

วารสาร



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 57 ฉบับพิเศษ 1 กรกฎาคม - กันยายน 2558 Vol. 57 Supplement 1 July - September 2015

ISSN 0125-684X

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยและแลกเปลี่ยนความรู้ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ ที่ปรึกษาด้านบริหาร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นพ.อภิชัย มงคล พญ.วารุณี จินารัตน์	นางจุรีภรณ์ บุญวงศ์โรจน์ นพ.วันชัย สัตยาวิมลพงศ์
ที่ปรึกษาด้านวิชาการ	ภญ.อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์ ภญ.ดร.จตุร ว่องพินัยรัตน์ ภญ.สุภัทรา อิมเอิบ ดร.ปนัดดา ชิลวา	พญ.มยุรา กุสุมภ์ นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท ภญ.ดร.สุมล ปวีตรานนท์
บรรณาธิการ	สพญ. ดร.เยาวภา พงษ์สุวรรณ	
คณะบรรณาธิการ	ศ. ดร. นพ.สมชัย บวรกิตติ ศ. ดร.อรสา สุตเธียรกุล ดร.อารี ทัตติยพงศ์ นายศิริ ศรีมโนรณ นางกนกพร อธิสุข นายสุธน วงษ์ชีรี ดร.สุวรรณมา เจริญอักษร ดร.วิมล เพชรกาญจนางค์ ภญ.ดร.เจริญดี ปิงสุทธีวงศ์ ดร.อารีรัตน์ สง่าแสง	ศ. ดร. นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล ศ. ดร.ไพโรจน์ พุฒินันท์ นางสาวจุไร โชติธนาทวิวงศ์ ดร.อุษาดี ถาวร นางวิชุดา จริยะพันธ์ นางสาวมาลินี จิตตกานต์พิชัย นางสิริภากร แสงกิจพร ดร.ประไพ วงศ์สินคงม่น ภญ.ดร.วัลย์ลักษณ์ เมธาภัทร
เลขานุการ	นางไพรวรรณ บุญวงศ์	
ฝ่ายธุรการ	นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ นางสาวประสาน จุลวงษ์	
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 1 กรกฎาคม - กันยายน 2558

Vol. 57 Supplement 1 July - September 2015

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ฮอร์โมนอินซูลิน ในรูปแบบ
ยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน 1
วิภาพรรณ ไสยสมบัติ สุภาณี ดวงธีรปรีชา สุภาวดี สุรางค์กุล และประสิทธิ์ โอภาส
การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม 20
ในยาจากสมุนไพร โดยวิธี **Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry**
สุภาณี ดวงธีรปรีชา จิราณัฐ แจ่มทวีกุล ประภาพรรณ สุขพรรณ และปรัชญาพร อินทองแก้ว
การพัฒนาระบบบริหารคุณภาพห้องปฏิบัติการของสำนักยาและวัตถุเสพติด 34
อนงค์นุช เนยเมืองปัก
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของภาชนะพลาสติกสำหรับ 46
บรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ โดยวิธี **Agar Diffusion**
ปิวิมา เจริญสิทธิ์ และทวีทรัพย์ ชัยสมบูรณ์พันธ์
การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โปรตีนในผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการ 54
ย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองโดยการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการที่มีความเชี่ยวชาญ
นิภาภรณ์ ลักษณะสมยา และจินตนา กิจเจริญวงศ์
ผลกระทบของการล้างผักบริโภคดิบเพื่อลดสารตกค้างที่มีต่อปริมาณพยาธิปนเปื้อน 72
ทงนพันธ์ สัจจปาละ กนกวรรณ ตุ่นสกุล และชั้นทอง เพ็ชรนอก
การพัฒนาการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในระดับสปิชีส์ โดยวิธี **Multiplex PCR** 88
ปนัดดา เทพอัศธร พันธธิดา ตริยวง สกฤรัตน์ สุนทรจัตราวัฒน์ และอนิชา เลื่องชัยเชวง
พัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยโรคสมองอักเสบชนิดเฉียบพลันด้วยเทคนิค **RT-PCR** และ **Real Time RT-PCR** 102
อัจฉริยา ลูกบัว อธิวัฒน์ ปริณสิริคุณาวุฒิ พัทธชา อินคำสืบ ศิริมา ปัทมดิลก
และปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

- การสำรวจปริมาณสารหล่อลื่นในอุ้งยางอนามัยที่จำหน่ายในประเทศไทย 115
สถาพร กล่อมแก้ว สุภาวรรณ จงธรรมวัฒน์

บทความทั่วไป

- การเตรียมความพร้อมเพื่อรองรับความสามารถห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ 121
ตามมาตรฐาน **ISO 15189:2012** ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง
สุภาภรณ์ นิยมแก้ว และธรรณชนก พัทธกิจ

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 57 ฉบับพิเศษ 1 กรกฎาคม - กันยายน 2558

Vol. 57 Supplement 1 July - September 2015

CONTENTS

Page

Original Articles

- Development and Validation Method for Determination of Azithromycin Capsules and Azithromycin for Oral Suspension** 1
Wipapan Saiyasombat Supanee Duangteraprecha Supawadee Surangkul and Prasit Opas
- Method Development and Validation for Determination of Arsenic, Lead and Cadmium in Herbal Medicines by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry** 20
Supanee Duangteraprecha Jiranuch Jamtaweekul Prapapan Sukphan and Prachyaporn Inthongkaew
- Development of the Laboratory Quality Management System: Bureau of Drug and Narcotic** 34
Anongnut Noeimuangpak
- Cytotoxicity Testing of Plastic Parenteral Container by Agar Diffusion Technique** 46
Paveena Charoensit and Daweesapya Chaisomboonpan
- Collaborative Study for Protein in Seasoning Sauce** 54
Niphaporn Lakshanasomya and Jintana Kitcharoenwong
- Impact of Washing Methods for Reduction of Pesticide Residues in Raw Vegetables on Parasitic Contamination** 72
Tanongpan Satjapala Kanogwan Toonsakool and Kuntong Pednog
- Development of Multiplex PCR for *Plasmodium* Species Detection** 88
Panadda Dhepakson Pantida Treeyoung Sakulrat Soonthorncharttrawat and Anicha Luengchaichaweng
- Establishment of RT-PCR and Real Time RT-PCR assay for Diagnosis of Nipah Virus Encephalitis** 102
Atchariya Lukebua Athiwat Primsirikunawu Patcha Incomserb Sirima Pattamadilok and Pathom Sawanpanyalert

Laboratory Findings

- Determination of Lubricant for Condoms in Markets in Thailand** 115
Sataporn Klomkaew and Supawan Chongthamawat

General Articles

- Preparation Guidelines for Laboratory Accreditation of Public Health Laboratory According to ISO 15189: 2012 of the Regional Medical Sciences Center 12/1 Trang** 121
Supaporn Niyomkaew and Thanchanok Pitak

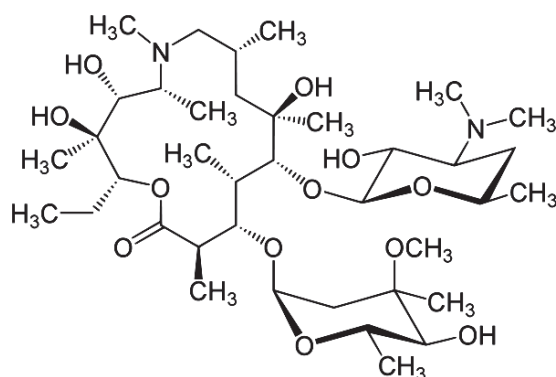
การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ อะซิโตรมัยซิน ในรูปแบบยาแคปซูลและยาผง สำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน

วิภาพรรณ ไสยสมบัติ สุภาณี ดวงธีรปรีชา สุภาวดี สุรางค์กุล และประสิทธิ์ โอภาส
สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์อะซิโตรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนด้วยวิธีเรเวอร์สเฟสไฮเพอร์ฟอร์แมนซิลิคิดโครมาโทกราฟี โดยใช้คอลัมน์ชนิด XTerra C18 ขนาด 4.6- × 150-มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สารละลายตัวพาประกอบด้วยส่วนผสมของ acetonitrile, methanol และสารละลายของ dibasic potassium phosphate กับ sodium 1-octanesulfonate pH 8.20 ในอัตราส่วน 21:40:39 โดยปริมาตร อัตราการไหลของตัวพา 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี พบว่าพีคของอะซิโตรมัยซินสามารถแยกจากสารละลายตัวของอะซิโตรมัยซินที่เกิดจากการเร่งให้สลายตัวด้วยสภาวะต่างๆ เช่น ความร้อน แสง กรด เบส และออกซิเดชัน การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9979 การทดสอบความแม่นยำของวิธี พบว่าร้อยละของการคืนกลับของอะซิโตรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 99.48, 99.20 ตามลำดับ และมีค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.28, 0.61 ตามลำดับ การทดสอบความทำซ้ำได้ให้ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของอะซิโตรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนเท่ากับ 1.3 และ 1.1 ตามลำดับ ความเที่ยงของการวิเคราะห์ต่างวัน ต่างนักวิเคราะห์และใช้เครื่องมือต่างกัน พบว่าค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของอะซิโตรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนเท่ากับ 1.4 และ 1.1 ตามลำดับ วิธีวิเคราะห์มีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ ที่ทดสอบ คือ คอลัมน์ ความเป็นกรด-เบสของสารละลายตัวพา อุณหภูมิ อัตราส่วนของสารละลายตัวพาและอัตราการไหลของสารละลายตัวพา จากผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมในการนำไปใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณอะซิโตรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน ซึ่งจากการนำวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวไปตรวจวิเคราะห์คุณภาพยาอะซิโตรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลจำนวน 15 ตัวอย่าง และยาอะซิโตรมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนจำนวน 8 ตัวอย่าง โดยใช้เกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดตามตำราของประเทศไทย (USP 35) พบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีคุณภาพเข้ามาตรฐานตามเกณฑ์ที่กำหนด

บทนำ

อะซิโธรมัยซิน (Azithromycin) เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มของ macrolide ซึ่งมีโครงสร้างหลักทางเคมีแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลักตามจำนวนคาร์บอนอะตอมในวงแหวน macrolides ได้แก่ 14, 15 และ 16 อะตอม อะซิโธรมัยซินเป็น macrolide ที่มีวงแหวน 15 อะตอม หรือ azalide เป็นยาที่เติมอะตอมของไนโตรเจน ทำให้ยามีคุณสมบัติเป็นด่างเพิ่มขึ้น ยานี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *H.influenza* มากกว่าอิริโธรมัยซินซึ่งเป็นยาตัวแรกในกลุ่ม macrolide ที่ออกจำหน่าย 2-8 เท่า ทนกรดได้ดีกว่า มีคุณสมบัติละลายในไขมันได้ดีและแตกตัวน้อยจึงกระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ดี ทำให้ระดับยาในเนื้อเยื่อสูงขึ้น สามารถรับประทานเพียงครั้งเดียวต่อวัน⁽¹⁾ อะซิโธรมัยซินออกฤทธิ์ได้ดีกับเชื้อแบคทีเรียทั้งกรัมบวก กรัมนลบ และ Anaerobes สามารถใช้รักษาการติดเชื้อในทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่าง รวมทั้ง atypical pneumonia โรคติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์และใช้รักษาและป้องกัน Mycobacterium Avium Complex (MAC) ในผู้ป่วยเอดส์⁽²⁾ อะซิโธรมัยซินมีลักษณะเป็นผงสีขาว⁽³⁾ ละลายน้ำได้น้อย แต่ละลายได้ดีในเมทานอล (Methanol) อะเซโตนไทร (Acetonitrile)⁽⁴⁾ มีชื่อทางเคมีว่า (2R, 3S, 4R, 5R, 8R, 10R, 11R, 12S, 13S, 14R)-13-[(2,6-dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl- α -L-ribo-hexo pyranosyl) oxy]-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-11-[[3,4,6-trideoxy-3-(dimethylamino)- β -D-xyl o-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-one มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$ น้ำหนักโมเลกุล 749.0 และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังนี้ (ภาพที่ 1)⁽⁵⁾



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของอะซิโธรมัยซิน

จากคุณสมบัติในการรักษาการติดเชื้อที่ครอบคลุมหลายระบบในร่างกายและสามารถรับประทานวันละครั้งเป็นเวลา 3 วัน มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการรักษา ทำให้มีการใช้ยาดังกล่าวอย่างกว้างขวาง และยังจัดเป็นยาในบัญชียาหลักแห่งชาติ ปัจจุบันมีอะซิโธรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลที่ขึ้นทะเบียนตำรับในประเทศไทย 11 ตำรับ จำแนกเป็นผลิตในประเทศ 9 ตำรับ และนำเข้าจากต่างประเทศ 2 ตำรับ รูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนที่ขึ้นทะเบียนตำรับในประเทศไทย 6 ตำรับ จำแนกเป็นผลิตในประเทศ 5 ตำรับ และนำเข้าจากต่างประเทศ 1 ตำรับ⁽⁶⁾ วิธีตรวจวิเคราะห์อะซิโธรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน มีวิธีมาตรฐานในตำรายาของสหรัฐอเมริกา (USP)⁽⁷⁾ แต่ต้องใช้อุปกรณ์ในการตรวจวัดสัญญาณที่ไม่มีใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ (Amperometric electrochemical detector) ดังนั้นจึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาอะซิโธรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน โดยใช้เทคนิค RP-HPLC ที่ใช้อุปกรณ์ในการตรวจวัดสัญญาณที่มีใช้กันทั่วไปในห้องปฏิบัติการและมีวิธีการวิเคราะห์ที่เหมือนกัน และตรวจสอบความถูกต้องตามหลักเกณฑ์ของตำรายา USP⁽⁷⁾ และ ICH Guideline⁽⁸⁾ โดยศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธี ความเป็น

เส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ ความแม่นยำ และความคงทนของวิธี เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานของสำนักยาและวัตถุเสพติด ในการวิเคราะห์คุณภาพยาอะซิโtromycin ในรูปแบบยาแคปซูลและรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน ในโครงการสำรวจคุณภาพยาดังกล่าวที่มีจำหน่ายในประเทศไทย เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคให้ได้ใช้ยาที่มีคุณภาพ และประสิทธิภาพในการรักษาโรค

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) with UV/PDA Detector : ผลิตภัณฑ์ของ Waters, Millipore Corporation, USA, Model Waters 2695-1996-Empower
2. High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) with UV/PDA Detector : ผลิตภัณฑ์ของ Agilent, Germany, Model Agilent 1100 Series
3. HPLC Column XTerra C18, 5 μm , 4.6 $\times$ 150 mm, Lot No. 0211311851
4. HPLC Column XBridge C18, 5 μm , 4.6 $\times$ 150 mm, Lot No. 0111381701
5. Analytical Balance : Model AT261 Deltarange, Mettler Toledo, Switzerland
6. Analytical Balance : Model MX5, Mettler Toledo, Switzerland
7. เครื่องกรองน้ำ : Model Milli-Q Advantage A10, Millipore, USA
8. Syringe filter: Nylon 0.45 μm
9. เครื่องแก้ว class A

สารมาตรฐานและสารเคมี

1. Azithromycin: USP RS
2. Azaerythromycin A: USP RS
3. Water: High Purity
4. Acetonitrile: HPLC
5. Methanol: HPLC
6. Dibasic potassium phosphate
7. Sodium 1-octanesulfonate
8. Monobasic ammonium phosphate
9. Ammonium hydroxide
10. Phosphoric acid

ตัวอย่าง

ตัวอย่างยาอะซิโtromycin ในรูปแบบยาแคปซูลประกอบด้วยปริมาณตัวอย่างอะซิโtromycin 250 มิลลิกรัมต่อแคปซูล

ตัวอย่างยาอะซิโtromycin ในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนประกอบด้วยปริมาณตัวอย่างอะซิโtromycin 200 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร

Placebo (ส่วนประกอบของยาที่ไม่มีตัวยาสำคัญ) ของยาอะซิโtromycin ในรูปแบบยาแคปซูลและในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนได้จากผู้ผลิต

วิธีการทดสอบ**สภาวะของระบบโครมาโทกราฟ (HPLC)**

คอลัมน์ :	HPLC Column XTerra C18, 5 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm, Lot No. 0211311851
อุณหภูมิของคอลัมน์ :	50 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล :	1.5 ml/min
สารละลายตัวพา :	Acetonitrile, Methanol, Solution A (21:40:39) (Solution A = A solution containing 4.4 mg/ml of dibasic potassium phosphate and 0.5 mg/ml of sodium 1-octanesulfonate, and adjust with phosphoric acid to a pH of 8.20 $\pm$ 0.05)
เครื่องตรวจวัด :	PDA 210 nm
ปริมาตรที่ฉีด :	50 μ l

System suitability

The resolution between azaerythromycin A and azithromycin is not less than 2.5.

The column efficiency is not less than 1000 theoretical plates.

The tailing factor for the analyte peak is 0.9–1.5.

The relative standard deviation for replicate injections is not more than 2.0%.

การเตรียมตัวทำละลาย (Diluent A)

Diluent A :	Acetonitrile, Methanol, Solution B (30:35:35) (Solution B = A solution containing 1.7 mg/ml of monobasic ammonium phosphate, and adjust with ammonium hydroxide to a pH of 10.00 $\pm$ 0.05)
-------------	---

การเตรียมสารละลายมาตรฐานอะซิโทรมัยซิน

ชั่งสารมาตรฐานอะซิโทรมัยซิน ประมาณ 4 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายประมาณ 7 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายหมด เจือจางด้วยตัวทำละลายจนครบปริมาตร กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

การเตรียมสารละลาย Resolution

1. ชั่งสารมาตรฐานอะซิโทรมัยซิน ประมาณ 4 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายประมาณ 7 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายหมด เจือจางด้วยตัวทำละลายจนครบปริมาตร

2. ชั่งสารมาตรฐาน Azaerythromycin A ประมาณ 2 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Acetonitrile ประมาณ 7 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายหมด เจือจางด้วย Acetonitrile จนครบปริมาตร

3. ปิเปตสารละลายข้อ 1 จำนวน 1.0 มิลลิลิตร และสารละลายข้อ 2 จำนวน 2.0 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 20 มิลลิลิตร เจือจางด้วยตัวทำละลายจนครบปริมาตร กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

การเตรียมสารละลายตัวอย่างในการหาปริมาณด้วยสำคัญ (Content of active ingredient)

ซึ่งตัวอย่างยาให้มีปริมาณด้วยอะซิโทรัมัยซิน 100 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำทำละลายประมาณ 200 มิลลิลิตร นำไปเขย่า 30 นาที ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย กรองผ่านแผ่นกรอง ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

การเตรียมสารละลายตัวอย่างในการหาการละลายของตัวยา (Dissolution)

ทำการตรวจหาการละลายของตัวยาจากแคปซูล โดยใช้วิธีและมาตรฐานตาม USP 35 ดังนี้ apparatus 2 ความเร็ว 100 รอบต่อนาที มีตัวกลางในการละลายเป็น sodium phosphate buffer pH 6.0 ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ± 0.5 องศาเซลเซียส ในเวลา 45 นาที กรองสารละลายที่ได้ผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยสำคัญ

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

1. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)

ซึ่งสารมาตรฐานอะซิโทรัมัยซิน ประมาณ 4 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร นำมาทำให้ละลายตัวในสถานะต่าง ๆ หลังจากนั้นเติมน้ำทำละลายประมาณ 7 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายหมด ปรับ pH ของสารละลายเฉพาะสถานะที่ 1 และ 2 เจือจางด้วยตัวทำละลายจนครบปริมาตร กรองสารละลายผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

สถานะต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดการละลายตัว

- 1) เติม 10 N Sodium hydroxide จำนวน 1 หยด แล้วนำไปต้มที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง
- 2) เติม 0.5 N Hydrochloric acid จำนวน 1 หยด
- 3) เติม 0.1% Hydrogen peroxide จำนวน 1 หยด
- 4) เติมน้ำจำนวน 1 หยดแล้วนำไปต้มที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง
- 5) นำไปผึ่งแดดนาน 6 ชั่วโมง^(9, 10)

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานที่ทำให้เกิดการละลายตัวที่สถานะต่าง ๆ ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อศึกษาการรบกวนจากสารละลายตัว คำนวณร้อยละของการละลายตัวโดยเปรียบเทียบกับค่าพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานที่สถานะปกติ

ซึ่งสถานะต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดการละลายตัวได้จากการทดลองทำการศึกษาเอง สำหรับสถานะที่ 2 และ 3 ไม่ต้องนำไปต้มต่อ เนื่องจากเมื่อเติมน้ำที่แรงทำให้เกิดการละลายตัวแล้วพบว่าสารที่ทำการศึกษาเกิดการละลายตัวแล้ว

2. การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

เตรียมสารละลายมาตรฐานอะซิโทรัมัยซิน ในตัวทำละลายให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายดังกล่าวให้มีความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเตรียมความเข้มข้นละ 3 ขั้ว กรองสารละลายผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีค สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ซึ่งต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995

3. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ทดสอบความแม่นยำของวิธีโดยวิเคราะห์ Placebo ที่เติมสารมาตรฐานอะซิโทรัมัยซิน (Spiked placebo) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.12, 0.4 และ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 30, 100 และ 140 ของระดับความเข้มข้นที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณอะซิโทรัมัยซินในตัวอย่าง ตามลำดับ สำหรับยาอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูล เตรียมโดยการซึ่งสารมาตรฐานอะซิโทรัมัยซินประมาณ 3, 10 และ 14 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน)

ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร และซั่ง placebo ประมาณ 8 มิลลิกรัม ลงในแต่ละ volumetric flask สำหรับอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนเตรียมโดยการชั่งสารมาตรฐานอะซิโทรัมัยซิน ประมาณ 3, 10 และ 14 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร และซั่ง placebo ประมาณ 270 มิลลิกรัม ลงในแต่ละ volumetric flask ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ ปริมาณอะซิโทรัมัยซินทั้งหมดที่มีในสารละลายเพื่อคำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) ของแต่ละระดับ ความเข้มข้น หาค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ (% mean recovery) และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%Relative Standard Deviation, %RSD) โดยที่ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับของอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบ ยาแคปซูล ต้องอยู่ในช่วง 98.0–102.0 และค่า %RSD ไม่เกิน 2.0 ส่วนค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับของ อะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน ต้องอยู่ในช่วง 97.0–103.0 และค่า %RSD ไม่เกิน 2.0

4. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

4.1 ความทำซ้ำได้ (Repeatability)

วิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญในตัวอย่างอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและอะซิโทรัมัยซินใน รูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน จำนวน 6 ซ้ำ โดยทดสอบในวันและสภาวะเดียวกัน คำนวณปริมาณ อะซิโทรัมัยซินต่อหน่วย ค่าเฉลี่ย และ %RSD โดย %RSD ต้องไม่เกิน 2.0

4.2 Intermediate Precision

วิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญในตัวอย่างอะซิโทรัมัยซินชนิดแคปซูลและอะซิโทรัมัยซินชนิดผงสำหรับเตรียม เป็นยาน้ำแขวนตะกอน จำนวน 6 ซ้ำ โดยเปลี่ยนนักวิเคราะห์ เปลี่ยนวัน และเปลี่ยนเครื่อง HPLC คำนวณปริมาณ อะซิโทรัมัยซินต่อหน่วย ค่าเฉลี่ย และ %RSD โดย %RSD ต้องไม่เกิน 2.0

5. การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

ศึกษาผลกระทบต่อการวิเคราะห์ยาจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ ของระบบโครมาโทกราฟี คือ คอลัมน์ อัตราส่วนของสารละลายตัวพา ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ของสารละลายบัฟเฟอร์ในสารละลายตัวพา อุณหภูมิของ คอลัมน์และอัตราการไหลของสารละลายตัวพา โดยวิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญในตัวอย่างอะซิโทรัมัยซิน จำนวน 3 ซ้ำ ศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆ ที่อาจมีผลกระทบต่อความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี เช่น resolution ระหว่าง azithromycin และ azaerythromycin A ต้องไม่น้อยกว่า 2.5 ลักษณะรูปร่างของพีค (tailing factor) retention time และ theoretical plates เปรียบเทียบผลวิเคราะห์ที่ได้โดยคำนวณค่า %RSD ต้องไม่เกิน 2.0

6. การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)

เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 ที่กำหนดให้มีการประเมินค่าความไม่แน่นอนของ การวัด ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ โดยคำนึงถึงแหล่ง ของความไม่แน่นอนทุกแหล่ง และเป็นไปตามแนวทางการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ด้าน ยาและวัตถุเสพติด^(11, 12) ซึ่งความไม่แน่นอนของการวัดเป็นค่ารวมของผลกระทบทั้งหมดที่มีต่อผลทดสอบที่เป็นเชิง ปริมาณ ดังนั้น แหล่งที่มาของความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ปริมาณอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผง สำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนพิจารณาได้จากสูตรคำนวณ คือ

$$\text{ปริมาณอะซิโทรัมัยซิน (มิลลิกรัมต่อหน่วย)} = \frac{\text{Peak area}_{\text{sample}}}{\text{Peak area}_{\text{std}}} \times \frac{W_{\text{std}}}{D_{\text{std}}} \times \frac{P}{100} \times D_{\text{sam}} \times \frac{\text{Av. Wt./unit}}{W_{\text{sample}}}$$

peak area _{sample}	= พื้นที่ใต้พีคอะซิโทรัมัยซินในสารละลายตัวอย่าง
peak area _{std}	= พื้นที่ใต้พีคอะซิโทรัมัยซินในสารละลายมาตรฐาน
W _{std}	= น้ำหนักของสารมาตรฐานอะซิโทรัมัยซิน (มิลลิกรัม)
D _{std}	= Dilution factor ของสารมาตรฐาน
P	= ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน (% purity)
D _{sample}	= Dilution factor ของตัวอย่าง
Av.Wt/unit	= น้ำหนักผงยาเฉลี่ยต่อแคปซูลหรือน้ำหนักยาเฉลี่ยต่อซองชา (กรัม)
W _{sample}	= น้ำหนักยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ (กรัม)

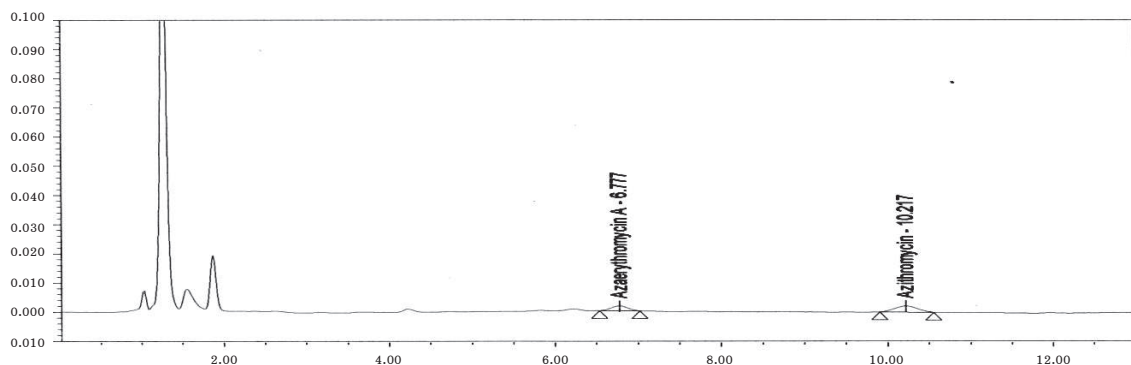
7. การศึกษาคุณภาพยาอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน

วิเคราะห์อะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนในหัวข้อปริมาณตัวยาสำคัญ (Assay) ความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย (Weight Variation) การละลายของตัวยา (Dissolution) ความเป็นกรด-เบส (pH) และปริมาณน้ำ (Water) โดยใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นและผ่านการตรวจสอบความถูกต้อง ในการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญและการละลายของตัวยา

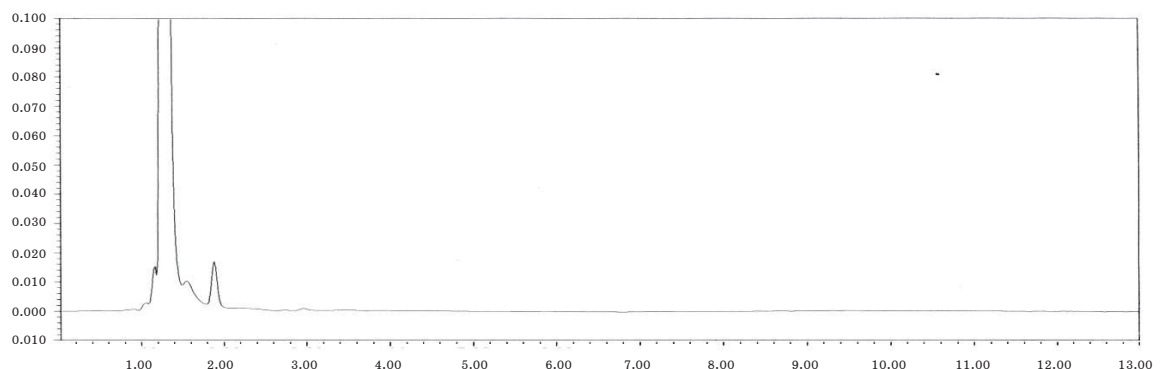
ผล

1. การทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ (Chromatographic system suitability)

จากการฉีดสารละลาย Resolution เพื่อตรวจสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ พบว่าระบบโครมาโทกราฟสามารถแยก azaerythromycin A และ azithromycin จากกัน (ภาพที่ 2) โดยมี retention time ประมาณ 6.8 และ 10.2 นาที ตามลำดับ และมีค่า resolution เท่ากับ 7.6 โดยไม่มีผลรบกวนจากตัวทำละลาย (Diluent A) (ภาพที่ 3)



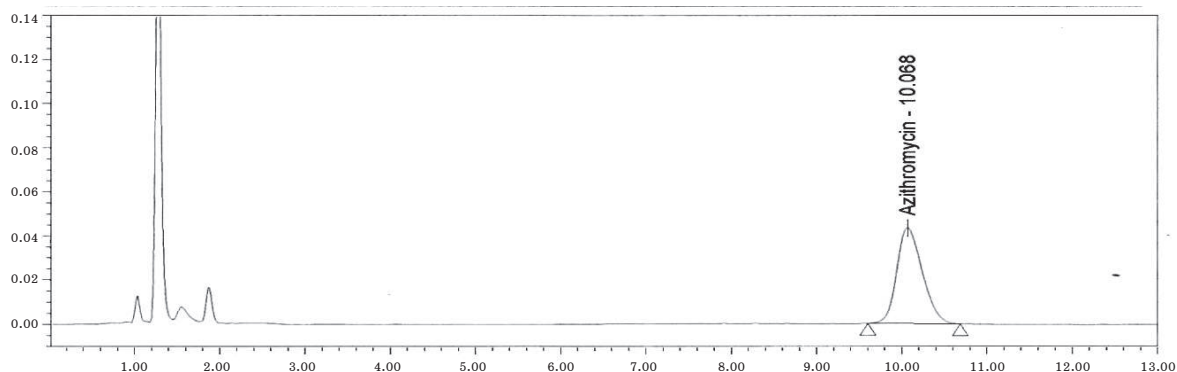
ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารละลาย Resolution



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของตัวทำละลาย (Diluent A)

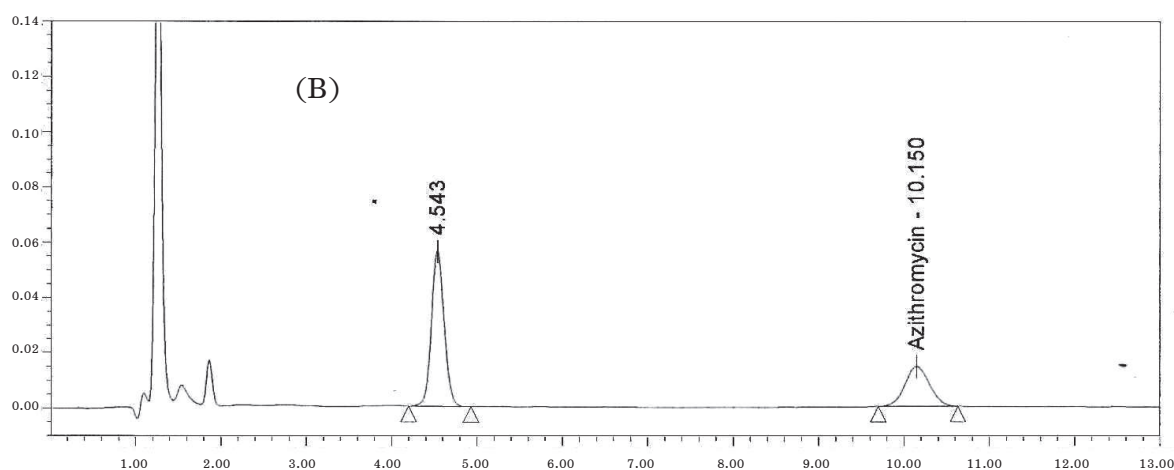
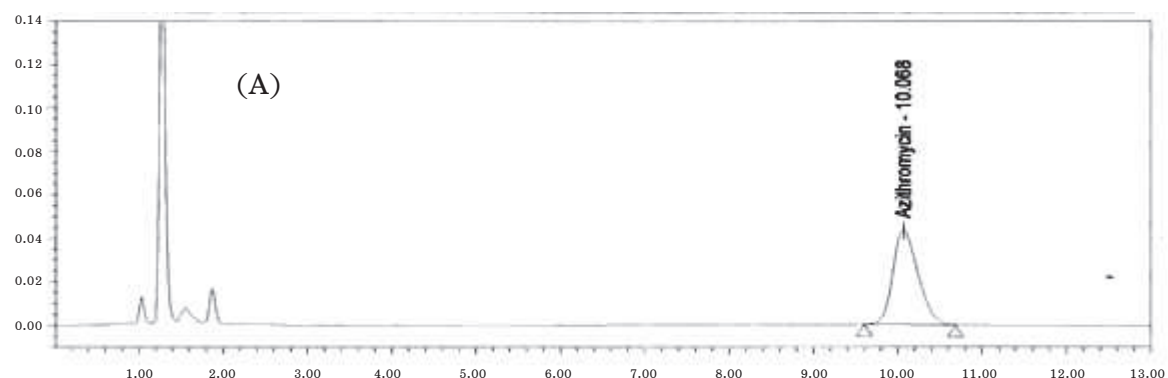
2. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)

