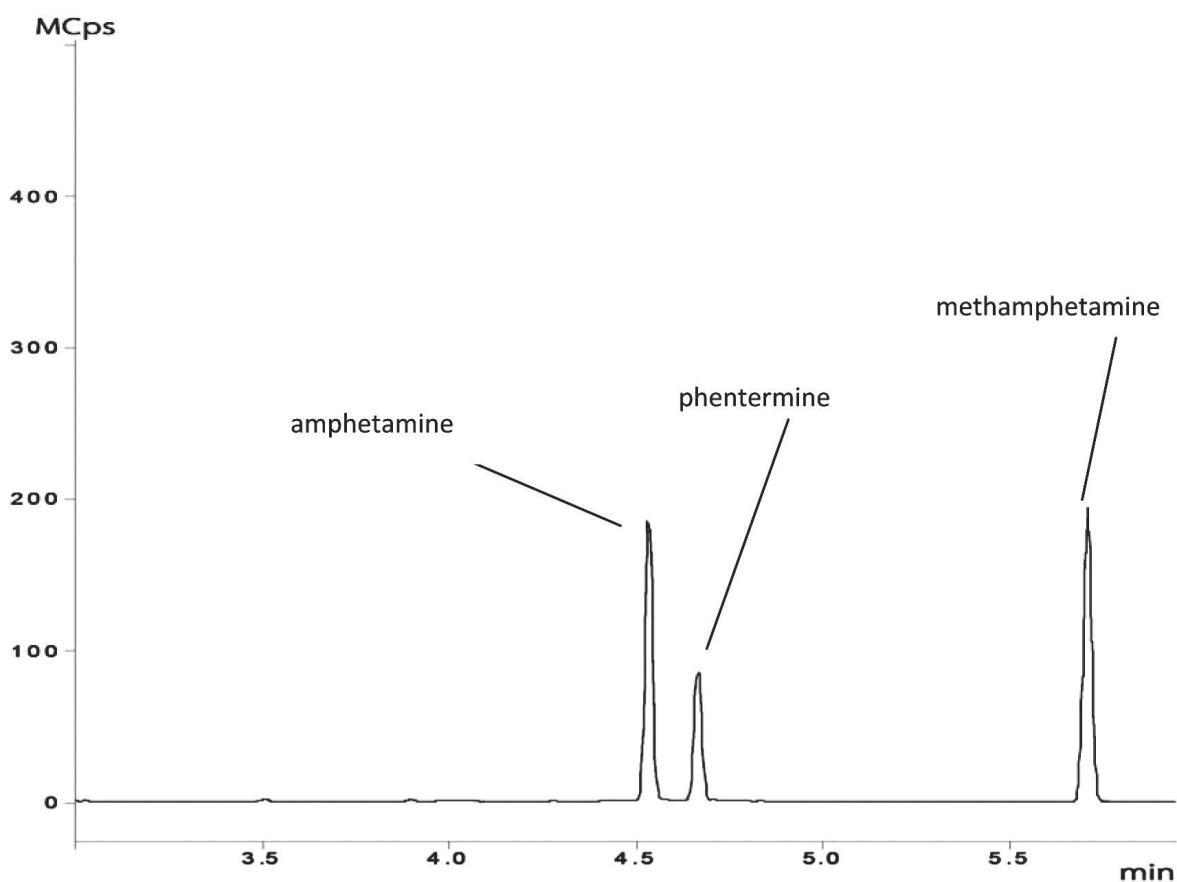
1. การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS และ LC-MS

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ตรวจยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS พบว่าสภาวะที่เหมาะสม ในการทดสอบ คือ ใช้ SPE ชนิด OASIS ขนาด 3 มิลลิกรัมต่อ 60 มิลลิกรัม กระบวนการ wash มี 2 ขั้นตอน ปริมาณสารสำหรับ elute คือ 3 มิลลิกรัม สภาวะการ derivatize คือ PFPA จำนวน 50 ไมโครลิตร diluent จำนวน 150 ไมโครลิตร อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที หลังจากนั้น ระเหยแห้ง และละลายกลับ ด้วย ethyl acetate ปริมาณ 100 ไมโครลิตร

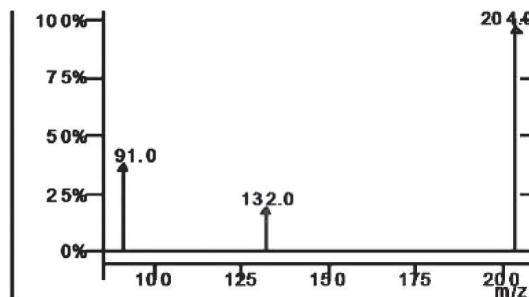
การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย LC-MS พบว่า สภาวะที่เหมาะสม ในการทดสอบ คือ ใช้ online SPE ชนิด Solex HRPcartridge ขนาด 2.1×20 มิลลิเมตร, guard column ชนิด acclaim trinity P1 อนุภาคขนาด 3 ไมโครเมตร 3.0×10 มิลลิเมตร และ analytical column ชนิด acclaim trinity P1 อนุภาคขนาด 3 ไมโครเมตร 3.0×100 มิลลิเมตร mobile phase สำหรับ elute คือ water ต่อ 50 mM ammonium formate pH 4.0 ด้วยระบบ gradient และ mobile phase สำหรับ loading คือ 0.02% HFBA ใน water ต่อ acetonitrile อัตราส่วน 90 ต่อ 10

2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS และ LC-MS

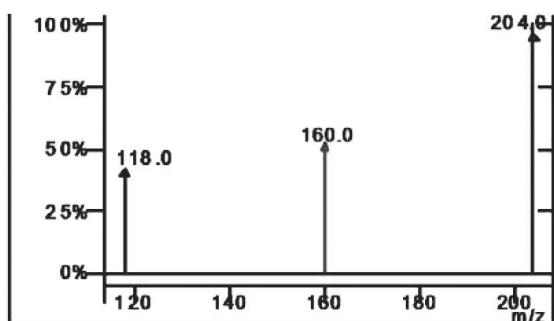
การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS ผลการตรวจสอบความเฉพาะเจาะจง พบว่า ไม่มีสารรบกวนจาก matrix blank ทั้ง 6 แหล่ง retention time (RT) ของ amphetamine phentermine และ methamphetamine ที่เวลา 4.54 4.67 และ 5.72 ตามลำดับ การแตก mass ครั้งที่ 1 ของ amphetamine มีค่า mass/charge (m/z) 190, 118 และ 91 phentermine มีค่า m/z 204, 132 และ 91 methamphetamine มีค่า m/z 204, 160 และ 118 (ภาพที่ 2) ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงของการวิเคราะห์ มีค่า 100-4,000 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของ methamphetamine และ amphetamine มีค่า 0.9972 และ 0.9961 accuracy และ precision ภายในวันเดียวกันและต่างวันมี ค่าเบี่ยงเบนน้อยกว่าร้อยละ 15 ทุกความเข้มข้น recovery มากกว่าร้อยละ 75 และ autosampler stability นาน 18 ชั่วโมง (ตารางที่ 2)



amphetamine 190.0, 118.0, 91.0



phentermine 204.0, 132.0, 91.0



ภาพที่ 2 chromatogram และ m/z ของ amphetamine, phentermine และ methamphetamine ของวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamine ในปัสสาวะ โดย GC-MS

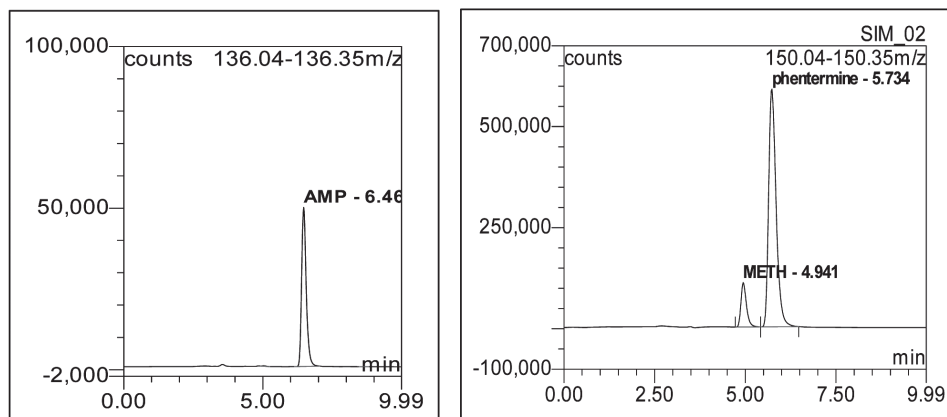
ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS

รายการ	ผล	เกณฑ์ตัดสิน
ความเฉพาะเจาะจง Selectivity	ไม่มี peak รบกวน จาก matrix blank ทั้ง 6 แหล่ง ที่ตำแหน่ง RT ของสารที่วิเคราะห์และ internal standard	- ค่า response ที่ตำแหน่ง RT เดียวกัน กับ amphetamine และ methamphetamine ไม่มากกว่า 20% ของ area ที่ระดับ LLOQ - ค่า response ที่ตำแหน่ง RT เดียวกัน กับ phentermine ไม่มากกว่าร้อยละ 5 ของ area ของ phentermine ที่ระดับความเข้มข้น 1000 นาโนกรัม ต่อ มิลลิกรัม
Carry over	ไม่มี peak รบกวนใน matrix blank หลังจาก การฉีด ULOQ	- ค่า response ที่ตำแหน่ง RT เดียวกัน กับ amphetamine และ methamphetamine ไม่มากกว่า 20% ของ area ที่ระดับ LLOQ - ค่า response ที่ตำแหน่ง RT เดียวกัน กับ phentermine ไม่มากกว่า 5% ของ area ของ phentermine ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม
ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and range)	ช่วงของการวิเคราะห์ : 100-4,000 นาโนกรัม ต่อ มิลลิกรัม Correlation coefficient (r): Amphetamine: 0.9961 Methamphetamine: 0.9972 back-calculated value (%RD): Amphetamine: -4.96 ถึง 14.51 Methamphetamine: - 5.76 ถึง 3.36	- Correlation coefficient (r) ≥ 0.990 - ค่า back-calculated value (%RD) ของแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่เกิน 15% ของค่าจริง ยกเว้นที่ระดับ LLOQ ไม่เกิน 20% ของค่าจริง
ความแม่นยำ Accuracy (%RD)	Intra-day (Amp/Meth) Inter-day (Amp/Meth)	ค่า %RD ของแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มากกว่า 15% ยกเว้นที่ระดับ LLOQ ไม่มากกว่า 20%
LLOQ (100.0 ng/mL)	13.55/8.53	17.23/-6.82
QCL (250.0 ng/mL)	-1.27/4.04	3.52/-6.16
QCM (2,500.0 ng/mL)	-11.18/2.39	-0.34/-1.57
QCH (4,000.0 ng/mL)	10.30/8.54	9.08/2.77
ความเที่ยง Precision (%CV)	Intra-day (Amp/Meth) Inter-day (Amp/Meth)	ค่า %CV เฉลี่ยของแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่เกิน 15% ยกเว้นที่ระดับ LLOQ ไม่มากกว่า 20%
LLOQ (100.0 ng/mL)	2.48/0.87	3.84/12.57
QCL (250.0 ng/mL)	9.11/3.92	9.52/8.79
QCM (2,500.0 ng/mL)	2.45/1.54	10.04/6.79
QCH (4,000.0 ng/mL)	5.25/6.30	5.23/6.32

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS (ต่อ)

รายการ	ผล	เกณฑ์ตัดสิน
การกลับคืน Recovery(%)	Amphetamine: 75.40% Methamphetamine: 76.89% Phentermine: 91.88%	ค่า %recovery ที่ต้องมีค่ามากกว่า 75%
Short term stability (8h)	Amphetamine: %RD: 1.01, %CV: 2.76 Methamphetamine: %RD: 4.68, %CV: 1.61	ค่า %RD และ %CV ของความเข้มข้น ที่คำนวณ ไม่เกิน 15%
Autosampler stability (18h)	Amphetamine: %RD: -7.36, %CV: 5.51 Methamphetamine: %RD: -11.2, %CV: 2.8	ค่า %RD และ %CV ของความเข้มข้น ที่คำนวณ ไม่เกิน 15%
Long term stability (90d)	Amphetamine: %RD: -6.79, %CV: 5.42 Methamphetamine: %RD: 10.55, %CV: 2.29	ค่า %RD และ %CV ของความเข้มข้น ที่คำนวณ ไม่เกิน 15%
Dry extract stability (24h)	Amphetamine: %RD: -8.19, %CV: 4.49 Methamphetamine: %RD: -10.41, %CV: 4.90	ค่า %RD และ %CV ของความเข้มข้น ที่คำนวณ ไม่เกิน 15%
Stock solution stability (90d)	Amphetamine: -14.69% Methamphetamine: -3.38%	เปรียบเทียบค่า response ระหว่าง RQC ที่เตรียมใหม่และที่ระยะเวลาต่างๆ มีความ แตกต่างกันไม่เกิน 20%
Dilution integrity	amphetamine: %RD: 6.50, %CV: 5.22 methamphetamine: %RD: -0.73, %CV 2.66	ค่า %RD และ %CV ของความเข้มข้น ที่คำนวณ ไม่เกิน 15%
Matrix effect	Amphetamine: 13.56% Methamphetamine: 12.51%	ค่า %CV ของ absolute matrix factor จาก 6 แหล่งของ blank matrix มีค่าไม่เกิน 15%

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย LC-MS ผลการตรวจสอบความเฉพาะเจาะจง พบว่า ไม่มีสารรบกวนจาก matrix blank ทั้ง 6 แหล่ง ตรวจวัด amphetamine ที่ RT 4.46 นาที m/z 136.04-136.35 methamphetamine ที่ RT 6.46 นาที m/z 150.04-150.35 และ phentermine ที่ RT 5.73 นาที m/z 150.04-150.35 (ภาพที่ 3) ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ มีค่า 300-2,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ของ methamphetamine และ amphetamine มีค่า 0.9928 และ 0.9971 accuracy และ precision ภายในวันเดียวกันและต่างวันมีค่าเบี่ยงเบนน้อยกว่าร้อยละ 15 ทุกความเข้มข้น และ autosampler stability นาน 35 ชั่วโมง (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 3 chromatogram และ m/z ของ amphetamine, methamphetamine และ phentermine และของวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamine ในปัสสาวะ โดย LC-MS

ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย LC-MS

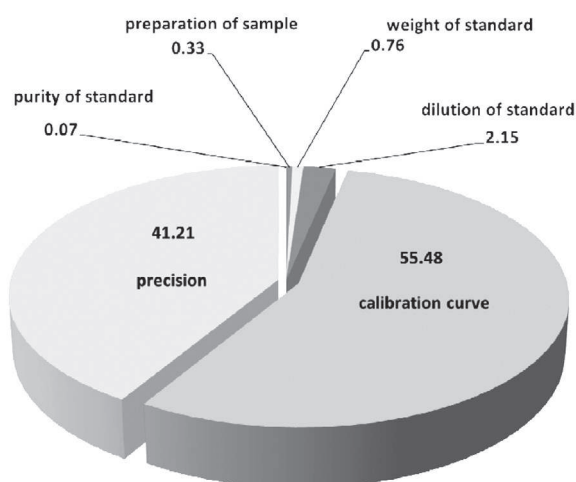
รายการ	ผล	เกณฑ์ตัดสิน
ความเฉพาะเจาะจง Selectivity	ไม่มี peak รบกวน จาก matrix blank ทั้ง 6 แหล่ง ที่ตำแหน่ง RT ของสารที่วิเคราะห์และ internal standard	- ค่า response ที่ตำแหน่ง RT เดียวกันกับ amphetamine และ methamphetamine ไม่มากกว่า 20% ของ area ที่ระดับ LLOQ - ค่า response ที่ตำแหน่ง RT เดียวกันกับ phentermine ไม่มากกว่าร้อยละ 5 ของ area ของ phentermine ที่ระดับความเข้มข้น 1000 นาโนกรัม ต่อ มิลลิกรัม
Carry over	ไม่มี peak รบกวนใน matrix blank หลังจากการฉีด ULOQ	- ค่า response ที่ตำแหน่ง RT เดียวกันกับ amphetamine และ methamphetamine ไม่มากกว่า 20% ของ area ที่ระดับ LLOQ - ค่า response ที่ตำแหน่ง RT เดียวกันกับ phentermine ไม่มากกว่า 5% ของ area ของ phentermine ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัม ต่อ มิลลิกรัม
ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and range)	ช่วงของการวิเคราะห์: 300–2,000 นาโนกรัม ต่อ มิลลิกรัม Correlation coefficient (r): Amphetamine: 0.9971 Methamphetamine: 0.9928 back-calculated value (%RD): Amphetamine: -3.92 ถึง 1.49 Methamphetamine: -10.35 ถึง 3.81	- Correlation coefficient (r) ≥ 0.990 - ค่า back-calculated value (%RD) ของแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่เกิน 15% ของค่าจริง ยกเว้นที่ระดับ LLOQ ไม่เกิน 20% ของค่าจริง
ความแม่นยำ Accuracy (%RD)	Intra-day (Amp/Meth) Inter-day (Amp/Meth)	ค่า %RD ของแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่มากกว่า 15% ยกเว้นที่ระดับ LLOQ ไม่มากกว่า 20%
LLOQ (300.0 ng/mL)	-12.90/-14.44	16.11/-9.26
QCL (800.0 ng/mL)	2.26/3.59	3.75/4.93

ตารางที่ 3 ผลการการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย LC-MS (ต่อ)

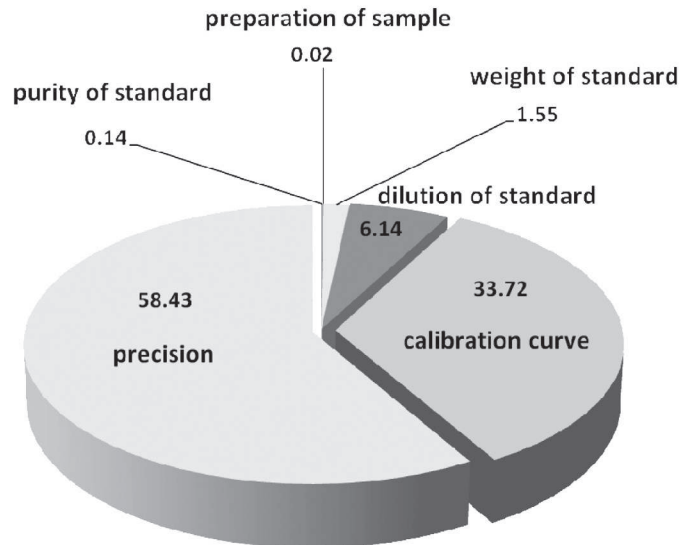
รายการ	ผล		เกณฑ์ตัดสิน
QCM (1,000.0 ng/mL)	9.01/7.43	-2.22/6.17	
QCH (1,500.0 ng/mL)	6.28/4.42	2.26/3.59	
ความเที่ยง Precision (%CV)	Intra-day (Amp/Meth)	Inter-day (Amp/Meth)	ค่า %CV เฉลี่ยของแต่ละระดับความเข้มข้น ไม่เกิน 15% ยกเว้นที่ระดับ LLOQ ไม่มากกว่า 20%
LLOQ (300.0 ng/mL)	2.26/3.59	10.42/6.37	
QCL (800.0 ng/mL)	4.53/3.86	3.60/2.36	
QCM (1,000.0 ng/mL)	4.29/3.13	10.43/3.12	
QCH (1,500.0 ng/mL)	2.02/2.53	2.36/2.39	
Autosampler stability (35h)	Amphetamine: %RD: 4.14, %CV: 0.97 Methamphetamine: %RD: 4.44, %CV: 1.84		ค่า %RD และ %CV ของความเข้มข้นที่คำนวณ ไม่เกิน 15%
Matrix effect	Amphetamine: 1.89% Methamphetamine: 2.48%		ค่า %CV ของ absolute matrix factor จาก 6 แหล่งของ blank matrix มีค่า ไม่เกิน 15%

3. การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด โดยคำนวณค่าความไม่แน่นอนที่เกิดจากแต่ละแหล่ง คำนวณความไม่แน่นอนรวม (combined standard uncertainty) และคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty) ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ($k=2$) ค่าความไม่แน่นอนขยายในการวิเคราะห์โดย GC-MS ของการวิเคราะห์ methamphetamine มีค่า 2.00 ± 0.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร amphetamine มีค่า 2.00 ± 0.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความไม่แน่นอนขยายในการวิเคราะห์โดย LC-MS ของการวิเคราะห์ methamphetamine มีค่า 2.00 ± 0.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร amphetamine มีค่า 2.00 ± 0.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อดำเนินการคำนวณสัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ methamphetamine ในปัสสาวะโดย GC-MS (ภาพที่ 4) และสัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ methamphetamine ในปัสสาวะโดย LC-MS (ภาพที่ 5)



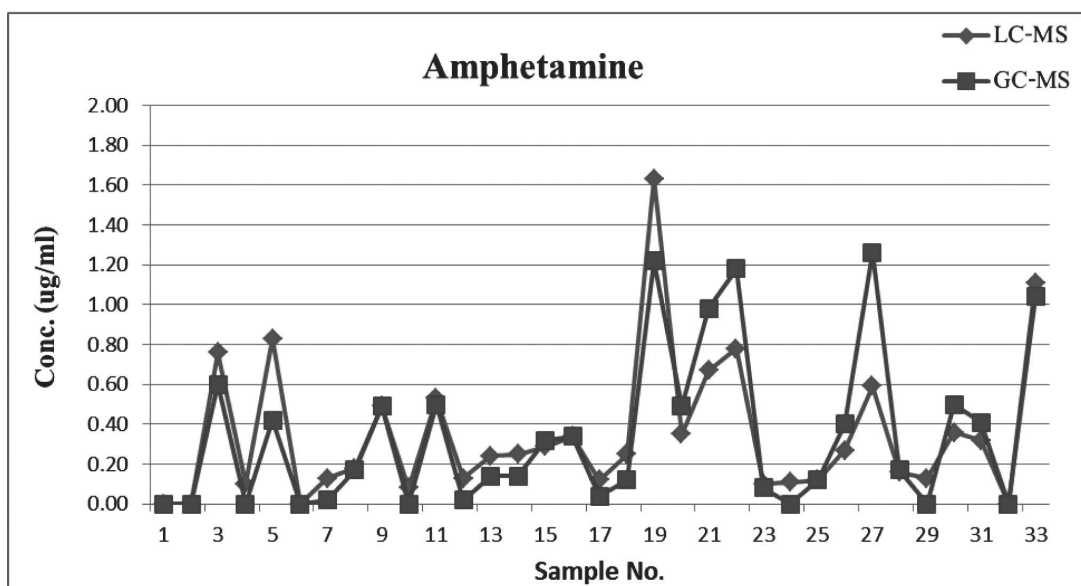
ภาพที่ 4 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ methamphetamine ในปัสสาวะโดย GC-MS



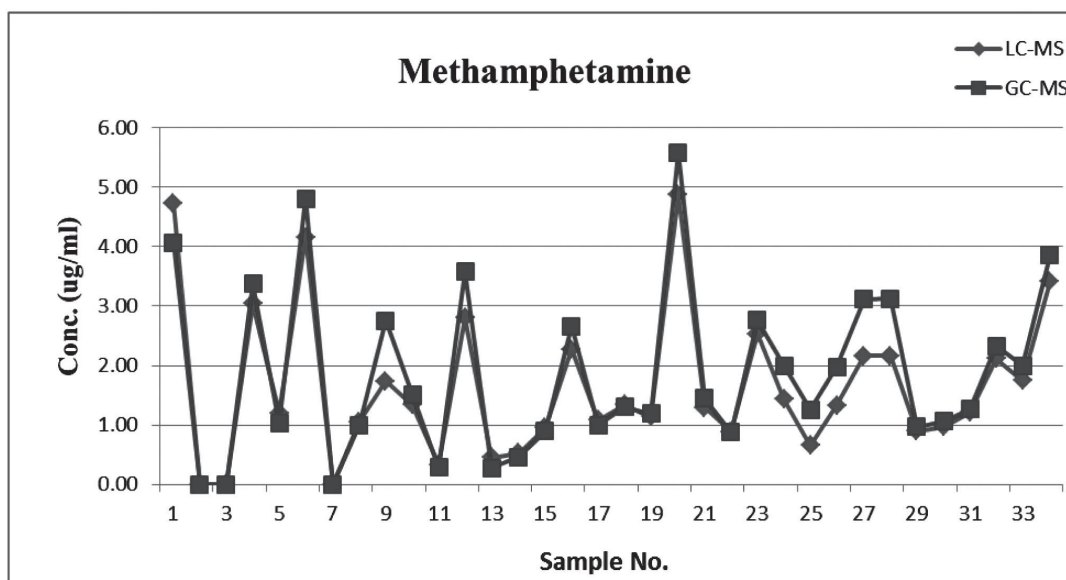
ภาพที่ 5 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ methamphetamine ในปัสสาวะ โดย LC-MS

4. การเปรียบเทียบผลกับตัวอย่างจริง และตัวอย่างที่ทราบปริมาณ โดย GC-MS และ LC-MS

การตรวจตัวอย่างจริงที่สำคัญยาและวัตถุเสพติดได้รับ จำนวน 35 ตัวอย่าง (ภาพที่ 6 และ 7) ผลการตรวจตัวอย่างที่ทราบค่าจาก UNODC ซึ่งเป็นค่ากำหนดจากผู้ดำเนินการแผนทดสอบความชำนาญ (assigned value) จำนวน 2 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 6 ผลการตรวจวิเคราะห์ amphetamine ในตัวอย่างปัสสาวะโดย GC-MS และ LC-MS



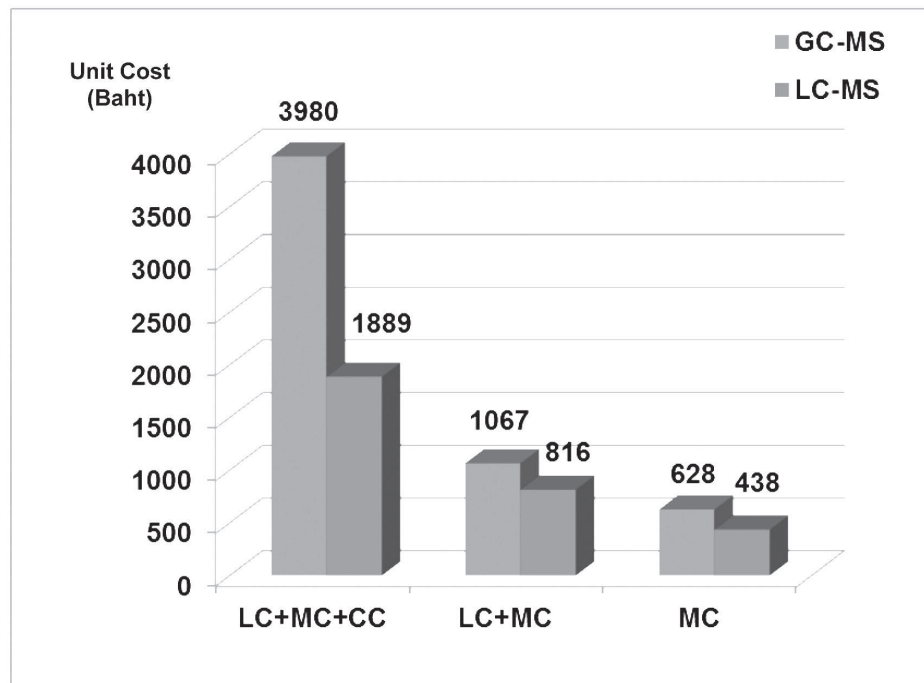
ภาพที่ 7 ผลการตรวจวิเคราะห์ methamphetamine ในตัวอย่างปัสสาวะโดย GC-MS และ LC-MS

ตารางที่ 4 ผลการตรวจตัวอย่างที่ทราบปริมาณ โดย GC-MS และ LC-MS

ตัวอย่าง	GC-MS (ug/ml)		LC-MS (ug/ml)		ค่าจาก UNODC (ug/ml)	
	A	M	A	M	A	M
1	-	2.00	-	1.75	-	1.73
2	1.04	3.85	1.11	3.41	1.15	3.45

5. การคำนวณต้นทุนต่อหน่วย

การคำนวณต้นทุนต่อหน่วยโดยใช้ข้อมูลพื้นฐานในปีงบประมาณ 2557 และประมาณ ตัวอย่าง 4,700 ตัวอย่าง ตามเป้าหมายในปี 2558 โดยคำนวณต้นทุนจาก 3 ส่วนคือ ค่าแรง ค่าวัสดุ และค่าลงทุน ทั้งทางตรงและทางอ้อม ด้วยวิธีการทางเศรษฐศาสตร์ (economic approach)⁽¹²⁾ ประมาณอายุการใช้งานของครุภัณฑ์กำหนด 10 ปี ผลการคำนวณ ต้นทุนต่อหน่วยของการวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS มีค่า 3,980 บาท การวิเคราะห์ ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย LC-MS มีค่า 1,889 บาท แต่หากคิดเฉพาะต้นทุนค่าวัสดุ ต้นทุนต่อหน่วย ของการวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS และการวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย LC-MS มีค่า 628 บาท และ 438 บาท ตามลำดับ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ต้นทุนต่อหน่วยของการตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะโดย GC-MS และ LC-MS

6. การเปรียบเทียบวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines โดย GC-MS และ LC-MS

การเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines โดย GC-MS และ LC-MS พบว่า ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทั้งสองเทคนิคผ่านเกณฑ์กำหนดทุกหัวข้อ ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างโดยเทคนิค GC-MS มีความยุ่งยากกว่าเทคนิค LC-MS ต้นทุนต่อหน่วยของเทคนิค LC-MS น้อยกว่า เทคนิค GC-MS รายละเอียด (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบวิธีตรวจวิเคราะห์ยากลุ่ม amphetamines โดย GC-MS และ LC-MS

รายการ	GC-MS	LC-MS
การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี	ผ่านเกณฑ์กำหนดทุกหัวข้อ	ผ่านเกณฑ์กำหนดทุกหัวข้อ
ช่วงของการวิเคราะห์	100–4,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	300–2,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง	ยุ่งยาก มีหลายขั้นตอน	ไม่ยุ่งยาก
ความเฉพาะเจาะจง	สูง	สูง
ผลการตรวจปริมาณตัวอย่างที่ทราบค่า (%difference)	น้อยกว่า ร้อยละ 13	น้อยกว่า ร้อยละ 3
ของเสียที่เกิดจากขั้นตอนการวิเคราะห์	มีปริมาณน้อย	มีปริมาณน้อย
ค่าความไม่แน่นอนของการวัด	Amphetamine: 2.00 ± 0.35 ug/ml Methamphetamine: 2.00 ± 0.39 ug/ml	Amphetamine: 2.00 ± 0.27 ug/ml Methamphetamine: 2.00 ± 0.24 ug/ml
ต้นทุนต่อหน่วย	LC+MC+CC = 3,980 บาท LC+MC = 1,067 บาท MC = 628 บาท	LC+MC+CC = 1,889 บาท LC+MC = 816 บาท MC = 438 บาท

วิจารณ์

ในการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม amphetamines โดย GC-MS การเลือก SPE ที่เหมาะสมโดยเปรียบเทียบ SPE ชนิด strong cation-exchange cartridge ซึ่งมีความจำเพาะต่อสารกลุ่ม amines กับ OASIS cartridge ผลการทดสอบ ให้ค่า %recovery และ sensitivity ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้ OASIS cartridge เนื่องจากการใช้งานง่ายและสะดวก และราคาต่อหน่วยที่ถูกกว่า สำหรับการปรับปรุงกระบวนการ wash และ elute เพื่อให้ได้ recovery และ repeatability ที่ดีขึ้น โดยในขั้นตอนการ wash ไม่ใช้ methanol เนื่องจากสารกลุ่ม amphetamines ละลายได้ดีใน methanol ส่วนขั้นตอนการ elute ด้วย methanol การเพิ่มปริมาณ จาก 2 มิลลิลิตร เป็น 3 มิลลิลิตร ส่งผลให้ค่า recovery และ repeatability ดีขึ้นในการเลือกสาร derivatize ที่เหมาะสม ได้เลือกใช้ สารกลุ่ม perfluoroacylated acylation ซึ่งทำปฏิกิริยาได้ดีกับสารในกลุ่ม amphetamines จำนวน 2 ชนิดคือ TFAA และ PFPA โดยพิจารณาค่า repeatability และ sensitivity พบว่า PFPA ให้ค่า repeatability และ sensitivity ดีกว่า TFAA ด้วยเหตุผลที่ PFPA มีโครงสร้างที่โตกว่า และมีความจำเพาะเจาะจงสูงกว่า สำหรับ ขั้นตอนการ derivatize ปริมาณ PEPA ที่ใช้มีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยา การเพิ่มปริมาณ diluent เป็น 150 ไมโครลิตร ช่วยให้การละลายของสารที่สนใจได้ทั่วถึง ส่งผลให้ค่า repeatability และ sensitivity ดีขึ้นและการเพิ่มขั้นตอนการทำให้แห้งหลังจาก derivatize ก่อนการละลายกลับด้วย 100 ไมโครลิตร ทำให้ค่า repeatability ดีขึ้น

การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม amphetamines โดย LC-MS ขั้นตอนสำคัญคือการเลือกใช้ online SPE, guard column, analytical column สภาวะการ elute และ loading ที่เหมาะสม ในการทดสอบได้ปรับเปลี่ยน ชนิดของ SPE, guard column และ analytical column จาก packing material ชนิด C-18 เป็น SPE ชนิด hydrophobic reverse phase, guard column และ analytical column ชนิด anion exchange ซึ่งให้ค่า repeatability ที่ดี สำหรับการเลือกชนิดและอัตราส่วนของสารที่ใช้ในการ elute และ loading มีความสำคัญเป็นอย่างมาก ต้องใช้ความละเอียดรอบคอบในการดำเนินการ จึงจะได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด

เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น เป็นเทคนิคที่มีความเฉพาะเจาะจงสูงทั้งสองเทคนิค ดังนั้นวิธีดังกล่าว สามารถตรวจได้ทั้งคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ คุณภาพวิเคราะห์ สำหรับเทคนิค LC-MS โดยการเปรียบเทียบค่า RT ของสารมาตรฐานและตัวอย่าง โดยค่า RT ต้องแตกต่างกันไม่น้อยกว่า 2⁽¹³⁾ และค่า m/z ซึ่งเป็น ค่าเฉพาะของสารแต่ละชนิด ส่วนเทคนิค GC-MS นอกจากจะเปรียบเทียบค่า RT ของสารมาตรฐานและตัวอย่างแล้ว สารจะแตกตัวครั้งที่ 1 ให้ค่า m/z และ m/z ratio ซึ่งเป็นค่าเฉพาะของสารแต่ละชนิด ช่วงของการทดสอบ โดย GC-MS คือ 300-4,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งกว้างกว่าช่วงการทดสอบของ LC-MS แต่อย่างไรก็ตาม สำหรับตัวอย่างที่มีค่ามากกว่าช่วงการทดสอบ สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยการ dilute ด้วย certified drugs free urine ในอัตราส่วน 1:1 1:9 และ 1:39 การทดสอบความคงสภาพในบางหัวข้อไม่จำเป็นต้องทดสอบทั้งสองเทคนิค เนื่องจากความคงสภาพของสารที่ไม่มีความเชื่อมโยงกับวิธีการทดสอบจะมีค่าเช่นเดียวกัน เช่น long term stability และ stock standard stability ส่วนระยะเวลาของการทดสอบ autosampler stability คำนึงถึง ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ของงานประจำ การเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์โดย LC-MS มีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยาก คือ นำตัวอย่างปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูง และนำเข้าเครื่อง LC-MS ที่มีระบบการสกัดสารแบบ online ในแต่ละครั้งของการตรวจวิเคราะห์จึงสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างในปริมาณมาก การทดสอบความคงสภาพในหัวข้อนี้จึงทดสอบเป็นเวลา 35 ชั่วโมง แตกต่างจากการวิเคราะห์โดย GC-MS ที่มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ค่อนข้างยุ่งยาก คือต้องสกัด SPE ระเหยแห้งและ derivatize ในแต่ละครั้งในการวิเคราะห์จึงไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างในปริมาณที่มากได้

ถึงแม้สำนักยาและวัตถุเสพติดจะใช้เครื่อง automate SPE ในการเตรียมตัวอย่าง แต่การเตรียมตัวอย่างยังคงต้องใช้เวลา จึงทำการศึกษา ความคงสภาพในหัวข้อนี้ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สำหรับการตรวจวิเคราะห์โดย LC-MS ซึ่งสกัดตัวอย่างแบบ online อาจมีข้อสงสัยในเรื่องการปนเปื้อนของตัวอย่าง การทดสอบหัวข้อ carry over สามารถตอบคำถามในประเด็นนี้ได้

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดการตรวจวิเคราะห์โดย LC-MS มีค่าน้อยกว่า GC-MS ในการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดคำนึงถึงแหล่งข้อมูลของความไม่แน่นอนในแต่ละวิธี ในการวิเคราะห์โดย GC-MS แหล่งความไม่แน่นอนมากที่สุดคือ จากค่า calibration curve มีอัตราส่วนถึง 55.48 รองลงมาคือ จากค่า precision ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากเปอร์เซ็นต์ของการเบี่ยงเบนที่มีค่ามากที่สุด ของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า 42.21 ค่าความไม่แน่นอนที่น้อยที่สุดคือ purity of standard มีค่า 0.07 แตกต่างจากการวิเคราะห์โดย LC-MS อัตราส่วนความไม่แน่นอนจาก precision มีค่ามากที่สุดคือ 58.43 รองลงมาคือจาก calibration curve 33.72 ค่าความไม่แน่นอนของ preparation of sampler มีค่าน้อยที่สุดคือ 0.02 เนื่องจากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ไม่ซับซ้อน การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดประมาณที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เนื่องจากปริมาณที่ตรวจพบมีผลกระทบค่าความไม่แน่นอนของการวัด ดังนั้นเพื่อให้สามารถเปรียบเทียบค่าความไม่แน่นอนของการวัดได้ จึงประมาณค่าที่ ตรวจพบที่ 2.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าความไม่แน่นอนจากเทคนิค GC-MS มีค่าสูงกว่า LC-MS เล็กน้อย ค่าความไม่แน่นอนของการวัด methamphetamine โดย GC-MS มีค่าร้อยละ 19.5 ของค่าที่ตรวจวัด และ LC-MS มีค่าร้อยละ 13.5 ของค่าที่ตรวจวัด ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเกณฑ์ยอมรับในหัวข้อทดสอบ precision เนื่องจากในการตรวจวิเคราะห์สามารถตรวจวิเคราะห์ทั้ง amphetamine และ methamphetamine ด้วยขั้นตอนเดียวกัน ดังนั้นปัจจัยที่มีผลกระทบต่อความไม่แน่นอนของการวัดของ amphetamine จึงเป็นไปในแนวทางเดียวกับ methamphetamine

การคำนวณต้นทุนต่อหน่วยในการศึกษาครั้งนี้วัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบต้นทุนต่อหน่วยของการตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines โดย GC-MS และ LC-MS ดังนั้นจึงอาจไม่สะท้อนต้นทุนที่แท้จริงทั้งหมดของสำนักยาและวัตถุเสพติด แต่อย่างไรก็ตามในการคำนวณครั้งนี้ได้คิดทั้งค่าต้นทุนทางตรงและทางอ้อม ค่ารวมอายุการใช้งานของครุภัณฑ์เป็นเวลา 10 ปี และอายุการใช้งานของสิ่งก่อสร้างเป็นเวลา 25 ปี เมื่อคำนวณต้นทุนต่อหน่วยทั้ง 3 แหล่ง คือ ค่าแรง ค่าวัสดุวิทยาศาสตร์ และค่าลงทุน การตรวจวิเคราะห์โดย LC-MS มีค่าร้อยละ 48 ของการตรวจวิเคราะห์โดย GC-MS เมื่อคำนวณต้นทุนจาก 2 แหล่ง คือ ค่าแรงและค่าลงทุน การตรวจวิเคราะห์โดย LC-MS มีค่าร้อยละ 77 ของการตรวจวิเคราะห์โดย GC-MS และมีการตรวจวิเคราะห์โดย LC-MS มีค่าร้อยละ 70 ของการตรวจวิเคราะห์โดย GC-MS เมื่อคำนวณเฉพาะค่าวัสดุอย่างเดียว จะเห็นว่าค่าต้นทุนต่อหน่วยของการตรวจวิเคราะห์โดย GC-MS มีค่าสูงกว่า LC-MS เนื่องจากในการตรวจวิเคราะห์โดย GC-MS มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างหลายขั้นตอน และต้องใช้ SPE ซึ่งมีราคาค่อนข้างสูงในการ clean up ตัวอย่าง ในการเปรียบเทียบต้นทุนต่อหน่วยของการตรวจวิเคราะห์จึงอาจพิจารณาเฉพาะค่าวัสดุ เนื่องจากค่าใช้จ่ายอื่นๆ ค่ารวมในพื้นฐานต้นทุนเดียวกัน

เมื่อเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์โดย GC-MS และ LC-MS ทั้งสองวิธีสามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างจริงจากผู้ต้องสงสัยที่ส่งตรวจที่สำนักยาและวัตถุเสพติด ทั้งสองวิธีมีค่าใกล้เคียงกัน การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่ทราบค่าซึ่งเป็นตัวอย่างที่เลือกจากการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญจาก UNODC ทั้งสองวิธีให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีค่าใกล้เคียงกับค่าจริง ค่าความแตกต่างของผลการตรวจวิเคราะห์โดย GC-MS มีค่าน้อยกว่า ร้อยละ 13 และความแตกต่างของผลการตรวจวิเคราะห์โดย LC-MS มีค่าน้อยกว่า ร้อยละ 3 ซึ่งน้อยกว่าค่าเกณฑ์กำหนดของการทดสอบในหัวข้อ precision

สรุป

วิธีการตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะ โดย GC-MS และ LC-MS ที่พัฒนาขึ้น สามารถตรวจคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสอดคล้องกับข้อกำหนดของกฎหมาย จึงเป็นทางเลือกให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ยาในกลุ่ม amphetamines ในปัสสาวะ ตามความเหมาะสมและความพร้อมของแต่ละหน่วยงาน

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่กรุณาให้การสนับสนุนทรัพยากรและให้คำแนะนำ ในการศึกษาวิจัย และขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายปฏิบัติการวัตถุเสพติด 1 สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ช่วยจัดเตรียมอุปกรณ์และตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด. แผนยุทธศาสตร์การป้องกันและแก้ไขปัญหายาเสพติด พ.ศ. 2558-2562. กรุงเทพฯ: สำนักยุทธศาสตร์; 2558.
2. สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด. ผลการปราบปรามยาเสพติดทั่วประเทศ ประจำปี 2556. กรุงเทพฯ: สำนักปราบปรามยาเสพติด; 2557.
3. พระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 135 (พ.ศ.2539) ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 113 ตอนพิเศษ 23 ง (ลงวันที่ 16 สิงหาคม 2539).
4. พระราชบัญญัติป้องกันและปราบปรามยาเสพติด พ.ศ. 2519 ประกาศคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 117 ตอนพิเศษ 76 ง (ลงวันที่ 4 สิงหาคม 2543).
5. ยาบ้า (methamphetamine). [online]. 2012 [cited 2015 July 17]; [2 screens]. Available from: URL: <http://narcotic.fda.moph.go.th/welcome/?p=2527>
6. สำนักยาและวัตถุเสพติด. คู่มือและแนวทางการจัดซื้อชุดทดสอบสารเสพติดในปัสสาวะ. พิมพ์ครั้งที่ 2. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2554.
7. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Guidance for industry bioanalytical method validation. [online]. 2001 [cited 2014 Mar 20]; [25 screens]. Available from: URL: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>
8. Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sailstad J, et.al. Workshop/conference report-quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. The AAPS J 2007; 9(1): E30-42.
9. Bansal S, DeStefano A. Key elements of bioanalytical method validation for small molecules. The AAPS J 2007; 9(1): E109-14.
10. EURACHEM/CITAC Guide CG 4: Quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. Austria: EURACHEM; 2012.
11. อักษร ธีรวิบูลย์. การวิเคราะห์ต้นทุนในการดูแลสุขภาพ. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2544.
12. คณพศ ชินชนะโชค. การวิเคราะห์ต้นทุน-ปริมาณ-กำไรและจุดคุ้มทุน. [ออนไลน์]. [สืบค้น 1 ส.ค. 2557]; [9 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: http://www.sdte.ac.th/subject_view_content.php?no=288
13. WADA technical document-TD2010IDCR. [online]. 2010 [cited 2014 Mar 25]; [9 screens]. Available from: URL: https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA_TD2010IDCRv1.0_Identification%20Criteria%20for%20Qualitative%20Assays_May%2008%202010_EN.doc.pdf

New Approach for Analysis of Amphetamines in Urine

Orapin Tanunkat Sumate Thiangthum and Rungtip Jeotee

Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000 Thailand.