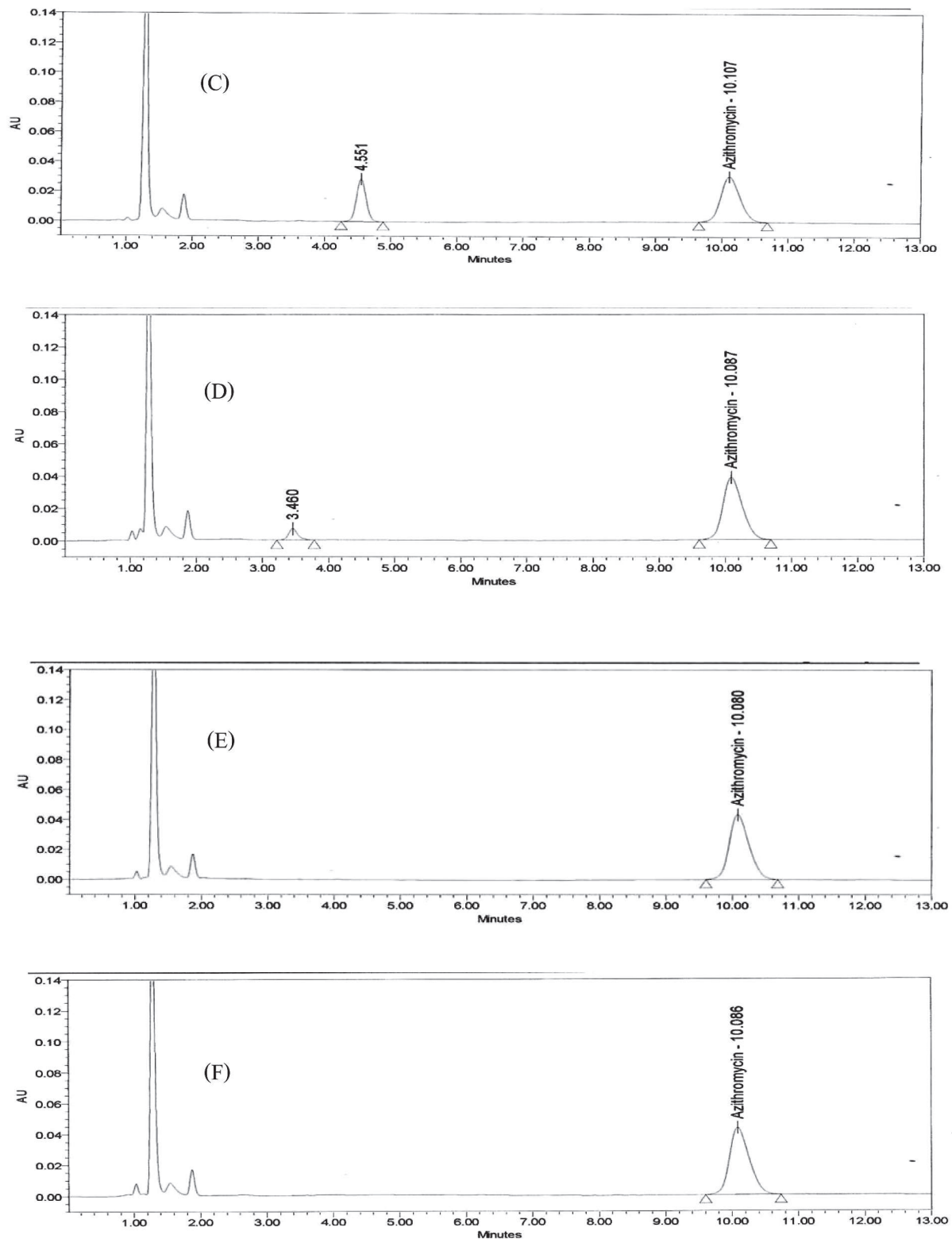
ภายใต้สภาวะของระบบโครมาโทกราฟที่พัฒนาขึ้น ได้พีคของอะซิโทรัมัยซินที่เวลาประมาณ 10.1 นาที (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอะซิโทรัมัยซิน

จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยการฉีดสารละลายมาตรฐานอะซิโทรัมัยซินที่ทำให้เกิดการสลายตัวที่สภาวะต่างๆ เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานอะซิโทรัมัยซิน โดยสามารถแยกสารสลายตัวของอะซิโทรัมัยซิน ที่เกิดการสลายตัวจากสภาวะต่าง ๆ ออกจากพีคของอะซิโทรัมัยซิน (ภาพที่ 5)





ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอะซิโทรัมัยซิน (A)

สารละลายมาตรฐานในสภาวะเบสที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง (B)

สารละลายมาตรฐานในสภาวะกรด (C)

สารละลายมาตรฐานในสภาวะออกซิเดชัน (D)

สารละลายมาตรฐานในสภาวะทำให้ร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง (E)

สารละลายมาตรฐานในสภาวะที่ถูกแสงแดดนาน 6 ชั่วโมง (F)

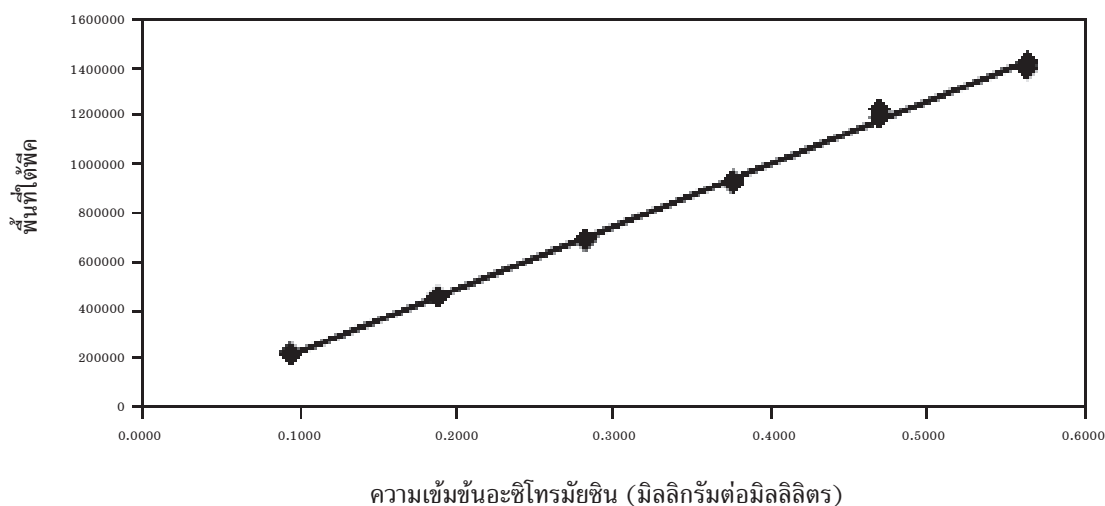
พบว่าอะซิโทรัมัยซิน มีความคงทนจากความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง และในสภาวะเร่งด้วยแสง คือ พบการสลายตัวเพียงร้อยละ 1.1 และ 1.3 ตามลำดับ ไม่คงตัวในสภาวะเบสที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง สภาวะกรดและสภาวะออกซิเดชัน โดยมีการสลายตัวและตรวจพบสารสลายตัว โดยแสดงผลการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีจากสภาวะที่ทำให้เกิดการสลายตัว (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงสภาวะที่ศึกษาการสลายตัวของอะซิโทรัมัยซิน และสารสลายตัวที่ตรวจพบ

สภาวะที่ทำให้เกิดการสลายตัว	ร้อยละของการสลายตัว	Retention time ของสารสลายตัว (นาที)
เบสที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง	68.35	4.5
กรด	32.00	4.5
ออกซิเดชัน	13.27	3.5
ทำให้ร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง	1.06	ไม่พบสารสลายตัว
แสงแดดนาน 6 ชั่วโมง	1.34	ไม่พบสารสลายตัว

3. การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐาน 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีคมีลักษณะเป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient) เท่ากับ 0.9979 (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีคของอะซิโทรัมัยซิน

4. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ผลจากการฉีดสารละลาย placebo ที่เติมสารมาตรฐานอะชิโรรณ์ยชินที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ ร้อยละ 30, 100 และ 140 ของความเข้มข้นที่ใช้วิเคราะห์หือะชิโรรณ์ยชิน เพื่อศึกษาร้อยละของการคืนกลับ พบว่าค่าเฉลี่ยของร้อยละของการคืนกลับของอะชิโรรณ์ยชินในรูปแบบยาแคปซูล มีค่าเท่ากับ 99.48 และ %RSD เท่ากับ 0.28 (ตารางที่ 2) ส่วนร้อยละของการคืนกลับของอะชิโรรณ์ยชินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน มีค่าเท่ากับ 99.20 และ %RSD เท่ากับ 0.61 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีของอะชิโรรณ์ยชินในรูปแบบยาแคปซูล

ระดับความเข้มข้น (ร้อยละของความเข้มข้น ที่ทดสอบ)	ปริมาณสารมาตรฐาน ที่ตรวจพบ (มิลลิกรัม)	ปริมาณสารมาตรฐาน ที่เติม (มิลลิกรัม)	ร้อยละ ของการคืนกลับ	ค่าเฉลี่ย	%RSD
30	2.8008	2.8218	99.26	99.25	0.18
	2.8223	2.8387	99.42		
	2.7733	2.7994	99.07		
100	9.4026	9.4248	99.76	99.79	0.19
	9.3559	9.3921	99.62		
	9.3691	9.3696	99.99		
140	13.1196	13.2490	99.02	99.41	0.35
	13.1246	13.1816	99.57		
	13.1114	13.1573	99.65		
ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ				99.48	0.28

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีของอะชิโรรณ์ยชินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน

ระดับความเข้มข้น (ร้อยละของความเข้มข้น ที่ทดสอบ)	ปริมาณสารมาตรฐาน ที่ตรวจพบ (มิลลิกรัม)	ปริมาณสารมาตรฐาน ที่เติม (มิลลิกรัม)	ร้อยละ ของการคืนกลับ	ค่าเฉลี่ย	%RSD
30	2.7360	2.7583	99.19	98.63	0.78
	2.7997	2.8639	97.76		
	2.7452	2.7741	98.95		
100	9.3179	9.3154	100.03	99.13	1.44
	9.2385	9.4772	97.48		
	9.4294	9.4407	99.88		
140	13.2607	13.2620	99.99	99.84	0.13
	13.1771	13.2097	99.75		
	13.2068	13.2340	99.79		
ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ				99.20	0.61

5. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

5.1 ความทำซ้ำได้ (Repeatability)

จากการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญในตัวอย่างยาอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลโดยวิเคราะห์ 6 ซ้ำ ได้ปริมาณตัวยาสำคัญเฉลี่ยเท่ากับ 242.2219 มิลลิกรัมต่อแคปซูล และ %RSD เท่ากับ 1.3 (ตารางที่ 4) ส่วนอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน ได้ปริมาณตัวยาสำคัญเฉลี่ยเท่ากับ 195.7848 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร และ %RSD เท่ากับ 1.1 (ตารางที่ 5)

5.2 Intermediate precision

การศึกษา Intermediate precision ของวิธีที่พัฒนาขึ้นได้ผลการทดสอบ (ตารางที่ 6 และ 7)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความทำซ้ำได้ของอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูล

ตัวอย่างที่	ปริมาณอะซิโทรมัยซิน (มิลลิกรัมต่อแคปซูล)
1	239.9909
2	243.1560
3	240.6924
4	239.6765
5	248.3456
6	241.4700
เฉลี่ย	242.2219
%RSD	1.3

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความทำซ้ำได้ของอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน

ตัวอย่างที่	ปริมาณอะซิโทรมัยซิน (มิลลิกรัมต่อแคปซูล)
1	194.8427
2	197.9665
3	197.8479
4	192.4077
5	195.4342
6	196.2096
เฉลี่ย	195.7848
%RSD	1.1

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบ Intermediate precision ของอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูล

รายการที่ ทดสอบ	ปริมาณอะซิโทรมัยซิน (มิลลิกรัมต่อแคปซูล)						เฉลี่ย	%RSD	เฉลี่ย	%RSD
	1	2	3	4	5	6				
นักวิเคราะห์ที่ 1*	239.9909	243.1560	240.6924	239.6765	248.3456	241.4700	242.2219	1.3	244.8319	1.4
นักวิเคราะห์ที่ 2 เปลี่ยนวันและเครื่องมือ**	248.0496	247.8729	247.8406	247.1409	247.2343	246.5128	247.4418	0.2		

* นักวิเคราะห์ที่ 1 ตรวจวิเคราะห์วันที่ 20 มิ.ย. 56 โดยเครื่อง HPLC ผลิตภัณฑ์ของ Waters Model Waters 2695-1996-Empower

** นักวิเคราะห์ที่ 2 ตรวจวิเคราะห์วันที่ 27 มิ.ย. 56 โดยเครื่อง HPLC ผลิตภัณฑ์ของ Agilent Model Agilent 1100 Series

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบ Intermediate precision ของอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน

รายการที่ทดสอบ	ปริมาณอะซิโทรัมัยซิน (มิลลิกรัมต่อแคปซูล)						เฉลี่ย	%RSD	เฉลี่ย	%RSD
	1	2	3	4	5	6				
นักวิเคราะห์ที่ 1*	194.8427	197.9665	197.8479	192.4077	195.4342	196.2096	195.7848	1.1	196.6561	1.1
นักวิเคราะห์ที่ 2 เปลี่ยนวันและเครื่องมือ**	199.4756	197.9835	196.3507	195.1510	196.2579	199.9452	197.5273	1.0		

*นักวิเคราะห์ที่ 1 ตรวจวิเคราะห์วันที่ 20 มิ.ย. 56 โดยเครื่อง HPLC ผลิตภัณฑ์ของ Waters Model Waters 2695-1996-Empower

** นักวิเคราะห์ที่ 2 ตรวจวิเคราะห์วันที่ 27 มิ.ย. 56 โดยเครื่อง HPLC ผลิตภัณฑ์ของ Agilent: Model Agilent 1100 Series

6. การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

จากการทดลองเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ ของระบบโครมาโทกราฟี เพื่อศึกษาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น resolution, retention time, theoretical plates และ tailing factor รวมทั้งวิเคราะห์หาปริมาณอะซิโทรัมัยซินในตัวอย่าง เพื่อเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ จากผลการทดสอบพบว่า สภาวะต่างๆ ของระบบโครมาโทกราฟีที่มีการเปลี่ยนแปลงไปให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณอะซิโทรัมัยซินในตัวอย่าง มีค่า %RSD ไม่เกิน 1.16 (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบความทนของวิธี

สภาวะของระบบโครมาโทกราฟี		ผลการทดสอบความทนของวิธี							
		Resolution	Retention time	Theoretical plates	Tailing factor	ปริมาณอะซิโทรัมัยซิน (มิลลิกรัม/หน่วย)			
						ค่าเฉลี่ย (n=3)	%RSD	ค่าเฉลี่ย	%RSD
HPLC column	No.1*	8.8	12.0	7330.5	1.09	245.2151	0.5	247.2346	1.16
	No.2	7.8	13.7	3587.9	0.92	249.2540	1.9		
pH ของ buffer	8.15	8.4	12.5	7397.8	1.02	246.0023	1.6	247.0882	1.05
	8.20*	8.8	12.0	7330.5	1.09	245.2151	0.5		
	8.25	8.2	11.8	5825.1	1.17	250.0471	0.6		
อุณหภูมิของ column	45	10.6	12.7	7981.7	1.05	246.2101	1.5	-	-
	50*	8.8	12.0	7330.5	1.09	245.2151	0.5	246.3080	0.46
	55	8.1	11.2	6695.5	1.05	247.4988	0.6	-	-
Flow rate (ml/minute)	1.4	9.8	12.8	10267.9	1.05	249.4342	0.0	-	-
	1.5*	8.8	12.0	7330.5	1.09	245.2151	0.5	247.8088	0.92
	1.6	9.9	11.3	7556.0	0.99	248.7771	0.2	-	-
ACN/MeOH/Sol.A	19:40:41	10.2	15.6	8590.0	0.94	247.1461	0.7	-	-
	21:40:39*	8.8	12.0	7330.5	1.09	245.2151	0.5	246.3427	0.41
	23:40:37	8.0	10.0	6284.1	1.05	246.6668	0.6	-	-

* หมายถึง สภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่ทำการตรวจสอบความถูกต้อง

7. การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)

เมื่อทราบแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนแล้ว จึงพิจารณาความไม่แน่นอนที่เกิดจากแต่ละแหล่งแล้วคำนวณหา ค่าความไม่แน่นอนรวม (combined relative standard uncertainty) และค่าความไม่แน่นอนขยาย (Expanded uncertainty) เพื่อรายงานเป็นผลการทดสอบ ดังตัวอย่างการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัดในการวิเคราะห์ อะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลที่ได้ผลการวิเคราะห์เท่ากับ 96.9% ของปริมาณที่แจ้ง ผลการคำนวณค่าความไม่แน่นอน พบว่าได้ค่าความไม่แน่นอนขยายเท่ากับ 1.56% ของปริมาณที่แจ้ง จึงรายงานผลการทดสอบเป็น $96.9 \pm 1.6\%$ ของปริมาณที่แจ้ง รายละเอียดของการคำนวณค่าความไม่แน่นอน (ตารางที่ 9) ส่วนอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน ได้ผลการวิเคราะห์เท่ากับ 97.9% ของปริมาณที่แจ้ง ผลการคำนวณค่าความไม่แน่นอน พบว่าได้ค่าความไม่แน่นอนขยายเท่ากับ 1.48% ของปริมาณที่แจ้ง จึงรายงานผลการทดสอบเป็น $97.9 \pm 1.5\%$ ของปริมาณที่แจ้ง รายละเอียดของการคำนวณค่าความไม่แน่นอน (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 9 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์อะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูล

Components	Value, xi	Unit	u(xi)	u(xi)/xi
Standard				
W_{std}	51.98	mg	0.0207	0.000398
Volumetric flask _{std}	25	ml	0.0466	0.001865
Pipet _{std}	5	ml	0.0122	0.002450
Volumetric flask _{std}	25	ml	0.0466	0.001865
Peak area _{std}	1084543.7	-	7050.5548	0.006501
Purity	-	-	-	-
Sample				
Av.Wt/unit	451.8	mg	0.0207	0.000046
W_{sample}	181.08	mg	0.0207	0.000114
Volumetric flask _{std}	250	ml	0.4385	0.001754
Peak area _{sample}	1080656.7	-	2730.5388	0.002527
Repeatability	242.2219	-	0.0053	0.000022
Total relative standard uncertainty: 0.00006486				
Combined relative standard uncertainty: 0.00805				
Test result is 96.9% la.: Combined standard uncertainty: $0.00805 \times 96.9 = 0.78$				
Expanded uncertainty: $k = 2, 2 \times 0.78 = 1.56\% \text{ la.}$				
Reported value: $96.9 \pm 1.6\% \text{ la.}$				

ตารางที่ 10 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์หือชิโรรมัยซินในรูปแบบยาผง สำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน

Components	Value, xi	Unit	u(xi)	u(xi)/xi
Standard				
W_{std}	50.01	mg	0.0207	0.000414
Volumetric flask _{std}	25	ml	0.0466	0.001865
Pipet _{std}	5	ml	0.0122	0.002450
Volumetric flask _{std}	25	ml	0.0466	0.001865
Peak area _{std}	848359.3	-	2471.9540	0.002914
Purity	-	-	-	-
Sample				
Av.Wt/unit	6327.8	mg	0.0207	0.0000033
W_{sample}	2794.7	mg	0.0207	0.0000074
Volumetric flask _{std}	250	ml	0.4385	0.001754
Peak areasample	867873.3	-	4980.8690	0.005739
Repeatability	195.7848	-	0.0045	0.000023

Total relative standard uncertainty: 0.00005764

Combined relative standard uncertainty: 0.00759

Test result is 97.9% la.: Combined standard uncertainty: $0.00759 \times 97.9 = 0.74$ Expanded uncertainty: $k = 2$, $2 \times 0.74 = 1.48\%$ la.Reported value: $97.9 \pm 1.5\%$ la.

8. ผลการศึกษาคุณภาพยาหือชิโรรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน

ในการเฝ้าระวังคุณภาพยาหือชิโรรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน ซึ่งเป็นโครงการร่วมระหว่างสำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้วิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 23 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างยาหือชิโรรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลทั้งหมด 15 ตัวอย่าง จากทะเบียนยา 8 ตำรับ จากผู้ผลิต 7 ราย เป็นผู้ผลิตในประเทศ 5 ราย และผู้นำเข้า 2 ราย ตรวจวิเคราะห์ในหัวข้อปริมาณตัวยาสำคัญ (Assay) ความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย (Weight variation) การละลายของตัวยา (Dissolution) และปริมาณน้ำ (Water) และยาหือชิโรรมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน 8 ตัวอย่าง จากทะเบียนยา 4 ตำรับ จากผู้ผลิต 3 ราย เป็นผู้ผลิตในประเทศ 2 ราย และผู้นำเข้า 1 ราย ตรวจวิเคราะห์ในหัวข้อปริมาณตัวยาสำคัญ (Assay) ความเป็นกรด-เบส (pH) และปริมาณน้ำ (Water) โดยการตรวจวิเคราะห์ในหัวข้อปริมาณตัวยาสำคัญและการละลายของตัวยาใช้วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีแล้ว ส่วนหัวข้อความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย ความเป็นกรด-เบส และปริมาณน้ำ ใช้วิธีและมาตรฐานตามตำราของประเทศไทย (USP 35) ซึ่งจากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 23 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีคุณภาพเข้ามาตรฐานตามเกณฑ์ที่กำหนด

วิจารณ์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนในครั้งนี้มีปัญหาเนื่องจากคุณสมบัติของอะซิโทรัมัยซิน คือ อะซิโทรัมัยซินมีโครงสร้างขนาดใหญ่ (ดังภาพที่ 1) โมลโมเลกุลมาก ประกอบกับมีค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่เด่นชัด⁽¹³⁾ (very weak ultraviolet chromophore) ทำให้การตรวจวิเคราะห์ที่ใช้การตรวจวัดโดยการดูดกลืนแสงกระทำได้ในช่วงความยาวคลื่นที่จำกัด แต่วิธีที่พัฒนาขึ้นมีขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่ไม่ยุ่งยาก โดยมีเพียงขั้นตอนเดียว ทำให้สามารถลดค่าความผิดพลาด (Error) อันเนื่องมาจากการเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง และวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวิเคราะห์อะซิโทรัมัยซินทั้งในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนได้ในคราวเดียวกัน ใช้อุปกรณ์ในการตรวจวัดสัญญาณที่มีใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ คือ UV detector แทนการใช้ Amperometric electrochemical detector ซึ่งเป็นอุปกรณ์ในการตรวจวัดสัญญาณที่เฉพาะเจาะจง ไม่มีใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้วิธีการวิเคราะห์ก็ยังเหมือนกับวิธีการวิเคราะห์อะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาเม็ดตามตำราของสหรัฐอเมริกา (USP 35) แตกต่างกันเฉพาะสัดส่วนของสารละลายตัวพาเท่านั้น

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีพบว่า วิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจงต่ออะซิโทรัมัยซิน ไม่พบการรบกวนจากสารละลายตัวที่เกิดขึ้นจากสถานะต่างๆ ที่ทำให้เกิดการสลายตัว

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการทดสอบ โดยศึกษาสารละลายมาตรฐานที่ 6 ระดับความเข้มข้นคิดเป็นช่วงของความเป็นเส้นตรงอยู่ระหว่าง 0.1–0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงตลอดช่วง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.9979

การทดสอบความแม่นยำของวิธี ทดสอบที่ 3 ความเข้มข้น คือ 30, 100 และ 140% ของค่าความเข้มข้นที่ทดสอบ พบว่าร้อยละของการคืนกลับของอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลของทุกความเข้มข้นที่ทดสอบอยู่ระหว่าง 99.02 ถึง 99.99 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 99.48 และ %RSD เท่ากับ 0.28 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ ร้อยละ 98.0–102.0 และค่า %RSD ไม่มากกว่า 2.0 สำหรับร้อยละของการคืนกลับของอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนของทุกความเข้มข้นที่ทดสอบอยู่ระหว่าง 97.48 ถึง 100.03 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 99.20 และ %RSD เท่ากับ 0.61 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ ร้อยละ 97.0–103.0 และค่า %RSD ไม่มากกว่า 2.0 แสดงถึงวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความแม่นยำ

การทดสอบความเที่ยงของวิธี ผลการทดสอบความทำซ้ำได้ ได้ค่า %RSD เท่ากับ 1.3 และ 1.1 สำหรับอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน ตามลำดับ เมื่อทดสอบโดยเปลี่ยนนักวิเคราะห์ เปลี่ยนวันวิเคราะห์ และเปลี่ยนเครื่องมือ ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 6 ซ้ำ ได้ %RSD รวมของผลการวิเคราะห์ เท่ากับ 1.4 และ 1.1 สำหรับอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ ไม่มากกว่า 2.0 แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถทำซ้ำได้และมีความเที่ยง

การทดสอบความทนของวิธีทดสอบโดยเปลี่ยนแปลง HPLC column อัตราส่วนของสารละลายตัวพา ความเป็นกรด-เบส (pH) ของสารละลายบัฟเฟอร์ในสารละลายตัวพา อุณหภูมิของคอลัมน์และอัตราการไหลของสารละลายตัวพา พบว่าการเปลี่ยนแปลงที่ได้ทำการทดสอบดังกล่าวไม่มีผลกระทบต่อระบบ ซึ่งพิจารณาจากประสิทธิภาพของการแยก (theoretical plates) Resolution ระหว่าง azithromycin และ azaerythromycin A และรูปร่างของพีค (tailing factor) และจากผลการวิเคราะห์อะซิโทรัมัยซินในตัวอย่างในสถานะที่มีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ได้ผลการทดสอบที่มีค่า %RSD ไม่เกิน 2.0 เป็นการยืนยันว่าเมื่อสถานะของระบบโครมาโทกราฟีมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยจะไม่กระทบต่อผลวิเคราะห์ แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความทนต่อสถานะที่เปลี่ยนแปลง

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดเป็นเครื่องวัดระดับคุณภาพของผลการทดสอบ การแสดงค่าความไม่แน่นอนทำให้ค่าที่รายงานนั้นมีความครบถ้วนสมบูรณ์และน่าเชื่อถือ นอกจากนี้ยังเป็นการแสดงถึงความสามารถในการสอบกลับได้ของระบบการวัด สำนักยาและวัตถุเสพติดเป็นห้องปฏิบัติการที่ให้บริการการทดสอบ ต้องสามารถรายงานค่าความไม่แน่นอนของผลการทดสอบได้หากเป็นความต้องการของลูกค้า จากตัวอย่างการประเมินค่าความไม่แน่นอนของผลการทดสอบหาปริมาณอะซิไทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน พบว่าได้ค่าความไม่แน่นอนขยาย 1.6% และ 1.5% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ปกติของการตรวจวิเคราะห์ยา

สรุป

วิธีวิเคราะห์อะซิไทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณอะซิไทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนได้อย่างถูกต้องแม่นยำและมีความจำเพาะเจาะจงต่อตัวยาสำคัญ เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และสามารถวิเคราะห์ทั้งสองรูปแบบได้ในเวลาเดียวกัน วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานของสำนักยาและวัตถุเสพติดในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพยา ดังกล่าวในโครงการสำรวจคุณภาพยาอะซิไทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนที่มีจำหน่ายในประเทศไทย โดยการตรวจวิเคราะห์ในหัวข้อปริมาณตัวยาสำคัญและการละลายของตัวยาใช้วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีแล้ว ส่วนหัวข้อความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย ความเป็นกรด-เบส และปริมาณน้ำ ใช้วิธีและมาตรฐานตามตำราของประเทศไทย (USP 35) ซึ่งจากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 23 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีคุณภาพเข้ามาตรฐานตามเกณฑ์ที่กำหนด

เอกสารอ้างอิง

1. คนารวรรณ พจนาคคม, จันคณา บุระโอสถ. เกสซ์เคมีของยาปฏิชีวนะกลุ่ม Macrolides. ว ไทยโภชนาการ [วารสารออนไลน์] 2547; [สืบค้น 9 พ.ย. 2556] 1(4): [8 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://oldweb.pharm.su.ac.th/thai/CE/datafiles/1-000-SPU-000-0410-01.pdf>.
2. อโนชา อุทัยพัฒน์. Macrolides. ใน : อโนชา อุทัยพัฒน์, นงลักษณ์ สุขวณิชยศิลป์, บรรณาธิการ. เกสซ์วิทยา เล่ม 2. กรุงเทพฯ : นิวไทยมิตรการพิมพ์; 2541. หน้า 114-128.
3. Guidechem. Azithromycin chemical properties. [online]. 2013; [cited 2013 Jan 14]; [1 screen]. Available from: URL: <http://www.guidechem.com/products/83905-01-5.html>.
4. Answers corporation. Solubility of azithromycin. [online]. 2013; [cited 2013 Jan 14]; [1 screen]. Available from: URL: http://www.wiki.answers.com/Q/solubility_of_azithromycin.
5. Azithromycin. In: Moffat AC, Oaaelton MD, Widdop B. Clarke's analysis of drugs and poisons. 3rd ed. London: Pharmaceutical Press; 2004. p. 663.
6. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ผลิตภัณฑ์ยา. [ออนไลน์]. [สืบค้น 22 ม.ค.2557] เข้าถึงได้จาก : URL: <http://fdaolap.fda.moph.go.th/logistics/drgdrug/DSerch.asp>.
7. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 35-NF 30). Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2012. p. 2283-2284, 2286-2287.
8. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Geneva: ICH Steering Committee; 2005.

9. จุไรรัตน์ รั้วทาทิน. แนวทางการทดสอบความคงสภาพของยาต่อแสง. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2539. หน้า 47.
 10. Sudheer M, Rao ABNN, Theja DHH, Prakash M, Ramalingam P, MohN AM. Development of stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of azithromycin and ambroxol HCl (SR) in the tablet formulation. *Der Pharmacia Lettre* 2012; 4(3): 803-10.
 11. สุวรรณ จารุณูช และคณะ. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550. หน้า 22-31.
 12. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549. หน้า 77-86.
 13. Kanfer I, Skinner MF, Walker RB. Analysis of macrolide antibiotics. *J Chromatogr A* 1998; 812 (1-2): 255-86.
-

Development and Validation Method for Determination of Azithromycin Capsules and Azithromycin for Oral Suspension

Wipapan Saiyasombat Supanee Duangteraprecha Supawadee Surangkul
and Prasit Opas

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

ABSTRACT The development and validation of reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method for the determination of azithromycin capsules and azithromycin for oral suspension was established. The separation was achieved on a XTerra C18, 5- μ m, 4.6- $\times$ 150-mm column, at 50 degree Celsius. The mobile phase was the mixture of acetonitrile, methanol and dibasic potassium phosphate with sodium 1-octanesulfonate pH 8.20 (21:40:39, v/v) at the flow rate of 1.5 ml per minute, setting the detection at 210 nm. Specificity test indicated that azithromycin peak was not interfered by its degradation product peaks from any stress conditions : heat, light, acid/base hydrolysis and oxidation. The described method was linear over the range of 0.1-0.6 mg per ml for azithromycin with correlation coefficient, r , 0.9979. The percentage mean recovery of azithromycin capsules and azithromycin for oral suspension were 99.48 (%RSD = 0.28) and 99.20 (%RSD = 0.61), respectively. The repeatability of azithromycin capsules and azithromycin for oral suspension were performed with %RSD 1.3 and 1.1, respectively. The intermediate precision data (%RSD) obtained among different days, analysts and HPLC instruments of azithromycin capsules and azithromycin for oral suspension were 1.4 and 1.1 respectively. The results showed that this method was robust when HPLC conditions such as the HPLC column, the pH of buffer solution, the ratio of mobile phase, the column temperature and even the flow rate, were changed. The proposed analytical method presented here revealed that it was suitable for the determination of azithromycin capsules and azithromycin for oral suspension. This validated method was further used to analyze azithromycin capsules and azithromycin for oral suspension; it was found that all of the samples complied with the specifications.