ABSTRACT Analytical results of amphetamines in urine are significant evidence of the legal proceedings. The methods used in the analysis must be highly effective. Bureau of Drug and Narcotic developed two fast, accurate and precise gas chromatography-mass spectrophotometry (GC-MS) and liquid chromatography - mass spectrophotometry (LC-MS) methods for qualitative and quantitative determination of amphetamines in urine. Amphetamines were extracted from urine by solid phase extraction method. The proposed method proved to be specific and selective without interference from urine matrixes. For GC-MS method, the linearity and range were 100-4,000 nanograms per milliliter for amphetamine and methamphetamine with correlation coefficients greater than 0.99. Mean percentage recoveries for amphetamine and methamphetamine were 75.40 and 76.89, respectively. Inter-day accuracy for all drugs range from 0.34 to 17.23 % RD. Inter-day precision for all drugs range from 3.84 to 12.57 % CV. The uncertainties at a confidence level of 95 were 2.00 ± 0.39 micrograms per milliliter and 2.00 ± 0.35 micrograms per milliliter, respectively. For LC-MS techniques, the linearity and range were 300-2,000 nanograms per milliliter for amphetamine and methamphetamine with correlation coefficients greater than 0.99. Inter-day accuracy for all drugs range from 2.22 to 16.11 % RD. Inter-day precision for all drugs range from 2.36 to 10.43 % CV. The uncertainties at a confidence level of 95 were 2.00 ± 0.27 micrograms per milliliter and 2.00 ± 0.24 micrograms per milliliter, respectively. The unit cost of material cost for the analysis by GC-MS and LC-MS are 628 baht and 438 baht, respectively. Therefore, the developed methods are applicable for analysis of amphetamines in urine with in the assigned level of narcotic acts.

Key words: Method Validation, Amphetamines, Methamphetamine, GC-MS, LC-MS

การปนเปื้อนเชื้อราและอะฟลาทอกซิน ในผลิตภัณฑ์ถั่วพร้อมบริโภค

ศศิธร จุติเพชรกุล* กนกพรรณ สมยรรพย์* ก่อเกียรติ ศาสตรินทร์* ประภาศรี บุญประภาพันธ์*
และนันทวรรณ เมฆา**

*สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร **สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์
นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ จากการเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่วพร้อมบริโภคจากร้านค้าปลีก ร้านค้าส่ง ห้างสรรพสินค้า ซูเปอร์มาร์เก็ต ตลาดสด และตลาดนัดในเขตกรุงเทพมหานคร จำนวน 266 ตัวอย่าง ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ถั่วลิสง พิสทาชิโอ อัลมอนต์ แมคคาเดเมีย ถั่วลิสงคั่ว ปากอ้า เกาลัด ถั่วเขียวผ่าซีก และเม็ดมะม่วงหิมพานต์ มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อรา สารอะฟลาทอกซิน และค่า water activity (a_w) พบการปนเปื้อนเชื้อราหลายชนิดในตัวอย่าง 67 ตัวอย่าง (25.19%) ในปริมาณ ตั้งแต่ 10-520 CFU/g พบสารอะฟลาทอกซินใน 12 ตัวอย่าง (4.51%) ในปริมาณ 1.02- 204.90 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยจำนวนนี้มี 7 ตัวอย่าง ที่มีสารอะฟลาทอกซินเกินมาตรฐานตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 ที่กำหนดให้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม หรือคิดเป็น 58.33% ของจำนวนที่ตรวจพบสารอะฟลาทอกซิน ส่วนค่า a_w ของตัวอย่างทั้งหมดมีค่าในช่วงพิสัยตั้งแต่ 0.09-1.00 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่าง a_w กับปริมาณเชื้อราและสารอะฟลาทอกซิน เท่ากับ 0.41 และ 0.34 ตามลำดับ ในขณะที่ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อรากับสารอะฟลาทอกซินเท่ากับ 0.18 ผลการศึกษานี้พบการปนเปื้อนของเชื้อราและสารอะฟลาทอกซิน ในผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสงซึ่งได้แก่ ถั่วลิสงอบกรอบ ขนมตัดบับ และถั่วลิสงปั่น เท่านั้น

Accepted for publication, 14 September 2015



บทนำ

ถั่วเป็นธัญพืชที่มีคุณค่าทางอาหารสูง และเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญรองจากเนื้อสัตว์ อีกทั้งหาง่ายราคาไม่แพงจึงนิยมบริโภคแพร่หลาย นอกจากหาบริโภคได้ง่าย แล้วยังเป็นส่วนประกอบอาหารคาวหวานต่าง ๆ และเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป ที่นิยมซื้อตามท้องตลาดมาเป็นของขบเคี้ยว ซึ่งผู้บริโภคอาจไม่ทันได้สังเกตอันตรายที่แฝงอยู่ ได้แก่ เชื้อราและสารอะฟลาทอกซินซึ่งเป็นสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา⁽¹⁾

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรารวมถึงการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ได้แก่ อุณหภูมิและความชื้น โดยช่วงภาวะเหมาะสมคือ 27-43 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 70-90% ซึ่งเป็นสภาวะสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย^(2, 3, 4, 5)

เบื้องต้นสามารถป้องกันพิษผลทางการเกษตรได้โดยการลดความชื้นของผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยวด้วยการทำแห้งอย่างรวดเร็วเพื่อลด water activity (a_w) ให้ต่ำกว่าที่เชื้อราจะเจริญ และสร้างสารพิษ เนื่องจาก a_w เป็นปัจจัยที่ขึ้นระดับปริมาณน้ำอิสระในอาหารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ⁽⁶⁾ นอกจากนี้ยังเป็นดัชนีของความปลอดภัยในการแบ่งประเภทของอาหาร และเป็นทางเลือกหนึ่งในการทำนายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษที่อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค หลายประเทศโดยเฉพาะสหรัฐอเมริกาหน่วยงาน USDA ได้ออกกฎหมายใช้ค่า a_w เป็นดัชนีของความปลอดภัยในการแบ่งประเภทอาหาร โดย a_w มีมาตราส่วนอยู่ในช่วง 0 (แห้งสนิท) ถึง 1 (น้ำบริสุทธิ์) สำหรับอาหารที่แห้งมาก ส่วนใหญ่มีระดับ a_w ประมาณ 0.2 ขณะที่อาหารสดและชื้นประมาณ 0.99 สำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีค่า a_w ต่ำสุดสำหรับการเจริญที่แตกต่างกันกล่าวคือ แบคทีเรียต้องการ a_w ในการเจริญที่สูงกว่าราและยีสต์ หรือแม้แต่ในกลุ่มแบคทีเรียด้วยกันยังต้องการ a_w ในการเจริญที่แตกต่างกัน สำหรับราสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีค่า a_w ต่ำได้ดีกว่าแบคทีเรียจึงอาจเป็นปัญหาในอาหารแห้ง โดยเชื้อราจะเจริญเติบโตได้ดีที่ a_w เท่ากับ 0.80 แต่เชื้อราบางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ที่ a_w เท่ากับ 0.61⁽⁷⁾ ดังนั้น ค่า a_w ของอาหารเป็นทางเลือกหนึ่งในการทำนายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้

สารอะฟลาทอกซิน (Aflatoxin) พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1960 มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับสุขภาพของมนุษย์โดยตรง เนื่องจากมีพิษรุนแรงถูกจัดเป็นสารก่อมะเร็งโดย International Association Research Cancer (IARC)⁽⁸⁾ พบทั่วไปในผลิตผลเกษตร ได้แก่ ถั่วลิสง ข้าวโพด กระจิเมียม หัวหอม ข้าวสาลี เป็นต้น อะฟลาทอกซินที่พบตามธรรมชาติมี 4 ชนิด คือ B1, B2, G1 และ G2 โดย B1 มีความเป็นพิษสูงที่สุด โดยเกิดจากเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* ssp. ได้แก่ *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *A. nomius*⁽⁹⁾ แต่มีผลิตจาก *A. flavus* เป็นส่วนใหญ่^(10, 11)

นอกจากนี้สารอะฟลาทอกซินยังเป็นสารพิษที่ทนความร้อนได้ถึง 268 องศาเซลเซียส ดังนั้นการหุงต้มธรรมดาไม่สามารถทำลายพิษได้ เมื่อร่างกายได้รับสารอะฟลาทอกซินจะทำให้เกิดอาการชัก หายใจลำบาก ตับถูกทำลาย หัวใจและสมองบวม นอกจากนี้ สารอะฟลาทอกซิน B1 ยังเป็นสารพิษที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งในตับได้อีกด้วย⁽¹²⁾ ตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 กำหนดให้มีสารอะฟลาทอกซินปนเปื้อนในอาหารได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ของอาหาร⁽¹³⁾ จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยด้านการปนเปื้อนเชื้อราในอาหาร พบว่างานวิจัยส่วนใหญ่ จะมุ่งเน้นในถั่วลิสงปน และรายงานการตรวจพบข้อมูลที่ได้ไม่เป็นปัจจุบัน ในการศึกษาจึงได้ทำการสำรวจใหม่ในผลิตภัณฑ์ถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์ถั่วประเภทอื่นๆ ด้วย เช่น พิสทาชิโอ แมคคาเดเมีย ปาก้า เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคในประเทศ โดยผลการศึกษาที่ได้จะนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับกำหนดแนวทางให้ประชาชนสามารถดูแลตัวเองให้มีความปลอดภัยในการบริโภคผลิตภัณฑ์ถั่วชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นอาหารที่มีความเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อนเชื้อรา และสารอะฟลาทอกซิน

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่ว ทั้งหมด 266 ตัวอย่าง ได้แก่ ถั่วลิสงอบ เคลือบ ทอด คั่ว ปั่น ขนมนุ่มดับดับ ถั่วตัด ถั่วแพทอด รวม 132 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์ถั่วอื่นๆ ได้แก่ ลันเตา ปากอ้า เขียวผ่าซีก พิสทาชิโอ แมคคาเดเมีย อัลมอนต์ เม็ดมะม่วงหิมพานต์ เกาลัด รวม 134 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างจากร้านค้าปลีก ร้านค้าส่ง ห้างสรรพสินค้า ซูเปอร์มาร์เก็ต ตลาดสด และตลาดนัดในเขตกรุงเทพมหานคร จำนวน 14 แห่ง ตั้งแต่ กรกฎาคม 2555-กรกฎาคม 2556

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- ◆ 3 M™ Petrifilm™ Yeast & Mold Count Plates
- ◆ Butterfield's buffered phosphate diluent
 1. เตรียม stock solution โดยละลาย KH_2PO_4 34 กรัมในน้ำ 500 มิลลิลิตร ปรับพีเอช 7.2 เติมน้ำปรับปริมาตรรวมเป็น 1 ลิตร หนึ่งฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที
 2. นำ stock solution 1.25 มิลลิลิตร เติมน้ำปรับปริมาตรรวมเป็น 1 ลิตร แบ่งใส่ขวด 90 มิลลิลิตร หนึ่งฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที
- ◆ สารความเข้มข้นมาตรฐาน (a_w salt standard) ได้แก่ SAL-98, SAL-90, SAL-75, SAL-53, SAL-33, SAL-11 (NOVASINA)
- ◆ acetonitrile, benzene, methanol, hexane, sodium chloride, trifluoroacetic acid, sodium hypochlorite, tween®20
- ◆ สารมาตรฐาน Aflatoxin B1, B2, G1, G2 (SIGMA)

เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องหนึ่งฆ่าเชื้อ ตู้บ่มเชื้อ เครื่องนับโคโลนี กล้องจุลทรรศน์ เครื่องตีผสมอาหาร ขวดแก้ว งานเพาะเชื้อ ปิเปต
- เครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ NOVASINA รุ่น 9407002 ตลับพลาสติกใส่ตัวอย่าง คีม ช้อน เครื่องปั่น ผสมอาหาร
- เครื่อง HPLC รุ่น water detector 2475 (Column: C18 250 × 4.6 mm id, 5 μm , mobile phase: $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{CN}$, Wavelength: EX 365 nm, EM 455 nm) Flow rate: 1.2 ml/min, Injection volume: 20 μl)
- เครื่อง UV-VIS spectrophotometer SHIMADZU รุ่น UV-1700
- ชุด vacuum manifold

วิธีการ

1. สุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่ว ทั้งหมด 266 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อรา ด้วยวิธี Dry Rehydratable Film Method (Petrifilm™ Method) AOAC (2005) 997.02

2. วิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซิน

โดยสกัดอะฟลาทอกซินในตัวอย่างด้วย $\text{CH}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้มาผ่าน immunoaffinitycolumns (Afla Test® column) ที่บรรจุ monoclonal antibodies ซึ่งมีคุณสมบัติเฉพาะเจาะจง

ต่ออะฟลาทอกซิน จากนั้น elute ด้วย methanol⁽¹⁴⁾ แล้วนำส่วนที่ได้มาเตรียม derivative ด้วย trifluoroacetic acid จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินด้วย HPLC ใช้ fluorescence detector ที่ความยาวคลื่น excitation 365 nm และ emission 455 nm โดยใช้สารมาตรฐาน Aflatoxin 4 ชนิด B1, B2, G1, G2 เป็น calibration curve⁽¹⁵⁾

3. วิเคราะห์ค่า a_w ด้วยวิธี AOAC (2012) 978.18B. (a) เทียบกับสารความชื้นมาตรฐาน (a_w salt standard)

4. พิสูจน์เอกลักษณ์ของสายพันธุ์เชื้อราที่ตรวจพบ โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อราที่ต้องการจำแนกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) บ่มเพาะเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 3-7 วัน บันทึกลักษณะโคโลนีของเชื้อราด้วยตาเปล่า ได้แก่ สีของโคโลนีเชื้อราทั้งด้านหน้าและด้านหลัง ความละเอียดผิวโคโลนี จากนั้นดูการสร้างสปอร์และชนิดของเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบลักษณะรูปร่างของเชื้อรา ทั้งลักษณะโคโลนีด้วยตาเปล่า ลักษณะรูปร่างจากกล้องจุลทรรศน์กับหนังสือ และตำราวิชาการ⁽¹⁶⁾

ผล

ศึกษาการปนเปื้อนจากเชื้อรา สารอะฟลาทอกซิน และ a_w ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่วพร้อมบริโภค

จากการตรวจวิเคราะห์เชื้อรา และสารอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่ว โดยจำแนกเป็นผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง และผลิตภัณฑ์ถั่วประเภทอื่น ๆ ที่นิยมบริโภคอย่างแพร่หลาย (ตารางที่ 1) พบว่าจากตัวอย่างทั้งหมด 266 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อรา 67 ตัวอย่าง คิดเป็น 25.19% โดยปริมาณที่ตรวจพบอยู่ในระหว่าง 10-520 CFU/g พบการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซิน 12 ตัวอย่าง คิดเป็น (4.51%) ที่ปริมาณตั้งแต่ 1.02- 204.90 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในถั่วลิสงอบกรอบ ขนมตัดบับ และถั่วลิสงป่น โดยตัวอย่างที่พบเกินเกณฑ์มาตรฐานพระราชบัญญัติกระทรวงสาธารณสุข 2522 ที่กำหนดให้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 7 ตัวอย่าง หรือคิดเป็น 58.33% ของจำนวนตัวอย่าง ที่ตรวจพบซึ่งได้แก่ ขนมตัดบับ และถั่วลิสงป่น (ตารางที่ 1)

จากการวิเคราะห์หาค่า a_w ในผลิตภัณฑ์ถั่วทั้งหมด 266 ตัวอย่าง ค่า a_w ที่ตรวจพบ มีค่าตั้งแต่ 0.09-1.00 โดยค่าสหสัมพันธ์ระหว่าง a_w กับ ปริมาณเชื้อรา และสารพิษอะฟลาทอกซินเท่ากับ 0.41 และ 0.34 ตามลำดับ ขณะที่ค่าสหสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณเชื้อรากับสารพิษอะฟลาทอกซินเท่ากับ 0.18

พิสูจน์เอกลักษณ์ของสายพันธุ์เชื้อราที่ตรวจพบ

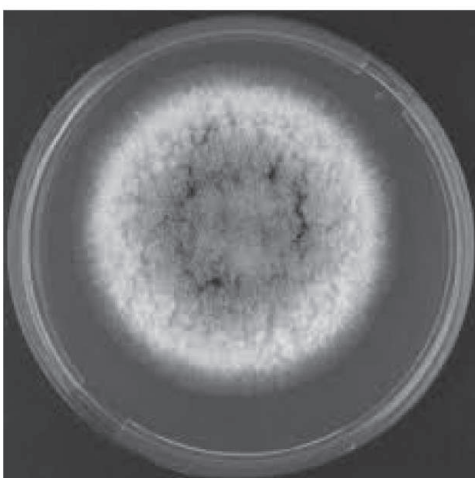
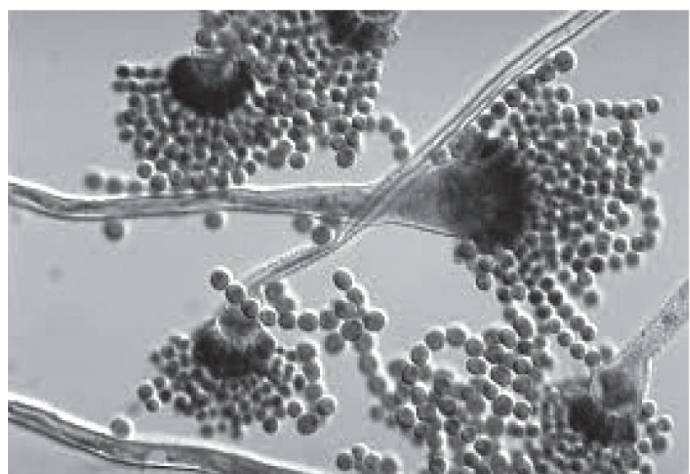
เชื้อราที่ตรวจพบจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่ว จำนวน 67 ตัวอย่าง นำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ชนิดของสายพันธุ์ (ตารางที่ 2) โดยพบการปนเปื้อนของเชื้อราหลากหลายสายพันธุ์รวมทั้ง *Aspergillus flavus* (ภาพที่ 1) ที่เป็นหนึ่งในสายพันธุ์ของเชื้อราที่สามารถสร้างสารอะฟลาทอกซิน โดยพบในแมคคาเดเมีย ถั่วลิสงทอด ถั่วลิสงอบ ถั่วลิสงเคลือบขนมตัดบับ และถั่วลิสงป่น (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณเชื้อรา สารอะฟลาทอกซิน และ a_w ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์ถั่ว

ผลิตภัณฑ์ถั่ว	จำนวนทั้งหมด	การปนเปื้อนเชื้อรา (ตัวอย่าง)							การปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน (ตัวอย่าง)			a _w	
		<10	10-100	101-200	201-300	301-400	401-500	>500	ไม่พบ	0.01-20	>20	ต่ำสุด	สูงสุด
		CFU/g							ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม				
มะม่วงหิมพานต์	27	25	2						27			0.23	0.86
แมคคาเดเมีย	22	5	13	2	2				22			0.32	0.51
ปาก้า	12	12							12			0.09	0.51
อัลมอนด์	11	9	2						11			0.22	0.45
ลิ้นเตา	18	16	2						18			0.11	0.45
ถั่วเขียวผ่าซีก	7	7							7			0.17	0.37
พิสทาชิโอ	9	8	1						9			0.24	0.30
เกาลัด	9	9							9			0.91	1.00
ถั่วผสม (mixed nut)	19	14	5						19			0.20	0.55
ถั่วลิสงทอด	20	18	2						20			0.21	0.53
ถั่วลิสงคั่ว	10	6	3			1			10			0.15	0.32
ถั่วลิสงเคลือบ	19	16	3						19			0.16	0.78
ถั่วลิสงอบ	35	29	5		1				33	2 (1.02-2.00)		0.09	0.59
ถั่วลิสงตัด	17	13	4						17			0.15	0.54
ถั่วลิสงแพทอด	9	8	1						9			0.30	0.52
ขนมตัดบับ	8		8						6	1 (2.29)	1 (30.66)	0.30	0.46
ถั่วลิสงป่น	14	4	2	2	3	2		1	6	2 (13.97-15.88)	6 (24.49-204.90)	0.17	0.68
รวม	266	199	53	4	6	3		1	254	5	7		

ตารางที่ 2 สายพันธุ์เชื้อราที่ตรวจพบจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่ว

ผลิตภัณฑ์ถั่ว	สายพันธุ์เชื้อราที่ตรวจพบ
มะม่วงหิมพานต์	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Phialophora verrucosa</i>
แมคคาเดเมีย	<i>Absidia corymbifera</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Penicillium solitum</i>
อัลมอนต์	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>
ลันเตา	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>
พิสทาชิโอ	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
ถั่วผสม (mixed nut)	<i>Syncephalastrum racemosum</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>Rhizopus microsporus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium expansum</i>
ถั่วลิสงทอด	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Trichoderma longibrachiatum</i>
ถั่วลิสงคั่ว	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Curvularia lunata</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , Non sporulating mold (Hyphae septate, hyaline without conidia production)
ถั่วลิสงเคลือบ	<i>Acremonium</i> sp., <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i>
ถั่วลิสงอบ	<i>Acremonium</i> sp., <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i>
ถั่วลิสงตัด	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Lecythophora hoffmannii</i>
ถั่วลิสงแพทอด	<i>Acremonium</i> sp., <i>Aspergillus niger</i>
ขนมตัดบับ	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Rhizopus microsporus</i>
ถั่วลิสงปั่น	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus terreus</i>

*Aspergillus flavus*, 30°C, 5 days*Aspergillus flavus* 460x

ที่มา : Deanna et al. 1998

ภาพที่ 1 *Aspergillus flavus* ในจานเพาะเชื้อ PDA และในกล้องจุลทรรศน์ที่ตรวจพบจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่ว

วิจารณ์

ปัจจุบันเราได้รับข่าวสารที่ผู้คนได้รับอันตรายที่แฝงจากการบริโภคอาหารตามสื่อต่างๆ มากมาย บางครั้งสามารถหลีกเลี่ยง หรือป้องกันได้ จากการสังเกตก่อนซื้ออาหาร หรือติดตามข่าวสารต่าง ๆ ดังนั้น เพื่อเผยแพร่ความรู้แก่ผู้บริโภค และแจ้งเตือนภัยถึงพิษภัยของเชื้อรา และสารอะฟลาทอกซิน ในการเลือกซื้อสินค้าที่ปลอดภัยตลอดจนเพื่อป้องกันโรคภัยไข้เจ็บที่เกิดจากการบริโภค ผลจากการสำรวจผลิตภัณฑ์ถั่วพร้อมบริโภคที่จำหน่ายในท้องตลาด เพื่อแสดงสถานการณ์การปนเปื้อนเชื้อรา และสารอะฟลาทอกซิน ในการศึกษาที่ตรวจพบสารอะฟลาทอกซินเกินเกณฑ์มาตรฐานในขนมตัดบับ และถั่วลิสงป่น ขณะที่ไม่พบการปนเปื้อนสารพิษดังกล่าวในผลิตภัณฑ์ถั่วประเภทอื่น ๆ และจากการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อรากับอะฟลาทอกซิน พบว่าปริมาณเชื้อราที่ปนเปื้อนในตัวอย่างกับการสร้างสารอะฟลาทอกซินมีค่าสหสัมพันธ์เพียง 0.18 แสดงว่ามีความสัมพันธ์น้อยมากซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้⁽⁵⁾ ที่พบว่าบางครั้งถึงแม้ไม่พบเชื้อรา หรือมีเชื้อราในปริมาณต่ำ ๆ ในตัวอย่างก็ไม่ได้แสดงว่าจะไม่มีสารอะฟลาทอกซินในตัวอย่างนั้น กล่าวคือ เชื้อราอาจจะถูกทำลายไป แต่สารอะฟลาทอกซินที่สร้างไว้ยังคงอยู่ อีกทั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินนั้นจะต้องมีปัจจัยที่เหมาะสมตั้งแต่ ความชื้นในเมล็ดพืช ความชื้นสัมพัทธ์ ระยะเวลาในการเก็บรักษา อุณหภูมิ อุดมภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ต้องมีความเหมาะสมอีกด้วย^(17, 18, 19) ขณะที่สหสัมพันธ์ระหว่างค่า a_w กับปริมาณเชื้อรา และ a_w กับการสร้างสารอะฟลาทอกซินเท่ากับ 0.41 และ 0.34 ตามลำดับ กล่าวคือ มีความสัมพันธ์กันค่อนข้างน้อย ทั้งนี้เนื่องจาก a_w เป็นเพียงหนึ่งในปัจจัยภายในที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา และการสร้างสารอะฟลาทอกซิน ยังมีปัจจัยภายในอื่นที่เกี่ยวข้อง เช่น สารอาหาร ความเป็นกรด-ด่าง ตลอดจนสารยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร ขณะเดียวกันก็มีปัจจัยภายนอกมาเกี่ยวข้องอีกด้วย เช่น ความชื้นสัมพัทธ์ของสภาพแวดล้อม ปริมาณออกซิเจน รวมทั้งอุณหภูมิในการเก็บรักษาอาหาร

นอกจากนี้ พบว่า ในทุกตัวอย่างที่พบสารพิษอะฟลาทอกซินจะพบการปนเปื้อน *A. flavus* ร่วมด้วยเสมอ ในขณะที่ ตัวอย่างที่พบการปนเปื้อน *A. flavus* ไม่จำเป็นจะต้องตรวจพบการสร้างสารอะฟลาทอกซิน ทั้งนี้ เนื่องจาก *A. flavus* มีหลายสายพันธุ์ และบางสายพันธุ์ไม่ได้สร้างสารอะฟลาทอกซิน^(9, 20)

สถานการณ์การปนเปื้อนของเชื้อราและอะฟลาทอกซิน ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งอันเกิดจาก *A. flavus* และ *A. parasiticus* ยังคงเป็นปัญหาในถั่วลิสงอบกรอบ ถั่วลิสงป่น และขนมตัดบับ ซึ่งเป็นปัญหาของประเทศไทย ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน อันเนื่องมาจากสภาวะอากาศซึ่งเป็นแบบร้อนชื้น จึงเหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อรา⁽¹⁾ ขณะที่พบการปนเปื้อนเชื้อราในผลิตภัณฑ์ถั่วประเภทอื่น ๆ บ้าง แต่ไม่พบการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซิน เนื่องจากเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* มีถิ่นอาศัยในดินประกอบกับถั่วลิสงก็เป็นพืชตระกูลถั่วที่มีการสร้างฝักอยู่ในดินโอกาสที่เชื้อทั้งสองจะเข้าทำลายฝักและสร้างอะฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสงจึงสูงกว่าถั่วชนิดอื่น ๆ ที่เป็นถั่วยืนต้น (Tree Nuts)⁽²⁰⁾

ผู้ประกอบการควรเลือกถั่วคุณภาพดี ไม่ขึ้น ไม่ปนเปื้อนเชื้อรา ไม่มีร่องรอยแมลงกัดแทะ ไม่มีกลิ่นหืน โดยมุ่งเน้นไปที่การจัดการสุขลักษณะของกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวของผู้ผลิต มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ขณะที่ผู้บริโภคก็เลือกซื้อผลิตภัณฑ์ถั่วที่มีบรรจุภัณฑ์ที่สะอาด และปิดสนิทเพื่อลดปริมาณ a_w ของอาหารให้ต่ำกว่าเกณฑ์ที่เชื้อราจะเจริญเติบโตและสร้างสารพิษ

สรุป

สถานการณ์การปนเปื้อนเชื้อรา และสารอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ถั่วที่จัดเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทย ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันยังคงเป็นผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง ทั้งนี้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องของภาครัฐบาลต้องพยายามณรงค์ให้ผู้ประกอบการคำนึงถึงอันตราย ตลอดจนช่วยกันแก้ไขปัญหาลดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษ ซึ่งมีโอกาส