Key words : azithromycin capsules, azithromycin for oral suspension, HPLC, method validation

การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในยาจากสมุนไพร โดยวิธี Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry

สุภาณี ดวงธีรปรีชา จิราณูช แจ่มทวีกุล ประภาพรรณ สุขพรรณ และปรัชญาพร อินทองแก้ว
สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การวิเคราะห์ปริมาณสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในยาจากสมุนไพร โดยวิธี Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry (GFAAS) ได้ถูกพัฒนาขึ้นและตรวจสอบความถูกต้อง เพื่อใช้ตรวจการปนเปื้อนของโลหะหนักดังกล่าวในยาจากสมุนไพร เพื่อประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ เตรียมตัวอย่างโดยวิธีย่อยสลายด้วยกรด แล้วตรวจหาปริมาณโดยวิธี GFAAS ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตามแนวทางของ ICH-Q2(R1) พบว่าสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 5-80, 10-80 และ 0.25-4.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.999 ขีดจำกัดของการตรวจพบ เท่ากับ 2.5, 2.5 และ 0.16 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยที่ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ เท่ากับ 1, 2 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม สำหรับสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ตามลำดับ การทดสอบความแม่นยำของวิธี ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับเท่ากับ 105.6, 98.8 และ 101.0 สำหรับสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียมตามลำดับ วิธีวิเคราะห์มีความเที่ยง ได้ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ น้อยกว่า 2.9, 2.0 และ 4.7 สำหรับสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียมตามลำดับ ทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ เมื่อนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปตรวจหาการปนเปื้อนของสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในยาจากสมุนไพร 86 ตัวอย่างที่มีจำหน่ายในประเทศไทย พบว่าการปนเปื้อนของโลหะหนักทั้งสามชนิดไม่เกินมาตรฐานที่กำหนดไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย

Accepted for publication, 17 June 2015

บทนำ

ปัจจุบันกระแสของการแพทย์ทางเลือก ไม่ว่าจะเป็นการแพทย์แผนไทย การแพทย์แผนจีน การแพทย์แบบองค์รวมหรือการแพทย์ทางเลือกอื่นๆ กลับมาได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง ประกอบกับการแพทย์แผนตะวันตกไม่สามารถตอบสนองต่อความต้องการของผู้ป่วยโรคเรื้อรังได้ จึงทำให้ประชาชนให้ความสนใจการแพทย์ทางเลือกมากขึ้น โดยใช้สมุนไพรและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรเพื่อรักษาและดูแลสุขภาพ โดยมีความเชื่อว่าผลิตภัณฑ์จากธรรมชาตินั้นจะมีความปลอดภัยหรือเกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์น้อยกว่ายาแผนปัจจุบัน และจากการที่ประเทศไทยมีนโยบายส่งเสริมการใช้ยาสมุนไพรอย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการบำบัดรักษา ดูแลสุขภาพของประชาชนและทดแทนการนำเข้ายาจากต่างประเทศ ตลอดจนเพื่อส่งเสริมองค์ความรู้ดั้งเดิมของหลักการแพทย์และเภสัชกรรมแผนไทย ทำให้มีการตื่นตัวในการใช้สมุนไพรและการแพทย์แผนไทยเพิ่มมากขึ้น ปัจจุบันมีการบรรจุยาแผนโบราณจำนวน 50 รายการ และยาพัฒนาจากสมุนไพร 21 รายการ ไว้ในบัญชียาหลักแห่งชาติฉบับที่ 4⁽¹⁾ และกระทรวงสาธารณสุขได้ให้การสนับสนุนโดยมีนโยบายส่งเสริมให้สถานพยาบาลในสังกัดทั่วประเทศใช้ยาจากสมุนไพรบำบัดรักษาควบคู่กับยาแผนปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการใช้ยาสมุนไพรยังมีสัดส่วนที่น้อยอยู่เมื่อเทียบกับเงินงบประมาณสาธารณสุขของประเทศ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากบุคลากรทางสาธารณสุขตลอดจนผู้บริโภคยังขาดความเชื่อมั่นในคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เหล่านี้

จากการขยายตัวของภาคอุตสาหกรรม ทำให้มีการนำโลหะหนักมาใช้ในกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมต่างๆ มากขึ้น ภาคการเกษตรมีการใช้ปุ๋ยและยาฆ่าแมลงมากขึ้น ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีโลหะหนักเป็นส่วนผสม ทำให้มีสารเคมีและโลหะหนักตกค้างสะสมในดินและน้ำ ส่งผลให้พืชสมุนไพรต่างๆ ที่ปลูกในสิ่งแวดล้อมเหล่านั้นดูดซึมและสะสมโลหะหนักมากขึ้น เมื่อผู้บริโภคได้รับสมุนไพรที่ปนเปื้อนดังกล่าวจะสามารถก่อให้เกิดพิษต่อผู้บริโภคได้ ทั้งพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรัง พิษจากโลหะหนักที่มีรายงานการพบมากในประเทศไทยคือ พิษสารหนู พิษตะกั่ว พิษแคดเมียม⁽²⁾ เป็นต้น พิษเนื่องจากสารหนูส่วนใหญ่เป็นพิษแบบเรื้อรัง จะทำให้ผิวหนังมีลักษณะกระดากระต่าง เกิดตุ่มแข็ง มีอาการชาปลายนิ้วมือ นิ้วเท้า กล้ามเนื้ออ่อนแรง โลหิตจาง เกิดมะเร็งผิวหนังหรืออวัยวะภายในได้ อันตรายโดยทั่วไปจากตะกั่ว จะทำให้เม็ดเลือดแดงอายุสั้นลง เกิดเป็นโรคโลหิตจาง และเป็นอันตรายต่อระบบประสาท ไต ทางเดินอาหาร ตับ และหัวใจ สำหรับแคดเมียมเมื่อเข้าสู่ร่างกาย จะแพร่กระจายไปที่ตับ ม้าม และลำไส้ และเมื่อสะสมมากขึ้นจะทำให้เกิดมะเร็ง ไตทำงานผิดปกติ ทำให้เกิดโรคความดันโลหิตสูง ปวดกระดูกสันหลัง ปวดแขนขา ซึ่งจะทำให้ไตพิการได้^(2, 3, 4)

ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการควบคุมคุณภาพยาจากสมุนไพร เพื่อให้ประชาชนได้รับความปลอดภัยในการบริโภคยา และได้รับยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาอาการเจ็บป่วย สำหรับด้านความปลอดภัยจะคำนึงถึงการปนเปื้อนของโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์เป็นหลัก โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้ประกาศเรื่องหลักเกณฑ์การพิจารณาการขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนโบราณ เกี่ยวกับมาตรฐานการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และโลหะหนัก⁽⁵⁾ ซึ่งจะต้องไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์และโลหะหนักเกินเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด เพื่อแสดงความปลอดภัยของยา ประกอบการขอขึ้นทะเบียนยาแผนโบราณหรือยาสมุนไพร โดยใช้ค่ามาตรฐานตามที่กำหนดในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia 2009) โดยเกณฑ์การปนเปื้อนของโลหะหนักในยาจากสมุนไพรต้องมีปริมาณสารหนูไม่เกิน 4 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ตะกั่วไม่เกิน 10 ส่วนในล้านส่วน (ppm) และแคดเมียมไม่เกิน 0.3 ส่วนในล้านส่วน (ppm)⁽⁶⁾

เนื่องจากไม่มีวิธีวิเคราะห์โลหะหนักแต่ละชนิดกำหนดไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยดังกล่าว ผู้วิจัยจึงพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก 3 ชนิดนี้คือ สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม เพื่อให้ได้วิธีที่สามารถตรวจปริมาณโลหะหนักแต่ละชนิดที่ระดับค่ามาตรฐานได้ โดยเลือกวิธีการเตรียมตัวอย่างแบบ wet digestion ย่อยสลายด้วยกรดไนตริก ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ ทาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างยาจากสมุนไพร จากนั้นจึงตรวจหาปริมาณโลหะหนักแต่ละชนิดโดยวิธี Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry

metry (GFAAS) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไว สามารถตรวจวิเคราะห์ที่ปริมาณต่ำๆ ได้ดี หาสภาวะของเครื่องที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์แต่ละธาตุ โดยใช้สภาวะการทดสอบของบริษัทผู้ผลิตเครื่องมือเป็นแนวทาง แล้วทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ได้ตามแนวทางของ ICH-Q2(R1)⁽⁷⁾ เพื่อนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปใช้ในการตรวจปริมาณสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในยาจากสมุนไพร เพื่อประกันความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ โดยใช้เกณฑ์ตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย เป็นการสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภค และยังเป็นการส่งเสริมนโยบายการใช้ยาจากสมุนไพรของประเทศด้วย

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่อง Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry (GFAAS), บริษัท PerkinElmer รุ่น Analyst 800
- Analytical balance ความละเอียด 0.0001 กรัม บริษัท Mettler รุ่น AT200
- หลอดกำเนิดแสงสำหรับวิเคราะห์ธาตุสารหนู (Arsenic lamp)
- หลอดกำเนิดแสงสำหรับวิเคราะห์ธาตุตะกั่ว (Lead lamp)
- หลอดกำเนิดแสงสำหรับวิเคราะห์ธาตุแคดเมียม (Cadmium lamp)
- หลอดกราฟไฟต์ (Graphite tubes)
- Water bath บริษัท Neslab รุ่น GP-400
- เครื่องแก้ว class A
- ขวดพลาสติกสำหรับบรรจุสารละลายตัวอย่าง ชนิด high density polyethylene (HDPE)
(เครื่องแก้วและขวดพลาสติก ต้องแช่ในสารละลายกรดไนตริก 10% v/v ทั้งค้างคืน แล้วล้างกรดออกด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง ผึ่งให้แห้งก่อนนำมาใช้งาน)
- กระดาษกรอง Whatman No.1
- ก๊าซอาร์กอนความบริสุทธิ์ 99.995%

สารมาตรฐานและสารเคมี

- สารละลายมาตรฐานผสม (Mixed standard solution: As 100 ppm, Pb 100 ppm, Cd 5 ppm), AA grade บริษัท PerkinElmer
- สารละลายมาตรฐานสารหนู (As 1000 ppm), สารละลายมาตรฐานตะกั่ว (Pb 1000 ppm), สารละลายมาตรฐานแคดเมียม (Cd 1000 ppm), AA grade บริษัท PerkinElmer
- สารละลาย Palladium nitrate (Pd 10,000 ppm), AA grade บริษัท PerkinElmer
- สารละลาย Magnesium nitrate (Mg (NO₃)₂ 10,000 ppm), AA grade บริษัท PerkinElmer
- กรดไนตริกเข้มข้น (65%), AR grade บริษัท Merck
- น้ำความบริสุทธิ์สูง ความต้านทานไฟฟ้าไม่น้อยกว่า 18.2 เมกะโอห์ม จากเครื่อง Elix 20 บริษัท Millipore

ตัวอย่าง

1. ใช้ยาจากสมุนไพรชนิดผง ที่มีสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ปนเปื้อนปริมาณน้อย เป็นตัวแทนของ matrix

2. เมื่อได้วิธีที่เหมาะสมที่ตรวจสอบความถูกต้องแล้ว จึงนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในตัวอย่างสมุนไพรชนิดอื่น ๆ จำนวน 86 ตัวอย่าง แบ่งเป็นวัตถุดิบสมุนไพร 26 ตัวอย่าง เป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรเดี่ยว 41 ตัวอย่าง และเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรตำรับซึ่งประกอบด้วยสมุนไพรหลายชนิด 19 ตัวอย่าง

การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับกราฟมาตรฐาน

เตรียม Standard stock solution ให้มีความเข้มข้นของสารหนู (As) และตะกั่ว (Pb) 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ppb) และแคดเมียม 5 ppb

โดยปีเปตสารละลายมาตรฐานผสม (As 100 ppm, Pb 100 ppm, Cd 5 ppm) 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ แล้วปีเปตสารละลายมาตรฐานที่ได้ 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ จากนั้นเจือจางสารละลายมาตรฐาน โดยตั้งระบบการทำงานของเครื่อง GFAAS ให้เจือจางอัตโนมัติ (automix) ให้ได้สารหนูที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 80 ppb ตะกั่วที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 80 ppb และแคดเมียมที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 และ 4.0 ppb

การเตรียมตัวอย่าง

ซึ่งตัวอย่างสมุนไพรที่บดเป็นเนื้อเดียวกัน ประมาณ 0.25 กรัม โดยทราบน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมกรดไนตริก 50% v/v จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระจกนาฬิกา ทำการย่อยสลายบนอ่างอังไอน้ำนาน 15 นาที ยกลง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง แล้วเติมกรดไนตริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ปิดบีกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา ทำการย่อยสลายบนอ่างอังไอน้ำต่ออีก 1 ชั่วโมง หรือจนผงสมุนไพรถูกย่อยสลายหมด ยกลงตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และถ่ายสารละลายตัวอย่างใส่ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ นำตัวอย่างมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 และถ่ายลงหลอดพลาสติก จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณ สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ด้วยเครื่อง GFAAS

การเตรียมสารละลาย Blank

วิธีเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่าง แต่ไม่มีส่วนผสมของตัวอย่าง

สภาวะการทดสอบ

Element	As	Pb	Cd
Wavelength (nm)	193.7	283.3	228.8
Slit (nm)	0.7	0.7	0.7
Mode	AA-BG	AA-BG	AA-BG
Lamp	EDL	EDL	EDL
Current (mA)	380	440	230
Sample volume (μl)	20	20	20
Standards (ppb)	5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80	10, 20, 30, 40, 50, 60, 80	0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0
Matrix modifier	Palladium 1:10, 5 μl	Magnesium 1:100, 2 μl Palladium 1: 50, 1 μl	Magnesium 1:10, 1 μl Palladium 1:10, 1 μl
Pyrolysis temp (°C)	1200	500	600
Atomization temp (°C)	2150	1500	1450

วัดค่า absorbance โดยใช้ค่า peak area

การทดสอบความเหมาะสมของเครื่อง AAS

ก่อนทำการวิเคราะห์จะต้องปรับเครื่องมือ โดยการทำ sensitivity check ให้ได้สัญญาณพีคที่สมมาตร มีพื้นที่ใต้พีคสูงสุดและได้ค่า absorbance อยู่ในช่วง $\pm 20\%$ ของค่าที่ผู้ผลิตเครื่องมือกำหนดไว้ เครื่องจึงเหมาะสมที่จะใช้ทำการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)⁽⁷⁾

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

ฉีดสารละลายมาตรฐานสารหนูความเข้มข้น 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 ppb สารละลายมาตรฐานตะกั่ว ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 ppb และสารละลายมาตรฐานแคดเมียมความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 ppb ตามสภาวะการทดสอบที่กำหนดไว้ของแต่ละธาตุ โดยฉีดซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำค่าเฉลี่ย absorbance ของแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐานของแต่ละธาตุ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่า absorbance คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เพื่อศึกษาความเป็นเส้นตรง ซึ่งควรมีค่าไม่ต่ำกว่า 0.995

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยเติมสารละลายมาตรฐาน ลงในตัวอย่าง (standard addition method) ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 3 ระดับ คือสารหนู ที่ความเข้มข้น 10, 30 และ 50 ppb ตะกั่วที่ความเข้มข้น 10, 30 และ 60 ppb และแคดเมียมที่ความเข้มข้นที่ 1.0, 1.5 และ 2.5 ppb ระดับละ 3 ซ้ำ วิเคราะห์หาปริมาณ คำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) ของแต่ละระดับความเข้มข้น หาค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ (% mean recovery) และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน สัมพัทธ์ (% Relative Standard Deviation, %RSD) โดยที่ % mean recovery ควรอยู่ในช่วง 80–110 และ ค่า %RSD ของสารหนูและตะกั่ว ไม่มากกว่า 7 และ %RSD ของแคดเมียม ไม่มากกว่า 11⁽⁸⁾

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

ความทวนซ้ำได้ (Repeatability)

เติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่าง (standard addition method) ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่าง ตามขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย คือสารหนูที่ความเข้มข้น 20 ppb ตะกั่วที่ความเข้มข้น 50 ppb และแคดเมียมที่ความเข้มข้น 1.5 ppb เตรียมความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ วิเคราะห์หาปริมาณ คำนวณค่าเฉลี่ย และ %RSD โดย %RSD สำหรับสารหนูและตะกั่ว ไม่มากกว่า 7 และสำหรับแคดเมียม ไม่มากกว่า 11⁽⁸⁾

Intermediate precision

เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการทดสอบ Repeatability โดยนักวิเคราะห์ 2 คน ทดสอบต่างวัน ด้วยเครื่องมือเดิม ทำคนละ 6 ซ้ำ รวมเป็น 12 ซ้ำ คำนวณ %RSD และใช้เกณฑ์พิจารณาเช่นเดียวกับของการทดสอบ Repeatability

การทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ประมาณค่า LOD โดยคำนวณจากสูตร $LOD = 3.3\sigma/S$ โดย σ คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ และ S คือ slope ของกราฟมาตรฐาน

แล้วทำการทดสอบยืนยันโดยเตรียมสารละลายตัวอย่าง จาก blank ที่เติมสารมาตรฐานชนิดเดียวให้มีความเข้มข้นที่ระดับ LOD จำนวน 7 ซ้ำ วิเคราะห์ด้วย GFAAS ทุกตัวอย่างต้องอ่านสัญญาณได้มากกว่า blank

การทดสอบหาขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ประมาณค่า LOQ (estimated LOQ) โดยคำนวณจากสูตร $LOQ = 10\sigma/S$ โดย σ คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ และ S คือ slope ของกราฟมาตรฐาน

แล้วทำการทดสอบยืนยันโดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี standard addition โดยเติมสารมาตรฐานชนิดเดียวลงในตัวอย่างที่ระดับ estimated LOQ จำนวน 7 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณ คำนวณ % recovery และ %RSD เพื่อหาค่า LOQ ที่มีความแม่นยำและความเที่ยงที่ยอมรับได้

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)⁽⁹⁾

เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานของ ISO/IEC 17025:2005 ที่กำหนดให้มีการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม โดยคำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนทุกแหล่ง เมื่อรวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมดแล้ว คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย โดยใช้ k เท่ากับ 2 ในการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด ปริมาณสารที่พบ คำนวณได้จาก

$$\text{ปริมาณสารที่พบ} \quad (\mu\text{g/g, ppm}) = \frac{\text{ความเข้มข้นที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (ng/ml)} \times \text{ปริมาตรที่ปรับ (ml)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)} \times 1000}$$

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารหนู (As) ตะกั่ว (Pb) และแคดเมียม (Cd) ในยาจากสมุนไพรโดยวิธี Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry (GFAAS)

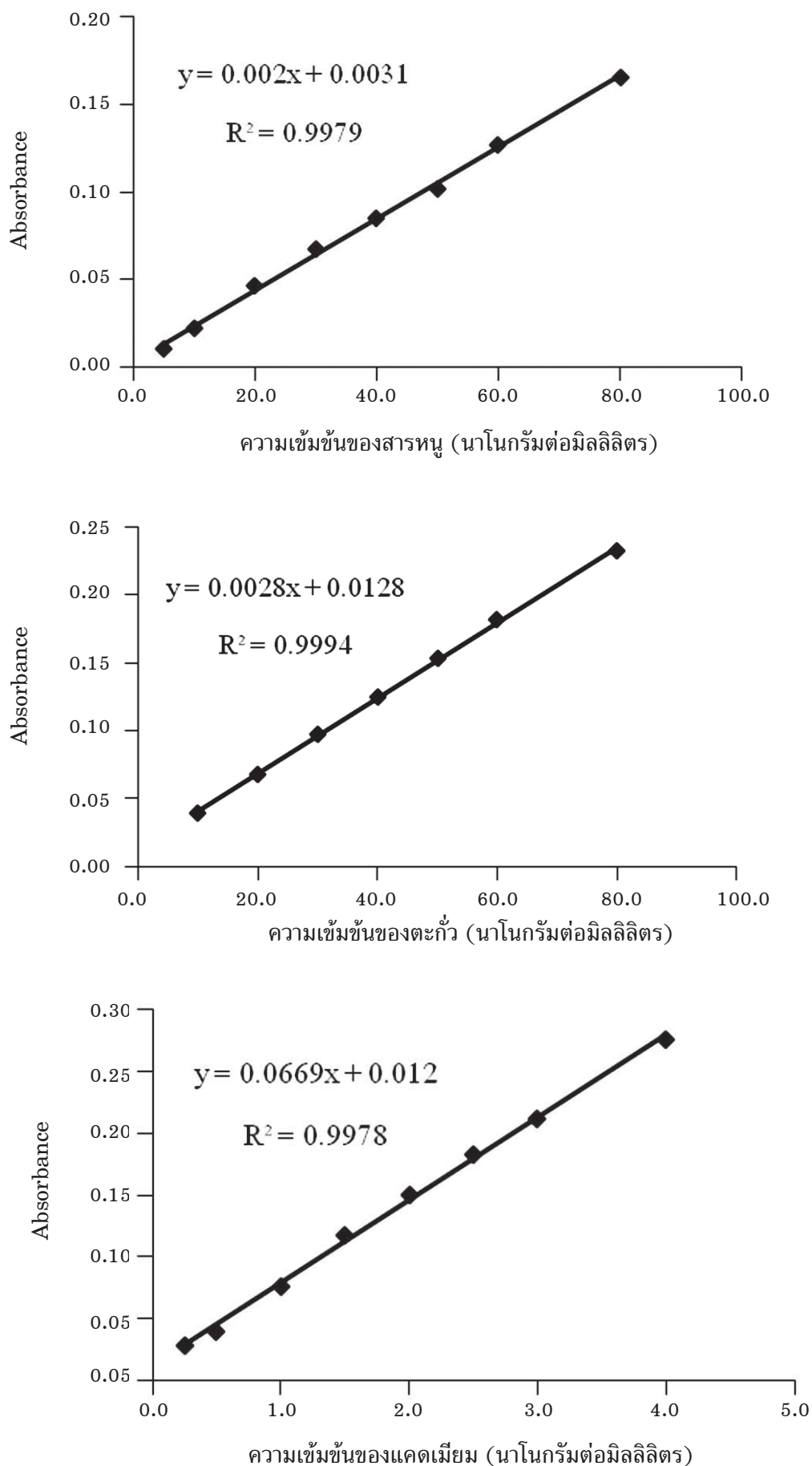
วิเคราะห์ปริมาณสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในตัวอย่างยาจากสมุนไพร โดยใช้วิธี GFAAS ที่ตรวจสอบความถูกต้องแล้ว จำนวน 86 ตัวอย่าง แบ่งเป็นวัตถุดิบสมุนไพร 26 ตัวอย่าง เป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรเดี่ยว 41 ตัวอย่าง และเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรตำรับซึ่งประกอบด้วยสมุนไพรหลายชนิด 19 ตัวอย่าง ใช้เกณฑ์การประเมินสารหนูและโลหะหนักที่ยอมให้ตกค้างในผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพร ที่กำหนดในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia 2009) คือ สารหนูไม่เกิน 4 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ตะกั่วไม่เกิน 10 ppm และแคดเมียมไม่เกิน 0.3 ppm

ผล

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

ผลจากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานสารหนู ในช่วง 5 ถึง 80 ppb สารละลายมาตรฐานตะกั่ว ในช่วง 10 ถึง 80 ppb และสารละลายมาตรฐานแคดเมียม ในช่วง 0.25 ถึง 4.0 ppb พบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่า absorbance เป็นเส้นตรงตลอดช่วงที่ทดสอบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.9989, 0.9997 และ 0.9989 ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

การทดสอบความแม่นยำ โดยการเติมสารละลายมาตรฐานในตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 3 ระดับ ระดับละ 3 ซ้ำ คือ สารหนูที่ความเข้มข้น 10, 30 และ 50 ppb ได้ค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 100.0 – 110.3 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 105.6 และ %RSD เท่ากับ 2.9 ตะกั่วที่ความเข้มข้นคือ 10, 30 และ 60 ppb ได้ค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 95.3–104.0 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 98.8 และ %RSD เท่ากับ 3.4 แคดเมียมที่ความเข้มข้น 1.0, 1.5 และ 2.5 ppb ได้ค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 97.9–104.8 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 101.0 และ %RSD เท่ากับ 2.3 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในยาจากสมุนไพร

ชนิด โลหะหนัก	ปริมาณสารมาตรฐาน ที่เติม (ppb)	ร้อยละของการคืนกลับ					ค่าเฉลี่ย	%RSD
		1	2	3	ค่าเฉลี่ย	%RSD		
สารหนู	10	103.0	104.5	107.8	105.1	2.3	105.6	2.9
	30	110.3	105.2	107.8	107.8	2.3		
	50	107.3	104.0	100.0	103.8	3.5		
ตะกั่ว	10	95.8	98.5	104.0	99.5	4.2	98.8	3.4
	30	103.0	101.5	99.3	101.3	1.8		
	60	96.7	95.3	95.4	95.8	0.8		
แคดเมียม	1.0	98.8	104.8	100.8	101.5	3.0	101.0	2.3
	1.5	99.9	97.9	101.9	99.9	2.0		
	2.5	99.9	100.3	104.3	101.5	2.4		

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

ผลการศึกษา repeatability ของการวิเคราะห์สารหนูที่ความเข้มข้น 20 ppb ได้ %RSD น้อยกว่า 1.5 การวิเคราะห์ตะกั่วที่ความเข้มข้น 50 ppb ได้ %RSD น้อยกว่า 1.2 และการวิเคราะห์แคดเมียมที่ความเข้มข้น 1.5 ppb ได้ %RSD น้อยกว่า 5.7 (ตารางที่ 2) และผลการศึกษา intermediate precision ได้ %RSD เท่ากับ 2.9, 2.0 และ 4.7 สำหรับสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในยาจากสมุนไพร

ตัวอย่างที่	สารหนู (20 ppb)		ตะกั่ว (50 ppb)		แคดเมียม (1.5 ppb)	
	A	B	A	B	A	B
1	19.42	20.45	48.14	50.98	1.66	1.63
2	18.90	20.77	47.97	49.87	1.49	1.52
3	19.65	20.21	48.45	49.42	1.58	1.56
4	19.27	20.58	48.59	49.71	1.51	1.52
5	19.50	20.23	47.71	49.59	1.53	1.56
6	19.69	20.00	48.00	49.50	1.56	1.37
ค่าเฉลี่ย (6 ค่า)	19.41	20.38	48.14	49.84	1.56	1.53
%RSD*	1.5	1.4	0.7	1.2	3.9	5.7
ค่าเฉลี่ย (12 ค่า)	19.89		48.99		1.54	
%RSD**	2.9		2.0		4.7	

A = วิเคราะห์โดยนักวิเคราะห์คนที่ 1 วันที่ 1 เครื่องมือเดิม

B = วิเคราะห์โดยนักวิเคราะห์คนที่ 2 วันที่ 2 เครื่องมือเดิม

* %RSD ของการทดสอบ Repeatability

** %RSD ของการทดสอบ Intermediate precision

การทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ได้ค่า LOD สำหรับสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม เท่ากับ 2.5, 2.5 และ 0.16 ppb ตามลำดับ

การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

ได้ค่า LOQ ของสารหนู เท่ากับ 5 ppb คิดเป็น 1 ppm ในตัวอย่าง มี % recovery เท่ากับ 89.2 และ %RSD เท่ากับ 6.2 ค่า LOQ ของตะกั่ว เท่ากับ 10 ppb คิดเป็น 2 ppm ในตัวอย่าง มี % recovery เท่ากับ 98.0 และ %RSD เท่ากับ 4.5 และค่า LOQ ของแคดเมียม เท่ากับ 0.5 ppb คิดเป็น 0.1 ppm ในตัวอย่าง มี % recovery เท่ากับ 94.2 และ %RSD เท่ากับ 4.8 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในยาจากสมุนไพร ที่ระดับ LOQ

ตัวอย่างที่	สารหนู (5 ppb)	ตะกั่ว (10 ppb)	แคดเมียม (0.5 ppb)
1	4.22	9.58	0.46
2	4.26	9.85	0.50
3	4.20	10.40	0.49
4	4.53	9.38	0.44
5	4.68	9.38	0.45
6	4.38	9.64	0.50
7	4.94	10.40	0.47
ค่าเฉลี่ย	4.46	9.80	0.47
% recovery	89.2	98.0	94.2
%RSD	6.2	4.5	4.8

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดของวิธีวิเคราะห์ ได้แหล่งที่มาของความไม่แน่นอนจากการเตรียมสารละลายมาตรฐาน เครื่องแก้ววัดปริมาตรที่ใช้ การชั่งน้ำหนักของตัวอย่าง ความแม่นยำ (% recovery) และความเที่ยง (Repeatability) เมื่อประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์สารหนูที่ระดับ 4 ppm ตะกั่วที่ระดับ 10 ppm และแคดเมียมที่ระดับ 0.3 ppm ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานที่กำหนดของการปนเปื้อนของสารแต่ละตัวในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายของการตรวจสารหนูได้เท่ากับ 0.34 ppm (ตารางที่ 4) ของการตรวจตะกั่วได้เท่ากับ 0.29 ppm (ตารางที่ 5) และของการตรวจแคดเมียมได้เท่ากับ 0.02 ppm (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 4 แสดงการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สารหนูในยาจากสมุนไพร

Components	Value, xi	Unit	Standard uncertainty, u (xi)	Relative standard uncertainty, u (xi)/xi
1. Standard				
Purity	99.3	µg/ml	0.35000	0.0035247
Pipet (P _{x1})	2	ml	0.00354	0.0017698
Volumetric flask (V _{x1})	200	ml	0.11310	0.0005655
Pipet (P _{x2})	10	ml	0.02707	0.0027070
Volumetric flask (V _{x2})	100	ml	0.06824	0.0006824
2. Sample				
Weight (m _s)	0.25	g	0.00006	0.0002366
Volumetric flask (V _s)	50	ml	0.03912	0.0007825
3. C₀	19.41	ng/ml	0.81410	0.0419423
4. Recovery	105.56	%	0.97653	0.0092510
5. Precision	100	%	0.61237	0.0061237
Sumsquare relative standard uncertainty				0.0019066
Combined standard uncertainty				0.0436643
Standard uncertainty (Uc): 0.0436643 × 3.88 ppm				0.1694176
Expanded uncertainty (U): k = 2, 2 × 0.1694176				0.3388352
Report value: 3.88 ± 0.34 ppm				

ตารางที่ 5 แสดงการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตะกั่วในยาจากสมุนไพร

Components	Value, xi	Unit	Standard uncertainty, u (xi)	Relative standard uncertainty, u (xi)/xi
1. Standard				
Purity	99.7	µg/ml	0.15000	0.0015045
Pipet (P _{x1})	2	ml	0.00354	0.0017698
Volumetric flask (V _{x1})	200	ml	0.11310	0.0005655
Pipet (P _{x2})	10	ml	0.02707	0.0027070
Volumetric flask (V _{x2})	100	ml	0.06824	0.0006824
2. Sample				
Weight (m _s)	0.25	g	0.00006	0.0002366
Volumetric flask (V _s)	50	ml	0.03912	0.0007825
3. C₀	48.14	ng/ml	0.3631	0.0075426
4. Recovery	98.85	%	1.12947	0.0114261
5. Precision	100	%	0.47357	0.0047357
Sumsquare relative standard uncertainty				0.0002240
Combined standard uncertainty				0.0149683
Standard uncertainty (Uc): 0.0149683 × 9.63 ppm				0.1441444
Expanded uncertainty (U): k = 2, 2 × 0.1441444				0.2882889
Report value: 9.63 ± 0.29 ppm				

ตารางที่ 6 แสดงการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์แคดเมียมในยาจากสมุนไพร

Components	Value, xi	Unit	Standard uncertainty, u (xi)	Relative standard uncertainty, u (xi)/xi
1. Standard				
Purity	5.00	µg/ml	0.00500	0.0010000
Pipet (P _{x1})	2	ml	0.00354	0.0017698
Volumetric flask (V _{x1})	200	ml	0.11310	0.0005655
Pipet (P _{x2})	10	ml	0.02707	0.0027070
Volumetric flask (V _{x2})	100	ml	0.06824	0.0006824
2. Sample				
Weight (m _s)	0.25	g	0.00006	0.0002366
Volumetric flask (V _s)	50	ml	0.03912	0.0007825
3. C₀	1.56	ng/ml	0.03230	0.0207051
4. Recovery	100.97	%	0.77227	0.0076485
5. Precision	100	%	2.31476	0.0231476
Sumsquare relative standard uncertainty				0.0010359
Combined standard uncertainty				0.0321858
Standard uncertainty (Uc): 0.0321858 × 0.31 ppm				0.0099776
Expanded uncertainty (U): k = 2, 2 × 0.0099776				0.0199552
Report value: 0.31 ± 0.02 ppm				

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารหนู (As) ตะกั่ว (Pb) และแคดเมียม (Cd) ในยาจากสมุนไพรโดยวิธี GFAAS

วิเคราะห์ปริมาณสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในตัวอย่างยาจากสมุนไพร โดยวิธีวิเคราะห์ที่ตรวจสอบความถูกต้องแล้ว จำนวน 86 ตัวอย่าง เป็นวัตถุดิบสมุนไพร 26 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์สมุนไพรเดี่ยว 41 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์สมุนไพรตำรับ 19 ตัวอย่าง ตรวจพบสารหนู 13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 15) ตะกั่ว 56 ตัวอย่าง (ร้อยละ 65) และแคดเมียม 70 ตัวอย่าง (ร้อยละ 81) แต่ปริมาณที่ตรวจพบไม่เกินมาตรฐานที่กำหนดในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในยาจากสมุนไพร

ประเภทตัวอย่าง	ตัวอย่าง (จำนวน)	สารหนู (≤ 4 ppm)*		ตะกั่ว (≤ 10 ppm)*		แคดเมียม (≤ 0.3 ppm)*	
		ตรวจพบ (จำนวน)	ปริมาณที่พบ (ppm)	ตรวจพบ (จำนวน)	ปริมาณที่พบ (ppm)	ตรวจพบ (จำนวน)	ปริมาณที่พบ (ppm)
วัตถุดิบสมุนไพร	26	4	< 1	14	< 2 – 4.01	25	< 0.1 – 0.15
ผลิตภัณฑ์สมุนไพรเดี่ยว	41	8	< 1	32	< 2 – 3.10	32	< 0.1 – 0.18
ผลิตภัณฑ์สมุนไพรตำรับ	19	1	1.61	10	< 2 – 2.19	13	< 0.1 – 0.26
รวม	86	13	< 1 – 1.61	56	< 2 – 4.01	70	< 0.1 – 0.26

* เกณฑ์มาตรฐานตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia 2009)

วิจารณ์

จากการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์นี้ พบว่ามีความเป็นเส้นตรงตลอดช่วงของการวิเคราะห์ ที่ความเข้มข้นของสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม คือ 5-80, 10-80 และ 0.25-4.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ppb) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9989, 0.9997 และ 0.9989 ตามลำดับ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ มากกว่า 0.995

การทดสอบความแม่นยำของวิธี สำหรับสารหนูที่ความเข้มข้น 10 ppb, 30 ppb และ 50 ppb ซึ่งครอบคลุมค่ามาตรฐานที่กำหนดของสารหนูที่ 4 ppm ($\mu\text{g/g}$) ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายตัวอย่างจะเท่ากับ 20 ppb พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ (mean percent recovery) ของสารหนู 3 ระดับ อยู่ในช่วง 103.8-107.8 มีค่าเฉลี่ยรวมเท่ากับ 105.6 และ %RSD เท่ากับ 2.9 สำหรับตะกั่วที่ความเข้มข้น 10 ppb, 30 ppb และ 60 ppb ซึ่งครอบคลุมค่ามาตรฐานที่กำหนดของตะกั่วที่ 10 ppm ($\mu\text{g/g}$) ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายตัวอย่างจะเท่ากับ 50 ppb ได้ค่าเฉลี่ย % recovery ของตะกั่ว 3 ระดับอยู่ในช่วง 95.8-101.3 มีค่าเฉลี่ยรวมเท่ากับ 98.8 และ %RSD เท่ากับ 3.4 และสำหรับแคดเมียม ที่ความเข้มข้น 1.0 ppb, 1.5 ppb และ 2.5 ppb ซึ่งครอบคลุมค่ามาตรฐานที่กำหนดของแคดเมียมที่ 0.3 ppm ($\mu\text{g/g}$) ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายตัวอย่างจะเท่ากับ 1.5 ppb ได้ค่าเฉลี่ย % recovery ของแคดเมียม 3 ระดับ อยู่ในช่วง 99.9-101.5 มีค่าเฉลี่ยรวมเท่ากับ 101.0 และ %RSD เท่ากับ 2.3 ผลทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ คือ ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 80-110 และ %RSD ของสารหนู และตะกั่ว ไม่มากกว่า 7 และของแคดเมียมไม่มากกว่า 11⁽⁶⁾

การทดสอบความเที่ยงของวิธี ได้ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นที่ค่ามาตรฐานที่กำหนดของแต่ละธาตุ คือ สารหนูที่ 20 ppb ตะกั่วที่ 50 ppb และแคดเมียมที่ 1.5 ppb ผลการทดสอบความทวนซ้ำได้ของสารหนู ตะกั่วและแคดเมียม ได้ค่า %RSD น้อยกว่า 1.5, น้อยกว่า 1.2 และน้อยกว่า 5.7 ตามลำดับ และเมื่อเปลี่ยนนักวิเคราะห์และเปลี่ยนวันวิเคราะห์ (intermediate precision) ได้ %RSD รวมของผลวิเคราะห์ของสารหนู เท่ากับ 2.9 ของตะกั่ว เท่ากับ 2.0 และของแคดเมียม เท่ากับ 4.7 ซึ่งทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ คือ %RSD ของสารหนูและของตะกั่ว ไม่มากกว่า 7 และ %RSD ของแคดเมียม ไม่มากกว่า 11⁽⁶⁾

จากการทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ เมื่อได้ค่า estimated LOQ แล้วทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับความเข้มข้นนี้ 7 ขั้ว คือ สารหนูที่ 1 ppm ตะกั่วที่ 2 ppm และแคดเมียมที่ 0.1 ppm ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ เท่ากับ 89.2, 98.0 และ 94.2 ตามลำดับ ซึ่งทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ คือร้อยละ 80-110 สำหรับ %RSD ที่ระดับ LOQ ของสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียมเท่ากับ 6.2, 4.5 และ 4.8 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ คือ %RSD ของสารหนูไม่มากกว่า 11 ของตะกั่วไม่มากกว่า 7 และของแคดเมียมไม่มากกว่า 15⁽⁶⁾ ค่า LOQ ของทั้งโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด ต่ำกว่าค่ามาตรฐานของการปนเปื้อนที่มีกำหนดไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้จึงใช้ตรวจปริมาณการปนเปื้อนของโลหะหนักเหล่านี้ในยาจากสมุนไพรได้อย่างถูกต้อง

จากการสำรวจการปนเปื้อนของโลหะหนักในยาจากสมุนไพรที่มีจำหน่ายในประเทศไทย โดยใช้วิธีวิเคราะห์ดังกล่าวที่ตรวจสอบความถูกต้องแล้ว จำนวน 86 ตัวอย่าง ส่วนประกอบของสมุนไพรในตัวอย่างเหล่านี้ มีทั้งที่เป็นส่วนจากใบ จากต้น จากลำต้นใต้ดิน ซึ่งการปนเปื้อนโลหะหนักจะแตกต่างกันไป โดยส่วนที่อยู่ใต้ดินจะมีโอกาสพบการปนเปื้อนมากกว่า เกณฑ์การปนเปื้อนสารหนูและโลหะหนักในผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพร ที่กำหนดในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย คือ สารหนูไม่เกิน 4 ppm ตะกั่วไม่เกิน 10 ppm และแคดเมียมไม่เกิน 0.3 ppm จากตัวอย่างดังกล่าวพบสารหนูปนเปื้อน 13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 15) พบตะกั่ว 56 ตัวอย่าง (ร้อยละ 65) และพบแคดเมียม 70 ตัวอย่าง (ร้อยละ 81) แต่ปริมาณที่ตรวจพบต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดทั้งหมด แสดงว่าผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีความปลอดภัยจากการปนเปื้อนของโลหะหนัก ซึ่งเป็นข้อกำหนดหนึ่งที่ต้องทดสอบเพื่อแสดงความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพร การตรวจปริมาณโลหะหนักนี้ควรตรวจตั้งแต่ขั้นตอนวัตถุดิบ เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าใช้วัตถุดิบที่ปลอดภัยและในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปด้วย เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าใช้หลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตยาจากสมุนไพร ซึ่งจะ

ไม่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของโลหะหนักในขั้นตอนการผลิต แต่อย่างไรก็ตามนอกจากเรื่องการปนเปื้อนของโลหะหนักแล้ว ยังต้องคำนึงถึงความปลอดภัยด้านอื่น ๆ อีกด้วย เช่น การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ การตกค้างของสารเคมีกำจัดแมลง ซึ่งเป็นข้อกำหนดด้านความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรเช่นกัน จึงจะสามารถประกันความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ได้

สรุป

วิธีวิเคราะห์สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในยาจากสมุนไพรโดยวิธี Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry ที่พัฒนาขึ้นนี้ มีความจำเพาะเจาะจงต่อโลหะหนักแต่ละชนิด มีความเป็นเส้นตรง ในช่วง 5-80, 10-80 และ 0.25-4.0 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ โดยที่ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ เท่ากับ 1, 2 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม สำหรับสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียมตามลำดับ การทดสอบความแม่นยำของวิธี ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับเท่ากับ 105.6, 98.8 และ 101.0 สำหรับสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียมตามลำดับ วิธีวิเคราะห์ที่มีความเที่ยง ได้ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ น้อยกว่า 2.9, 2.0 และ 4.7 สำหรับสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ตามลำดับ สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ปริมาณสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ได้อย่างถูกต้อง และนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจการปนเปื้อนของโลหะหนักทั้งสามชนิดในยาจากสมุนไพรตามข้อกำหนดในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย เพื่อประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ และจากการตรวจตัวอย่างยาจากสมุนไพรที่จำหน่ายในประเทศ จำนวน 86 ตัวอย่าง ไม่พบการปนเปื้อนโลหะหนักเกินเกณฑ์มาตรฐานกำหนด

เอกสารอ้างอิง

1. ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ ฉบับที่ 4 (พ.ศ. 2554). ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 128, ตอนพิเศษ 72 ง. (ลงวันที่ 28 มิถุนายน 2554).
2. ทรงพล ไชยาริ. โลหะหนักที่มีพิษต่อสุขภาพ. สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ. [ออนไลน์]. พฤศิกายน 2555; [สืบค้น 10 เมษายน 2558]; [8 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: [http://eic.wu.ac.th/Data_Download/Research/Metals toxic.pdf](http://eic.wu.ac.th/Data_Download/Research/Metals%20toxic.pdf)
3. ชนิษฐ พานชูวงศ์. ปรอต ตะกั่ว สารหนู โลหะหนักภัยใกล้ตัว. [ออนไลน์]. กุมภาพันธ์ 2550; [สืบค้น 10 เมษายน 2558]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://www.doctor.or.th/article/detail/4102>
4. มลพิษจากโลหะหนัก. [ออนไลน์]. [สืบค้น 10 เมษายน 2558]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/ecology/chapter2/chapter2_airpollution11.htm
5. พระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์การพิจารณาขึ้นทะเบียนตำรับยา แผนโบราณเกี่ยวกับมาตรฐานการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และโลหะหนัก. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 121, ตอนพิเศษ 43 ง. (ลงวันที่ 21 มิถุนายน 2547).
6. Department of Medical Sciences. Thai herbal pharmacopoeia Vol. III. Nonthaburi: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; 2009.
7. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Geneva: ICH Steering Committee; 2005.
8. AOAC Peer Verified Methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, VA, Nov 1993.
9. สุวรรณ จารุณช และคณะ. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550.