ปนเปื้อนในทุกกระบวนการของห่วงโซ่ในการผลิต ตลอดจนการจัดจำหน่าย และการบริโภค การแก้ปัญหาจำเป็นต้องกระทำในทุกภาคส่วน ตั้งแต่เกษตรกรที่ปลูกถั่วลิสง จะต้องมีการผลิตทางการเกษตรที่ดี และเหมาะสม (GAP) เพื่อควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราที่สามารถสร้างสารอะฟลาทอกซินตั้งแต่เริ่มต้นคัดเลือกเมล็ดพันธุ์ ควบคุมกระบวนการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การขนส่ง และการบรรจุ โรงงานผู้ผลิตต้องมีสุขลักษณะการผลิตที่ดี (GMP) ขณะที่นักวิชาการที่เกี่ยวข้อง ต้องทำการเฝ้าระวังอย่างสม่ำเสมอ และเผยแพร่ประชาสัมพันธ์ความรู้ให้แก่ ผู้ผลิต ผู้บริโภคทราบถึงสถานการณ์การปนเปื้อน ตลอดจนเสนอแนะวิธีปฏิบัติในการคัดเลือกซื้อถั่ว และผลิตภัณฑ์ที่จะนำไปจำหน่ายให้แก่ผู้บริโภคได้อย่างปลอดภัย รวมไปถึงสินค้าอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพื่อให้ประเทศไทยก้าวเข้าสู่ประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน และครัวของโลกได้อย่างเข้มแข็งและยั่งยืน

เอกสารอ้างอิง

1. อนงค์ บินทวิท. สารพิษจากเชื้อรา: อะฟลาทอกซิน. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2546.
2. Ashworth LJ, Schroeder HW, Langley BC. Aflatoxins: environmental factor governing occurrence in Spanish peanuts. *Science* 1965; 148(3674): 1228-9.
3. วนิตา ยุธยาติ. อะฟลาทอกซินตกค้างในผลิตภัณฑ์ถั่วลิสงที่ผ่านการคัดแยกถั่วลิสงดิบด้วยน้ำ. สมุทราการ: คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง; 2551.
4. ศรีสิทธิ์ การุณยะวนิช, ดวงจันทร์ สุประเสริฐ, อูมา บริบูรณ์, สุวัฒน์ โปษะวัฒนากุล, นพากรณ์ ปัญจะ. อะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์ในประเทศไทย. *ว. กรมวิทย์ พ* 2538; 37(1): 19-32.
5. อมรา ชินภูติ. สถานการณ์การปนเปื้อนของเชื้อราและสารอะฟลาทอกซินในถั่ว. [ออนไลน์]. 2552; [7 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <http://www.oocities.org/ubfcr/12.doc>.
6. นุชนารถ ทรัพย์พาณิชย์. Water activity กับ การควบคุมอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร. *วารสารจารย์พา* 2545; 9(68): 48-51.
7. Beuchat LR, Food and beverage mycology. Westport, CT: Avi Publishing; 1978. p. 2, 45-82.
8. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans Vol. 56. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. UK: International Agency for Research on Cancer; 1993. p. 245-521.
9. อรุณศรี วงศ์ไธ. ความสามารถในการสร้างอะฟลาทอกซินของ *Aspergillus flavus* จากดินในไร่ถั่วลิสง. ใน : รายงานการสัมมนาเรื่องถั่วลิสงแห่งชาติ ครั้งที่ 12. ขอนแก่น: กรมวิชาการเกษตร; 2540. หน้า 230-232.
10. Glinsukon T, Thamavit W, Ruchirawat M. Studies on the population of toxigenic fungi in market food and foodstuffs. I. Mycoflora contamination. *J Sci Soc Thailand* 1976; 2: 179-84.
11. Moss MO. Mycotoxin fungi. In: Eley AR, edited. Microbial food poisoning. London: Chapman & Hall; 1994. p. 73-91.
12. Uma RM, Gulla S, Nagalakshmi AVD. Influence of temperature and moisture in extrusion processing on the reduction of aflatoxin B1 in corn products. *Int J Food Sci Technol Nutr* 2012; 6: 71-77.
13. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ.2529) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน. ราชกิจจานุเบกษาฉบับพิเศษ เล่มที่ 103 ตอนที่ 23 (ลงวันที่ 16 กุมภาพันธ์ 2529).
14. Trucksess MW, Chapter editor: Chapter 49 Natural toxins. In: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 19th ed. Gaithersburg, MD: AOAC INTERNATIONAL; 2012. AOAC official method 997.22; p. 4-5, 991.31; p. 21-23.
15. Tarter E.J, Hanchay JP, Scott PM. Improved liquid chromatographic method for determination of aflatoxins in peanut butter and other commodities. *J Assoc Off Anal Chem* 1984; 67(3): 597-600.

16. Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG. Guide to clinically significant fungi. Maryland: Williams & Wilkins; 1998.
17. เนตรนภิส หัสมินทร์, ทรงศักดิ์ ศรีอนุชาต, วันเพ็ญ รัตมีโสภพร. การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงพร้อมบริโภคนในเขตกรุงเทพมหานคร. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2545.
18. อมรา ชินภูติ, ศุภรา อัดตะสาระกุล, อรุณศรี วงษ์อุไร, ชวเลศ ตริกรณาสวัสดิ์, พรทิพย์ วิสารทนนท์, ไพศาล รัตนเสถียร. การควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินในข้าวโพดโดยใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพร. กรุงเทพฯ: สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร; 2550.
19. ทิพย์ ปาณะโตชะ, ศิริพรรณ เอี่ยมรุ่งโรจน์, วารุณี เสนสภา, ทรงพล รัตนพันธุ์. รายงานการศึกษาวิจัย การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในอาหารสำเร็จรูปที่ทำจากถั่ว. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข; 2530.
20. โสภณ วงศ์แก้ว, สนั่น จอกลอย. อะฟลาทอกซินในถั่วลิสง: ข้อเสนอวิธีแก้ปัญหา. แก่นเกษตร 2554; 39 (พิเศษ 3): 1-11.

Fungus & Aflatoxin Contamination in Ready to Eat Nuts Products

Sasithorn Thitipetchrakul* Kanokpan Somyoonsup* Kokeiat Sattarin*
Prapasri Boonyaprapapan* and Nanthawan Mekha**

*Bureau of Quality and Safety of Food, **National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT Ready to Eat Nut Products including peanuts products and pistachios, almonds, macadamia nuts, peas, broad beans, chestnuts, half and half green beans, and cashews from retailer, supermarkets, fresh and community markets, surrounding Bangkok Metropolitan, 266 samples were collected for determination of fungus, aflatoxin and water activity (a_w). Various kinds of fungal contamination in a sample and a total of 67 samples (25.19%) were found with the concentrations of 10–520 CFU/g whereas aflatoxin an amount of 1.02–204.90 $\mu\text{g/kg}$ in 12 samples (4.51%) was analyzed. Only seven among twelve samples (58.33%), their aflatoxin above the standard criteria of 20 $\mu\text{g/kg}$ as claimed by Ministry of Public Health Standard no. 98 (2529) were detected. In addition a_w of all samples are in the range of 0.09–1.00. Statistical analysis showed that correlation between a_w and fungus concentration and aflatoxin were 0.41 and 0.34, respectively while the one of 0.18 did between fungus concentration and aflatoxin. In this study aflatoxin and fungus contamination were found only in peanuts products such as crispy baked peanuts, peanut cake and ground peanuts.

Key words: fungus, water activity, aflatoxin, nut products

ผลสัมฤทธิ์ด้านประสิทธิผลและคุณภาพการให้บริการ การดำเนินงานตามภารกิจหลักของสำนักมาตรฐาน ห้องปฏิบัติการ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 - 2557

อมรรัตน์ ทศนกิจ และชลนไธ สันธสาร

สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ เป็นหน่วยงานบริการ ซึ่งมีการกิจหลักด้านการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุข การประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการชั้นสูตรและการพัฒนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการชั้นสูตรสาธารณสุข ให้แก่ผู้รับบริการทั้งภาครัฐและเอกชน การศึกษาค้นคว้าเพื่อประเมินผลสัมฤทธิ์ ของการดำเนินงานตามภารกิจหลักด้านประสิทธิผล และด้านคุณภาพการให้บริการ มีผลการดำเนินงานตั้งแต่ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 - 2557 ดังนี้ ด้านประสิทธิผล กำหนดตัวชี้วัดเป็นร้อยละความสำเร็จของเป้าหมายตามแผนการปฏิบัติราชการประจำปี การดำเนินงานการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุข มีห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐานสากล คิดเป็นร้อยละ 157, 138, 138, 193 จากค่าเป้าหมายที่กำหนด และห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ คิดเป็นร้อยละ 174, 88, 110, 100 จากค่าเป้าหมายที่กำหนด ตามลำดับ และการดำเนินการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการชั้นสูตร มีห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ คิดเป็นร้อยละ 123, 132, 132, 113 จากค่าเป้าหมายที่กำหนด ตามลำดับ งานการพัฒนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการชั้นสูตรสาธารณสุข มีห้องปฏิบัติการที่ได้รับการพัฒนาระบบคุณภาพมาตรฐานห้องปฏิบัติการ คิดเป็นร้อยละ 115, 119, 120, 109 จากค่าเป้าหมายที่กำหนด ตามลำดับ และด้านคุณภาพการให้บริการ กำหนดตัวชี้วัดเป็นร้อยละระดับความพึงพอใจของผู้รับบริการ ผลการสำรวจความพึงพอใจผู้รับบริการในปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 - 2557 มีดังนี้ งานการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุข ความพึงพอใจอยู่ในระดับร้อยละ 82.70, 83.40, 84.80, 85.36 ตามลำดับ งานการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการชั้นสูตร ความพึงพอใจอยู่ในระดับร้อยละ 83.00, 82.75, 84.11, 84.11 ตามลำดับ ส่วนการพัฒนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการชั้นสูตรสาธารณสุข ไม่มีการสำรวจความพึงพอใจของผู้รับบริการ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ นำไปวิเคราะห์และวางแผนบูรณาการแผนงาน และการจัดทำแผนการปฏิบัติราชการ 4 ปี (พ.ศ. 2559 - 2562) ของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ และดำเนินงานตามภารกิจหลักในอนาคตให้เกิดผลสัมฤทธิ์และเกิดประโยชน์ต่อประชาชน ตามนโยบายและวัตถุประสงค์คุณภาพของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ต่อไป

Accepted for publication, 28 August 2015

บทนำ

สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการมีภารกิจหลักในการสนับสนุนและพัฒนาระบบประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุขของประเทศ โดยดำเนินการรับรองคุณภาพห้องปฏิบัติการด้านผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพและด้านการแพทย์ ทั้งหน่วยงานภาครัฐและเอกชน รวมถึงการสร้างเครือข่าย/พัฒนาห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุข ซึ่งการดำเนินงานภายใต้แผนปฏิบัติราชการในปีงบประมาณ พ.ศ. 2554-2557 ตามเป้าหมายและตัวชี้วัดของแผนปฏิบัติการประจำปี ของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ สอดคล้องกับตามยุทธศาสตร์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ระบุตามเอกสารงบประมาณรายจ่าย การจัดสรรงบประมาณ เพื่อดำเนินการกิจกรรมตามผลผลิตที่ 1 กิจกรรม 2 การพัฒนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการชั้นสูงสาธารณสุขภาครัฐและเอกชน และ ผลผลิตที่ 1 กิจกรรม 3 การรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุข และได้รับการสนับสนุนเงินนอกงบประมาณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการดำเนินงานการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการชั้นสูง โดยภารกิจหลักของหน่วยงาน มีการกำหนดตัวชี้วัดเพื่อวัดผลการดำเนินงาน มีระบบการติดตามและรายงานผลการดำเนินการประจำทุกเดือน เพื่อรายงานต่อผู้บริหารทางโปรแกรมระบบติดตามแผนงานงบประมาณ (Department Operation Center: DOC) ตัวชี้วัดด้านประสิทธิผล คือ ร้อยละของเป้าหมายตามแผนการปฏิบัติราชการ ซึ่งกำหนดอย่างต่อเนื่องทุกปีงบประมาณ ด้านคุณภาพการให้บริการ กำหนดตัวชี้วัด เป็นร้อยละความพึงพอใจของผู้รับบริการ ที่ส่วนราชการต้องดำเนินการให้สอดคล้องกับพระราชกฤษฎีกาว่าด้วยหลักเกณฑ์และวิธีการบริหารกิจการบ้านเมืองที่ดี พ.ศ. 2546 โดยดำเนินการสำรวจความพึงพอใจของผู้รับบริการ นำข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะมาปรับปรุงคุณภาพการให้บริการให้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับระบบบริหารคุณภาพ ISO 9001 และเกณฑ์คุณภาพการบริหารจัดการภาครัฐ (Public Sector Management Quality Award: PMQA)⁽¹⁾ จึงจำเป็นต้องมีการนำข้อมูลมาวิเคราะห์ และทบทวนผลการดำเนินงาน ในภาพรวมของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ เพื่อการวางแผนบูรณาการแผนงาน และการจัดทำแผนการปฏิบัติราชการ 4 ปี ต่อไป

ดังนั้น ในการกำหนดกรอบการพัฒนาศักยภาพการให้บริการและการวางแผน บูรณาการแผนงาน การจัดทำแผนการปฏิบัติราชการ 4 ปี (พ.ศ. 2559-2562) ของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการนั้น มีความจำเป็นต้องมีการวิเคราะห์ ข้อมูล ตามเกณฑ์ PMQA หมวด 4 การวัด การวิเคราะห์ และการจัดการความรู้ เพื่อให้สามารถนำข้อมูลเชิงเปรียบเทียบการดำเนินงานตามภารกิจที่ผ่านมา มาทบทวนผลการดำเนินงานและขีดความสามารถของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการตัดสินใจของผู้บริหาร ในการพัฒนาและปรับปรุงอย่างต่อเนื่อง และนำไปเป็นโอกาสในการสร้างนวัตกรรม⁽²⁾ ให้เกิดผลสัมฤทธิ์ตามนโยบายและวัตถุประสงค์คุณภาพของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อสร้างความมั่นใจให้ผู้รับบริการว่า สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการสามารถตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและวางแผนการดำเนินงานในอนาคตได้อย่างเหมาะสม⁽³⁾

วิธีการศึกษา

ศึกษาวิจัยเชิงพรรณนาโดยใช้วิธีวิเคราะห์ข้อมูลทุติยภูมิ ผลการดำเนินงานตามภารกิจหลัก ของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ จากการติดตามรายงานผลการดำเนินงานประจำเดือนของกลุ่มงานภารกิจหลัก ซึ่งกลุ่มพัฒนาระบบคุณภาพ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการเป็นผู้รับผิดชอบในการรวบรวมข้อมูลเพื่อรายงานในโปรแกรมระบบติดตามแผนงานงบประมาณ DOC ระบบรายงานดัชนีชี้วัดผลงาน (Key Performance Indicator Reporter: KPI reporter) และรายงานประจำปี สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ระหว่างปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 -2557⁽⁴⁻⁷⁾ วิเคราะห์ผลการดำเนินการด้านประสิทธิผลและคุณภาพการให้บริการเป็นคำร้อยละ เพื่อเป็นข้อมูลในการประเมินผลการดำเนินงานและขีดความสามารถของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ

ผลการศึกษา

1. ผลการดำเนินงานการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุข ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ถึง พ.ศ. 2557

ผลการดำเนินงาน ตามแผนการปฏิบัติราชการ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการของงานการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุข ตามมาตรฐานสากล ISO 15189 และ/หรือ ISO/IEC 17025, ISO 22870, OECD GLP และเริ่มการรับรองตามมาตรฐาน ISO 15190 ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2556 การรับรองตามมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้แก่ มาตรฐานการรับรองสถานพยาบาลตรวจสุขภาพคนหางานที่จะไปทำงานต่างประเทศ, การรับรองคุณภาพระบบตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักสด ผลไม้สด การรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการงานด้านอาหารและยาโดยมีห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุขทั่วประเทศทั้งภาครัฐและเอกชน เป็นผู้รับบริการ ซึ่งกำหนดค่าเป้าหมายตามแผนปฏิบัติการ ตั้งแต่ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ถึง พ.ศ. 2557 มีดังนี้ ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุข ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐานสากลในแต่ละปี จำนวน 200 แห่ง และมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในแต่ละปี จำนวน 50 แห่ง มีผลการดำเนินงานให้การรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล จำนวน 314, 275, 277, 386 แห่ง คิดเป็นร้อยละ 157, 138, 139, 193 ตามลำดับ ส่วนการรับรองตามมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 87, 44, 55, 50 แห่ง คิดเป็นร้อยละ 174, 168, 110, 100 ตามลำดับ ผลการสำรวจความพึงพอใจของผู้รับบริการ ของการดำเนินงานการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุขตามมาตรฐานสากล ISO 15189 และ ISO/IEC 17025 อยู่ในระดับร้อยละ 82.70, 83.40, 84.80, 85.36 ตามลำดับ มีรายละเอียดดังนี้

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ส่งแบบสอบถามให้ผู้รับบริการรวมทั้งสิ้น 276 หน่วยงาน แบบสำรวจที่ได้รับทั้งหมด 225 ฉบับ คิดเป็นร้อยละ 81.52 ผลความพึงพอใจและความเชื่อมั่นในคุณภาพการให้บริการค่าเฉลี่ยรวม 4.14 คิดเป็นร้อยละ 82.70

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 ส่งแบบสอบถามให้ผู้รับบริการรวมทั้งสิ้น 265 หน่วยงาน แบบสำรวจที่ได้รับทั้งหมด 227 ฉบับ คิดเป็นร้อยละ 85.66 ผลความพึงพอใจและความเชื่อมั่นในคุณภาพการให้บริการค่าเฉลี่ยรวม 4.17 คิดเป็นร้อยละ 83.40

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2556 ส่งแบบสอบถามให้ผู้รับบริการรวมทั้งสิ้น 298 หน่วยงาน แบบสำรวจที่ได้รับทั้งหมด 220 ฉบับ คิดเป็นร้อยละ 73.82 ผลความพึงพอใจและความเชื่อมั่นในคุณภาพการให้บริการค่าเฉลี่ยรวม 4.24 คิดเป็นร้อยละ 84.80

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 ส่งแบบสอบถามให้ผู้รับบริการรวมทั้งสิ้น 330 หน่วยงาน แบบสำรวจที่ได้รับทั้งหมด 262 ฉบับ คิดเป็นร้อยละ 79.40 ผลความพึงพอใจและความเชื่อมั่นในคุณภาพการให้บริการค่าเฉลี่ยรวม 4.28 คิดเป็นร้อยละ 85.36

ผลสำรวจความไม่พึงพอใจ ตั้งแต่ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ถึง พ.ศ. 2557 ไม่แตกต่างกัน อาทิ ด้านความรวดเร็วการให้บริการภายในระยะเวลาที่กำหนด การบริการข้อมูลหรือแนวทางปฏิบัติระหว่างการรับรองและหลังได้รับรองแล้ว การรับส่งเอกสารและการติดต่อประสานงานไม่สะดวก การตรวจประเมินของผู้ตรวจประเมินที่มีมาตรฐานต่างกัน และต้องการให้มีการจัดพิธีมอบใบรับรองอย่างสมเกียรติ เป็นต้น (ตารางที่ 1 และ 2)

ตารางที่ 1 ข้อมูลผลการดำเนินงานการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุขปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ถึง พ.ศ. 2557

รายการ	เป้าหมาย	ปีงบประมาณ (พ.ศ.)			
		2554	2555	2556	2557
1. จำนวนห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรอง	แผน	200	200	200	200
ตามมาตรฐานสากล ^a (แห่ง)	ผล	314	275	277 ^c	386 ^c
ร้อยละความสำเร็จของเป้าหมายตาม	ร้อยละ	157	138	139	193
แผนปฏิบัติการราชการ					
2. จำนวนห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองตาม	แผน	50	50	50	50
มาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ^b (แห่ง)	ผล	87	44	55	50
ร้อยละความสำเร็จของเป้าหมายตาม	ร้อยละ	174	88	110	100
แผนการปฏิบัติราชการ					
3. ร้อยละระดับความพึงพอใจของผู้รับบริการ	แผน	85	85	85	85
	ผล	82.7	83.4	84.8	85.36

^a มาตรฐานสากล หมายถึง มาตรฐานสากล ISO 15189, ISO/IEC 17025, ISO 22870, OECD GLP

^b มาตรฐานกรมกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หมายถึง มาตรฐานการรับรองสถานพยาบาลตรวจสุขภาพคนทำงานที่จะไปทำงานต่างประเทศ, การรับรองคุณภาพระบบตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักสด ผลไม้สด และการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการงานด้านอาหารและยา

^c นับรวมห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐานสากล ISO 15190

ตารางที่ 2 จำนวนห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐานสากลและมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ แยกตามกรณีการรับรอง ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ถึง พ.ศ. 2557

กรณีการรับรอง	มาตรฐานสากล				มาตรฐานกรมฯ ^a			
	2554	2555	2556	2557	2554	2555	2556	2557
จำนวนทั้งหมด (แห่ง)	314	275	277	389	87	44	55	50
การขอรับรองใหม่ (แห่ง)	41	35	27 + 8 ^a	32 + 71 ^a	10	4	4	3
การต่ออายุ (แห่ง)	55	52	68	186	65	24	8	27
การขยายขอบข่าย (แห่ง)	100	87	72	97	8	3	10	2
การเฝ้าระวัง (แห่ง)	118	101	102	0	4	13	33	18

^a จำนวนห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐานสากล ISO 15190

2. ผลการดำเนินงานการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการชั้นสูตร ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ถึง พ.ศ. 2557

ผลการดำเนินงานการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการชั้นสูตร เปิดบริการด้านชั้นสูตร สาธารณสุขใน 6 สาขา ดังนี้ สาขาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก สาขาจุลชีววิทยาคลินิก สาขาเคมีคลินิก สาขาโลหิตวิทยา สาขานาการเลือด และสาขาอิมมูโนวิทยา ให้ผู้รับบริการกลุ่มเป้าหมาย ได้แก่ ห้องปฏิบัติการของสถานพยาบาลทั้งภาค รัฐและเอกชน ที่ผ่านมาตั้งแต่ปีประมาณ พ.ศ. 2554 - 2557 มีสมาชิกผู้รับบริการ โดยเฉลี่ยต่อสาขาปีละ 984, 1057,

1090, 1016 แห่ง ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 123, 132, 132, 113 และมีจำนวนครั้งการประเมินคุณภาพ การตรวจวิเคราะห์ (รวมทุกสาขา/3 รอบต่อปี) เท่ากับ 17,730 19,026 16,350 15,324 ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ ความสำเร็จของเป้าหมายตามแผนการปฏิบัติราชการ 123, 132, 114, 114 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเป้าหมายที่กำหนด โดยมีการให้บริการห้องปฏิบัติการสมาชิกใน 6 สาขา ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 – 2555 และ 5 สาขาในปีงบประมาณ พ.ศ. 2556 – 2557 ซึ่งให้บริการ สาขาละ 3 รอบต่อปี และแบ่งแยกสมาชิกตามหน่วยงานได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ โรงพยาบาล สังกัดกระทรวงสาธารณสุข โรงพยาบาลสังกัดนอกกระทรวงสาธารณสุข และหน่วยงานภาคเอกชน โดยสัดส่วน ของสมาชิกแยกตามกลุ่มข้างต้นคิดเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ 69.8, 6.8, 23.4 ตามลำดับ โดยมีผลการสำรวจความพึงพอใจ ของผู้รับบริการ ผลสำรวจพบว่า ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 – 2557 ร้อยละระดับความพึงพอใจต่ำกว่าค่าเป้าหมาย ที่กำหนด รายละเอียดดังนี้

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ส่งแบบสอบถามให้ผู้รับบริการรวมทั้งสิ้น 1,700 หน่วยงาน แบบสำรวจที่ได้รับ ทั้งหมด 542 ฉบับ คิดเป็นร้อยละ 31.88 ผลความพึงพอใจและความเชื่อมั่นในคุณภาพการให้บริการ ค่าเฉลี่ย รวม 4.15 คิดเป็นร้อยละ 83.00

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 ส่งแบบสอบถามให้ผู้รับบริการรวมทั้งสิ้น 1,120 หน่วยงาน แบบสำรวจที่ได้รับ ทั้งหมด 573 ฉบับ คิดเป็นร้อยละ 51.16 ผลความพึงพอใจและความเชื่อมั่นในคุณภาพการให้บริการ ค่าเฉลี่ยรวม 4.14 คิดเป็นร้อยละ 82.75

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2556 ส่งแบบสอบถามให้ผู้รับบริการรวมทั้งสิ้น 400 หน่วยงาน แบบสำรวจ ที่ได้รับ ทั้งหมด 339 ฉบับ คิดเป็นร้อยละ 84.75 ผลความพึงพอใจและความเชื่อมั่นในคุณภาพการให้บริการค่าเฉลี่ยรวม 4.20 คิดเป็นร้อยละ 84.11

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 ส่งแบบสอบถามให้ผู้รับบริการรวมทั้งสิ้น 1,063 หน่วยงาน แบบสำรวจที่ได้รับ ทั้งหมด 761 ฉบับ คิดเป็นร้อยละ 71.59 มีผลการสำรวจความพึงพอใจและความเชื่อมั่นในคุณภาพการให้บริการค่า เฉลี่ยรวม 4.20 คิดเป็นร้อยละ 84.11

โดยมีผลสำรวจความไม่พึงพอใจ ตั้งแต่ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ถึง พ.ศ. 2557 ไม่แตกต่างกันดังนี้ ผู้รับ บริการมีความเห็นว่าควรปรับปรุงงานให้สามารถรองรับความต้องการของผู้รับบริการในการรับสมาชิก โดยนำเทคโนโลยี สารสนเทศมาใช้อำนวยความสะดวก และพัฒนางานให้สามารถตอบสนองความต้องการของผู้รับบริการได้ ด้านคุณภาพ ของวัตถุทดสอบที่ส่งให้สมาชิก การติดต่อประสานงานในการส่งรายงานผลวิเคราะห์ และการติดต่อสอบถามข้อมูลไม่ ได้รับความสะดวก การจัดส่งวัตถุทดสอบที่ส่งให้สมาชิกไม่ตรงเวลาที่กำหนด การส่งรายงานผลวิเคราะห์ล่าช้ากว่าแผนที่ กำหนด และการติดต่อสอบถามข้อมูลไม่ได้รับความสะดวก (ตารางที่ 3)

3. ผลการดำเนินงานการพัฒนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการชั้นสูตรสาธารณสุข ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ถึง พ.ศ. 2557

ผลการดำเนินงานการพัฒนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการชั้นสูตรสาธารณสุข โดยมีห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ภาครัฐทั่วประเทศ เป็นผู้รับบริการกลุ่มเป้าหมาย โดยตั้งแต่ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ถึง พ.ศ. 2557 โดยกำหนด เป้าหมายตามแผนปฏิบัติการจำนวน 750, 700, 700, 700 แห่ง ตามลำดับ และมีจำนวนห้องปฏิบัติการที่ได้รับการ พัฒนาระบบคุณภาพมาตรฐานห้องปฏิบัติการจำนวน 850, 830, 838, 760 แห่ง มีผลความสำเร็จจากเป้าหมาย ตามแผนการปฏิบัติราชการคิดเป็นร้อยละ 115, 119, 120, 109 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเป้าหมายที่กำหนด (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 ข้อมูลผลการดำเนินงานการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการชั้นสูตร ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ถึง พ.ศ. 2557

รายการ	เป้าหมาย	ปีงบประมาณ (พ.ศ.)			
		2554	2555	2556	2557
1. จำนวนห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการประเมิน	แผน	800	800	800	900
คุณภาพการตรวจวิเคราะห์ เฉลี่ยทุกสาขา (แห่ง)	ผล	984	1,057	1,057	1,016
ร้อยละความสำเร็จของเป้าหมายตามแผนการปฏิบัติราชการ	ร้อยละ	123	132	132	113
2. จำนวนครั้งการประเมินคุณภาพ	แผน	14,400	14,400	14,400	13,500
การตรวจวิเคราะห์ (รวมทุกสาขา/3 รอบต่อปี)	ผล	17,730	19,026	16,350	15,324
ร้อยละความสำเร็จของเป้าหมายตามแผนการปฏิบัติราชการ	ร้อยละ	123	132	114	114
3. ร้อยละระดับความพึงพอใจของผู้รับบริการ	แผน	85	85	85	85
	ผล	83	82.75	84.11	84.11

ตารางที่ 4 ข้อมูลผลการดำเนินงานการพัฒนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการชั้นสูตรมาตรฐานสุข ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ถึง พ.ศ. 2557

รายการ	เป้าหมาย	ปีงบประมาณ (พ.ศ.)			
		2554	2555	2556	2557
1. จำนวนห้องปฏิบัติการที่ได้รับการพัฒนา	แผน	750	700	700	700
ระบบคุณภาพมาตรฐานห้องปฏิบัติการ (แห่ง)	ผล	860	830	838	760
ร้อยละความสำเร็จของเป้าหมายตามแผนการปฏิบัติราชการ	ร้อยละ	115	119	120	109

วิจารณ์

จากการวิเคราะห์ข้อมูลผลการศึกษานี้ ผลสัมฤทธิ์ด้านประสิทธิผลการดำเนินงานการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุข เกินค่าเป้าหมายที่กำหนดอย่างต่อเนื่อง ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ถึง พ.ศ. 2557 ตามแผนการปฏิบัติการ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ มีการกำหนดค่าเป้าหมายคงที่มาระยะเวลา 4 ปี พบว่า มีห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐานสากลและมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สูงมากกว่าค่าเป้าหมายตามแผนที่กำหนด โดยในปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 มีห้องปฏิบัติที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐานสากล สูงมากกว่าค่าเป้าหมายคิดเป็นร้อยละ 193 ส่วนห้องปฏิบัติที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีแนวโน้มลดลงตามลำดับ เนื่องจากห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐานการรับรองสถานพยาบาลตรวจสุขภาพคนหางานที่จะไปทำงานต่างประเทศ มีการปรับเปลี่ยนไปขอการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุขตามมาตรฐานสากล ISO 15189 มากขึ้น จำนวนห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐานสากลและมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์นั้น นับรวมทุกกรณีของการดำเนินการ ได้แก่ การขอรับ

รองใหม่ การต่ออายุ การขยายขอบข่าย และการเฝ้าระวังทั้งที่เป็น Onsite assessment และ Self assessment พบว่ามีห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐานสากล ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 มีการขอรับรองใหม่จำนวนมากขึ้นจากปีก่อนประมาณ 3 เท่า เป็นผลจากจำนวนห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO 15190 ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการกลุ่มผู้รับบริการเดิมที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO 15189 และห้องปฏิบัติการได้รับการรับรองใหม่ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2556 จึงไม่ได้เป็นการขยายฐานจำนวนผู้รับบริการรายใหม่ทั้งหมด โดยสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการได้เริ่มให้การรับรองห้องปฏิบัติการด้านความปลอดภัยตามมาตรฐาน ISO 15190 สำหรับห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรอง ISO 15189 โดยไม่คิดค่าธรรมเนียมเพิ่ม ส่งผลให้มีจำนวนห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO 15190 เพิ่มขึ้น 8 แห่ง ในปี พ.ศ. 2556 และ 71 แห่ง ในปี พ.ศ. 2557 ส่วนกรณีการต่ออายุที่มีจำนวนสูงขึ้นเป็น 3 เท่าในปี พ.ศ. 2557 เมื่อเปรียบเทียบกับผลการดำเนินงานปีก่อนหน้านี้ เป็นผลจากการปรับอายุใบรับรองจาก 3 ปี เป็น 2 ปี ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ทั้งนี้เนื่องมาจากผลการจัดทำแผนพัฒนาปรับปรุงและระบบการให้บริการตามความต้องการและความคาดหวังของผู้ใช้บริการประจำปี พ.ศ. 2554 มีการปรับปรุงกระบวนการรับรองในประเด็นสำคัญ อาทิ การปรับวิธีการตรวจติดตามผลเพื่อเฝ้าระวัง ณ สถานที่ปฏิบัติงาน (Surveillance on-site assessment) เป็นวิธีการสุ่มตรวจสอบข้อมูลที่สำคัญตามความเหมาะสม (self assessment) ขึ้นอยู่กับประเภทของการเฝ้าระวังตามสถานะของแต่ละหน่วยงานที่ขอรับการรับรอง (conformity Assessment Body: CAB) เพื่อติดตามการรักษาระบบคุณภาพของ CAB ที่ผ่านการรับรองความสามารถในช่วงระหว่างที่ได้รับการรับรอง เป็นการดำเนินการในช่วงก่อนครบรอบการตรวจประเมินเพื่อต่ออายุใบรับรอง ซึ่งสามารถลดปัญหาเรื่องจำนวนผู้ตรวจประเมินไม่เพียงพอในการออกตรวจประเมินเฝ้าระวังจริงได้ครบตามจำนวนห้องปฏิบัติการที่ต้องได้รับการตรวจประเมินตามช่วงเวลาที่กำหนดรวมถึงการปรับระยะเวลาของใบรับรองจากเดิม 3 ปี เป็น 2 ปี^(๕) นอกจากนั้นยังมีการจัดทำคู่มือการให้บริการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบการแพทย์และสาธารณสุข ปรับปรุงสถานที่รับบริการให้เป็นสัดส่วนและอยู่ในห้องปรับอากาศ รวมถึงการพัฒนาศักยภาพบุคลากร โดยจัดการอบรมความเข้าใจ กระบวนการรับรองตามมาตรฐานสากลที่เกี่ยวข้อง และข้อกำหนดสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ รวมทั้งการจัดอบรมหลักสูตรการให้บริการที่ดี ซึ่งสอดคล้องกับผลการสำรวจความพึงพอใจของผู้รับบริการ ซึ่งเพิ่มขึ้นตามลำดับ แม้ว่าช่วงปีงบประมาณ พ.ศ. 2554-2556 ร้อยละความพึงพอใจของผู้รับบริการต่ำกว่าค่าเป้าหมายที่กำหนดเล็กน้อย โดยสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการได้นำประเด็นความไม่พึงพอใจ มาดำเนินการปรับปรุงกระบวนการ และกำหนดเป็นตัวชี้วัดของหน่วยงานตามคำรับรองการปฏิบัติราชการอย่างต่อเนื่อง และพบว่าผลสัมฤทธิ์ด้านคุณภาพการให้บริการมีแนวโน้มในทางที่ดีขึ้นในปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 มีร้อยละระดับความพึงพอใจของผู้รับบริการสูงกว่าค่าเป้าหมายที่กำหนด สำหรับผลการดำเนินงานของการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการชั้นสูงและการพัฒนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการชั้นสูงสาธารณสุขมีผลสัมฤทธิ์ด้านประสิทธิผลการดำเนินงาน เกินค่าเป้าหมายที่กำหนดอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากมีห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลในสังกัดกระทรวงสาธารณสุข หน่วยงานภาครัฐนอกสังกัดกระทรวงสาธารณสุข และหน่วยงานภาคเอกชน มากกว่า 1,000 แห่ง เป็นห้องปฏิบัติการสมาชิกที่ได้รับการพัฒนาศักยภาพในการรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ที่มีการจัดการสัมมนาวิชาการให้แก่ห้องปฏิบัติการสมาชิกอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้เกิดการแลกเปลี่ยนเรียนรู้ ทันต่อวิทยาการสมัยใหม่^(๖) และผู้รับบริการสามารถใช้เป็นหลักฐานส่วนหนึ่งในการขอรับการรับรองตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการได้อีกด้วย แต่อย่างไรก็ดีผลสัมฤทธิ์ด้านคุณภาพการให้บริการของการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการชั้นสูง พบยังมีปัญหาด้านความไม่พึงพอใจในประเด็นเดิมต่อเนื่อง ได้แก่ การจัดส่งวัตถุดิบทดสอบที่ส่งให้สมาชิกไม่ตรงเวลาที่กำหนด การส่งรายงานผลวิเคราะห์ล่าช้ากว่าแผนที่กำหนด และไม่สามารถขยายสาขาการให้บริการตามความต้องการของผู้รับบริการ ซึ่งจากการวิเคราะห์ปัญหาในกลุ่มงานอาจเกิดจากบุคลากรไม่เพียงพอ เนื่องจากมีการเกษียณอายุราชการ โอนย้าย และลาออก ส่งผลกระทบต่ออัตรากำลังบุคลากรรวมถึงศักยภาพและขีดความสามารถของบุคลากร ที่ยังขาดประสบการณ์ และความเชี่ยวชาญในการปฏิบัติงาน สำหรับงานการพัฒนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการชั้นสูงสาธารณสุข ไม่มีการรายงานผลสำรวจความพึงพอใจของผู้รับบริการ เนื่องจากการดำเนินงานเชิงบูรณาการร่วมกับศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ และไม่ได้กำหนดเป็นตัวชี้วัดระดับความพึงพอใจของหน่วยงาน

สรุป

การศึกษาในครั้งนี้ เพื่อประเมินผลสัมฤทธิ์ด้านประสิทธิผลและด้านคุณภาพการให้บริการ การดำเนินงานตามภารกิจหลักด้านการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุข การประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการชั้นสูตร และการพัฒนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการชั้นสูตรสาธารณสุข มีผลประเมินการดำเนินงานตั้งแต่ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 – 2557 เกินค่าเป้าหมาย ที่กำหนดอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นในการนำข้อมูลผลการดำเนินงานในช่วง 4 ปีที่ผ่านมา เพื่อวางแผนบูรณาการแผนงาน และการจัดทำแผนการปฏิบัติราชการ 4 ปี (พ.ศ. 2559-2562) ของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ด้านประสิทธิผล ต้องมีการปรับค่าเป้าหมายหรือขยายศักยภาพการให้บริการให้เกิดความท้าทาย เชิงยุทธศาสตร์ เพื่อให้บรรลุผลการดำเนินการที่เป็นเลิศ โดยสามารถเทียบเคียงและแข่งขันได้กับองค์กรที่เป็นเลิศ หรือที่มีผู้รับบริการกลุ่มเดียวกัน เพื่อรักษาฐานกลุ่มผู้รับบริการไว้ และขยายความร่วมมือกับหน่วยงานอื่นให้ได้มาซึ่งงบประมาณและทุนสนับสนุนเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพ ประสิทธิผล ของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการทั้งในด้านพันธกิจ ด้านปฏิบัติการ และด้านทรัพยากรบุคคลให้มีจำนวนเพียงพอและมีศักยภาพสูงในการปฏิบัติงานสำหรับด้านคุณภาพการให้บริการ จากผลการสำรวจความพึงพอใจและความเชื่อมั่นในคุณภาพการให้บริการ การดำเนินงานตามภารกิจหลัก สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ อยู่ในระดับพอใจและเชื่อมั่น แต่เป็นผลการวัดและวิเคราะห์โดยไม่มีคู่เทียบ ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์สถานะของหน่วยงานในปัจจุบัน จึงจำเป็นต้องให้ความสำคัญกับผู้รับบริการในปัจจุบันและอนาคต โดยมุ่งเน้นถึงความสามารถในการตอบสนองผู้รับบริการ รวมทั้งทำให้บุคลากรมีความพึงพอใจและแรงจูงใจ ในการมุ่งสู่ความเป็นเลิศ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบุคลากรทุกกลุ่ม/ฝ่าย ของสำนักมาตรฐานงานห้องปฏิบัติการ ที่ให้ความสำคัญกับงานการบริหารจัดการภาครัฐ การดำเนินการตามแผนปฏิบัติราชการ และคำรับรองการปฏิบัติราชการและสนับสนุนข้อมูลผลการดำเนินงานของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาระบบราชการ. เกณฑ์คุณภาพการบริหารจัดการภาครัฐ พ.ศ. 2558. กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาระบบราชการ; 2557.
2. ทิพวรรณ หล่อสุวรรณรัตน์. เครื่องมือการจัดการ = Management tools. กรุงเทพฯ : สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์; 2550.
3. กิตติ บุญนาค. กลยุทธ์การบริหารความเสี่ยงสำหรับนักบริหาร. กรุงเทพฯ : สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์; 2554.
4. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ. รายงานประจำปี 2554. นนทบุรี : สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2554.
5. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ. รายงานประจำปี 2555. นนทบุรี : สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2555.
6. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ. รายงานประจำปี 2556. นนทบุรี : สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2556.
7. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ. รายงานประจำปี 2557. นนทบุรี : สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2557.
8. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ. นโยบายการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบด้านการแพทย์และสาธารณสุข 2558. นนทบุรี : สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2558.
9. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ. สรุปการสัมมนาการพัฒนาศักยภาพการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ 2557. นนทบุรี : สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2557.

The Achievement of the Effectiveness of Operations and the Quality of Services Based on the Performance of the Bureau of Laboratory Quality Standards For the Fiscal Years 2011-2014

Amornrat Tatsanakit and Chomchailai Sinthusarn

Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences, Tiwanond. Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT The Bureau of Laboratory Quality Standards, a service-based unit under the Ministry of Public Health, offers the standard accreditation and external quality assessment of medical and public health laboratory services for the public and private sectors and also promotes the establishment of public health laboratories network. The study, conducted to assess the effectiveness of operations and the quality of services based on the Action Plan of the Bureau of Laboratory Quality Standards for the fiscal years 2011-2014, illustrates the results as follows: According to the study, the effectiveness of operations was quantitatively analyzed by the Bureau's performance based on indicators of the Action Plan for the fiscal years 2011- 2014 and the results were shown by the fiscal years 2011, 2012, 2013 and 2014 respectively. The results of the study indicate that 157, 138, 138 and 193 percent of medical and public health laboratories have been accredited by international standards, that 174, 88, 110 and 100 percent of medical laboratories have been accredited by the Department of Medical Sciences standard, that 123, 132, 132 and 113 percent of medical laboratories participated in the external quality assessment and that 115, 119, 120 and 109 percent of laboratories have been improved for the standardization system. Furthermore, the results of the quality of services were evaluated by the percentage of customer's satisfaction for the fiscal years 2011, 2012, 2013 and 2014 respectively. The results of the study indicate that 82.70, 83.40, 84.80 and 85.36 percent of customers have been satisfied with the process of medical laboratories accreditation and that 83.00, 82.75, 84.11 and 84.11 percent of customers have been satisfied with the process of medical laboratories external quality assessment. However, the customer-satisfaction survey of medical laboratories network establishment was not carried out. The results of the study can be applied to the development of the Action Plan of the Bureau of Laboratory Quality Standards for the fiscal years 2016-2019, the promotion of the Bureau's integrated program and the major function of the Bureau in providing people quality services as determined by the policy and objectives of the Department of Medical Sciences.

Key words: Effectiveness, Quality of services, Bureau of Laboratory Quality Standards

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	Apichai Mongkol	Jureporn Boonyawongvirot
	Varunee Jinaratana	Wanchai Sattayawuthipong
Technical Advisor	Amara Vongbuddhapitak	Mayura Kusum
	Jongdee Wongpinairat	Pimjai Naigowit
	Supatra Im-Erb	Sumol Pavittranon
	Panadda Silva	
Editor	Yaowapa Pongsuwanna	
Editorial Board	Somchai Bovornkitti	Prasert Auewarakul
	Orasa Suthienkul	Pilaipan puthavathana
	Aree Thattiyaphong	Jurai Chotichanathawewong
	Siri Srimanoroth	Usavadee Thavara
	Kanokporn Atisook	Wichuda Jariyapan
	Suthon Vongsheree	Malinee Chittaganpitch
	Suwanna Tienungoon	Siripakorn Sangkitporn
	Wimol Petkanchanapong	Prapai Wongsinkongman
	Charoendee Pingsuthiwong	Walailuk Matapatara
	Areerat Sa-ngasang	
Secretary	Paiwan Boonwong	
Administration	Namfon Noiprasert	
	Prasan Julwong	
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	Aroonkarnphim Ltd., Part. 457/6-7 Phra Sumen Road, Bangkok 10200 Tel. 0-2282-6033-4	



มุ่งมั่นพัฒนา คำนึงวิจัย ฉบับบริการ มาตรฐานสากล

www.dmsc.moph.go.th