Method Development and Validation for Determination of Arsenic, Lead and Cadmium in Herbal Medicines by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry

Supanee Duangteraprecha Jiranuch Jamtaweekul Prapapan Sukphan
and Prachyaporn Inthongkaew

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

ABSTRACT Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry (GFAAS) method was developed and validated for the determination of arsenic (As), lead (Pb) and cadmium (Cd) in herbal medicines. Samples were prepared by wet digestion. Validation was performed according to the International Committee on Harmonization (ICH) Guidelines. The proposed method permitted the determination of As, Pb and Cd in the ranges of 5–80 ng/ml, 10–80 ng/ml and 0.25–4.0 ng/ml, respectively, with correlation coefficients greater than 0.999. Limit of detection (LOD) were found to be 2.5 ng/ml, 2.5 ng/ml and 0.16 ng/ml for As, Pb and Cd, respectively, while limit of quantitation (LOQ) were found to be 1 µg/g, 2 µg/g and 0.1 µg/g for As, Pb and Cd, respectively. Mean percentage recoveries were in the range of 98.8–105.6 while intra- and inter-day precisions were less than 4.7% for all three heavy metals. The method was successfully applied to the study of heavy metal contamination in herbal medicines available in Thailand. A total of 86 samples were investigated and the results showed that all test samples contained As, Pb and Cd lower than the limit specified in the Thai Herbal Pharmacopoeia.

Key words: arsenic, lead, cadmium, herbal medicines, GFAAS, method validation

การพัฒนาระบบบริหารคุณภาพห้องปฏิบัติการ ของสำนักยาและวัตถุเสพติด

อนงค์นุช เนยเมืองปัก

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านยาและวัตถุเสพติด มีภารกิจที่สำคัญคือ การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเภสัชภัณฑ์ และตรวจพิสูจน์วัตถุเสพติด สำนักยาและวัตถุเสพติดได้รับการตรวจประเมินตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025:2005 จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในระหว่างวันที่ 27-28 ตุลาคม 2557 และ 6-7 พฤศจิกายน 2557 ผลการตรวจประเมินพบข้อบกพร่อง (condition) 14 ข้อ และข้อสังเกต (observation) 14 ข้อ นอกจากนี้ยังได้รับการตรวจประเมินเพื่อรักษาระบบตามเกณฑ์หลักปฏิบัติที่ดีสำหรับห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพเภสัชภัณฑ์ขององค์การอนามัยโลก จากผู้ตรวจประเมินจากองค์การอนามัยโลก เมื่อวันที่ 3-4 พฤศจิกายน 2557 ผลการตรวจประเมินไม่พบข้อบกพร่องในระดับวิกฤต (critical) แต่มีข้อสังเกตในระดับสำคัญ (major) 1 ข้อ และข้อสังเกตทั่วไป (other observations) จำนวน 7 ข้อ จากผลดังกล่าวทำให้สำนักยาและวัตถุเสพติด ได้ปรับปรุงและพัฒนากระบวนการ และได้รับการรับรองอย่างต่อเนื่อง

Accepted for publication, 19 June 2015

บทนำ

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านยาและวัตถุเสพติด⁽¹⁾ มีภารกิจที่สำคัญคือการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเภสัชภัณฑ์เพื่อเฝ้าระวังคุณภาพยาในท้องตลาด รวมถึงเฝ้าระวังเภสัชภัณฑ์ที่ต้องสงสัยว่ามีปัญหาคุณภาพ นอกจากนี้ยังมีการปฏิบัติงานการตรวจพิสูจน์วัตถุเสพติด เพื่อใช้ดำเนินการอรรถคดี เพื่อทำให้เกิดความมั่นใจในผลการตรวจวิเคราะห์ สำนักยาและวัตถุเสพติด ได้พัฒนาระบบคุณภาพอย่างต่อเนื่อง ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories⁽²⁾ และหลักปฏิบัติที่ดีสำหรับห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพเภสัชภัณฑ์ขององค์การอนามัยโลก (WHO good practices for pharmaceutical quality control laboratories⁽³⁾) ได้รับการรับรองความสามารถทางห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550 จนถึงปัจจุบัน⁽⁴⁾ ในปี พ.ศ. 2555 ห้องปฏิบัติการตรวจคุณภาพเภสัชภัณฑ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ และศูนย์สารมาตรฐานยาและวัตถุเสพติด ได้รับการรับรอง WHO Pre-qualification of Quality Control Laboratories⁽⁵⁾ (WHO PQ) ดังนั้น ผลวิเคราะห์ทดสอบที่มาจากห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองระบบดังกล่าว จึงเป็นที่ยอมรับในระดับสากล นอกจากนี้ในฐานะห้องปฏิบัติการอ้างอิง สำนักยาและวัตถุเสพติดยังเป็นผู้จัดการทดสอบความชำนาญด้านยาและวัตถุเสพติด (Proficiency Testing Provider; PT Provider) ได้เริ่มดำเนินการในปี พ.ศ. 2548 ถึงปัจจุบัน โดยเป็นผู้จัดการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการด้านยา การทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการของสถานตรวจพิสูจน์ยาบ้าในปัสสาวะ และการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการของสถานตรวจพิสูจน์ยาเสพติดในของกลาง และมีแผนขอรับการรับรองระบบคุณภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2010 Conformity assessment-General requirements for proficiency testing⁽⁶⁾ จากกรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ในปี พ.ศ. 2558

สำนักยาและวัตถุเสพติด จึงตระหนักและให้ความสำคัญของการพัฒนาระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการอย่างต่อเนื่องและพัฒนาศักยภาพด้านต่าง ๆ ของห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านยาและวัตถุเสพติดของประเทศไทย และเป็นการดำเนินการที่สอดคล้องกับบทบาทภารกิจ และวิสัยทัศน์ ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่กำหนดว่า กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นองค์กรชั้นนำด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ในระดับประเทศและภูมิภาคเอเชีย

การดำเนินงาน

การพัฒนาห้องปฏิบัติการด้านยาและวัตถุเสพติด ของสำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ดำเนินการดังนี้

1. การพัฒนาและรักษาระบบบริหารคุณภาพทางห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 และหลักปฏิบัติที่ดีสำหรับห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพเภสัชภัณฑ์ขององค์การอนามัยโลก

1.1 การพัฒนาบุคลากร โดยสำนักยาและวัตถุเสพติด นอกจากการพัฒนาทักษะด้านการตรวจวิเคราะห์แล้วยังส่งเสริมให้บุคลากรได้รับการอบรม ระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025:2005 และหลักปฏิบัติที่ดีสำหรับห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพเภสัชภัณฑ์ขององค์การอนามัยโลก การทดสอบความถูกต้อง การทวนสอบของวิธีวิเคราะห์ น้ำที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ การเป็นผู้ตรวจประเมินห้องปฏิบัติการ (Assessor) และอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

1.2 ปรับปรุงเอกสารในระบบคุณภาพ และระบบการจัดการ ได้แก่ คู่มือคุณภาพ มาตรฐานการปฏิบัติงานต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง อาทิ มาตรฐานการปฏิบัติงาน เรื่อง ความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ การบริหารจัดการ การสอบเทียบเครื่องมือ Qualification of Equipment การจัดการสารเคมี เป็นต้น สำหรับแบบบันทึกการปฏิบัติงาน (worksheet, form) ได้มีการเผยแพร่ Form-Worksheet share folder แบบ read-only (ห้ามแก้ไข) ในระบบ

เครือข่ายภายในสำนักงานและวัตถุประสงค์ สำหรับการนำไปใช้งาน โดยสอดคล้องกับระบบบริหารคุณภาพที่จะรองรับเรื่อง การป้องกันการแก้ไขบันทึกที่จัดเก็บไว้ในรูปอิเล็กทรอนิกส์

1.3 ปรับปรุงหลักเกณฑ์วิธีการประเมินผู้จำหน่าย และผู้สอบเทียบเครื่องมือวิทยาศาสตร์

1.4 เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing) การเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory comparison) และการประเมินความสามารถการทดสอบภายในห้องปฏิบัติการ (Assessment of Laboratory's Performance between Analyst)

สำนักงานและวัตถุประสงค์ ได้เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญด้านยาและวัตถุเสพติดกับหน่วยงานต่างประเทศ การเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ และการประเมินความสามารถการทดสอบภายในห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 1, 2 และ 3)

ตารางที่ 1 การเข้าร่วมทดสอบความชำนาญกับหน่วยงานต่างประเทศ

ลำดับที่	หน่วยงานผู้จัดการทดสอบความชำนาญ	รายการทดสอบ
1.	European Directorate for Quality of Medicines (EDQM) ประเทศฝรั่งเศส	Assay by Liquid chromatography, Dissolution test, Loss on drying, Water content, Melting point, UV-VIS absorption spectrophotometry, Bacterial Endotoxins
2.	Laboratory of the Dutch Pharmacists, a department of the Royal Dutch Association for the Advancement of Pharmacy (KNMP) ประเทศเนเธอร์แลนด์	Content, pH
3.	External Quality Assessment Scheme ขององค์การอนามัยโลก	Assay by Titration, Assay by HPLC, Dissolution test
4.	IFM Quality Services Pty Ltd ประเทศออสเตรเลีย	ตรวจการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ใน Chinese Medicine
5.	USP Global Health Impact Program ประเทศสหรัฐอเมริกา	Assay, Dissolution test
6.	LGC Standards Proficiency Testing ประเทศอังกฤษ	Sterility test
7.	United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC)	ตรวจพิสูจน์สารเสพติดใน Biological specimens และ Seized materials

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ

ลำดับที่	หน่วยงานผู้จัดการทดสอบความชำนาญ	รายการทดสอบ
1.	ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1/1 (เชียงใหม่)	การตรวจเอกลักษณ์ยาที่ปนปลอมในยาแผนโบราณ
2.	สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์	Assay by HPLC
3.	สำนักยาและวัตถุเสพติด	Assay by HPLC
4.	ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 (สงขลา)	การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ยาแก้แพ้ แก้ไอ และวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตประสาทกลุ่ม Benzodiazepines ในช่องกลาง
5.	สำนักยาและวัตถุเสพติด	Cytotoxicity Test

ตารางที่ 3 การประเมินความสามารถการทดสอบภายในห้องปฏิบัติการ

ลำดับที่	ห้องปฏิบัติการ	รายการทดสอบ
1.	กลุ่มตรวจคุณภาพเภสัชภัณฑ์ทางชีววิทยา	Bacterial Endotoxins, Permeability to Microorganisms
2.	กลุ่มตรวจคุณภาพเภสัชภัณฑ์ทางเคมี-ฟิสิกส์	Dissolution test
3.	กลุ่มวัตถุเสพติด	Dissolution test
4.	ศูนย์สารมาตรฐานยาและวัตถุเสพติด	Water content

1.5 ตรวจติดตามภายใน (internal audit) ตามเกณฑ์ของ ISO/IEC 17025:2005 และหลักปฏิบัติที่ดีสำหรับห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพเภสัชภัณฑ์ขององค์การอนามัยโลก เพื่อให้ทราบข้อบกพร่อง และดำเนินการปรับปรุงระบบ

1.6 ทบทวนระบบบริหารจัดการ เพื่อพิจารณาผลการดำเนินการที่ผ่านมา และกำหนดเป็นนโยบาย และถ่ายทอดให้บุคลากรของหน่วยงานได้รับทราบ และร่วมมือในการดำเนินการ

2. การพัฒนาระบบคุณภาพการให้บริการทดสอบความชำนาญตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2010 สำนักยาและวัตถุเสพติดได้เตรียมความพร้อมเพื่อขอรับการรับรองระบบ ดังนี้

2.1 พัฒนาศูนย์กลาง โดยสำนักยาและวัตถุเสพติดได้จัดการฝึกอบรมระบบคุณภาพการทดสอบความชำนาญ (ISO/IEC 17043:2010) สถิติที่ใช้ (ISO/IEC 13528:2005) และอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง แก่ผู้ปฏิบัติงาน

2.2 จัดทำและปรับปรุงเอกสารในระบบคุณภาพ ได้แก่ คู่มือคุณภาพการทดสอบความชำนาญ มาตรฐานการปฏิบัติงานต่างๆ ได้แก่ เรื่อง Proficiency Testing Procedure, Homogeneity Test of Proficiency Testing Sample (Pharmaceuticals Scheme), Proficiency Testing Provider in Pharmaceuticals Scheme เป็นต้น และแบบบันทึกการปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้อง

2.3 ตรวจติดตามภายใน (internal audit) ตามเกณฑ์ของ ISO/IEC 17043:2010

2.4 ทบทวนระบบบริหารจัดการ

ในปี พ.ศ. 2557 สำนักยาและวัตถุเสพติด ได้แสดงความจำนงขอรับการตรวจติดตามระบบ ISO/IEC 17025:2005 โดยมีรายการต่ออายุ 10 รายการ และรายการขยายขอบข่าย 19 รายการ นอกจากนี้ยังได้รับการตรวจติดตามเพื่อรักษาระบบตามมาตรฐานและหลักปฏิบัติที่ดีสำหรับห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพเภสัชภัณฑ์ขององค์การอนามัยโลก ในด้านการตรวจวิเคราะห์ยาสำเร็จรูป (Finished products) และวัตถุดิบ (Active pharmaceutical ingredients) ทางเคมีและฟิสิกส์ สำหรับการขอการรับรองการเป็นผู้จัดบริการทดสอบความชำนาญด้านยาและวัตถุเสพติด ตามระบบ ISO/IEC 17043:2010 จะดำเนินการในปี พ.ศ. 2558

ผล

1. การพัฒนาและรักษาระบบบริหารคุณภาพทางห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025:2005

จากการตรวจประเมินในระหว่างวันที่ 27-28 ตุลาคม 2557 และ 6-7 พฤศจิกายน 2557 จากผู้ตรวจประเมินสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ประเมินห้องปฏิบัติการ 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มตรวจคุณภาพเภสัชภัณฑ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ กลุ่มตรวจคุณภาพเภสัชภัณฑ์ทางชีววิทยา กลุ่มวัตถุเสพติด และศูนย์มาตรฐานยาและวัตถุเสพติด พบข้อบกพร่อง (condition) 14 ข้อ และข้อสังเกต (observation) 14 ข้อ (ตารางที่ 4 และ 5)

ตารางที่ 4 ข้อบกพร่องจากการตรวจประเมิน

ลำดับที่	ชนิดของข้อบกพร่องที่พบ	จำนวน (เรื่อง)
1.	สถานที่และสภาวะแวดล้อม	1
2.	วิธีทดสอบและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี	3
3.	เครื่องมือ	4
4.	การประกันคุณภาพผลการทดสอบ	2
5.	การควบคุมบันทึก	3
6.	การรายงานผลการทดสอบ	1

ตารางที่ 5 ข้อสังเกตจากการตรวจประเมิน

ลำดับที่	ชนิดของข้อสังเกตที่พบ	จำนวน (เรื่อง)
1.	การควบคุมเอกสาร	2
2.	การควบคุมบันทึก	2
3.	สถานที่และสภาวะแวดล้อม	1
4.	วิธีทดสอบและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี	7
5.	เครื่องมือ	2

จากข้อบกพร่องและข้อสังเกตของผู้ตรวจประเมิน สำนักยาและวัตถุเสพติดได้ดำเนินการปรับปรุงงานในระบบคุณภาพด้านต่างๆ (ตารางที่ 6 และ 7) และได้รับการรับรองจากหน่วยรับรองเมื่อวันที่ 30 เม.ย. 2558 รวมทั้งสิ้น 29 รายการ เป็นการตรวจวิเคราะห์ด้านยา 19 รายการ และเป็นการตรวจพิสูจน์ด้านวัตถุเสพติด 10 รายการ⁽⁴⁾

ตารางที่ 6 รายละเอียดการปรับปรุงหลังการตรวจประเมินพบข้อบกพร่อง

ลำดับที่	ข้อบกพร่องที่พบ	การปรับปรุง
1.	สถานที่และสภาวะแวดล้อม	1.1 ติดตั้งเครื่อง Thermohygrometer ในห้องเครื่องซึ่งและมีการจดบันทึกอุณหภูมิและความชื้น
2.	วิธีทดสอบและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี	2.1 ทำการทวนสอบวิธีวิเคราะห์ (Method verification) ดังนี้ การทดสอบ Water content การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์เฮโรอินในของกลาง และการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์กัญชาในของกลาง 2.2 ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) การตรวจหาปริมาณเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์
3.	เครื่องมือ	3.1 ดำเนินการทวนผลสอบเทียบตู้เย็นเก็บสารมาตรฐาน 3.2 จัดทำมาตรฐานการปฏิบัติงานการควบคุมคุณภาพเครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการ 3.3 จัดทำป้ายแสดงสถานะเสียของเครื่องมือ GC 3.4 ทำการสอบเทียบเครื่องมือ pH meter ก่อนการใช้งาน
4.	การประกันคุณภาพผลการทดสอบ	4.1 จัดประเมินความสามารถการทดสอบภายในห้องปฏิบัติการ ดังนี้ - Water content - Dissolution test - วิธีทดสอบ Plastic containers “Permeability to microorganisms”
5.	การควบคุมบันทึก	5.1 ทำการบันทึกข้อมูลการเตรียมสารมาตรฐานและการบ่งชี้ให้เป็นไปตามมาตรฐานการปฏิบัติงานการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์สารกลุ่มแอมเฟตามีนในของกลาง การตรวจหาปริมาณเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์
6.	การรายงานผลการทดสอบ	6.1 ปรับปรุงคู่มือคุณภาพ เรื่องการรายงานผลวิเคราะห์ให้สอดคล้องกับมาตรฐานการปฏิบัติงานการรายงานผลการวิเคราะห์

ตารางที่ 7 รายละเอียดการปรับปรุงงานหลังการตรวจประเมินพบข้อสังเกต

ลำดับที่	ข้อบกพร่องที่พบ	การปรับปรุง
1.	การควบคุมเอกสาร	1.1 กำหนดให้ผู้ปฏิบัติงานใช้แบบบันทึกการปฏิบัติงาน (worksheet, form) ที่ download จากระบบเครือข่ายภายในสำนัก 1.2 เพิ่มรายละเอียดการเขียนมาตรฐานการปฏิบัติงานในมาตรฐานการปฏิบัติงานเรื่อง การเขียนมาตรฐานการปฏิบัติงาน ให้ชัดเจนยิ่งขึ้นเพื่อให้เอกสารคุณภาพมีรูปแบบเดียวกัน
2.	การควบคุมบันทึก	2.1 ปรับปรุง แบบรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ ให้เหมาะสมกับการใช้งานปัจจุบัน 2.2 กำหนดให้ผู้ปฏิบัติงานบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกการปฏิบัติงาน (worksheet) ให้ครบถ้วน
3.	สถานที่และสภาวะแวดล้อม	3.1 จัดวาง Incubator สำหรับการทดสอบ Plastic container “Permeability to microorganisms” ในที่เหมาะสมเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจุลินทรีย์
4.	วิธีทดสอบและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี	4.1 จัดทำเอกสารข้อมูล Method verification ของรายการทดสอบดังนี้ - Related substances - Degradation products - Chromatographic purity 4.2 ปรับมาตรฐานการปฏิบัติงาน รายละเอียดให้ชัดเจนขึ้น เช่น การตรวจเบื้องต้นสารเสพติดในปัสสาวะ ด้วยหลักการภูมิคุ้มกันวิทยา การเตรียมตัวอย่างทดสอบความปราศจากเชื้อ เป็นต้น
5.	เครื่องมือ	5.1 ปรับมาตรฐานการปฏิบัติงาน Qualification of Analytical Balance (s) Qualification of Ultra-Microbalance(s) และ Qualification of Microbalance (s) ให้มีการระบุเกณฑ์หรือมาตรฐานการรับผลการทำ daily check ของเครื่องชั่ง 5.2 ระบุวันที่สอบเทียบครั้งต่อไป (due date of calibration) บนป้ายแสดงสถานะสอบเทียบของตู้เย็นเก็บสารมาตรฐาน

2. การพัฒนาและรักษาระบบคุณภาพหลักปฏิบัติที่ดีสำหรับห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพเภสัชภัณฑ์ขององค์การอนามัยโลก

จากการตรวจประเมินในระหว่างวันที่ 3-4 พฤศจิกายน 2557 จากผู้ตรวจประเมินองค์การอนามัยโลก ได้ประเมินห้องปฏิบัติการ 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มตรวจคุณภาพเภสัชภัณฑ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ และศูนย์สารมาตรฐานยาและวัตถุเสพติด โดยผู้ตรวจประเมินขององค์การอนามัยโลก ผลการตรวจประเมินสรุปได้ดังนี้

1. ไม่พบข้อบกพร่องในระดับวิกฤต (critical) ตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก
2. ผู้ตรวจประเมินให้ข้อสังเกตในระดับสำคัญ (major observations) จำนวน 1 ข้อ และข้อสังเกตในระดับทั่วไป (other observation) จำนวน 7 ข้อ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ข้อสังเกตจากการตรวจประเมิน

ลำดับที่	ชนิดของข้อสังเกตที่พบ	จำนวน (เรื่อง)
1.	สารมาตรฐาน (Reference Standard)*	1
2.	ปฏิบัติการแก้ไขและป้องกัน	1
3.	การควบคุมเอกสาร	1
4.	การเตรียมน้ำยาในห้องปฏิบัติการและการติดฉลาก	1
5.	เครื่องมือ	2
6.	การสำรองข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์	1
7.	การทดสอบที่ไม่เป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนด (Out of Specification)	1

*ข้อสังเกตในระดับสำคัญ

จากข้อสังเกตของผู้ตรวจประเมิน สำนักยาและวัตถุเสพติด ได้ดำเนินการปรับปรุงงานในระบบคุณภาพด้านต่าง ๆ (ตารางที่ 9) และได้รับการรับรองต่อเนื่องจากหน่วยรับรอง เมื่อวันที่ 20 เม.ย. 2558 โดยครอบคลุมทุกรายการตรวจวิเคราะห์ยาสำเร็จรูป (Finished products) และวัตถุดิบ (Active pharmaceutical ingredients) ทางเคมีและฟิสิกส์

ตารางที่ 9 รายละเอียดการปรับปรุงงานหลังการตรวจประเมิน

ลำดับที่	ข้อสังเกตที่พบ	การปรับปรุง
1.	สารมาตรฐาน	1.1 เพิ่มการแนบข้อมูลใบรับรองสารมาตรฐาน (Certificate of Reference Standard) ในรายงานผลการวิเคราะห์ 1.2 จัดทำมาตรฐานการปฏิบัติงานระบบการจัดเก็บสารมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ (Handling system for Standard kept in Laboratory)
2.	การควบคุมเอกสาร	2.1 ลงบันทึกในแบบบันทึกการปฏิบัติงาน เรื่อง Out of Specification report ให้ครบทุกหัวข้อ 2.2 ลงบันทึกในแบบบันทึกการปฏิบัติงาน เรื่อง การใช้เครื่องกรองน้ำ Elix - 20 ให้ครบถ้วน
3.	ปฏิบัติการแก้ไขและป้องกัน	3.1 จัดทำ Corrective and preventive action report หลังจากที่มีการวิเคราะห์แนวโน้มสาเหตุการเกิด Out of Specification แล้วพบว่าเป็นปัญหาต่อระบบคุณภาพมากที่สุด
4.	การเตรียมน้ำยาในห้องปฏิบัติการและการติดฉลาก	4.1 แก้ไขมาตรฐานการปฏิบัติงานเรื่อง Preparation of Solutions in the Chemical Laboratory โดยเพิ่มการกำหนดอายุของน้ำยาที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 9 รายละเอียดการปรับปรุงงานหลังการตรวจประเมิน (ต่อ)

ลำดับที่	ข้อสังเกตที่พบ	การปรับปรุง
5.	เครื่องมือ	5.1 ปรับปรุงแผนการสอบเทียบเครื่องมือ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงการสอบเทียบ 5.2 มีการทวนสอบข้อมูล Qualification report ของเครื่องมือ
6.	การสำรองข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์	6.1 แก้ไขมาตรฐานการปฏิบัติงานการสำรองข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ให้ข้อมูล วันที่เริ่มสำรองข้อมูล
7.	การทดสอบที่ไม่เป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนด	7.1 แก้ไขมาตรฐานการปฏิบัติงาน Out of Specification โดยเพิ่มรายละเอียดในการสอบสวน (investigation) ผลการทดสอบเดิม ก่อนที่จะทำการทดสอบซ้ำ

3. การตรวจติดตามภายในระบบคุณภาพการให้บริการทดสอบความชำนาญตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2010

จากการตรวจประเมินภายในสำนักยาและวัตถุเสพติด ในระหว่างวันที่ 9-13 มีนาคม 2558 จากผู้ตรวจประเมินในสำนักยาและวัตถุเสพติด ได้ประเมินผู้จัดการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการด้านยา การทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการของสถานตรวจพิสูจน์ยาบ้าในปัสสาวะ และการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการของสถานตรวจพิสูจน์ยาเสพติดในของกลาง พบข้อบกพร่อง 3 ข้อ ได้แก่ เรื่องการวางแผน การออกแบบทางสถิติ และการวิเคราะห์ข้อมูลและการบันทึกผล (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 รายละเอียดการปรับปรุงหลังการตรวจติดตามภายใน

ลำดับที่	ข้อบกพร่องที่พบ	การปรับปรุง
1.	การวางแผน	1.1 ระบุวิธีการและขั้นตอนการตรวจซ้ำในมาตรฐานการปฏิบัติงานเรื่อง Proficiency Testing Procedure 1.2 จัดทำแบบบันทึกการปฏิบัติงานในการดำเนินการในแต่ละขั้นตอนให้ข้อมูลครบถ้วนตามมาตรฐานที่กำหนด
2.	การออกแบบทางสถิติ	2.1 กำหนดวิธีการตรวจหาและการจัดการข้อมูลที่เป็น outlier ในมาตรฐานการปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องของแต่ละ scheme
3.	การวิเคราะห์ข้อมูลและการบันทึกผล	3.1 กำหนดวิธีการและแก้ไขกรณีมีความผิดพลาดของการบันทึกข้อมูล และระบุวิธีการตรวจสอบการลงข้อมูล การถ่ายโอนข้อมูลในมาตรฐานการปฏิบัติงานเรื่อง Proficiency Testing Procedure

วิจารณ์

จากการรับการตรวจติดตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025:2005 เพื่อรักษา และพัฒนาเพื่อขยายขอบข่ายการวิเคราะห์ พบข้อบกพร่องและข้อสังเกต ด้านวิชาการมากกว่าด้านการบริหารจัดการ ความถี่สูงสุดของข้อบกพร่องและข้อสังเกตที่ปรากฏในข้อกำหนดด้านวิชาการคือ เรื่องวิธีการทดสอบและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ เครื่องมือ และการควบคุมบันทึก ตามลำดับ สำหรับการตรวจติดตามภายในระบบคุณภาพ ISO/IEC 17043:2010 ส่วนใหญ่พบข้อบกพร่องด้านวิชาการ ปัญหาที่พบเนื่องจากรายละเอียดการปฏิบัติไม่ครบถ้วน

การรับการตรวจติดตามระบบคุณภาพ เพื่อรักษาระบบคุณภาพหลักปฏิบัติที่ดีสำหรับห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพเภสัชภัณฑ์ขององค์การอนามัยโลก พบข้อสังเกตระดับสำคัญ เรื่องสารมาตรฐาน ส่วนข้อสังเกตอื่นๆ ที่พบมาก ได้แก่ เรื่องการควบคุมเอกสาร และเครื่องมือ ซึ่งปัญหาส่วนใหญ่มีรายละเอียดการปฏิบัติไม่ครบถ้วน ในการตรวจประเมินครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจประเมินครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2555⁽⁷⁾ พบข้อสังเกตน้อยกว่า เนื่องจากสำนักได้ดำเนินการพัฒนาและปรับปรุงระบบอย่างต่อเนื่อง

ประเด็นปัญหาที่พบในการตรวจประเมินทั้งสามระบบจะเกี่ยวข้องกับบุคลากรเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นเน้นให้บุคลากรที่ปฏิบัติงานได้มีโอกาสเข้าถึงวิธีการและมาตรฐานต่างๆ และติดตามการเปลี่ยนแปลงให้เป็นปัจจุบัน และได้รับการอบรมด้านวิชาการ เช่น การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ การประเมินผลการสอบเทียบเครื่องมือวิทยาศาสตร์ การใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ การดำเนินการจัดการทดสอบความชำนาญ เป็นต้น ซึ่งจะส่งผลให้การพัฒนาระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการสู่สากลอย่างยั่งยืน

สรุป

สำนักยาและวัตถุเสพติด ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 และหลักปฏิบัติที่ดีสำหรับห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพเภสัชภัณฑ์ขององค์การอนามัยโลก อย่างต่อเนื่อง ทำให้มีการพัฒนาของห้องปฏิบัติการทั้งด้านบริหารจัดการและวิชาการ เช่น ระบบการจัดการข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ ระบบการจัดการสารเคมี ระบบการควบคุมเอกสารและการบันทึก ระบบการจัดการเครื่องมือ เป็นต้น นอกจากนี้สำนักได้พัฒนาระบบคุณภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2010 เพื่อให้ได้รับการรับรองความสามารถภายในปี พ.ศ. 2558 ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บุคลากรทุกท่านของสำนักยาและวัตถุเสพติดที่ได้ร่วมมือร่วมใจ เพื่อให้การดำเนินการรับรองเพื่อรักษาระบบคุณภาพในครั้งนี้บรรลุวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

1. กฎกระทรวงแบ่งส่วนราชการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พ.ศ. 2552. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 126, ตอนที่ 98 ก. (ลงวันที่ 28 ธันวาคม 2552).
2. ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: International Organization for Standardization; 2005.
3. WHO Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparation. Forty-fourth report. WHO technical report series, No. 957. Geneva: World Health Organization; 2010.
4. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. ศูนย์ข้อมูลการประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ. [ออนไลน์]. 2558; [สืบค้น 26 กุมภาพันธ์ 2558]; [10 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: http://webdb.dmhc.moph.go.th/ifc_qa/dbqa/default.asp?iID=LDMEM

5. World Health Organization. WHO list of prequalified quality control laboratories version: 35th ed. [online]. 2015 Jan 22; [cited 2015 Feb 26]; [24 screens]. Available from: URL: http://apps.who.int/prequal/lists/PQ_QCLabsList.pdf
 6. ISO/IEC 17043:2010. Conformity assessment general requirements for proficiency testing. Geneva: International Organization for Standardization; 2010.
 7. สุรัชณี เศวตศิลา. การเสริมสร้างความเข้มแข็งระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพยาของประเทศไทย ผ่านการเข้าร่วม WHO prequalification programme. ว กรรมวิทย์ พ 2557; 56(1): 29-39.
-

Development of the Laboratory Quality Management System: Bureau of Drug and Narcotic

Anongnut Noeimuangpak

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

ABSTRACT The Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences is the reference laboratory for the drugs and narcotics. The main responsibility is to analyze the pharmaceutical and narcotic samples. Quality management system of the Bureau was assessed by the Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences on 27-28 October 2014, and 6-7 November 2014 according to ISO/IEC 17025:2005. The findings showed that there were 14 conditions and 14 observations needed to be improved. In addition, the Bureau was also assessed according to WHO good practices for pharmaceutical quality control laboratories by WHO inspectors on 3-4 November 2014. No critical errors were found, however 7 other observations and 1 major observation were reported. These quality control activities make the Bureau being continuously improved and accredited.

Key words: quality management system, reference laboratory, Bureau of Drug and Narcotic

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง ของภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัช ปราศจากเชื้อ โดยวิธี Agar Diffusion

ปวีณา เจริญสิทธิ์ และทวีทรัพย์ ชัยสมบุญพันธ์

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถ.ติวานนท์ อ.เมือง นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ในการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ ตามวิธีที่กำหนดไว้ใน มอก. 531 จะใช้เทคนิค Direct Contact แต่วิธีนี้พบปัญหาบ้างเมื่อทดสอบตัวอย่างที่อยู่ในรูปแบบของถุงและขวด ดังนั้น เพื่อให้ได้วิธีการทดสอบใหม่ที่เหมาะสม จึงได้ทดสอบตัวอย่างภาชนะพลาสติกจำนวน 34 ตัวอย่างเปรียบเทียบวิธีตาม มอก. 531 กับวิธีใหม่ คือ เทคนิค Agar Diffusion โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อ L-929 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) ที่มี fetal bovine serum (FBS) ร้อยละ 5 จนเซลล์โตเป็นชั้นเดียว จากนั้นเติมอาหาร MEM ที่มีวุ้นร้อยละ 1.5 และสีย้อม neutral red ก่อนวางชิ้นตัวอย่างบนชั้นวุ้น สังเกตการตายของเซลล์ในบริเวณด้านใต้และรอบๆ ชิ้นตัวอย่าง การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิต ภายหลังการสัมผัสกับชิ้นตัวอย่าง 24 ชั่วโมง โดยใช้แผ่นพลาสติก USP Positive Bioreaction RS เป็นตัวควบคุมเพื่อยืนยันผลบวกจากการทดสอบพบว่า ทั้ง 2 วิธีให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เทคนิค Agar Diffusion เหมาะสำหรับพลาสติกทั้งชนิด โพลีเอทิลีน โพลีโพรพิลีน โพลีไวนิลคลอไรด์ และพลาสติกชั้น ดังนั้นเทคนิค Agar Diffusion จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้แทนที่เทคนิค Direct Contact

Accepted for publication, 23 July 2015

บทนำ

ภาชนะพลาสติกบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราคาจากเชื้อ เช่น หลอดบรรจุยาฉีด (ampoule) ขวดบรรจุยาฉีด (vial) ถุงพลาสติกสำหรับบรรจุน้ำเกลือ ถุงพลาสติกสำหรับบรรจุโลหิต เป็นต้น มีทั้งที่ทำจากแก้วและพลาสติก ภาชนะบรรจุเภสัชภัณฑ์ที่ทำจากแก้วแม้ว่าจะป้องกันการซึมผ่านของก๊าซและไอน้ำได้ดี และสามารถทำให้ปราศจากเชื้อและกำจัดสารก่อไข่โดยใช้อุณหภูมิสูงได้ แต่มีข้อเสียคือ แตกง่าย และอาจมีออกไซด์ของโลหะบางชนิดที่เป็นส่วนผสมของแก้วหลุดออกมาปนเปื้อนกับเภสัชภัณฑ์ที่บรรจุอยู่ ทำให้เภสัชภัณฑ์มีความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้น ดังนั้นจึงมีการพัฒนาภาชนะบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชที่ทำจากพลาสติกขึ้นมา ซึ่งมีน้ำหนักเบา ไม่แตกง่าย มีความยืดหยุ่น ผลิตเป็นรูปแบบต่างๆ ได้ง่าย วัสดุที่ใช้ในการผลิตภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุเภสัชภัณฑ์ ได้แก่ โพลีเอทิลีน (PE) โพลีโพรพิลีน (PP) โพลีไวนิลคลอไรด์ (PVC) และพลาสติกชั้น (laminar) อย่างไรก็ตาม พลาสติกที่นำมาผลิตเป็นภาชนะบรรจุต้องไม่ทำปฏิกิริยากับเภสัชภัณฑ์ที่บรรจุจนทำให้คุณภาพเปลี่ยนแปลงไป และเกิดผลข้างเคียงของตัวยา กล่าวคือภาชนะพลาสติกนั้นต้องไม่ปล่อยสารปนเปื้อนกับเภสัชภัณฑ์ในปริมาณที่ทำให้เกิดพิษเป็นอันตรายต่อสุขภาพ และต้องไม่ดูดซึมโมเลกุลหรือไอออนของสารต่างๆ ในเภสัชภัณฑ์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของภาชนะบรรจุว่าเหมาะสมกับเภสัชภัณฑ์ที่จะบรรจุ⁽¹⁻²⁾

ภาชนะพลาสติกบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราคาจากเชื้อ (มอก. 531)⁽³⁾ เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีพระราชกฤษฎีกากำหนดให้ต้องเป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนด หรือเป็นมาตรฐานที่ใช้บังคับ กล่าวคือ ภาชนะพลาสติกที่บรรจุเภสัชภัณฑ์สำหรับฉีด ทั้งปริมาตรมากและปริมาตรน้อย ทั้งที่ผลิตในประเทศ และนำเข้าเพื่อจำหน่ายในประเทศ ต้องได้รับการควบคุมคุณภาพตามข้อกำหนดของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม คือ ต้องมีการตรวจคุณภาพทั้งทางฟิสิกส์ เคมี และชีวภาพก่อน จึงจะสามารถนำมาบรรจุเภสัชภัณฑ์เพื่อจำหน่ายได้ การทดสอบคุณลักษณะทางชีวภาพมี 4 หัวข้อ ได้แก่ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง การทดสอบหาสารไพโรเจน การทดสอบการทำลายเม็ดเลือด และการทดสอบการซึมผ่านเข้าออกของเชื้อจุลินทรีย์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (Cytotoxicity Test) ตาม มอก. 531 นั้น เป็นการทดสอบโดยใช้เทคนิค Direct Contact คือ วางชิ้นตัวอย่างลงในหลุมที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์โดยตรง วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดสำหรับพลาสติกชนิด high density และ low density เนื่องจากพลาสติกนี้อาจจะไปกีดกั้นให้เซลล์ตายได้ หรืออาจจะลอยไปมาในหลุมทดสอบ จนอาจทำให้ผลการทดสอบผิดพลาดได้ อีกทั้งภาชนะพลาสติกบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราคาจากเชื้อในประเทศไทยมีทั้งในรูปแบบของขวด และในรูปแบบของถุง การทดสอบตามวิธีใน มอก. 531 จึงอาจไม่เหมาะสมกับรูปแบบของตัวอย่างในปัจจุบัน ซึ่งมีการพัฒนารูปร่างลักษณะและขนาดไปเป็นอันมาก จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการทดสอบโดยใช้เทคนิคใหม่ เพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง น่าเชื่อถือ และเหมาะสมกับสภาพตัวอย่างในปัจจุบัน

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงในเภสัชตำรับและมาตรฐานต่างๆ เช่น United States Pharmacopeia (USP)⁽⁴⁾ American Society for Testing and Materials (ASTM)⁽⁵⁾ และ ISO 10993, ISO 7405⁽⁶⁻⁷⁾ สามารถแบ่งได้เป็น 3 เทคนิค ได้แก่ Elution, Direct Contact และ Agar Diffusion วิธีการทดสอบโดยเทคนิค Elution จำเป็นต้องมีขั้นตอนการสกัดตัวอย่างก่อนนำมาทดสอบกับเซลล์ที่เลี้ยงเป็น monolayer วิธีการทดสอบโดยเทคนิค Agar Diffusion เป็นวิธีที่นิยมใช้ทดสอบตัวอย่างที่มีน้ำหนักมาก เช่น เครื่องมือแพทย์ วัสดุทางทันตกรรม จุกยาง เป็นต้น⁽⁸⁻¹²⁾ และสามารถทดสอบกับตัวอย่างที่มีรูปร่างต่างๆ ได้ วิธีการทดสอบโดยใช้เทคนิค Direct Contact และ Agar Diffusion มีวิธีการทดสอบที่คล้ายกันและมีวิธีการประเมินผลที่เหมือนกัน คือ วิธี Direct Contact เป็นการทดสอบโดยวางชิ้นตัวอย่างบนเซลล์ที่เลี้ยงเป็น monolayer โดยตรง ส่วนวิธี Agar Diffusion เป็นการทดสอบโดยมีการเพาะชิ้นตัวอย่างบนเซลล์ที่เลี้ยงเป็น monolayer ก่อนที่จะวางชิ้นตัวอย่าง ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ จึงศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำวิธีการทดสอบแบบ Agar Diffusion มาใช้แทนที่วิธีการทดสอบแบบเดิม คือ วิธี Direct Contact ของมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

วัสดุและวิธีการ

1. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1.1 ภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุภัณฑ์ปราศจากเชื้อ ซึ่งถูกส่งมาตรวจคุณลักษณะทางชีวภาพ ในระหว่างปีงบประมาณ 2553- 2555 จำนวนรวมทั้งสิ้น 34 ตัวอย่าง

1.2 เซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง L-929 mammalian fibroblast cell (ATCC cell line CCL1, NCTC clone 929)

1.3 เครื่องมือ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ชนิดอินเวอร์ท (inverted microscope) ตู้บเพาะเชื้อ แบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ไมโครมิเตอร์ haemocytometer และ laminar flow cabinet

1.4 อุปกรณ์ ได้แก่ ขวดสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ (tissue culture flask) ถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม (6-well tissue culture petridish) ไมโครปิเปต ปิเปต เครื่องแก้วต่างๆ

1.5 สารเคมี ได้แก่ Phosphate Buffer Solution, Trypsin Solution (0.25 g/100 ml), สีย้อม Trypan Blue, สารละลาย Neutral Red 50 µg/ml, 1% Sodium Bicarbonate Solution, Glutamine Solution (29.2 g/100 ml)

1.6 อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) ที่มี Fetal Bovine Serum 5%

1.7 อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโตที่มีวุ้น 1.5% โดยการเตรียม MEM ให้มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่า (2X) และมี Fetal Bovine Serum 10% และสารละลาย neutral red 2% นำไปอุ่นที่ 47 องศาเซลเซียส ผสมกับวุ้น 3% ที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส

1.8 วัสดุมาตรฐาน

- วัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลบวก (Positive Material Control) คือแผ่น USP Positive Bioreaction RS

- วัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลลบ (Negative Material Control) คือแผ่น USP High-density Polyethylene RS

2. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

ตัดภาชนะพลาสติกทรงบริเวณที่โค้งน้อยที่สุดและมีเนื้อสม่ำเสมอ ตัดชิ้นวัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลลบ และชิ้นวัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลบวกให้มีพื้นที่ผิวไม่น้อยกว่า 100 ตารางมิลลิเมตร ทำการฆ่าเชื้อโดยแช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลาประมาณ 1 นาที

2.2 การเตรียมเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

นำเซลล์เนื้อเยื่อ L-929 ที่เพาะเลี้ยงไว้ในขวดสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ ล้างด้วย Phosphate Buffer Solution เติม Trypsin Solution เพื่อให้เซลล์หลุดล่อนจากพื้นผิวขวด แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต (อาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มี Fetal Bovine Serum 5%) ให้ได้สารแขวนตะกอนของเซลล์ที่เป็นเนื้อเดียวกัน นำสารแขวนตะกอนที่ได้ไปวัดความเข้มข้นของเซลล์โดยนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตพร้อมทั้งคำนวณความเข้มข้นของเซลล์ในสารแขวนตะกอน โดยใช้เครื่องมือนับเม็ดเลือด (Haemocytometer) จากนั้นเจือจางสารแขวนตะกอนของเซลล์นี้ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต ให้ได้ความเข้มข้น 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำสารแขวนตะกอนของ

เซลล์ที่เจือจางแล้วเติมลงในภาตเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม หลุมละ 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 1 วัน จนเซลล์โตเป็นชั้นเดี่ยว (monolayer) อย่างน้อย 80% ของพื้นที่เลี้ยงเซลล์

2.3 วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง โดยเทคนิค Direct Contact

เมื่อเซลล์โตเป็นชั้นเดี่ยว ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในภาตเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมออก เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต หลุมละ 0.8 มิลลิลิตร วางชิ้นตัวอย่างทดสอบ 2 หลุม หลุมละ 1 ชิ้น วางชิ้นวัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลบวก 2 หลุม หลุมละ 1 ชิ้น วางชิ้นวัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลลบ 1 หลุม หลุมละ 1 ชิ้น และอีกหลุมเป็น blank จากนั้นนำภาตเลี้ยงเซลล์ไปบ่มในตู้บเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ดูความเป็นพิษที่เกิดกับเซลล์ โดยดูลักษณะของเซลล์และวงใส (zone) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกการตายของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological change) และความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิต (cell density) แล้วประเมินผล (ตารางที่ 1) หลังจากนั้นทำการยัด (fix) และย้อมสีเซลล์ให้ติดบนภาตเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลายฟอร์มาลินคริสทัลไวโอเลต การทดสอบจะถือว่า ตัวอย่างไม่เป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง เมื่อชิ้นตัวอย่างมีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงไม่มากกว่าระดับ 2 และการทดสอบจะมีผลเชื่อถือได้ เมื่อ blank และชิ้นวัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลลบไม่เป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (ระดับ 0) และชิ้นวัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลบวกเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงในระดับ 3 ขึ้นไป

2.4 วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง โดยเทคนิค Agar Diffusion

เมื่อเซลล์โตเป็นชั้นเดี่ยว ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในภาตเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมออก และเติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต ที่มีวุ้น 1.5% หลุมละ 3 มิลลิลิตร รอให้แข็งในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที วางชิ้นตัวอย่างทดสอบ 2 หลุม หลุมละ 1 ชิ้น วางชิ้นวัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลบวก 2 หลุม หลุมละ 1 ชิ้น วางชิ้นวัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลลบ 1 หลุม หลุมละ 1 ชิ้น และอีกหลุมเป็น blank จากนั้นนำภาตเลี้ยงเซลล์ไปบ่มในตู้บเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ดูความเป็นพิษที่เกิดกับเซลล์ โดยดูลักษณะของเซลล์และวงใส ด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกการตายของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิต แล้วประเมินผลตาม (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การประเมินระดับความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

ระดับ (grade)	ปฏิกิริยา (reactivity)	สภาพของเซลล์เนื้อเยื่อ (Description of Reactivity Zone)
0	ไม่เป็นพิษ (none)	ไม่พบวงใสรอบๆ หรือภายในชิ้นทดสอบ
1	เป็นพิษน้อยมาก (slightly)	พบเซลล์มีรูปร่างผิดปกติภายในชิ้นทดสอบ
2	เป็นพิษน้อย (mild)	มีเซลล์ตายเป็นวงจำกัดอยู่ในพื้นที่ที่ชิ้นทดสอบ
3	เป็นพิษปานกลาง (moderate)	มีเซลล์ตายเป็นวงใสแผ่ขยายออกจากชิ้นทดสอบ 0.5 – 1.0 ซม.
4	เป็นพิษรุนแรง (severe)	มีเซลล์ตายเป็นวงใสแผ่ขยายออกจากชิ้นทดสอบ มากกว่า 1.0 ซม.

ผล

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของภาชนะพลาสติกบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อที่ผลิตและนำเข้าในประเทศไทย ซึ่งถูกส่งมาตรวจคุณลักษณะทางชีวภาพ ในระหว่างปี 2553 - 2555 จำนวน 34 ตัวอย่าง โดยวิธีตาม มอก. 531 คือ เทคนิค Direct Contact และวิธีใหม่ คือ เทคนิค Agar Diffusion พบว่า ทั้ง 2 วิธีให้ผลการทดสอบที่ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อเปรียบเทียบระหว่าง เทคนิค Direct Contact และเทคนิค Agar Diffusion

ตัวอย่าง	ชนิดพลาสติก	รูปแบบ Grade	Direct Contact Grade	Agar Diffusion
BOE-1, BOE-2, BOE-3, BOE-4, BOE-6, BOE-7, BOE-10, BOE-11, BOE-12, BOE-13, BOE-14	PE	ขวด	0	0
BOE-8, BOE-9	PE	ขวด	1	0
BOE-5	PE	ขวด	1	1
BOP-1, BOP-2, BOP-3, BOP-4, BOP-6, BOP-7, BOP-9, BOP-10, BOP-11, BOP-12, BOP-13	PP	ขวด	0	0
BOP-5, BOP-8	PP	ขวด	1	1
BAP-1, BAP-2, BAP-3, BAP-4,	PP	ถุง	0	0
BAV-1	PVC	ถุง	0	0
BAL-1, BAL-2	ชั้น	ถุง	0	0

วิจารณ์

เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของตัวอย่างภาชนะพลาสติกบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ จำนวน 34 ตัวอย่าง ตามวิธีที่กำหนดใน มอก. หรือเทคนิค Direct Contact เปรียบเทียบกับเทคนิค Agar Diffusion พบว่า ทั้ง 2 วิธีให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แม้ว่าจะมีภาชนะพลาสติก

ชนิดขวดจำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ให้ผลการทดสอบทั้ง 2 วิธี ที่ต่างกันบ้าง ซึ่ง 2 ตัวอย่างเป็นภาชนะพลาสติกที่ทำจาก PE โดยพบว่า เทคนิค Direct Contact มีความเป็นพิษมากกว่าเทคนิค Agar Diffusion ทั้ง 2 ตัวอย่าง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ภาชนะพลาสติกอาจเป็นชนิด high density มีน้ำหนักมาก เมื่อทำการทดสอบโดยเทคนิค Direct Contact ชิ้นพลาสติกนี้จะไปกดทับทำให้เซลล์ได้ชั้นทดสอบตายได้ หรือภาชนะพลาสติกอาจเป็นชนิด low density มีน้ำหนักเบา เมื่อทำการทดสอบโดยเทคนิค Direct Contact ชิ้นพลาสติกนี้จะเคลื่อนที่ไปมาในหลุมทดสอบทำให้เซลล์ได้ชั้นทดสอบตายได้ หรืออาจเกิดจากสารพิษที่มีอยู่ในชิ้นพลาสติกอาจไม่ละลายหรือถูกดูดซับไว้ในชั้นวุ้น มีผลทำให้ความเข้มข้นของสารพิษลดลงเมื่อซึมผ่านชั้นวุ้นมาสัมผัสกับเซลล์ จึงพบความเป็นพิษโดยเทคนิค Direct Contact มากกว่าเทคนิค Agar Diffusion⁽⁶⁾ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเปรียบเทียบขนาดวงใสของชิ้นวัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลบวกพบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลไม่แตกต่างกัน คือ มีขนาดวงใส 0.5 – 0.7 เซนติเมตร แสดงให้เห็นว่า สารพิษที่หลุดรอดออกมาสามารถละลายและซึมผ่านชั้นวุ้นลงมาสัมผัสกับเซลล์ได้

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของตัวอย่างภาชนะพลาสติกบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราคาจากเชื้อที่อยู่ในรูปถุง จำนวน 7 ตัวอย่าง แม้พบว่า ทุกตัวอย่างให้ผลไม่ต่างกัน แต่เนื่องจากถุงมีความบางมากกว่าขวด จึงมีโอกาสเกิดการเคลื่อนที่ของตัวอย่างภายในหลุมทดสอบ เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค Direct Contact จำเป็นต้องระวังในเรื่องดังกล่าวเป็นอย่างมาก ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการแปลผลที่ผิดได้ การนำเทคนิค Agar Diffusion มาใช้แทนที่จึงช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวได้

เมื่อประเมินผลตามเกณฑ์ที่ มอก. กำหนด พบว่า ทุกตัวอย่างเข้ามาตรฐานทั้ง 2 วิธี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของทวีทรัพย์และคณะซึ่งรายงานถึงคุณภาพของภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุเภสัชภัณฑ์ปราคาจากเชื้อในประเทศไทย⁽¹³⁾ ทั้งนี้เนื่องจาก ตำรายา USP ได้กำหนดให้เม็ดพลาสติกที่นำมาใช้ในการผลิตภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุเภสัชภัณฑ์ต้องผ่านการทดสอบคุณภาพและความปลอดภัยก่อน ถ้าไม่ผ่านก็ไม่สามารถนำมาใช้ในการผลิตภาชนะพลาสติกบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราคาจากเชื้อได้⁽³⁾

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่กำหนดใน มอก. 531 เป็นเทคนิค Direct Contact วิธีนี้แม้จะสามารถสกัดและทดสอบตัวอย่างได้ในเวลาเดียวกัน ทำให้สามารถประหยัดเวลาในการทดสอบ คือ เมื่อวางชิ้นทดสอบลงในหลุมที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ อาหารเลี้ยงเซลล์จะสกัดเอาสารพิษจากชิ้นตัวอย่างออกมา และลงสัมผัสกับเซลล์โดยตรง ทำให้ช่วยลดขั้นตอนในการสกัด สามารถใช้ตัวอย่างที่มีด้านเรียบเพียงแค่ 1 ด้าน ก็สามารถนำมาใช้ประเมินความเป็นพิษได้ อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ไม่เหมาะกับตัวอย่างที่เป็นโลหะหรือตัวอย่างที่มีพื้นผิวไม่เรียบ รวมทั้งตัวอย่างที่เป็นพลาสติกชนิด high density หรือ low density เนื่องจาก ตัวอย่างพลาสติกชนิด high density อาจทำให้เกิดการกดทับบนเซลล์เนื้อเยื่อทำให้เซลล์ตาย ส่วนตัวอย่างพลาสติกชนิด low density อาจทำให้ชิ้นตัวอย่างเกิดการเคลื่อนที่ทำให้เซลล์ตายได้ ทั้งนี้การตายเกิดจากลักษณะทางกายภาพของตัวอย่าง ไม่ได้เกิดจากสารพิษที่หลุดรอดออกมา ทำให้เกิดการแปลผลที่ผิดพลาดได้^(4, 8)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่นำมาแทนที่วิธีเดิมเป็นเทคนิค Agar Diffusion วิธีนี้สามารถสกัดและทดสอบตัวอย่างได้ในเวลาเดียวกัน ทำให้สามารถประหยัดเวลาในการทดสอบ เช่นเดียวกับกับเทคนิค Direct Contact วิธีนี้ยังสามารถทดสอบกับตัวอย่างที่มีลักษณะทางกายภาพแตกต่างกันได้และไม่ขึ้นกับ material density เนื่องจากมีชั้นวุ้นรองรับน้ำหนักไว้ หรือถ้าตัวอย่างมีพื้นผิวไม่เรียบหรือมีขนาดเล็ก ก็สามารถนำตัวอย่างมาสกัดและนำสารสกัดหยดลงบนกระดาษกรองก่อนที่จะนำมาทดสอบได้⁽⁶⁻⁸⁾ ดังนั้นมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมจึงจะมีการปรับเปลี่ยนวิธีการทดสอบจากเทคนิคเดิม คือ Direct Contact เป็นเทคนิคใหม่ คือ Agar Diffusion ซึ่งเป็นเทคนิคที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ทดสอบกับภาชนะพลาสติกบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราคาจากเชื้อในประเทศไทยที่มีทั้งในรูปแบบของขวด และในรูปแบบของถุง ซึ่งมีการผลิตมาจากวัตถุดิบทั้ง PE PP PVC และพลาสติกชั้นได้

สรุป

วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงแบบ Agar Diffusion เป็นวิธีที่มีความไว ให้ผลการทดสอบที่มีความน่าเชื่อถือ สามารถทดสอบกับตัวอย่างที่มีลักษณะทางกายภาพแตกต่างกันซึ่งมีทั้งในรูปแบบของขวดและในรูปแบบของถุง นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น มอก. 1298 ภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิตได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Laschi A, Sehnal N, Alarcon A, Barcelo B, Caire-Maurisier F, Delaire M, et al. Container-content compatibility studies: a pharmaceutical team's integrated approach. PDA J Pharm Sci Technol 2009; 63(4): 285-93.
2. ศุภพร ศรีพัฒนพิพัฒน์. ภาชนะบรรจุสำหรับผลิตภัณฑ์เภสัช. สมอ สาร 2545; 28(319): 7-8.
3. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 531-2546. ภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ. กรุงเทพฯ : สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม หน้า 14-16.
4. USP 35-NF 30: The United States Pharmacopeia. The National Formulary. 35th ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention; 2012. p. 92-94, 472-479.
5. ASTM F 895-11. Standard test method for agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity. Pennsylvania: American Society for Testing and Materials (ASTM); 2011.
6. ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 2009.
7. ISO 7405:2008. Dentistry -- Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 2008.
8. Guess WL, Rosenbluth SA, Schmidt B, Autian J. Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. J Pharm Sci 1965; 54(10): 1545-7.
9. Vidal MNP, Aiub C, Abrantes S, Zamith HPS. Evaluation of Brazilian medical devices using agar diffusion cytotoxicity assay. Rev Bras Hematol Hemoter 2009; 31(2): 84-7.
10. สุวรรณ ก่อสุวรรณวงศ์, ราชพร สัจจันทร์, ละอองทอง วัชรากย์. การประเมินพิษของสารยึดติดเนื้อฟันโดยวิธีอาการโอเวอร์เลย์. วิทยาศาสตร์ทันตแพทยศาสตร์ 2551; 58(3): 196-202.
11. Miranda RB, Fidel SR, Boller MA. L929 cell response to root perforation repair cements: an in vitro cytotoxicity assay. Braz Dent J 2009; 20(1): 22-6.
12. Lonroth EC. Toxicity of medical glove materials: a pilot study. Int J Occup Saf Ergon 2005; 11(2): 131-9.
13. ทวีทรัพย์ ชัยสมบูรณ์พันธ์, ศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์, ปวีณา สีลาภัทรานุรักษ์, อารีญา ดิษฐ์กิจ. คุณภาพความปลอดภัยและความเข้ากันได้ทางชีววิทยาของพลาสติกที่ใช้ทางการแพทย์. สารตำรายา 2546; 10(2): 33-43.

Cytotoxicity Testing of Plastic Parenteral Container by Agar Diffusion Technique

Paveena Charoensit and Daweesapya Chaisomboonpan

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

ABSTRACT Even though direct contact technique was used to screen the cytotoxicity of plastic parenteral containers according to TIS 531, some difficulties were encountered when samples having bag and bottle forms were found moving in the wells during testing. In order to be able to test all types of containers, agar diffusion technique was applied to evaluate 34 plastic parenteral containers parallel with direct contact technique. The L-929 cultures were grown to monolayer in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS). After incubation, the agar layer (1.5%) supplemented with MEM in 5% FBS and neutral-red stain was added to replace the medium. The samples were cut and placed on the agar layer. After 24-hour exposure, the cell monolayers were observed for cell deaths beneath and surrounding the samples as well as changes in morphology and cell densities. In this study, USP Positive Bioreaction RS were used as positive material control. There were no statistical differences between both techniques ($P>0.05$). However, the agar diffusion technique was a useful method for screening plastic parenteral containers made from polyethylene, polypropylene, polyvinyl chloride and laminar. Therefore, it could be another useful method to be implemented for the cytotoxicity testing scheme in order to replace the direct contact technique.

Key words: Cytotoxicity testing, Plastic parenteral container, Agar diffusion technique

การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โปรตีน ในผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีน ของถั่วเหลืองโดยการเปรียบเทียบผล ระหว่างห้องปฏิบัติการที่มีความเชี่ยวชาญ

นิภาภรณ์ ลักษณะสมยา และจินตนา กิจเจริญวงศ์

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ปริมาณโปรตีนเป็นหนึ่งในข้อกำหนดด้านคุณภาพของผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลือง ซึ่งเป็นอาหารควบคุมคุณภาพหรือมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข แต่ในประเทศไทยยังไม่มีข้อกำหนดวิธีวิเคราะห์ให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน ซึ่งอาจทำให้เกิดข้อโต้แย้งถึงผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันเมื่อใช้วิธีทดสอบที่ต่างกัน จึงได้ศึกษาและคัดเลือกวิธีวิเคราะห์นำมาทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว และศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของวิธีโดยการส่งตัวอย่างให้ห้องปฏิบัติการหลายแห่งที่มีความเชี่ยวชาญทำการตรวจวิเคราะห์และนำผลมาประเมินทางสถิติ (collaborative study) วิธีวิเคราะห์โปรตีนที่ศึกษาใช้วิธีเคเจดดาห์ล (Kjeldahl method) ใช้เตาหลุม (block digester) ในการย่อยตัวอย่าง มีทองแดงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา กลิ่นแอมโมเนียลงในกรดบอริก และไตเตรทกับสารมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก เพื่อเสนอวิธีนี้ให้สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา พิจารณารับและกำหนดเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชน ที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 เข้าเป็นสมาชิก จำนวน 14 แห่ง จัดส่งวิธีวิเคราะห์ที่ได้ผ่านการทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว และผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลือง 3 ชนิดคือ ผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์โปรตีนของถั่วเหลือง ผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการหมักที่มีได้ปรุงแต่งรสและที่ปรุงแต่งรสหวาน ที่มีปริมาณโปรตีนในช่วง 1.8 ถึง 12 กรัม ต่อ 100 กรัม รวม 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ขวดที่มีรหัสต่างกันโดยที่สมาชิกไม่ทราบว่าเป็นตัวอย่างเดียวกัน (blind duplicate samples) จากการศึกษาและประเมินผลโดยวิธีการทางสถิติคือ Cochran's test, Grubbs' test และ ANOVA พบว่าคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ ที่ศึกษาอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือค่า repeatability standard deviation (S_r), repeatability relative standard deviation ($RSD_r, \%$) และ repeatability limit (r) อยู่ระหว่าง 0.03-0.16, 0.57-1.72 และ 0.09-0.46 ตามลำดับ ค่า reproducibility standard deviation (S_R), reproducibility relative standard deviation ($RSD_R, \%$) and reproducibility limit (R) อยู่ระหว่าง 0.07-0.21, 1.39-3.78 และ 0.19-0.59 ตามลำดับ โดยสรุปวิธีนี้เหมาะสมที่จะใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลือง ซึ่งจะได้นำเสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาพิจารณารับรอง และประกาศใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว

Accepted for publication, 23 July 2015

บทนำ

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข⁽¹⁾ ได้นิยามผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองว่า หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองด้วยการหมักหรือกรรมวิธีอื่นที่เหมาะสม และจะแต่งรสหรือสีหรือไม่ก็ได้ เช่น ซีอิ้ว ซอสปรุงรส ทั้งนี้ให้หมายความรวมถึงผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองที่ได้ออกมาแล้ว ให้เป็นอาหารที่กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน ผลิตภัณฑ์นี้แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ตามลักษณะการผลิต คือ ผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองด้วยการหมักที่มีได้มีการปรุงแต่งรสหรือสี ผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองด้วยการหมักที่ไม่ได้มีการปรุงแต่งรสหรือสี และผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์โปรตีนของถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังได้กำหนดคุณภาพของผลิตภัณฑ์ในสภาพที่เป็นของเหลว ให้ต้องมีโปรตีนไม่น้อยกว่า 4, 1.5 และ 10 กรัม ต่อ 100 กรัม ตามลำดับ แต่ยังไม่มีการกำหนดวิธีการตรวจวิเคราะห์โปรตีนในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน ซึ่งอาจทำให้เกิดข้อโต้แย้งถึงผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันเมื่อใช้วิธีทดสอบที่ต่างกัน

วิธีวิเคราะห์โปรตีน เป็น empirical method นั่นคือ ผลทดสอบที่ได้จะขึ้นกับวิธีวิเคราะห์ที่ใช้และสอบกลับไปทำวิธีการทดสอบนั้น ๆ การใช้วิธีที่ต่างกันจะให้ผลทดสอบที่ต่างกัน ไม่สามารถนำผลการทดสอบมาเปรียบเทียบกันได้ ดังนั้นการกำหนดวิธีวิเคราะห์ให้เป็นวิธีมาตรฐานเดียวกันนั้นมีความสำคัญมาก วิธีวิเคราะห์โปรตีนมีหลายวิธีโดยใช้หลักการต่าง ๆ⁽²⁾ เช่น Kjeldahl method, Dumas principle (combustion principle), Formal titration, Colorimetric methods และ spectroscopic method วิธี Kjeldahl method เป็นวิธีที่องค์ระหว่างประเทศ เช่น CODEX, international association for cereal science and technology (ICC) ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในหลาย ๆ ผลิตภัณฑ์ เช่น ในนม (AOAC 991.20, ISO 8968-1/IDF 20-1:2014)^(3, 4) ในธัญพืชและผลิตภัณฑ์ (ICC NO.105/2⁽⁵⁾) ในน้ำผักและผลไม้ (DIN EN 12135 (1997-12))⁽⁶⁾ และยังเป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารในประเทศไทยส่วนใหญ่เลือกใช้และได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 จึงได้เลือกเทคนิคนี้มากำหนดเป็นวิธีทดสอบและทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยห้องปฏิบัติการเดียวที่ห้องปฏิบัติการของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นำค่าที่ได้มาประเมินผลทางสถิติ พบว่าเป็นวิธีที่เหมาะสม จึงได้นำวิธีนี้มาทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยห้องปฏิบัติการหลายแห่งที่มีความเชี่ยวชาญ (collaborative study) โดยคัดเลือกห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชนที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 เข้าร่วมโครงการรวม 14 แห่ง เตรียมตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนในช่วง 1.8 ถึง 12 กรัมต่อ 100 กรัม รวม 5 ตัวอย่างส่งให้ห้องปฏิบัติการพร้อมวิธีวิเคราะห์ที่จัดทำขึ้น ผลที่ได้จากห้องปฏิบัติการนำมาประเมินผลโดยใช้สถิติที่เหมาะสมตามแนวทาง Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis⁽⁷⁾ ผลการประเมินจะได้คุณลักษณะเฉพาะของวิธี (method performance characteristic) ที่สำคัญ คือ repeatability และ reproducibility ซึ่งใช้เป็นเกณฑ์การยอมรับสำหรับการทวนสอบ (method verification) สำหรับผู้ที่นำวิธีนี้ไปใช้ต่อไป

การทำ collaborative study จัดเป็น multi-laboratory method validation เป็นการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่สมบูรณ์และน่าเชื่อถือที่สุดซึ่งต้องมีการดำเนินการตามขั้นตอน (protocol) ที่นานาชาติยอมรับ ส่งผลให้วิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการทำ collaborative study มีความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติ⁽⁸⁾

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมและเป็นที่ยอมรับของผู้มีส่วนได้เสียทุกภาคส่วน นำเสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาพิจารณารับรองและประกาศใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองตามมาตรฐานที่กำหนด

วัสดุและวิธีการ

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการเดียว

ทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยห้องปฏิบัติการเดียวที่ห้องปฏิบัติการของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ตัวอย่างทดสอบ

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์โปรตีนของถั่วเหลือง ผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองด้วยการหมัก และผลิตภัณฑ์ปรุงรสชนิดหวานรวม 5 ตัวอย่าง ที่มีปริมาณโปรตีนในช่วง 1.8 ถึง 12 กรัมต่อ 100 กรัม

วิธีวิเคราะห์

วิธี Kjeldahl method ใช้ block digestion/steam distillation ตัวอย่างถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริกที่อุณหภูมิสูง มี K_2SO_4 ช่วยเพิ่มจุดเดือดของกรดซัลฟูริก ทองแดงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ใช้กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 เป็นตัวดักจับแอมโมเนียที่กลั่นได้ และไตเตรทกับสารมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก โดยมีรายละเอียดตามวิธีวิเคราะห์ที่ส่งให้ห้องปฏิบัติการในการทำ collaborative study

การทดสอบความเที่ยง (precision)

ทดสอบความเที่ยงของวิธี (repeatability) โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปรุงรสฯ ทั้ง 5 ตัวอย่างโดยวิธีที่กำหนดตัวอย่างละ 7 ซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

การทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

ทดสอบร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจน โดยการทดสอบประสิทธิภาพการย่อย ทดสอบการสูญเสียไนโตรเจน และทดสอบประสิทธิภาพการกลั่นและการไตเตรท โดยการวิเคราะห์สารมาตรฐานอย่างละ 7 ซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของวิธีโดยห้องปฏิบัติการที่มีความเชี่ยวชาญ (collaborative study)

การศึกษานี้ได้คัดเลือกห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชนเข้าร่วมโครงการรวม 14 แห่ง ทุกห้องปฏิบัติการได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 ในรายการตรวจวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Kjeldahl

ตัวอย่างทดสอบ

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์โปรตีนของถั่วเหลือง ผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองด้วยการหมัก และผลิตภัณฑ์ปรุงรสชนิดหวานโดยคัดเลือกตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนต่างกัน 5 ระดับ ในช่วง 1.8 ถึง 12 กรัมต่อ 100 กรัม รวม 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างละประมาณ 3 ลิตร ผสมให้เข้ากัน เทใส่ขวดพลาสติก ขวดละประมาณ 30 มิลลิลิตร ติดฉลากระบุหมายเลขตัวอย่าง และรหัสที่ต่างกันตัวอย่างละ 2 รหัส ดังนี้ ตัวอย่างที่ 1: sample A และ N, ตัวอย่างที่ 2: sample B และ Q, ตัวอย่างที่ 3: sample C และ S, ตัวอย่างที่ 4: sample F และ X, ตัวอย่างที่ 5: sample M และ Z (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างซอสปรุงรสที่ใช้ในการทำ collaborative study

Sample No.	Sample code	Sample type	Sample description	Protein content (g/100g)
1	A N	Blind duplicates	ซอสปรุงรส (ชนิดไฮโดรไลซ์โปรตีนของถั่วเหลือง)	10-11
2	B Q	Blind duplicates	ซอสปรุงรส (ชนิดไฮโดรไลซ์โปรตีนของถั่วเหลือง)	มากกว่า 11
3	C S	Blind duplicates	ซอสปรุงรส	5-7
4	F X	Blind duplicates	ซอสปรุงรส (ชนิดหมัก)	8-10
5	M Z	Blind duplicates	ซอสปรุงรสชนิดหวาน	1-2

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity test)

ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง โดยสุ่มตัวอย่างแบบ random ตัวอย่างละ 10 ขวด ตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยทดสอบแบบสุ่มขวดละ 2 ขวด ผลที่ได้นำมาทดสอบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง (between sample variation) โดยใช้สถิติ One-way ANOVA (Analysis of Variance) ค่า F ที่คำนวณได้จะต้องน้อยกว่า F critical ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การทดสอบความคงตัว (Stability test)

คัดเลือกตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันแล้วที่มีปริมาณโปรตีนประมาณ 5-7 กรัมต่อ 100 กรัม และประมาณ 11-12 กรัม ต่อ 100 กรัม เป็นตัวแทนในการทดสอบความคงตัวของตัวอย่าง โดยสุ่มตัวอย่างละ 5 ขวด ทำการวิเคราะห์หลังจากวันที่ครบกำหนดการส่งผลโดยวิเคราะห์ขวดละ 2 ขวด นำผลวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์จากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้สถิติ t-test ค่า t ที่ได้จะต้องน้อยกว่า t critical ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การส่งตัวอย่างทดสอบและเอกสารให้ห้องปฏิบัติการ (Distribution of samples and documents)

ส่งตัวอย่างและสารเร่งปฏิกิริยา (copper catalyst (Kjeltab Cu/3.5)) 50 เม็ด วิธีวิเคราะห์ แบบตอบรับตัวอย่าง คำแนะนำ แบบรายงานผล และแบบสอบถามรายละเอียดเกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์ พร้อมทั้งแจ้งรหัสให้แต่ละห้องปฏิบัติการทราบ เพื่อใช้ในการติดต่อกับผู้ดำเนินการ ส่งให้ทางไปรษณีย์ลงทะเบียน แต่ละห้องปฏิบัติการจะได้รับตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ขวดที่มีรหัสต่างกัน โดยไม่ทราบวาทัง 2 ขวด เป็นตัวอย่างเดียวกัน (blind duplicates)

ในคำแนะนำระบุให้ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง แต่เมื่อเปิดขวดแล้วให้เก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8°C ให้ตรวจวิเคราะห์ตามวิธีที่กำหนด ตรวจวิเคราะห์และส่งผลกลับภายใน 3 สัปดาห์ โดยรายงานผลทุกรหัสตัวอย่างในรูปแบบฟอร์มที่กำหนดด้วยทศนิยม 2 ตำแหน่ง

วิธีวิเคราะห์จะประกอบด้วยรายละเอียดของวิธีวิเคราะห์ การทดสอบร้อยละ การคืนกลับของไนโตรเจน และข้อแนะนำในการตรวจวิเคราะห์ต่างๆ ดังนี้

วิธีวิเคราะห์

1. วิธีดำเนินการ (Procedures)

- 1.1 ชั่งตัวอย่างซอสปรุงรส 1-2 กรัม (เทคนิค 4 ตำแหน่ง) ลงในหลอดย่อย
- 1.2 เติม copper catalyst จำนวน 2 เม็ด และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร แกว่งเบาๆ เพื่อผสมให้เข้ากันอย่างทั่วถึง หยด antifoam 2-3 หยด
- 1.3 นำหลอดย่อยวางลงใน tube rack วาง heat shields แล้วสวม exhaust manifold ลงบนปากของหลอดย่อยให้ปิดพอดีจึงยก rack ไปวางบนเครื่องย่อย (digestor) ซึ่งได้ปรับตั้งอุณหภูมิไว้ที่ $420 \pm 10^{\circ}\text{C}$ ปรับระดับการดูดของ exhaust manifold ในส่วนของ scrubber unit หรืออุปกรณ์อื่นให้เหมาะสมที่สามารถดูดควันที่เกิดจากการย่อย ย่อยจนกระทั่งเกิดควันสีขาว (ประมาณ 5 นาที)
- 1.4 ปรับลดระดับการดูดของ exhaust manifold ในส่วนของ scrubber unit หรืออุปกรณ์อื่น (ให้ควันสีขาววนเวียนอยู่ในหลอดย่อย) ย่อยต่อจนกระทั่งได้ของเหลวใส (ประมาณ 50 นาที)
- 1.5 ยก tube rack ออกจากเครื่องย่อย โดยยังมี exhaust manifold สวมอยู่ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น (ประมาณ 25 นาที) (ไม่ควรทิ้งไว้ข้ามคืนเพราะอาจทำให้เกิดตะกอนในหลอดย่อย) เมื่อหมดควันยก manifold ออกพร้อมปิด scrubber unit
- 1.6 นำหลอดย่อยที่เย็นแล้วต่อเข้ากับเครื่องกลั่น
- 1.7 เติมกรดบอริก 30 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ต่อเข้ากับเครื่องกลั่น โดยให้ปลายของหลอดแก้วที่ต่อจาก condenser ของเครื่องกลั่นอยู่ใต้กรดบอริก
- 1.8 เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อยที่เย็นแล้ว 60 มิลลิลิตร เติม 40% NaOH ในหลอดย่อย 50 มิลลิลิตร กลั่นจนได้ distillate ประมาณ 180 มิลลิลิตร
- 1.9 ไตเตรต distillate ที่ได้ด้วย 0.1 M HCl ถึงจุดยุติ บันทึกปริมาตรของ 0.1 M HCl
- 1.10 ทำ blank โดยใช้น้ำตาลซูโครส 0.25 กรัม แทนตัวอย่าง
- 1.11 คำนวณปริมาณไนโตรเจนและโปรตีน

ข้อแนะนำในการตรวจวิเคราะห์

1. หลังจากทิ้งไว้ให้เย็นแล้วของเหลวที่ได้ควรใสไม่มีตะกอน หรือมีตะกอนเพียงเล็กน้อยที่ก้นของหลอดย่อย การเกิดตะกอนแสดงว่าปริมาณกรดซัลฟูริกที่เหลืออยู่ในหลอดย่อยน้อยเกินไป ซึ่งอาจมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้น้อยกว่าความเป็นจริง
2. การเกิดตะกอนอาจเป็นผลมาจากการใช้เวลาในการย่อยนานเกินไปหรือการดูดของ exhaust manifold ในส่วนของ scrubber unit แรงเกินไป
3. ถ้าเกิดตะกอนในหลอดย่อยให้อุ่นหลอดย่อยใน block digester จนกระทั่งตะกอนละลาย
4. ในกรณีที่มีความจำเป็นต้องตั้งหลอดย่อยที่ยังไม่วิเคราะห์ค้างคืน ให้เติมน้ำลงในหลอดย่อยประมาณ 20 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันการตกตะกอนของสารในหลอด

การคำนวณ (calculation)

$$\text{ไนโตรเจน (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \frac{1.4007 (V_A - V_B) M}{W}$$

$$\text{โปรตีน (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \text{ไนโตรเจน (ร้อยละของน้ำหนัก)} \times CF$$

เมื่อ V_A = ปริมาตรของ 0.1 M HCl ที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

- V_B = ปริมาตรของ 0.1 M HCl ที่ใช้ในการไตเตรต blank (มิลลิลิตร)
 M = ความเข้มข้นของ 0.1 M HCl (โมลาร์)
 W = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)
 CF = แฟกเตอร์ในการเปลี่ยนปริมาณไนโตรเจนเป็นปริมาณโปรตีน มีค่า 6.25

2. การทดสอบร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจน (nitrogen recovery verification)

2.1 ทดสอบประสิทธิภาพการย่อย (digestion efficiency)

ชั่ง tryptophan 0.14–0.15 กรัม (หรือ lysine hydrochloride 0.12–0.13 กรัม) และน้ำตาลซูโครส 0.25 กรัม พร้อมสารต่างๆ ทำการย่อย กลั่น และไตเตรต เช่นเดียวกับตัวอย่าง

2.2 ทดสอบการสูญเสียไนโตรเจน (nitrogen loss)

ชั่ง ammonium sulfate (อบที่ 102°C นาน 3 ชั่วโมง เก็บใน desiccator) 0.09–0.1 กรัม น้ำตาลซูโครส 0.25 กรัม พร้อมสารต่างๆ ทำการย่อย กลั่น และไตเตรต เช่นเดียวกับตัวอย่าง

2.3 ทดสอบประสิทธิภาพการกลั่นและการไตเตรต (distillation/titration efficiency)

ชั่ง ammonium sulfate (อบที่ 102°C นาน 3 ชั่วโมง เก็บใน desiccator) 0.09–0.1 กรัม ลงในหลอดย่อย นำไปต่อเข้ากับเครื่องกลั่น ทำการกลั่นและไตเตรต

การคำนวณ

$$\% \text{ recovery} = \frac{\% \text{ ไนโตรเจนที่วิเคราะห์ได้} \times 100}{\% \text{ ไนโตรเจนของสารมาตรฐานที่ใช้} \times P}$$

การประเมินผลด้วยวิธีทางสถิติ (Statistic evaluation of results)

การตรวจสอบข้อมูลเบื้องต้น

ทวนสอบข้อมูลผลการวิเคราะห์และข้อมูลต่างๆ จากห้องปฏิบัติการในเบื้องต้น โดยศึกษาจากข้อมูลในแบบรายงานผลและจากแบบสอบถามรายละเอียดเกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์ของแต่ละห้องปฏิบัติการเพื่อกำจัดผลวิเคราะห์ที่ไม่ถูกต้องหรือผลวิเคราะห์ที่เห็นได้ชัดเจนว่าไม่น่าเชื่อถือ (invalid data) ออกก่อนการประมวลผลทางสถิติ ผลวิเคราะห์ดังกล่าวได้แก่ผลวิเคราะห์ที่คำนวณผิด ผลวิเคราะห์ที่ต่ำหรือสูงกว่าผลจากห้องปฏิบัติการอื่นอย่างชัดเจน ผลวิเคราะห์ที่รายงานหน่วยผิด รวมทั้งผลวิเคราะห์ที่ไม่ได้ทำตามวิธีที่กำหนด เพื่อให้มั่นใจว่าได้ข้อมูลที่ต้องการและน่าเชื่อถือมาใช้ในการประเมินผล

การทดสอบค่าสุดต่าง (Outliers test)

ข้อมูลที่มีค่าแตกต่างทั้งมากกว่าและน้อยกว่าจากข้อมูลในชุดเดียวกันที่ทำให้สงสัยว่าเป็นข้อมูลที่ไม่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน จะถูกนำมาทดสอบค่าสุดต่าง (outliers) โดยใช้สถิติ Cochran's test และ Grubbs' test โดยดำเนินการตามแนวทางของ Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis⁽⁷⁾ โดยมีขั้นตอนดังนี้

นำข้อมูลที่ผ่านการตรวจสอบในเบื้องต้นแล้วมาทดสอบค่าสุดต่างในห้องปฏิบัติการเดียวกัน (within-laboratory outliers) โดยสถิติ Cochran's test จากนั้นนำมาทดสอบค่าสุดต่างระหว่างห้องปฏิบัติการ (inter-laboratory outliers) ด้วยสถิติ Grubbs' test โดยเริ่มต้นจาก single Grubbs' test ทดสอบทั้งค่าที่สูงที่สุดของกลุ่ม 1 ค่า และค่าที่ต่ำที่สุดของกลุ่ม 1 ค่า ต่อมาจึงทดสอบ double Grubbs' test โดยทดสอบค่าที่ต่ำที่สุดของกลุ่ม

2 ค่า ทดสอบค่าที่สูงที่สุดของกลุ่ม 2 ค่า และทดสอบค่าที่สูงที่สุดและต่ำสุดของกลุ่ม ในขณะที่ทดสอบ Grubbs's test ถ้ามี outliers เกิดขึ้นให้ตัด outlier นั้นออก แล้วนำข้อมูลที่เหลือย้อนกลับไปทำ Cochran's test และ Grubbs's test ตามลำดับอีกครั้ง (ภาพที่ 1) ให้ทำงานกระทั่งไม่มีข้อมูลที่เป็น outliers หรือมีข้อมูลมากกว่า 2/9 ของข้อมูลทั้งหมดเป็น outlier นำข้อมูลที่เหลือมาคำนวณค่า precision ของวิธี

ทดสอบค่าสุดต่างของห้องปฏิบัติการเดียวกัน (within-laboratory outliers test)

ผลวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการที่มีความแตกต่างของค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ของคู่ตัวอย่างเดียวกันมากที่สุด เมื่อเทียบกับผลวิเคราะห์ของคู่ตัวอย่างเดียวกันจากห้องปฏิบัติการอื่นๆ จะถูกนำมาทดสอบว่าเป็นค่าสุดต่าง (outlier) หรือไม่โดยใช้สถิติ Cochran's test

$$C = \frac{(D_{\max}^2)}{(\sum D_i^2)} \times 100$$

เมื่อ D_i = ค่าแตกต่างของคู่ตัวอย่างคู่ที่ i เมื่อ $i = 1, 2, 3, \dots, n$
 $D_{\max}$ = ค่าแตกต่างของคู่ตัวอย่างที่มีค่าสูงสุด

เปรียบเทียบค่า C ที่คำนวณได้กับค่าวิกฤตในตาราง ที่ระดับ $P = 2.5\%$ (1-tail) เมื่อ L คือ จำนวนห้องปฏิบัติการ หรือจำนวนคู่ของตัวอย่างเดียวกัน ถ้าค่าที่คำนวณได้มากกว่าค่าวิกฤตแสดงว่ามีความแตกต่างของผลการวิเคราะห์คู่ตัวอย่างนั้นถือว่าค่าที่สงสัยนั้นเป็น outlier ให้ตัดค่าผลการวิเคราะห์คู่ตัวอย่างนี้ออกก่อนดำเนินการทดสอบในขั้นต่อไป

ทดสอบค่าสุดต่างระหว่างห้องปฏิบัติการ (inter-laboratory outliers test)

กรณีค่าสงสัยมีค่าเดียว (single Grubbs' test)

คำนวณค่าเฉลี่ยผลวิเคราะห์ของแต่ละห้องปฏิบัติการ คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลทั้งหมด (S) คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลเมื่อไม่มีค่าต่ำสุดของข้อมูล (S_L) และคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลเมื่อไม่มีค่าสูงสุดของข้อมูล (S_H) คำนวณค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ลดลงดังนี้

$$G_L = 100 \times [1 - (S_L/S)] \text{ และ } G_H = 100 \times [1 - (S_H/S)]$$

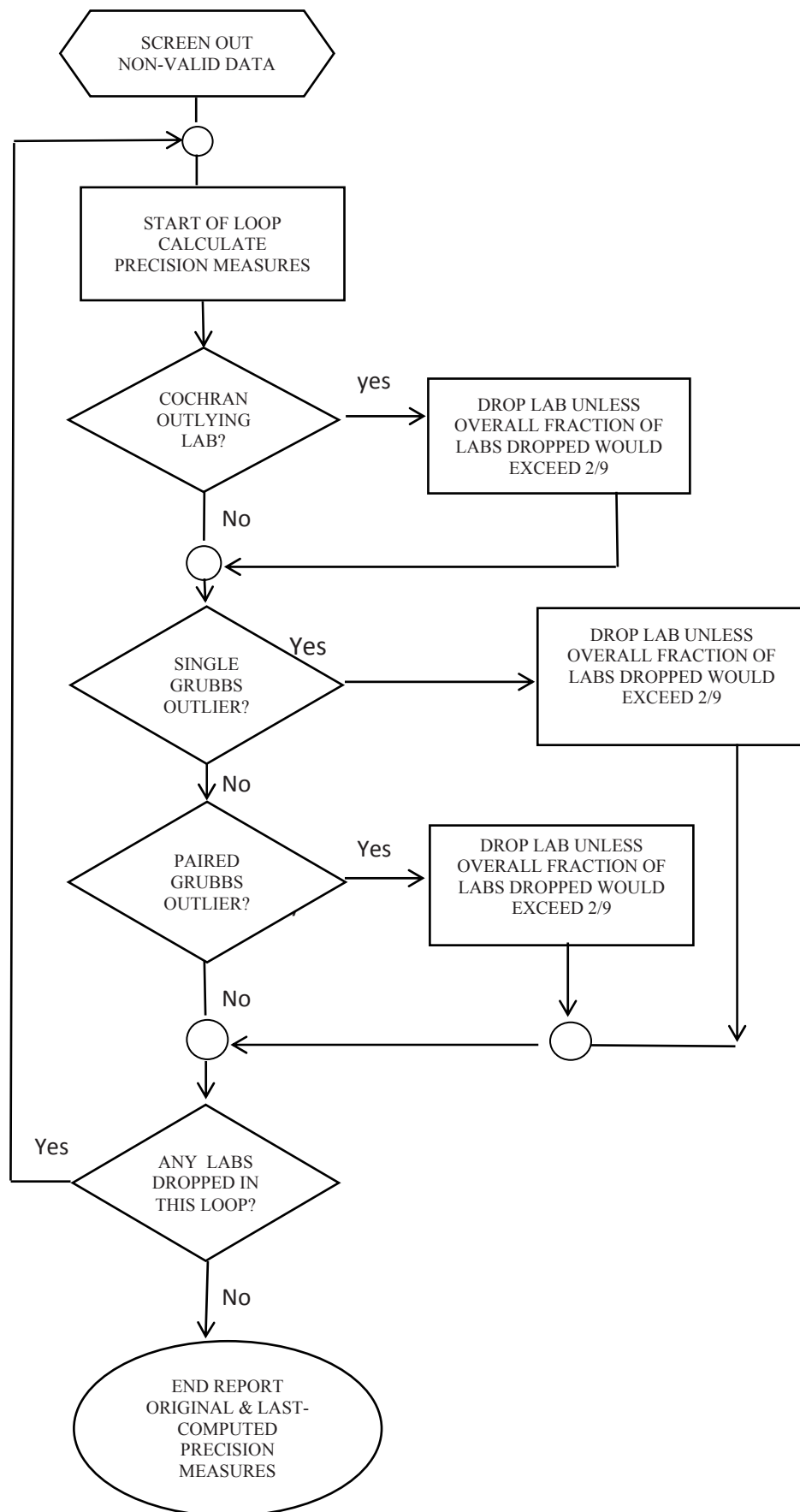
G_L ร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ลดลงเมื่อไม่มีค่าต่ำสุดของข้อมูล

G_H ร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ลดลงเมื่อไม่มีค่าสูงสุดของข้อมูล

เปรียบเทียบค่า G_L , G_H ที่คำนวณได้กับค่าวิกฤตในตาราง Grubbs' test ที่จำนวน L ข้อมูล ถ้าค่า G สูงกว่าค่าวิกฤตที่ $P = 2.5\%$ (2-tail) แสดงว่าค่าที่สงสัยนั้นเป็น outlier

กรณีค่าสงสัยมี 2 ค่า (double Grubbs' test)

ดำเนินการทำนองเดียวกับกรณีค่าสงสัยมีค่าเดียว โดยคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเมื่อไม่มีค่าต่ำสุด 2 ค่าของข้อมูล (S_{2L}) เมื่อไม่มีค่าสูงสุด 2 ค่าของข้อมูล (S_{2H}) และเมื่อไม่มีค่าต่ำสุดและสูงสุดของข้อมูล (S_{HL}) คำนวณค่า G_{2L} , G_{2H} , G_{HL} ตามสูตร $G_{2L} = 100 \times [1 - (S_{2L}/S)]$; $G_{2H} = 100 \times [1 - (S_{2H}/S)]$ และ $G_{HL} = 100 \times [1 - (S_{HL}/S)]$ เปรียบเทียบค่า G ที่คำนวณได้กับค่า G จากตารางเช่นเดียวกับกรณีที่ค่าสงสัยมีค่าเดียว



ภาพที่ 1 ลำดับขั้นตอนการประเมินผลทางสถิติ⁽⁷⁾

คำนวณความเที่ยงของวิธี (precision)

ข้อมูลที่เหลือจากการตัดค่าสุดต่างออกแล้วจะนำไปคำนวณค่าทางสถิติอื่นๆ เพื่อแสดงถึง precision ของวิธี ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$), repeatability standard deviation (S_r), repeatability relative standard deviation (RSD_r), repeatability limit (r), reproducibility standard deviation (S_R), reproducibility relative standard deviation (RSD_R) และ reproducibility limit (R) โดยการคำนวณ

$$\text{Repeatability standard deviation; } S_r = (\sum d_i^2 / 2L)^{(1/2)}$$

เมื่อ d_i = ความต่างของผลวิเคราะห์ของคู่ตัวอย่างเดียวกัน

L = จำนวนห้องปฏิบัติการ (หรือจำนวนคู่ของตัวอย่างเดียวกัน)

$$\text{Repeatability relative standard deviation ; } \%RSD_r = \frac{(S_r \times 100)}{\text{mean}}$$

$$\text{Repeatability limit; } R = 2.8 S_r$$

$$\text{Reproducibility standard deviation; } S_R = \{(S_d^2 + S_r^2) / 2\}^{1/2}$$

$$\text{เมื่อ } S_d^2 = \frac{\sum (T_i - T)^2}{2(L - 1)}$$

T_i = ผลรวมค่าของคู่ของตัวอย่าง i ของแต่ละห้องปฏิบัติการ

T = ค่าเฉลี่ยของค่า T_i ของทุกห้องปฏิบัติการ

L = จำนวนห้องปฏิบัติการ (หรือจำนวนคู่ของตัวอย่างเดียวกัน)

$$\text{Reproducibility relative standard deviation; } \%RSD_R = \frac{(S_R \times 100)}{\text{mean}}$$

$$\text{Reproducibility limit, } R = 2.8 S_R$$

การทดสอบความแม่นยำของวิธี (Accuracy)

คำนวณค่าร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจน (% recovery) จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานในการทดสอบประสิทธิภาพการย่อย (digestion efficiency) ทดสอบการสูญเสียไนโตรเจน (nitrogen loss) และทดสอบประสิทธิภาพการกลั่นและการไตเตรต (distillation/titration efficiency)

ผล

การทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยห้องปฏิบัติการของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร

การทดสอบความเที่ยง

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลือง จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีน 10.44, 11.70, 5.98, 8.28 และ 1.86 กรัม ต่อ 100 กรัม %RSD 1.34, 0.26, 0.50, 0.85 และ 2.15 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การทดสอบวิธีวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการเดียว : ความเที่ยงของวิธีโดยการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างซอสปรุงรส

ลำดับที่	ปริมาณโปรตีน (กรัม/100 กรัม)				
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 4	ตัวอย่างที่ 5
1	10.27	11.65	5.94	8.18	1.80
2	10.27	11.66	5.94	8.20	1.80
3	10.38	11.70	5.95	8.26	1.88
4	10.46	11.71	5.99	8.29	1.89
5	10.53	11.71	6.00	8.30	1.89
6	10.54	11.72	6.01	8.32	1.89
7	10.62	11.73	6.02	8.39	1.89
mean	10.44	11.70	5.98	8.28	1.86
SD	0.14	0.03	0.03	0.07	0.04
RSD (%)	1.34	0.26	0.50	0.85	2.15

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีโดยการทดสอบประสิทธิภาพการย่อย ทดสอบการสูญเสียไนโตรเจน และทดสอบประสิทธิภาพการกลั่นและการไตเตรต พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจน (% mean recovery) มีค่า 98.65, 99.91 และ 99.96 ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.45, 0.22 และ 0.21ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การทดสอบวิธีวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการเดียว : ความแม่นยำของวิธีโดยการทดสอบร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจน

ลำดับที่	ร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจน		
	ประสิทธิภาพการย่อย	การสูญเสียไนโตรเจน	ประสิทธิภาพการกลั่นและการไตเตรต
1	98.32	99.57	99.82
2	98.32	99.79	99.82
3	98.32	99.82	99.82
4	98.32	99.82	99.82
5	98.89	100.04	99.96
6	98.89	100.12	100.12
7	99.46	100.21	100.37
Mean	98.65	99.91	99.96
SD	0.45	0.22	0.21
RSD (%)	0.45	0.22	0.21

การทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยห้องปฏิบัติการที่มีความเชี่ยวชาญ (collaborative study)

ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity testing)

จากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของทั้ง 5 ตัวอย่าง โดยใช้ one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P=0.05$) พบว่าทุกตัวอย่าง มีค่า F น้อยกว่าค่าของ F-critical แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกันเพียงพอที่จะใช้ประเมินผลทดสอบวิธีวิเคราะห์ในครั้งนี

การทดสอบความคงตัว (Stability test)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปรุงรส ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีน 5-7 และ 11-12 กรัม ต่อ 100 กรัม ตัวอย่างละ 5 ขวด ขวดละ 2 ขั้ว เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับผลวิเคราะห์จากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง ด้วยสถิติ t-test พบว่า ค่า t น้อยกว่า t-critical แสดงว่าตัวอย่างมีความคงตัวตลอดช่วงเวลาที่ดำเนินโครงการ

การตรวจสอบเบื้องต้น

จากการตรวจสอบข้อมูลผลวิเคราะห์และรายละเอียดของวิธีการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นจากข้อมูลในแบบรายงานผลและแบบสอบถามรายละเอียดเกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์ของแต่ละห้องปฏิบัติการ ไม่พบข้อมูลที่คิดว่าเป็นการรายงานผิด คำวนผิด หรือรายงานหน่วยผิด แต่พบว่าห้องปฏิบัติการบางแห่งไม่ปฏิบัติตามวิธีวิเคราะห์ที่กำหนด เช่น ในขั้นตอนการดักจับแอมโมเนียที่ได้จากการกลั่น ห้องปฏิบัติการที่ 3 ใช้กรดซัลฟูริก ห้องปฏิบัติการที่ 12 และ 14 ใช้กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 2 และ 1.5 ตามลำดับ แทนการใช้กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ตามที่กำหนด ในวิธีวิเคราะห์ ดังนั้นผลวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการทั้ง 3 แห่ง จึงไม่ถูกนำมาประมวลผลทางสถิติ ผลการวิเคราะห์ของทุกห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองของแต่ละห้องปฏิบัติการ (กรัมต่อ 100 กรัม)

lab code	Sample 1		Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5	
	A	N	B	Q	C	S	F	X	M	Z
1	10.23	10.25	11.57	11.79	5.81	5.95	8.70	8.82	1.81	1.76
2	10.38	10.44	11.56	11.83	5.97	6.02	8.94	8.96	1.92	1.89
3*	10.12	10.18	11.40	11.52	5.85	5.87	8.54	8.88	1.67	1.64
4	10.45	10.38	11.89	11.86	6.06	6.04	9.12	8.98	1.96	1.88
5	10.32	10.26	11.78	11.80	5.99	5.94	8.96	8.90	1.86	1.85
6	9.97	10.31	11.82©	10.82©	5.94	5.86	8.86	8.92	1.74	1.79
7	9.98	10.00	11.48	11.40	5.92	5.95	8.59	8.58	1.76	1.73
8	10.28	10.77	11.78	11.83	5.95	5.95	8.90	8.92	NR	NR
9	10.20	10.25	11.76	11.69	5.74	5.86	8.82	8.89	1.71	1.76
10	10.53	10.06	11.91	11.92	6.01©	5.42©	8.77	8.80	1.85	1.82
11	9.95	9.94	11.69	11.72	5.89	5.78	8.74	8.81	1.88	1.86
12*	10.47	10.30	11.68	11.44	6.04	5.89	9.12	8.81	1.71	1.92
13	10.32	10.35	11.97	12.00	5.87	5.81	8.85	8.90	1.84	1.79
14*	10.50	10.33	11.98	11.75	5.93	5.89	9.03	8.83	1.64	2.04

© = outlier-within lab variation using Cochran's test ($P= 2.5\%$; 1- tail)

NR ห้องปฏิบัติการไม่ได้ส่งผล

*lab No 3, 12 และ 14 ข้อมูลไม่ถูกนำมาคำนวณทางสถิติ

ทดสอบค่าสุดต่าง (outliers test)

จากการทดสอบพบว่า มี 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 2 และ 3 มีค่าสุดต่างเมื่อใช้สถิติ Cochran's ตัวอย่างละ 1 ห้องปฏิบัติการ เมื่อตัดค่าสุดต่างออกแล้ว นำข้อมูลที่เหลือไปหาค่าสุดต่างระหว่างห้องปฏิบัติการ โดยใช้ Grubbs' test ไม่พบค่าสุดต่างระหว่างห้องปฏิบัติการในทุกตัวอย่าง คิดเป็นจำนวนห้องปฏิบัติการที่เป็น outliers ร้อยละ 9 ในตัวอย่างที่ 2 และ 3 (ตารางที่ 4 และตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 จำนวนห้องปฏิบัติการที่มีค่าสุดต่าง

	จำนวนห้องปฏิบัติการ		
	ทั้งหมด	Cochran's test outlier	Grubbs' test outlier
sample 1 (A, N)	11	0	0
sample 2 (B, Q)	11	1 (9%)	0
sample 3 (C, S)	11	1 (9%)	0
sample 4 (F, X)	11	0	0
sample 5 (M, Z)	10	0	0

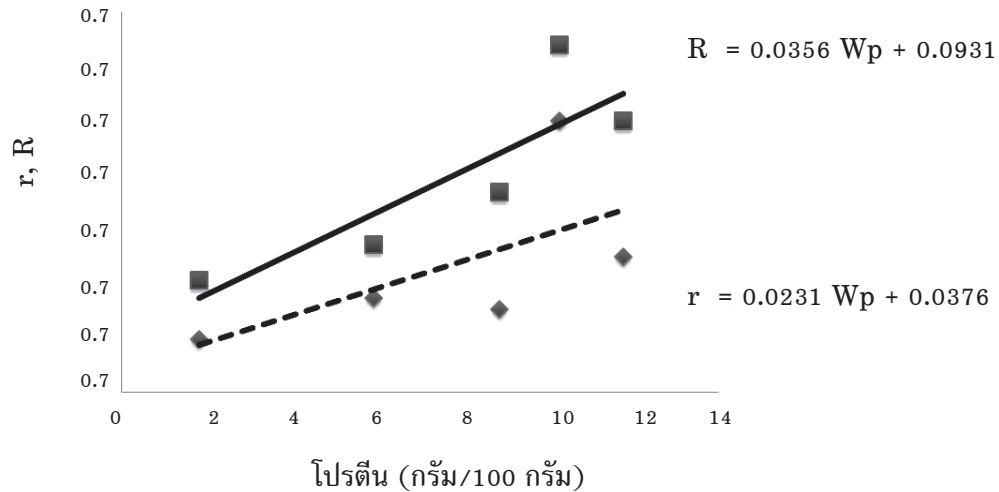
ความเที่ยงของวิธี (precision testing)

จากการคำนวณค่าความเที่ยงของวิธีพบว่า repeatability standard deviation (S_r), repeatability relative standard deviation ($\%RSD_r$) และ repeatability limit (r) เฉลี่ย 0.08 (0.03-0.16), 1.11 (0.57-1.72) และ 0.22 (0.09-0.46) ตามลำดับ ค่า reproducibility standard deviation (S_R), reproducibility relative standard deviation (RSD_R , %) และ reproducibility limit (R) เฉลี่ย 0.13 (0.07-0.21), 2.03 (1.39-3.78) และ 0.37 (0.19-0.59) ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ค่า precision ของวิธีที่แสดงด้วย $\%RSD_r$ และ $\%RSD_R$ ทุกตัวอย่างมีค่า RSD_r น้อยกว่า RSD_R คิดเป็นอัตราส่วนของ RSD_r/RSD_R เฉลี่ย 0.55 (0.40-0.78)

ตารางที่ 6 คุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์โปรตีนในซอสปรุงรส

	Sample 1 A, N	Sample 2 B, Q	Sample 3 C, S	Sample 4 F, X	Sample 5 M, Z
Laboratories remaining after eliminating outliers (outlier)	11(0)	10(1)	10(1)	11(0)	10(0)
Mean value, g/100g	10.26	11.76	5.93	8.85	1.82
Repeatability standard deviation, S_r , g/100g	0.16	0.08	0.06	0.05	0.03
Repeatability relative standard deviation, RSD_r , %	1.60	0.71	0.94	0.57	1.72
Repeatability limit, r (= $2.8 S_r$), g/100g	0.46	0.23	0.16	0.14	0.09
Reproducibility standard deviation, S_R , g/100g	0.21	0.16	0.09	0.13	0.07
Reproducibility relative standard deviation, RSD_R , %	2.06	1.39	1.49	1.44	3.78
Reproducibility limit, R (= $2.8 S_R$), g/100g	0.59	0.46	0.25	0.36	0.19

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า repeatability limit (r) และ reproducibility limit (R) กับความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนในตัวอย่างได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ $r = 0.0231Wp + 0.0376$; $R = 0.0356Wp + 0.0931$ เมื่อ Wp คือปริมาณโปรตีน (กรัม ต่อ 100 กรัม) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง r, R และปริมาณโปรตีน

ร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจน (Nitrogen recovery verification)

การประเมินผลการทดสอบร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจนจะใช้เฉพาะข้อมูลของห้องปฏิบัติการที่ใช้คำนวณทางสถิติเพื่อศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของวิธี ดังนั้นข้อมูลของห้องปฏิบัติการ 3, 12 และ 14 จะไม่ถูกนำมาประมวลผล นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการ 10 รายงานผลเป็นค่าต่ำสุดและสูงสุดในทุกรายการทดสอบ ห้องปฏิบัติการ 8 ใช้ lysine hydrochloride ในการทดสอบประสิทธิภาพของการย่อย ในขณะที่ห้องปฏิบัติการอื่นใช้ tryptophan ดังนั้นข้อมูลในทุกรายการทดสอบจากห้องปฏิบัติการ 10 และข้อมูลการทดสอบประสิทธิภาพของการย่อยของห้องปฏิบัติการที่ 8 ไม่ถูกนำมาประมวลผลเช่นกัน ผลการทดสอบร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจนจากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อย การทดสอบการสูญเสียไนโตรเจนและการทดสอบประสิทธิภาพการกลั่นและการไทเตรตเฉลี่ย 99.38, 99.57 และ 99.53 ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% relative standard deviation) 1.04, 0.54 และ 0.87 ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจน

lab code	ร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจน		
	ประสิทธิภาพการย่อย	การสูญเสียไนโตรเจน	ประสิทธิภาพการกลั่นและการไต่เตรต
1	99.83	99.28	99.93
2	97.80	99.70	99.70
3*	NR	NR	99.06
4	100.04	100.41	100.15
5	100.81	99.71	98.72
6	98.80	99.10	97.50
7	98.60	99.20	99.48
8	88.03*	99.70	100.07
9	99.04	99.06	99.29
10*	99.08-100.99	99.28-100.76	99.97-101.88
11	98.50	99.02	99.94
12*	99.29	100.11	100.08
13	101.01	100.50	100.50
14*	101.37	NR	99.47
Mean	99.38	99.57	99.53
RSD (%)	1.04	0.54	0.87

* ข้อมูลไม่ถูกนำมาคำนวณ

วิจารณ์

การทำ collaborative study จัดเป็น multi-laboratory method validation เป็นการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่สมบูรณ์และน่าเชื่อถือที่สุดซึ่งต้องมีการดำเนินการตามขั้นตอน (protocol) ที่นานาชาติยอมรับ ทำให้วิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการทำ collaborative study มีความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติ⁽⁸⁾ ดังจะเห็นได้จากในปี พ.ศ. 2550 สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้กำหนดวิธีวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดและไขมันในกะทิสำเร็จรูป เพื่อสนับสนุนการกำหนดมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศของ Codex (Codex Stan 240, 2003) และได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีที่กำหนดโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยวที่ห้องปฏิบัติการของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร และทำ collaborative study จนได้คุณลักษณะเฉพาะของวิธีเสนอต่อคณะกรรมการอาหารระหว่างประเทศ สาขาวิธีวิเคราะห์และชักตัวอย่างในการประชุม Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling ที่ประเทศยังการี ระหว่างวันที่ 9-13 มีนาคม 2552 ที่ประชุมได้รับรองให้ทั้งสองวิธีเป็นวิธีมาตรฐาน type I (empirical method) ในการวิเคราะห์กะทิสำเร็จรูปและผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐานดังกล่าว นับเป็นความสำเร็จและความภาคภูมิใจของประเทศไทยในการเสนอวิธีวิเคราะห์สู่เวทีโลก

วิธีวิเคราะห์โปรตีนโดย Kjeldahl method ได้มีการพัฒนามาเป็นลำดับ ตั้งแต่การใช้ Kjeldahl flask และเตาย่อยแบบดั้งเดิม (traditional digestion) มาเป็นการใช้หลอดย่อย และย่อยในเตาหลุม (block digestion)

ซึ่งเป็นที่ยอมรับมากในปัจจุบัน เนื่องจากง่ายและสะดวกในการปฏิบัติงาน อีกทั้งเป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการหลายแห่งในประเทศเลือกใช้และได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 จึงได้คัดเลือกให้เป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ห้องปฏิบัติการที่ 1,8 และ 10 พบว่า ตัวอย่างแห้งหลังการย่อย แสดงว่ามีการสูญเสียกรดในระหว่างการย่อย ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากอัตราการดูดความชื้นเกินไป แต่อย่างไรก็ตามห้องปฏิบัติการที่ 1 แก้ไขโดยเพิ่มปริมาณกรดที่ใช้ย่อย และปรับลดอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อย ห้องปฏิบัติการที่ 10 แก้ไขโดยเติมน้ำลงในหลอดย่อย ผลการวิเคราะห์ทั้งสองห้องปฏิบัติการอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ จึงเห็นได้ว่าขั้นตอนการย่อยนั้นปริมาณกรดที่ใช้ อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการย่อย และอัตราการดูดความชื้นกรดต้องสัมพันธ์กันที่จะทำให้ได้ของเหลวที่ใส ไม่แห้งแข็ง และเมื่อหลอดย่อยเย็นลงแล้วให้เติมน้ำลงไปและทำการกลั่นทันที ถ้าไม่สามารถกลั่นได้ทันทีหรือต้องทิ้งไว้ค้างคืนให้เติมน้ำลงในหลอดย่อยเมื่อหลอดย่อยเย็นลงแล้วเช่นกัน

ตัวอย่างที่เตรียมได้นั้นเมื่อนำมาทดสอบโดยสถิติ one-way ANOVA พบว่าทุกตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกันและมีความคงตัวตลอดระยะเวลาที่ทำกิจกรรม จึงเหมาะสมที่จะใช้ในกิจกรรมนี้

การศึกษาครั้งนี้ไม่พบห้องปฏิบัติการที่มีผลการทดสอบเป็น outlier เมื่อใช้สถิติ Grubbs' test แต่พบว่ามีผลการทดสอบเป็น outlier เมื่อใช้สถิติ Cochran's test คิดเป็นร้อยละ 9 ในตัวอย่างที่ 2 และ 3 ซึ่งไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนดคือ ร้อยละ 22 แสดงว่าห้องปฏิบัติการสามารถนำวิธีนี้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ปรุงรสฯ ได้โดยไม่จำกัดทั้งเวลาและสถานที่ ห้องปฏิบัติการที่มีผลการวิเคราะห์เป็น outlier อาจเกิดข้อผิดพลาดในขั้นตอนการย่อย เช่น อุณหภูมิของแต่ละหลุมย่อยไม่สม่ำเสมอทำให้การย่อยในหลอดย่อยบางหลอดไม่สมบูรณ์ หรือเกิดการรั่วในขั้นตอนการกลั่น ความเที่ยงของวิธีเมื่อแสดงด้วยอัตราส่วนของ RSD_F/RSD_R มีค่าเฉลี่ย 0.55 (0.40-0.78) เป็นค่าที่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐานอื่นๆ เช่น การวิเคราะห์โปรตีนในนมโคมีค่า 0.76⁽³⁾

จากสมการแสดงความสัมพันธ์ $r = 0.0231W_p + 0.0376$ เมื่อ W_p คือปริมาณโปรตีน (กรัม ต่อ 100 กรัม) ห้องปฏิบัติการควรนำค่า r ไปกำหนดเป็นเกณฑ์ในการควบคุมคุณภาพผลวิเคราะห์ของการทำ 2 ซ้ำ ให้ต่างกันได้ไม่เกินค่า r ที่ระดับปริมาณโปรตีน W_p ซึ่งเกณฑ์ดังกล่าวเป็นเกณฑ์ยอมรับที่เหมาะสมกับวิธีเนื่องจากได้มาจากผลการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการหลายแห่งที่มีความเชี่ยวชาญ

การทดสอบร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจนในการศึกษาครั้งนี้ทดสอบทั้ง 3 รายการ คือ การทดสอบประสิทธิภาพการย่อย โดยการใช้สารมาตรฐาน tryptophan ส่วนการทดสอบการสูญเสียไนโตรเจน และการทดสอบประสิทธิภาพการกลั่นและการไตเตรต ใช้สารมาตรฐานแอมโมเนียมซัลเฟต สำหรับน้ำตาลซูโครสที่เติมลงไปในการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยและการทดสอบการสูญเสียไนโตรเจนนั้นเพื่อเป็นตัวแทนของสารอินทรีย์ที่มีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นองค์ประกอบ ผลการทดสอบทุกรายการมีค่าเฉลี่ยอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดในมาตรฐานต่างๆ เช่น ร้อยละ 98-101⁽⁹⁾, 99-101⁽⁹⁾ ของการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยและการทดสอบประสิทธิภาพการกลั่นและการไตเตรตตามลำดับ และไม่น้อยกว่าร้อยละ 98^(3,4) และ 99^(3,4) ของการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยและการสูญเสียไนโตรเจนตามลำดับเมื่อห้องปฏิบัติการนำวิธีนี้ไปใช้อาจจะกำหนดให้มีการทดสอบร้อยละการคืนกลับของไนโตรเจนเพียง 2 อย่าง คือ การทดสอบประสิทธิภาพการย่อย และทดสอบการสูญเสียไนโตรเจน^(3,4) โดยค่าที่ได้ควรอยู่ระหว่างร้อยละ 98-101 และ 99-101 ตามลำดับ ถ้าค่าที่ได้ต่ำกว่าเกณฑ์ให้เพิ่มการทดสอบประสิทธิภาพการกลั่นและการไตเตรต ถ้าการทดสอบนี้ได้ค่าตามเกณฑ์คือร้อยละ 99-101⁽⁹⁾ แสดงว่ามีการสูญเสียไนโตรเจนระหว่างการย่อย ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากอุณหภูมิ หรือเวลาที่ใช้ย่อยไม่เหมาะสม หรือการย่อยยังไม่สมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบที่ได้ค่าร้อยละการคืนกลับต่ำหรือสูงกว่าเกณฑ์ อาจมีสาเหตุมาจากค่าความเข้มข้นของกรดที่ใช้ในการไตเตรตไม่ถูกต้อง

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้วิธีที่จะใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข แต่ห้องปฏิบัติการสามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากพืชตามมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก.) ของกระทรวงอุตสาหกรรมได้ โดย มอก.กำหนดปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่า 12 กรัมต่อ 100 กรัม⁽¹⁰⁾

สรุป

การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยการทำ collaborative study ในครั้งนี้ ทำให้ได้วิธีวิเคราะห์โปรตีนโดย Kjeldahl method ใช้ block digestion/ steam distillation มี K_2SO_4 ช่วยเพิ่มจุดเดือดของกรดซัลฟูริก ทองแดงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ใช้กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 เป็นตัวจับแอมโมเนียที่กลั่นได้ และไตเตรตกับสารมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ซึ่งจะได้เสนอให้สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข พิจารณารับและประกาศใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ ถือเป็นมาตรการหนึ่งในการลดข้อโต้แย้งถึงผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันเมื่อใช้วิธีทดสอบที่ต่างกัน และเป็นแนวทางหนึ่งในการคุ้มครองผู้บริโภค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชนที่ให้ความร่วมมือในการเข้าร่วมการประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โปรตีนในผลิตภัณฑ์ปรุงรสฯ ดังรายชื่อต่อไปนี้ บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด และสาขาสงขลา บริษัท เอสจีเอส (ประเทศไทย) จำกัด บริษัท เอแอลเอส แลบบอราทอรี กรุ๊ป (ประเทศไทย) จำกัด บริษัท แอนาไลติคอล ลาบบอราทอรีส์ เซอร์วิส จำกัด ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ เชียงใหม่ สุราษฎร์ธานี สงขลา ขอนแก่น นครราชสีมา บริษัท ศูนย์ห้องปฏิบัติการและวิจัยทางการแพทย์และการเกษตรแห่งเอเชีย จำกัด สถาบันอาหาร และสถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล

เอกสารอ้างอิง

1. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลือง. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 127, ตอนพิเศษ 74 ง. (ลงวันที่ 14 มิถุนายน 2553).
2. Kirk RS, Sawyer R, editors. Pearson's composition and analysis of foods. 9th ed. Singapore: Longman Singapore Publishers; 1991. p. 20-22.
3. Bradley RL, chapter editor. Chapter 33. Dairy products: nitrogen (total) in milk, Kjeldahl method. In: Latimer GW, editor. Official methods of analysis of AOAC international. 19th ed. Gaithersburg, MD: AOAC International; 2012. p.10-12.
4. ISO 8968-1/IDF 20-1: 2014. Milk and milk products - determination of nitrogen content-Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation 2nd ed. Geneva: ISO/IDF; 2014.'
5. ICC No.105/2. Determination of crude protein in cereals and cereal products for food and for feed. Vienna: International Association for Cereal Science and Technology; 1994.
6. DIN EN 12135 (1997-12). Fruit and vegetable juices - determination of nitrogen content by the Kjeldahl method. Sydney: Deutsch Industrial Norms; 1997.

7. Latimer GW, editor. Official methods of analysis of AOAC international. Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. 19th ed. Gaithersburg, MD: AOAC International; 2012. p. 1-11.
 8. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549. หน้า 10.
 9. ISO 1871: 2009. Food and feed products -- general guidelines for the determination of nitrogen by Kjeldahl method. 2nd ed. Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 2009.
 10. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม มอก. 8-2549 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำซอสปรุงรส. ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่มที่ 123, ตอนที่ 68 ง. (ลงวันที่ 20 กรกฎาคม 2549).
-

Collaborative Study for Determination of Protein in Seasoning Soy Sauce

Niphaporn Lakshanasomya and Jintana Kitcharoenwong

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

ABSTRACT Protein content is a key requirement for the quality of seasoning soy sauce according to the notification of the Ministry of Public Health. There are various methods available for protein determination in food but no specific method for seasoning soy sauce exists. Since method for protein determination is an empirical method which gives the result that is method-dependent, different method may give different result. This can lead to the disputes among users of the analytical data. It is obvious that a standardized method is needed especially when the result is to be used in law enforcement. The aims of this study is to validate the selected method for protein in seasoning soy sauces using collaborative trial in order to ensure inter-laboratory reproducibility and to characterize the performance of the method that can be used as acceptance criteria when laboratories apply this method in routine work. In this study, Kjeldahl method using block digestion with a copper catalyst followed by steam distillation and titration was validated by single laboratory prior to the collaborative study. The collaborative study involved a series of experiments in 14 selected competent laboratories. Five blind duplicate samples of seasoning soy sauces and sweetening seasoning soy sauces with protein content varied from 1.8 g/100g to 12 g/100g were used. The analytical data were statistical analyzed using Cochran's test, Grubbs' test and ANOVA. The results showed as follows: repeatability standard deviation (S_r), repeatability relative standard deviation ($RSD_r, \%$) and repeatability limit (r) ranged from 0.03–0.16, 0.57–1.72 and 0.09–0.46 respectively. Reproducibility standard deviation (S_R), reproducibility relative standard deviation ($RSD_R, \%$) and reproducibility limit (R) ranged from 0.07–0.21, 1.39–3.78 and 0.19–0.59 respectively. It can be concluded that this method is reproducible and appropriate for the determination of protein in seasoning soy sauces. This method will be proposed for adoption as the standard method attached to the related food standards in the Notification of the Ministry of Public Health.

Key words: collaborative study, Protein determination, Kjeldahl method, seasoning soy sauce

ผลกระทบของการล้างผักซึ่งบริโภคดิบ เพื่อลดสารตกค้างที่มีต่อปริมาณพยาธิปนเปื้อน

ทงนพันธ์ สัจจาปะละ กนกวรรณ ต้นสกุล และชนทอง เพ็ชรนอก

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ผักสดเป็นอาหารสุภาพที่อุดมไปด้วยโภชนาการ เป็นแหล่งสำคัญของวิตามิน เส้นใยลดน้ำหนัก และแร่ธาตุต่าง ๆ ผู้ที่ต้องการลดน้ำหนักมักบริโภคผักเป็นอาหารหลัก อย่างไรก็ตามผักสดหากบริโภคดิบอาจเสี่ยงต่อการติดเชื้อพยาธิและเกิดปัญหาต่อสุขภาพเช่นท้องผูก ท้องร่วง ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อและข้อ โลหิตจางได้ ในระหว่างปี พ.ศ. 2556-2557 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ได้ทำการศึกษาจำนวนพยาธิที่ปนเปื้อนมากับผักสดที่ไม่ได้ล้าง เพื่อเปรียบเทียบกับจำนวนพยาธิในผักที่เก็บตัวอย่างในครั้งเดียวกันที่ผ่านการล้าง 3 วิธี วิธีการล้างที่ศึกษาเป็นวิธีที่แนะนำให้ใช้ในการล้างผักเพื่อลดอันตรายจากสารตกค้าง ได้แก่ การแช่น้ำเปล่า การแช่ในส่วนผสมน้ำส้มสายชูเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ต่อ น้ำ 4 ลิตร และการแช่น้ำเกลือความเข้มข้น 15 กรัม ต่อ น้ำ 4 ลิตร แล้วล้างออกด้วยน้ำเปล่าอีกครั้ง การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะแสดงให้เห็นว่าวิธีการล้างผักสดข้างต้นนอกจากจะลดปริมาณสารตกค้างแล้วจะสามารถลดปริมาณพยาธิปนเปื้อนได้ด้วยหรือไม่ โดยได้ทำการศึกษาทดลองในผักสดที่นิยมบริโภคดิบที่ซื้อตัวอย่างจากตลาดสดในกรุงเทพฯ และปริมาณผล จำนวน 8 ชนิด ๆ ละ 10 ตัวอย่าง ได้แก่ สะระแหน่ (peppermint), ผักกาดหอม (lettuce), ต้นหอม (spring onion), ใบบัวบก (*Centella asiatica* (L.) Urb.) ใบกุยช่าย (garlic-like vegetable), ใบคื่นฉ่าย (celery), ผักชี (coriander) และผักชีฝรั่ง (parsley) การศึกษาจำนวนพยาธิใช้ sedimental technique ผลการศึกษาพบว่าผักที่ไม่ได้ล้างทั้ง 8 ชนิด ตรวจพบพยาธิตัวกลมอัสสระ และ 1 จาก 8 ชนิด คือ ใบกุยช่ายที่ตรวจไม่พบไข่พยาธิไส้เดือน (*Ascaris* spp.) ส่วนผักอีก 7 ชนิดที่ทำการศึกษา พบไข่พยาธิไส้เดือน ผักชีพบไข่พยาธิเข็มหมุด (*Enterobius vermicularis*) และผักชีฝรั่งพบไข่พยาธิตัวตืด (*Taenia* spp.) เมื่อนำผลการตรวจหาจำนวนพยาธิในผักสดที่ไม่ได้ล้างกับหลังการล้างทั้ง 3 วิธี มาทดสอบด้วยสถิติ The Mann Whitney U ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ได้ค่า $P < 0.05$ และเมื่อทดสอบด้วยสถิติ One - Way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบวิธีการล้างผัก 3 วิธี ในผัก 8 ชนิด ที่ศึกษา พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จึงเป็นการพิสูจน์ด้วยวิธีการทางวิทยาศาสตร์ว่าการล้างผักเพื่อลดปริมาณสารตกค้างทั้ง 3 วิธี สามารถลดจำนวนพยาธิที่ปนเปื้อนในผักได้จริงและไม่่ว่าจะใช้วิธีล้างวิธีใดก็ให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน

Accepted for publication, 19 June 2015

บทนำ

ผู้รักษาสุขภาพที่ต้องการจะควบคุมน้ำหนัก มักบริโภคผักเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญ เนื่องจากผักเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการประกอบไปด้วยวิตามิน เส้นใยที่ช่วยลดน้ำหนัก (dietary fiber) และแร่ธาตุต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ ผู้บริโภคบางส่วนนิยมบริโภคผักดิบ เพื่อคงคุณค่าทางโภชนาการ รักษาสารอาหารที่เป็นประโยชน์ที่อาจถูกทำลายเมื่อถูกความร้อน การบริโภคผักดิบจะมีความเสี่ยงต่อการได้รับสารตกค้างประเภทยาฆ่าแมลง ที่สะสมในร่างกายได้ จึงมีการแนะนำให้ล้างผักด้วยวิธีต่าง ๆ ก่อนบริโภคเพื่อลดปริมาณสารเคมีตกค้างที่ผู้บริโภคจะได้รับ อย่างไรก็ตามอันตรายที่มากับผักดิบนอกจากสารตกค้างจากยาฆ่าแมลงแล้ว ผู้บริโภคยังเสี่ยงต่อการได้รับเชื้อโรคและพยาธิที่ทำให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพด้วย แหล่งที่มาของการปนเปื้อนของพยาธิในผัก คือ จากมูลสัตว์ที่ปนเปื้อนอยู่ในดิน น้ำที่ใช้ปลูกผัก และการใช้ปุ๋ยคอกเพื่อเพิ่มผลผลิต⁽¹⁾ วิธีปฏิบัติของชาวสวนผักเมื่อเก็บผักแล้วจะทำการตัดแต่งเพื่อส่งขายจนถึงมือผู้บริโภคโดยจะไม่มี การล้างผัก ก่อนดั่งนั้นจึงอาจมีพยาธิปนเปื้อนมากับผักสดที่จำหน่ายตามท้องตลาด ซึ่งมีรายงานว่าผู้บริโภคผักดิบที่ไม่ผ่านการล้างอย่างเหมาะสมจะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้บริโภคได้รับประทานผักที่มีการปนเปื้อนของพยาธิ⁽²⁾ อาจเกิดการเจ็บป่วยเนื่องจากพยาธิเข้าไปเจริญในร่างกายโดยเฉพาะในลำไส้ เกิดอาการท้องผูก เกิดการสะสมของพิษในร่างกาย อาจทำให้เกิดอาการโรคโลหิตจางและ parasites อื่น ๆ ที่ติดมากับผักอาจทำให้เกิดอาการท้องเสีย ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อและข้อ รวมทั้งมีโอกาที่จะทำให้พยาธิแพร่กระจายไปในกลุ่มประชากรอย่างกว้างขวางได้ ดังนั้นสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งเป็นหน่วยงานที่ดูแลคุ้มครองสุขภาพอนามัยของผู้บริโภคจึงได้ทำการศึกษาวิจัยเพื่อหาวิธีจัดการความเสี่ยงในเรื่องดังกล่าว โดยใช้ผักที่ไม่ผ่านการล้างเปรียบเทียบกับจำนวนพยาธิกับผักที่ผ่านการล้าง ด้วยน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ซึ่งเป็นวิธีที่ได้ผ่านการวิจัยมาแล้วว่าสามารถลดสารตกค้างประเภทยาฆ่าแมลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ^(3, 4, 5) มาทำการศึกษาทดลองเพื่อพิสูจน์ว่าจะสามารถลดจำนวนพยาธิได้ด้วยหรือไม่

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างผักสดจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ สะระแหน่ (peppermint) ผักกาดหอม (lettuce) ผักชี (coriander) ต้นหอม (spring onion) ผักชีฝรั่ง (parsley) ใบบัวบก (*Cantellaasiatica* (L) urb.) ใบกุยช่าย (garlic-like vegetable) ใบคื่นฉ่าย (celery) จากตลาดสดในกรุงเทพฯ และปริมาณผลชนิดละ 10 ตัวอย่าง

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิด 2 ตำแหน่ง
2. เครื่องเขย่า (shaker)
3. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ชนิดปรับตั้งความเร็วรอบ ได้
4. กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope พร้อม glass slide
5. Beaker ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
6. Sedimentation cylinder ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
7. กระชอนใช้กรองผัก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร ที่วางบน Sedimentation cylinder ได้พอดี
8. หลอด centrifuge
9. Capillary pipet

สารละลายที่ใช้ในการล้างผัก 3 สูตร ได้แก่

1. น้ำเปล่า หรือน้ำประปา
2. น้ำเกลือ เตรียมโดยใช้เกลือป่น 15 กรัมผสมน้ำประปา 4 ลิตร ใช้แช่ผักก่อนวิเคราะห์
3. น้ำส้มสายชูเตรียมโดยใช้น้ำส้มสายชู 5% ที่จำหน่ายตามท้องตลาดปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมน้ำประปา 4 ลิตร ใช้แช่ผักก่อนวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์หาจำนวนพยาธิปนเปื้อนใช้ sedimentation technique⁽⁶⁾ ปฏิบัติตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. สุ่มตัวอย่างผักจากการเก็บตัวอย่างในคราวเดียวกันแบบ random sampling จำนวน 200 กรัม ถ้าผักชนิดใดมีรากให้ตัดรากทิ้ง ทำเป็น 4 กลุ่ม แล้วดำเนินการต่อ ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 ไม่ต้องล้างน้ำ
- กลุ่มที่ 2 แช่น้ำเปล่านาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้ง
- กลุ่มที่ 3 แช่น้ำส้มสายชู (น้ำส้มสายชู 5% 15 มิลลิลิตร ต่อ น้ำ 4 ลิตร) นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้ง

- กลุ่มที่ 4 แช่ในเกลือป่น 15 กรัม ผสม น้ำ 4 ลิตร นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้ง นำผักแต่ละกลุ่มดำเนินการวิเคราะห์หาจำนวนพยาธิตามขั้นตอน ต่อไปนี้

2. ตัดผักเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงใน beaker ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายไลโปนเอฟ ที่ผสมกับน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซนต์ (น้ำยาไลโปนเอฟ 1 ส่วน ในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซนต์ 9 ส่วน) ให้ท่วมผักเพื่อลดแรงตึงผิวซึ่งจะช่วยให้พยาธิปนเปื้อนหลุดออกจากผัก

4. นำไปเขย่าบน shaker 240 ครั้งต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง
5. นำไปกรองโดยใช้กระชอนลงใน sedimentation cylinder ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้พยาธิและไข่พยาธิตกตะกอน

6. วนร่งขึ้นเทน้ำเหนือตะกอนทิ้งให้เหลือประมาณ 5-10 มิลลิลิตร
7. เขย่าให้เข้ากันดี แล้วถ่ายของเหลวลงหลอด centrifuge แล้วนำไปปั่นที่ 2,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

8. ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้งไป ให้น้ำในหลอดเหลือ 1.0 มิลลิลิตร
9. ใช้ capillary pipet ผสมตะกอนให้เข้ากันดีแล้วดูดน้ำมาหยดบนแผ่นสไลด์จนหมด
10. นำไปตรวจภายในกล้องจุลทรรศน์โดยใช้วิธี simple direct smear
11. นับจำนวนตัวพยาธิและไข่พยาธิที่พบแล้วบันทึกผลการตรวจ

การทดสอบทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบจำนวนพยาธิ

ใช้การทดสอบ The Mann-Whitney U Test เพื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างจำนวนพยาธิจากผักที่ไม่ได้ล้าง กับผักที่ผ่านการล้างน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู และใช้การทดสอบ One-Way ANOVA เพื่อทดสอบความแตกต่างของจำนวนพยาธิ ในผักชนิดเดียวกันที่ผ่านการล้าง 3 วิธี การทดสอบทั้ง 2 กรณี ทดสอบที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ถ้า $P < 0.05$ แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผล

ผลการตรวจพยาธิหลังการล้างผักสระแหน่จำนวน 10 ตัวอย่าง ด้วยน้ำล้าง 3 ชนิดเทียบกับที่ไม่ได้ล้างได้ผลตามตารางที่ 1 ดังนี้

ตัวอย่างที่ 1 ผักที่ไม่ล้างพบ พยาธิตัวกลม (nematode) จำนวน 7 ตัว ส่วนผักที่ล้างโดยแช่น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 1 ตัว, 1 ตัว และ 0 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 2 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 4 ตัว ไข่ *Ascaris* spp. จำนวน 1 ฟอง ส่วนผักที่ล้างโดยแช่น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 1 ตัว, 0 ตัว และ 0 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 3 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 6 ตัว ส่วนผักที่ล้างโดยแช่น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 1 ตัว, 0 ตัว และ 1 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 4 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 1 ตัว ส่วนผักที่ล้างโดยแช่น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 5 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 5 ตัว ส่วนผักที่ล้างโดยแช่น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 3 ตัว, 2 ตัว และ 1 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 6 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 3 ตัว ส่วนผักที่ล้างโดยแช่น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 0 ตัว, 1 ตัว และ 1 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 7 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 1 ตัว ส่วนผักที่ล้างโดยแช่น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 8 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 37 ตัว ส่วนผักที่ล้างโดยแช่น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode วิถีละ 3 ตัว

ตัวอย่างที่ 9 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 51 ตัว ส่วนผักที่ล้างโดยแช่น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 20 ตัว, 19 ตัว และ 11 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 10 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 114 ตัว ส่วนผักที่ล้างโดยแช่น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 13 ตัว, 20 ตัว และ 10 ตัว ตามลำดับ

ตารางที่ 1 จำนวนพยาธิที่ตรวจพบในใบสาระแนที่ไม่ผ่านการล้างและผ่านการล้างด้วย น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู

ตัวอย่างที่	ไม่ล้าง		ล้างน้ำเปล่า		ล้างน้ำเกลือ		ล้างน้ำส้มสายชู	
	nematode	ไข่	nematode	ไข่	nematode	ไข่	nematode	ไข่
		<i>Ascaris</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.
1	7	0	1	0	1	0	0	0
2	4	1	1	0	0	0	0	0
3	6	0	1	0	0	0	1	0
4	1	0	0	0	0	0	0	0
5	5	0	3	0	2	0	1	0
6	3	0	0	0	1	0	1	0
7	1	0	0	0	0	0	0	0
8	37	0	3	0	3	0	3	0
9	51	0	20	0	19	0	11	0
10	114	0	13	0	20	0	10	0

ส่วนผลการตรวจพยาธิหลังการล้างผักกาดหอม จำนวน 10 ตัวอย่าง ด้วยน้ำล้าง 3 ชนิด เทียบกับผักที่ไม่ได้ล้าง ได้ผลตามตารางที่ 2 ดังนี้

ตัวอย่างที่ 1 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 16 ตัว ไข่ *Ascaris* spp. จำนวน 1 ฟอง ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 5 ตัว, 3 ตัว และ 3 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 2 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 1 ตัว ไข่ *Ascaris* spp. จำนวน 6 ฟอง ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 3 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 8 ตัว ไข่ *Ascaris* spp. จำนวน 1 ฟอง ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 0 ตัว, 3 ตัว และ 1 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 4 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 7 ตัว ไข่ *Ascaris* spp. จำนวน 4 ฟอง ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 0 ตัว, 1 ตัว และ 0 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 5 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 1 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 6 ไม่พบพยาธิในผักที่ไม่ล้างและผักที่ล้าง

ตัวอย่างที่ 7 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 8 ตัว ไข่ *Ascaris* spp. จำนวน 1 ฟอง ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 5 ตัว, 0 ตัว และ 0 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 8 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 1 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 9 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 3 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 10 ไม่พบพยาธิในผักที่ไม่ล้างและผักที่ล้าง

ตารางที่ 2 จำนวนพยาธิที่ตรวจพบในผักกาดหอมที่ไม่ผ่านการล้างและผ่านการล้างด้วย น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู

ตัวอย่างที่	ไม่ล้าง		ล้างน้ำเปล่า		ล้างน้ำเกลือ		ล้างน้ำส้มสายชู	
	nematode	ไข่	nematode	ไข่	nematode	ไข่	nematode	ไข่
		<i>Ascaris</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.
1	16	1	5	1	3	0	3	0
2	1	6	0	0	0	0	0	0
3	8	1	0	0	3	0	1	0
4	7	4	0	0	1	0	0	0
5	1	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	8	1	5	0	0	0	0	0
8	1	0	0	0	0	0	0	0
9	3	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0

เมื่อนำตัวอย่างต้นหอมมาตรวจพยาธิหลังการล้าง จำนวน 10 ตัวอย่าง ด้วยน้ำล้าง 3 ชนิด เทียบกับผักที่ไม่ได้ล้าง ได้ผลตามตารางที่ 3 ดังนี้

ตัวอย่างที่ 1 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 32 ตัว ไข่ *Ascaris* spp. จำนวน 1 ฟอง ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 1 ตัว, 1 ตัว และ 3 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 2 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 4 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 0 ตัว, 1 ตัว และ 1 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 3 ไม่พบพยาธิในผักที่ไม่ล้างและผักที่ล้าง

ตัวอย่างที่ 4 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 2 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 5 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 8 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 0 ตัว, 0 ตัว และ 2 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 6 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 5 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 1 ตัว, 0 ตัว และ 0 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 7 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 4 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 8 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 3 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 9 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 8 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 10 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 15 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตารางที่ 3 จำนวนพยาธิที่ตรวจพบในต้นหอมที่ไม่ผ่านการล้างและผ่านการล้างด้วย น้ำเปล่า น้ำเกลือ และ น้ำส้มสายชู

ตัวอย่างที่	ไม่ล้าง		ล้างน้ำเปล่า		ล้างน้ำเกลือ		ล้างน้ำส้มสายชู	
	nematode	ไข่	nematode	ไข่	nematode	ไข่	nematode	ไข่
		<i>Ascaris</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.
1	32	1	1	0	1	0	3	1
2	4	0	0	0	1	0	1	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	2	0	0	0	0	0	0	0
5	8	0	0	0	0	0	2	0
6	5	0	1	0	0	0	0	0
7	4	0	0	0	0	0	0	0
8	3	0	0	0	0	0	0	0
9	8	0	0	0	0	0	0	0
10	15	0	0	0	0	0	0	0

เมื่อนำตัวอย่างใบบัวบกมาตรวจพยาธิหลังการล้างจำนวน 10 ตัวอย่าง ด้วยน้ำล้าง 3 ชนิด เทียบกับผักที่ไม่ได้ล้าง ได้ผลตามตารางที่ 4 ดังนี้

ตัวอย่างที่ 1 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 50 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 17 ตัว, 21 ตัว และ 7 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 2 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 30 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 4 ตัว, 10 ตัว และ 0 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 3 ผักที่ไม่ล้าง พบ nematode จำนวน 19 ตัว ไข่ *Ascaris* spp. จำนวน 2 ฟอง ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชูพบ nematode จำนวน 1 ตัว, 1 ตัว และ 1 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 4 ผักที่ไม่ล้าง พบไข่ *Ascaris* spp. จำนวน 1 ฟอง ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 5 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 2 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 6 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 6 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 7 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 2 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 8 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 18 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 0 ตัว, 3 ตัว และ 5 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 9 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 45 ตัว ไข่ *Ascaris* spp. จำนวน 1 ฟอง ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 3 ตัว, 2 ตัว และ 3 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 10 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 11 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 0 ตัว, 2 ตัว และ 1 ตัวตามลำดับ

ตารางที่ 4 จำนวนพยาธิที่ตรวจพบในใบผักที่ไม่ผ่านการล้างและผ่านการล้างด้วย น้ำเปล่า น้ำเกลือ และ น้ำส้มสายชู

ตัวอย่างที่	ไม่ล้าง		ล้างน้ำเปล่า		ล้างน้ำเกลือ		ล้างน้ำส้มสายชู	
	nematode	ไข่	nematode	ไข่	nematode	ไข่	nematode	ไข่
		<i>Ascaris</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.
1	50	0	17	0	21	0	7	0
2	30	0	4	0	10	0	0	0
3	19	2	1	0	1	0	1	0
4	0	1	0	0	0	0	0	0
5	2	0	0	0	0	0	0	0
6	6	0	0	0	0	0	0	0
7	2	0	0	0	0	0	0	0
8	18	0	0	0	3	0	5	0
9	45	1	3	0	2	0	3	0
10	11	0	0	0	2	0	1	0

เมื่อนำตัวอย่างใบกุยช่ายมาตรวจพยาธิหลังการล้างจำนวน 10 ตัวอย่าง ด้วยน้ำล้าง 3 ชนิด เทียบกับผักที่ไม่ได้ล้าง ได้ผลตามตารางที่ 5 ดังนี้

ตัวอย่างที่ 1 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 15 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 0 ตัว, 4 ตัว และ 6 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 2 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 3 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 3 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 14 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 4 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 3 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 5 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 11 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 1 ตัว, 0 ตัว และ 0 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 6 ผักที่ไม่ล้างและล้างไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 7 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 1 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 8 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 1 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 9 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 9 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 1 ตัว, 0 ตัว และ 1 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 10 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 2 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตารางที่ 5 จำนวนพยาธิที่ตรวจพบในใบกุยช่ายที่ไม่ผ่านการล้างและผ่านการล้างด้วย น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู

ตัวอย่างที่	ไม่ล้าง		ล้างน้ำเปล่า		ล้างน้ำเกลือ		ล้างน้ำส้มสายชู	
	nematode	ไข่	nematode	ไข่	nematode	ไข่	nematode	ไข่
		<i>Ascaris</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.
1	15	0	0	0	4	0	6	0
2	3	0	0	0	0	0	0	0
3	14	0	0	0	0	0	0	0
4	3	0	0	0	0	0	0	0
5	11	0	1	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	1	0	0	0	0	0	0	0
8	1	0	0	0	0	0	0	0
9	9	0	1	0	0	0	1	0
10	2	0	0	0	0	0	0	0

เมื่อนำตัวอย่างใบคื่นฉ่ายมาตรวจพยาธิหลังการล้าง จำนวน 10 ตัวอย่าง ด้วยน้ำล้าง 3 ชนิด เทียบกับผักที่ไม่ได้ล้าง ได้ผลตามตารางที่ 6 ดังนี้

ตัวอย่างที่ 1 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 54 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 3 ตัว, 1 ตัว และ 5 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 2 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 38 ตัว ไข่ *Ascaris* spp. จำนวน 3 ฟอง ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 8 ตัว, 0 ตัว และ 5 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 3 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 5 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 4 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 5 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 5 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 32 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 1 ตัว, 1 ตัว และ 2 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 6 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 1 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 7 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 22 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 1 ตัว, 0 ตัว และ 0 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 8 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 2 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 9 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 30 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 1 ตัว, 0 ตัว และ 0 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 10 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 34 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 0 ตัว, 0 ตัว และ 1 ตัว ตามลำดับ

ตารางที่ 6 จำนวนพยาธิที่ตรวจพบในใบคีนฉ่ายที่ไม่ผ่านการล้างและผ่านการล้างด้วย น้ำเปล่า น้ำเกลือและน้ำส้มสายชู

ตัวอย่างที่	ไม่ล้าง		ล้างน้ำเปล่า		ล้างน้ำเกลือ		ล้างน้ำส้มสายชู	
	nematode	ไข่	nematode	ไข่	nematode	ไข่	nematode	ไข่
		<i>Ascaris</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.
1	54	0	3	0	1	0	5	0
2	38	3	8	0	0	0	5	0
3	5	0	0	0	0	0	0	0
4	5	0	0	0	0	0	0	0
5	32	0	1	0	1	0	2	0
6	1	0	0	0	0	0	0	0
7	22	0	1	0	0	0	0	0
8	2	0	0	0	0	0	0	0
9	30	0	1	0	0	0	0	0
10	34	0	0	0	0	0	1	0

เมื่อนำตัวอย่างผักขึ้นมาตรวจพยาธิหลังการล้างจำนวน 10 ตัวอย่าง ด้วยน้ำล้าง 3 ชนิด เทียบกับผักที่ไม่ได้ล้าง ได้ผลตามตารางที่ 7 ดังนี้

ตัวอย่างที่ 1 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 20 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 2 ผักที่ไม่ล้างพบ ไข่ *Ascaris* spp. จำนวน 1 ฟอง ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 3 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 41 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 8 ตัว, 4 ตัว และ 2 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 4 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 4 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 5 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 12 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 2 ตัว, 0 ตัว และ 2 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 6 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 2 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 7 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 5 ตัว ไข่พยาธิเข็มหมุด จำนวน 3 ฟอง ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 2 ตัว, 2 ตัว และ 2 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 8 ไม่พบพยาธิในผักที่ไม่ล้างและผักที่ล้าง

ตัวอย่างที่ 9 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 6 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 10 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 3 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตารางที่ 7 จำนวนพยาธิที่ตรวจพบในผักซีที่ไม่ผ่านการล้างและผ่านการล้างด้วย น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู

ตัวอย่างที่	ไม่ล้าง			ล้างน้ำเปล่า		ล้างน้ำเกลือ		ล้างน้ำส้มสายชู	
	nematode	ไข่ <i>Ascaris</i> spp.	ไข่ <i>Enterobius</i> <i>vermicularis</i>	nematode	ไข่ <i>Ascaris</i> spp.	nematode	ไข่ <i>Ascaris</i> spp.	nematode	ไข่ <i>Ascaris</i> spp.
1	20	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3	41	0	0	8	0	4	0	2	0
4	4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	12	0	0	2	0	0	0	2	0
6	2	0	0	0	0	0	0	0	0
7	25	0	3	2	0	2	0	2	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	6	0	0	0	0	0	0	0	0
10	3	0	0	0	0	0	0	0	0

สำหรับการล้างผักซีฝรั่งจำนวน 10 ตัวอย่าง ด้วยน้ำล้าง 3 ชนิด มาตรวจพยาธิ เทียบกับผักที่ไม่ได้ล้าง ได้ผลตามตารางที่ 8 ดังนี้

ตัวอย่างที่ 1 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 24 ตัว ไข่ *Ascaris* spp. จำนวน 1 ฟอง ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 2 ตัว, 0 ตัว และ 1 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 2 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 6 ตัว ไข่ *Ascaris* spp. จำนวน 2 ฟอง ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 0 ตัว, 0 ตัว และ 1 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 3 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 4 ตัว ไข่ *Ascaris* spp. จำนวน 2 ฟอง ส่วนล้างด้วยน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 4 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 2 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ไม่พบพยาธิ

ตัวอย่างที่ 5 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 3 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 1 ตัว, 0 ตัว และ 1 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 6 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 5 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 1 ตัว, 0 ตัว และ 0 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 7 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 19 ตัว ไข่ *Taenia* spp. จำนวน 3 ฟอง ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 0 ตัว, 0 ตัว และ 1 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 8 ไม่พบพยาธิในผักที่ไม่ล้างและผักที่ล้าง

ตัวอย่างที่ 9 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 27 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 1 ตัว, 0 ตัว และ 3 ตัว ตามลำดับ

ตัวอย่างที่ 10 ผักที่ไม่ล้างพบ nematode จำนวน 5 ตัว ส่วนผักที่ล้างในน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบ nematode จำนวน 1 ตัว, 0 ตัว และ 0 ตัว ตามลำดับ

ตารางที่ 8 จำนวนพยาธิที่ตรวจพบในผักซีฝรั่งที่ไม่ผ่านการล้างและผ่านการล้างด้วย น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู

ตัวอย่างที่	ไม่ล้าง			ล้างน้ำเปล่า		ล้างน้ำเกลือ		ล้างน้ำส้มสายชู	
	nematode	ไข่	ไข่	nematode	ไข่	nematode	ไข่	nematode	ไข่
		<i>Ascaris</i> spp.	<i>Taenia</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.		<i>Ascaris</i> spp.
1	24	1	0	2	0	0	0	1	0
2	6	2	0	0	0	0	0	1	0
3	4	2	0	0	0	0	0	0	0
4	2	0	0	0	0	0	0	0	0
5	3	0	0	1	0	0	0	1	0
6	5	0	0	1	0	0	0	0	0
7	19	0	3	0	0	0	0	1	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	27	0	0	1	0	0	0	3	0
10	5	0	0	1	0	0	0	0	0

เมื่อนำจำนวนพยาธิที่ตรวจพบในผักแต่ละชนิดที่ศึกษา มาทดสอบทางสถิติโดยใช้ The Mann-Whitney U Test เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างจำนวนพยาธิจากผักที่ไม่ได้ล้าง กับผักที่ผ่านการล้างน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่า การล้างผักทุกวิธีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับผักที่ไม่ได้ล้าง ดังนี้ สระแห่น ค่า $P = 0.035$, 0.035, 0.023 ตามลำดับ ผักกาดหอมค่า $P = 0.015$, 0.019, 0.007 ตามลำดับ ต้นหอมค่า $P = 0.000$, 0.000, 0.001 ตามลำดับ ใบบัวบก ค่า $P = 0.002$, 0.015, 0.002 ตามลำดับ ใบกุยช่าย ค่า $P = 0.001$, 0.002, 0.003 ตามลำดับ ใบคื่นฉ่ายค่า $P = 0.000$, 0.000, 0.001 ตามลำดับ ผักชี ค่า $P = 0.005$, 0.002, 0.002 ตามลำดับ และผักซีฝรั่ง ค่า $P = 0.001$, 0.000, 0.001 ตามลำดับ

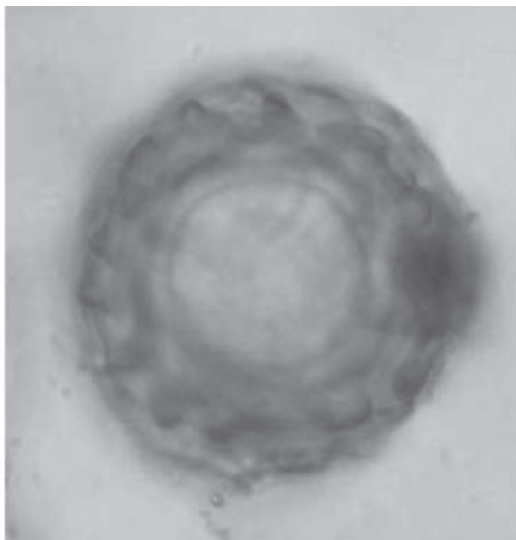
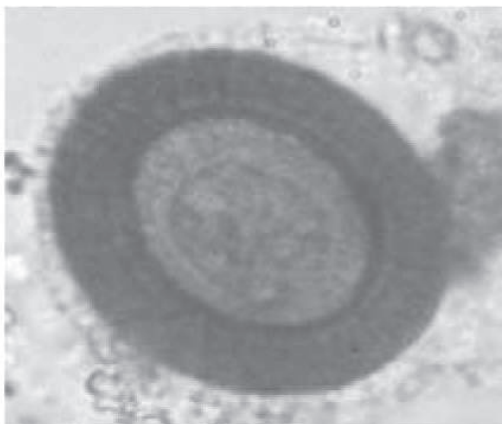
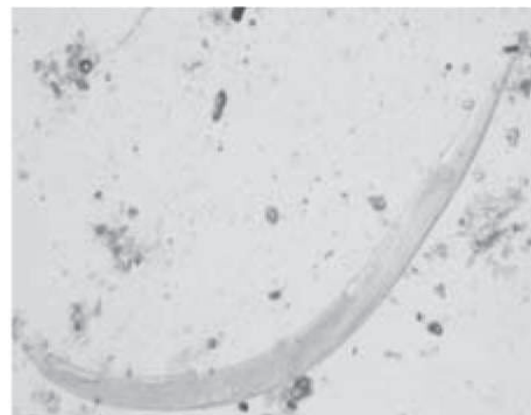
ตารางที่ 9 ผลการทดสอบ The Mann - Whitney U Test ในผัก 8 ชนิด ระหว่างผักที่ไม่ล้างเปรียบเทียบกับผักที่ล้าง 3 วิธี

ชนิดผัก	ล้างน้ำเปล่า	ล้างน้ำเกลือ	ล้างน้ำส้มสายชู
1. สระแห่น	0.035	0.035	0.023
2. ผักกาดหอม	0.015	0.019	0.007
3. ต้นหอม	0.000	0.000	0.001
4. ใบบัวบก	0.002	0.015	0.002
5. ใบกุยช่าย	0.001	0.002	0.003
6. ใบคื่นฉ่าย	0.000	0.000	0.001
7. ผักชี	0.005	0.002	0.002
8. ผักซีฝรั่ง	0.001	0.000	0.001

นำจำนวนพยาธิที่ตรวจพบ มาทดสอบทางสถิติโดยใช้ One-Way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างจำนวนพยาธิจากผักที่ผ่านการล้างน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าผักทั้ง 8 ชนิด ที่ผ่านการล้างทั้ง 3 วิธี มีจำนวนพยาธิที่ลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า $P > 0.05$) ดังนี้ สระแห่นค่า $P = 0.777$ ผักกาดหอมค่า $P = 0.682$ ต้นหอมค่า $P = 0.361$ ใบบัวบก ค่า $P = 0.631$ ใบกุยช่าย ค่า $P = 0.704$ ใบคื่นฉ่าย ค่า $P = 0.304$ ผักชี ค่า $P = 0.679$ ผักซีฝรั่ง ค่า $P = 0.098$

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบ One-Way ANOVA ในผัก 8 ชนิด เปรียบเทียบวิธีการล้าง 3 วิธี ในผักชนิดเดียวกัน

ชนิดผัก	ค่า P ของจำนวนพยาธิจากการล้างผัก 3 วิธี
1. สะระแหน่	0.777
2. ผักกาดหอม	0.682
3. ต้นหอม	0.361
4. ใบบัวบก	0.631
5. ใบกุยช่าย	0.704
6. ใบคื่นฉ่าย	0.304
7. ผักชี	0.679
8. ผักชีฝรั่ง	0.098

ภาพที่ 1 ไข่พยาธิไส้เดือน (*Ascaris* spp.) กำลังขยาย 100 เท่าภาพที่ 2 ไข่พยาธิเข็มหมุด (*Enterobius vermicularis*) กำลังขยาย 100 เท่าภาพที่ 3 ไข่พยาธิตัวตืด (*Taenia* spp.) กำลังขยาย 100 เท่า

ภาพที่ 4 พยาธิตัวกลม (nematode) กำลังขยาย 100 เท่า

วิจารณ์

ผักที่ไม่ได้ล้างจำนวน 1 จาก 8 ชนิด คือใบกุยช่ายที่ตรวจไม่พบไข่พยาธิไส้เดือน (*Ascaris* spp.) ส่วนผักอีก 7 ชนิดที่ทำการศึกษา พบไข่พยาธิไส้เดือน (ภาพที่ 1) ไข่พยาธิชนิดนี้พบได้มากในดินในเขตร้อนและอบอุ่น เป็นพยาธิที่เป็น parasite ทำให้เกิดโรคในคน เมื่อคนกลืนไข่พยาธิชนิดนี้ลงไปในระบบทางเดินอาหาร น้ำย่อยจากกระเพาะอาหารและลำไส้จะย่อยเปลือกไข่ทำให้ตัวอ่อนฟักออกจากไข่บริเวณลำไส้เล็กตอนต้น พยาธิจะไชผ่านผนังลำไส้เล็กเข้าสู่กระแสเลือด เดินทางเข้าสู่ตับเพื่อไปยังหัวใจซีกขวาและปอดในที่สุด^(7, 8) ซึ่งผักหลังจากผ่านการล้างด้วยน้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชูแล้ว ตรวจไม่พบไข่พยาธิชนิดนี้ทุกตัวอย่าง ส่วนผักซี ตรวจพบไข่พยาธิเข็มหมุด (*Enterobius vermicularis*) (ภาพที่ 2) จำนวน 3 ฟองใน 1 ตัวอย่าง พยาธิชนิดนี้มีคนเป็นพาหะ (host) จำเพาะตัวเต็มวัยจะอาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ แล้วออกมาวางไข่บริเวณทวารหนักในตอนกลางคืน⁽⁷⁾ ผักชีฝรั่ง ตรวจพบไข่พยาธิตัวเต็ม (*Taenia* spp.) (ภาพที่ 3) จำนวน 3 ฟองใน 1 ตัวอย่าง พยาธิตัวเต็มวัยชนิดนี้อาศัยอยู่ในลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) ของคน ซึ่งจะทำให้เกิดลำไส้หรือไส้ติ่งอุดตัน⁽⁷⁾ อย่างไรก็ตามหลังจากผ่านการล้างทั้ง 3 วิธี แล้ว ตรวจไม่พบไข่พยาธิที่ปนเปื้อน

ผักทั้ง 8 ชนิด ที่ไม่ได้ล้างตรวจพบพยาธิตัวกลมอิสระ (free-living nematode) (ภาพที่ 4) ในปริมาณมาก เนื่องจากเป็นผักที่มีส่วนที่บริโภคได้อยู่ติดพื้นดิน พยาธิตัวกลมอิสระเป็นสิ่งที่ติดมากับดินที่ใช้ในการปลูกผัก แม้มีรายงานว่าพยาธิตัวกลมอิสระไม่เป็น parasite ในคน แต่ในลำไส้ของพาดังกล่าวอาจมีแบคทีเรียที่เป็นเชื้อโรคเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์⁽⁹⁾ การศึกษาครั้งนี้พบว่าใบสะระแหน่ที่ไม่ผ่านการล้างพบพยาธิตัวกลมสูงสุดจำนวน 114 ตัว ซึ่งหลังจากผ่านการล้างด้วย น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชูแล้ว ยังคงพบพยาธิตัวกลมอิสระหลงเหลืออยู่จำนวน 13, 20, 11 ตัว ตามลำดับ ผักกาดหอมที่ไม่ผ่านการล้างพบพยาธิตัวกลมสูงสุดจำนวน 18 ตัว ซึ่งหลังจากผ่านการล้างด้วย น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชูแล้ว ยังคงพบพยาธิตัวกลมสูงสุดจำนวน 5, 3, 3 ตัว ตามลำดับ ต้นหอมที่ไม่ผ่านการล้างพบพยาธิตัวกลมสูงสุด จำนวน 32 ตัว ซึ่งหลังจากผ่านการล้างด้วย น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชูแล้ว ยังคงพบพยาธิตัวกลมสูงสุด จำนวน 1, 1, 3 ตัว ตามลำดับ ใบบวบที่ไม่ผ่านการล้างพบพยาธิตัวกลมสูงสุดจำนวน 50 ตัว ซึ่งหลังจากผ่านการล้างด้วย น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชูแล้ว ยังคงพบพยาธิตัวกลมอิสระหลงเหลืออยู่ จำนวน 17, 21, 7 ตัว ตามลำดับ ใบกุยช่ายที่ไม่ผ่านการล้างพบพยาธิตัวกลมสูงสุด จำนวน 14 ตัว ซึ่งหลังจากผ่านการล้างด้วย น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชูแล้ว ยังคงพบพยาธิตัวกลมอิสระหลงเหลืออยู่จำนวน 1, 4, 6 ตัว ตามลำดับ ใบคื่นฉ่ายที่ไม่ผ่านการล้างพบพยาธิตัวกลมสูงสุดจำนวน 54 ตัว ซึ่งหลังจากผ่านการล้างด้วย น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชูแล้ว ยังคงพบพยาธิตัวกลมอิสระหลงเหลืออยู่จำนวน 8, 1, 5 ตัว ตามลำดับ ผักชีที่ไม่ผ่านการล้างพบพยาธิตัวกลมสูงสุด จำนวน 41 ตัว ซึ่งหลังจากผ่านการล้างด้วย น้ำเปล่า น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชูแล้ว ยังคงพบพยาธิตัวกลมอิสระหลงเหลืออยู่จำนวน 8, 4, 2 ตัว ตามลำดับ ผักชีฝรั่งที่ไม่ผ่านการล้างพบพยาธิตัวกลมสูงสุดจำนวน 27 ตัว ซึ่งหลังจากผ่านการล้างด้วย น้ำเปล่า และน้ำส้มสายชูแล้ว ยังคงพบพยาธิตัวกลมอิสระหลงเหลืออยู่จำนวน 2, 1 ตัว ตามลำดับ ส่วนการล้างด้วยน้ำเกลือตรวจไม่พบพยาธิตัวกลม

อนึ่งการเปรียบเทียบระหว่างวิธีการล้างผัก 3 วิธี ในผักชนิดเดียวกันโดยใช้ One-Way ANOVA พบว่าในผักทั้ง 8 ชนิด การล้างผักทั้ง 3 วิธี ที่ศึกษา ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และเมื่อพิจารณาผลการล้างผักในส่วนของการลดจำนวนพยาธิตัวกลมในภาพรวม แสดงให้เห็นว่าการล้างผักไม่สามารถล้างพยาธิตัวกลมออกได้ทั้งหมด ดังนั้นการจัดการความเสี่ยงเรื่องพยาธิในผักเพื่อลดจำนวนการปนเปื้อน จึงควรดำเนินการตั้งแต่ที่ต้นทางคือที่แปลงผัก ซึ่งประเทศไทยมีการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับพืชอาหาร⁽¹⁰⁾ ที่สอดคล้องกับมาตรฐาน Codex: Code of Practice for Fresh Fruits and Vegetables⁽¹¹⁾ กำหนดให้แปลงปลูก น้ำที่ใช้ในแปลงปลูกต้องมาจากแหล่งที่ไม่มีสภาพแวดล้อม ซึ่งก่อให้เกิดการปนเปื้อนวัตถุหรือสิ่งที่เป็นอันตราย สำหรับปุ๋ย มาตรฐานของไทยห้ามใช้สิ่งขับถ่าย

ของคนมาเป็นปฏี ส่วน Codex กำหนดในภาพกว้างว่าจะต้องบริหารจัดการเพื่อจำกัดความเสี่ยงจากจุลินทรีย์ ประเด็นนี้เป็นความรับผิดชอบของชาวสวนผักซึ่งมีหน่วยงานรับผิดชอบของรัฐกำกับดูแล

การล้างผักเพื่อใช้บริโภคซึ่งพิสูจน์แล้วว่าลดความเสี่ยงจากสารเคมีการเกษตรตกค้างได้ในระดับหนึ่งนั้น มีหลายวิธี แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกวิธีการล้างผักที่ผู้บริโภคจะทำได้สะดวก ประหยัด สิ่งที่ใช้เป็นสิ่งที่หาง่าย มีใช้ในครัวเรือนทั่วไป คือเกลือและน้ำส้มสายชู วิธีการล้างไม่ยุ่งยากสามารถทำได้ด้วยตัวเองการศึกษาเพื่อลดอันตรายด้านชีวภาพจากการบริโภคผักดิบ นอกจากการติดเชื้อจากพยาธิ ยังมีอีกหลายสาเหตุ เช่น เชื้อแบคทีเรีย protozoa และวิธีการล้างก็มีอีกหลายวิธี ที่ควรได้รับความสนใจในการศึกษาต่อไป

สรุป

ผลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการล้างผักทั้ง 3 วิธี ที่เลือกมาศึกษาคือการแช่ในน้ำเปล่า แช่ในน้ำเกลือ และแช่ในน้ำส้มสายชู ซึ่งเป็นสิ่งที่ทำได้ง่ายตามครัวเรือน นอกจากจะลดสารตกค้างประเภทยาฆ่าแมลงได้อย่างมีประสิทธิภาพแล้วยังสามารถลดจำนวนพยาธิที่ปนเปื้อนมากับผักได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยในระหว่าง 3 วิธีนี้จะใช้วิธีใดในการล้างผักก็ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เพียงแต่ประเด็นสำคัญ คือการล้างผักให้สะอาดนั้น จะต้องดำเนินการไม่ว่าจะเป็นที่ร้านอาหาร แผงลอยริมถนน หรือการประกอบอาหารเพื่อรับประทานเองในครัวเรือน หน่วยงานรับผิดชอบที่มีอำนาจหน้าที่ตามกฎหมาย จึงควรมีการณรงค์ และเข้มงวดในส่วนสุขลักษณะการประกอบอาหารของร้านค้า แผงลอย หรือภายในครัวเรือน ที่ใช้ผักดิบประกอบอาหารหรือบริโภคเป็นเครื่องเคียงสำหรับอาหารไทยหลายชนิด เพื่อเป็นการประกันความปลอดภัยของผู้บริโภค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางสาวจาวรรณ ลิ้มสัจจะสกุล ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่สนับสนุนให้มีการเผยแพร่ผลการศึกษาในครั้งนี้ และนางกัญญา พุกสูงเนิน นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารที่ให้คำปรึกษา แนะนำในการประเมินผลทางสถิติ

เอกสารอ้างอิง

1. Beuchat LR. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect* 2002; 4(4): 413-23.
2. Slifko TR, Smith HV, Rose JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol* 2000; 30(12-13): 1379-93.
3. กรมวิชาการเกษตร. ล้างอย่างไรลดสารพิษ. จดหมายข่าวผลไม้ [ออนไลน์]. 2556; [สืบค้น 28 พฤษภาคม 2558]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: http://it.doa.go.th/pibai/pibai/n16/v_9-oct/borkor.html
4. อนเนก หาลี่, บุญยกฤต รัตนพันธุ์, วชิระ สิงห์คง. การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาล้างผักชนิดต่างๆ สำหรับใช้ในท้องถิ่นเพื่อลดปริมาณสารปราบศัตรูพืชในผักคะน้า. *วารสารวิจัย มช* 2556; 18(4): 577-84.
5. สมสมัย ปาลกุล. การลดปริมาณสารมีพิษตกค้างใน/บนพุทรา. *ข่าวสารวัดภูมิพิศ* 2531; 15(4): 156-62.
6. ภารดี มามีชัย, ดำรงค์ เชี่ยวศิลป์. การสำรวจหนอนพยาธิติดต่อด้านดินในผักสดในตลาดเขตเทศบาลเมือง จังหวัดนนทบุรี. *สารเทคนิคการแพทย์จุฬา* 2534; 5(16): 859-67.
7. ประยงค์ ระดมยศ, อัญชลี ตั้งตรงจิตร, วราร์ มีสมบุรณ์, ชูเกียรติ ศิริวิชัยกุล, วิติมา วงศาโรจน์, ไพศาล อัมพันธ์, และคณะ. *ปรสิตวิทยาหนอนพยาธิทางการแพทย์ ทฤษฎีและปฏิบัติการ*. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์แห่งประเทศไทย; 2537.

8. Centers for Disease Control and Prevention. Parasites soil-transmitted helminthes (STHs). [online]. 2013 [cited 2015 May 18]; [1 screen]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/parasites/sth/>
 9. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality volume 1: recommendations. 3rd ed. [online]. 2008 [cited 2015 June 4]; [668 screens]. Available from: URL: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/en/
 10. สำนักมาตรฐานสินค้าและระบบคุณภาพ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 9001-2513 การปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีของพืชอาหาร. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2556.
 11. Codex Alimentarius Commission. CAC/RCP 53-2003. Code of hygienic practice for fresh fruits and vegetables. Geneva: FAO/WHO; 2003.
-

Impact of Washing Procedures for Reduction of Pesticide Residues in Vegetables Consumed Raw on Numbers of Contaminated Parasitic Worms

Tanongpan Satjapala Kanogwan Toonsakool and Kuntong Pednog

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

ABSTRACT Raw vegetables are nutritious and healthy food owing to great source of vitamins, dietary fiber and minerals. However, the consumption of raw vegetable without proper washing is an important route in the transmission of parasitic diseases such as constipation, diarrhea, joint and muscle aches and pains, anemia. Therefore, during 2556-2557 B.E., Department of Medical Sciences undertook a study on the impact of washing procedures for reduction of pesticide residues in vegetables consumed raw on the numbers of contaminated parasitic worms. Eight kinds of vegetables consumed raw and 10 samples of each kind were collected to study for the changes of numbers of contaminated parasitic worms in unwashed and washed samples. The samples of peppermint, lettuce, spring onion, garlic-like vegetable *Centella asiatica* (L.) Urb., celery, coriander and parsley were bought from the markets in Bangkok Metropolitan region. Among washing procedures recommended to reduce pesticide residues in raw vegetables, 3 washing procedures were selected. The selected procedures consisted of soaking for 10 minutes in water; in saline solution (15 grams NaCl in 4 liters of water) and in vinegar solution (15 milliliters of 5% vinegar in 4 liters of water) and followed by rinsing with water. Sedimentation Technique was used to determine the numbers of contaminated parasitic worms in the samples. The results showed that all kinds of unwashed vegetables studied were contaminated with free-living nematodes. One out of eight kinds of vegetables, the garlic-like vegetable, was not contaminated with *Ascaris* spp. egg, while the rest were contaminated. Coriander was contaminated with *Enterobius vermicularis* egg and parsley was contaminated with *Taenia* spp. egg. Mann-Whitney U test at significant level 0.05 was used to analyzed the results of study. It was found that all 3 washing procedures selected could significantly reduce the numbers of worm-type parasites contaminated in all kinds of vegetables used in this study. One-Way ANOVA test at significant level 0.05 proved that there was no significant difference in the numbers of worms after using 3 washing procedures in the same kind of vegetable. The study revealed scientific proof that the 3 washing procedures selected could reduce the numbers of worm-type parasites in raw vegetables with the same efficacy.

Key words: Washing procedures, worm-type parasites, raw vegetables

การพัฒนาการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในระดับสปีชีส์ โดยวิธี Multiplex PCR

ปนัดดา เทพอัศร พันธิดา ตรียวง สกุรัตน์ สุนทรนัทรวัฒน์ และอนิชา เลื่องชัยเขวง
สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ผู้ติดเชื้อมาลาเรียมีกว่า 300-500 ล้านคนต่อปี และมีผู้เสียชีวิตกว่า 1 ล้านคนทั่วโลก ประเทศไทยพบผู้ติดเชื้อในปี พ.ศ. 2556 ประมาณ 29,317 คน การตรวจการติดเชื้อในระดับสปีชีส์มีความสำคัญต่อการรักษาโรค การศึกษานี้ได้พัฒนาเทคนิค multiplex PCR ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Snounou และคณะ โดยทำการหาสภาวะที่เหมาะสมและค่าต่ำสุดในการตรวจและนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อ การตรวจประกอบด้วย 2 ปฏิกริยา ปฏิกริยาแรกตรวจการติดเชื้อ genus *Plasmodium* โดยใช้ human GAPDH เป็น internal control ปฏิกริยาที่ 2 ใช้จำแนกเชื้อมาลาเรียในคนทั้ง 4 สปีชีส์คือ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* และ *P. ovale* พบว่าปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่ตรวจพบ genus *Plasmodium* และ human GAPDH คือ 10^3 และ 10 copies ตามลำดับ สามารถตรวจการติดเชื้อร่วมในแต่ละสปีชีส์ได้ที่ 10^3 copies และสามารถตรวจการติดเชื้อร่วม *P. falciparum* และ *P. vivax* ที่มีสัดส่วนแตกต่างกันมากที่ 100 copies ต่อ 10,000 copies ได้ใช้ได้ดีกับตัวอย่างบนกระดาษเก็บตัวอย่างเลือด การศึกษานี้พบว่าเทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจการติดเชื้อมาลาเรียได้อย่างแม่นยำถึงระดับสปีชีส์ ทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาอย่างถูกต้อง ทั้งยังเป็นเทคนิคที่ง่ายต่อการนำไปใช้ตรวจคัดกรองในกลุ่มประชากรขนาดใหญ่หรือใช้ในภาคสนามที่มีการระบาดของโรค

Accepted for publication, 17 June 2015

บทนำ

โรคมาลาเรียเกิดจากการติดเชื้อ *Plasmodium* ซึ่งเป็นปรสิตเซลล์เดียว มียุงก้นปล่องเป็นพาหะ ประชากรร้อยละ 36 ของประชากรจาก 90 ประเทศทั่วโลกอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีการแพร่กระจายของโรคมาลาเรีย สำหรับประเทศไทยพบอัตราการป่วยและตายที่มีแนวโน้มสูงขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ.2539 เป็นต้นมา โดยแหล่งของเชื้อมาลาเรียอยู่บริเวณป่าชายแดนของประเทศ จังหวัดที่พบผู้ป่วยจำนวนมาก ได้แก่ แม่ฮ่องสอน ตาก กาญจนบุรี ราชบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ระนอง สระแก้ว ตรัง และจันทบุรี⁽¹⁾ โดยทั่วไปเชื้อ *Plasmodium* ที่ก่อโรคในคนมี 4 สปีชีส์ ได้แก่ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* และ *P. ovale* ในประเทศไทยเชื้อที่พบมักเป็นชนิด *P. falciparum* และ *P. vivax* การรักษาโรคที่มีประสิทธิภาพต้องอาศัยผลการตรวจจำแนกสปีชีส์จากห้องปฏิบัติการ เช่น การใช้ primaquine ในการรักษา *P. vivax* และ *P. ovale* นอกจากนี้หากติดเชื้อ *P. falciparum* ซึ่งมีความรุนแรงของโรค การตรวจจำแนกสปีชีส์ที่จำเป็นมีความสำคัญมาก⁽²⁾ การวินิจฉัยโดยทั่วไปใช้วิธีส่องกล้องจุลทรรศน์จำแนก *Plasmodium* ทั้ง 4 สปีชีส์ แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองแรงงานและต้องการผู้ที่มีทักษะสูง นอกจากนี้อาจเกิดความผิดพลาดในการจำแนกสปีชีส์กรณีที่ปรสิตมีจำนวนน้อยหรือเกิดการติดเชื้อร่วมมากกว่า 1 สปีชีส์⁽³⁾ จากปัญหาดังกล่าวจึงมีการพัฒนาเทคนิค polymerase chain reaction มาใช้ตรวจวิเคราะห์⁽⁴⁻⁷⁾ ซึ่งพบว่ามีความไวและความจำเพาะสูง แต่บางเทคนิค เช่น nested PCR และ hybridization มีความซับซ้อนและต้องใช้ระยะเวลา ในการศึกษาจึงได้พัฒนาเทคนิค multiplex PCR ขึ้นเพื่อตรวจการติดเชื้อและจำแนกสปีชีส์ทั้ง 4 ได้อย่างสะดวกรวดเร็วและมีความถูกต้องแม่นยำ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางห้องปฏิบัติการได้ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียม DNA ของ parasites

Panel parasites ซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างเชื้อที่มีความหนาแน่นสูงและต่ำ คือ 200 parasites/μl, 5,000 parasites/μl และ 500 parasites/μl, 5,000 parasites/μl ของเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* ตามลำดับจากผู้ติดเชื้อในประเทศไทยซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักโรคติดต่อมาโดยแมลง กรมควบคุมโรค โดยการหาความหนาแน่นของเชื้อทำได้โดยการนับจำนวนเชื้อจากการทำสเมียร์เลือดฟิล์มหนาซึ่งย้อมด้วยสีย้อมขาว โดยดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย × 100 ใน field ต่างๆ ซึ่งมีเม็ดเลือดขาว (White Blood Cell: WBC) รวมกันไม่ต่ำกว่า 200 ตัว แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณดังนี้

$$\frac{\text{จำนวน parasites ในระยะไม่มีเพศที่นับได้} \times \text{จำนวน WBC}/\mu\text{l}^*}{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้}} = \text{parasites}/\mu\text{l}$$

*จำนวน WBC/μl ประมาณค่าเป็น 8,000 cells/ μl⁽⁸⁾

ทำการเตรียม DNA จาก panel parasites ของเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* ที่ความหนาแน่นสูงที่ 5,000 parasites/μl ส่วน *P. malariae* และ *P. ovale* เป็นกรณีที่พบการติดเชื้อน้อยมาก จึงทำการสังเคราะห์ยีนบริเวณ 18S small subunit ribosomal RNA genes และสร้าง recombinant plasmid DNA ทดแทน DNA ที่สกัดจากเลือดเพื่อเป็นตัวแทนในการศึกษา ส่วน negative control ได้จากเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพดีไม่มีประวัติติดเชื้อมาลาเรีย

1.1 การสกัด DNA จากเลือดด้วยชุดสกัด

สกัด DNA ของปรสิตจากตัวอย่างเลือด 200 μl โดยใช้ QIAamp blood kit (QIAGEN, CA) ขั้นตอนตามคู่มือของบริษัท จากนั้นละลาย DNA ที่สกัดได้ ด้วย AE buffer 200 μl เก็บตัวอย่าง DNA ที่ -20 °C จนกว่าจะนำไปใช้งาน

1.2 การสกัด DNA จากกระดาษเก็บตัวอย่างเลือดชนิด FTA Elute Micro card (Whatman, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA)

วิธีการเก็บตัวอย่างเลือดบนกระดาษทำโดยดูดตัวอย่างเลือดปริมาตร 20 µl ด้วยปิเปตแล้วหยดบนกระดาษเก็บตัวอย่างเลือด ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งแล้วเก็บใส่ซองกันน้ำที่สามารถเก็บรักษาตัวอย่างได้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อต้องการสกัด DNA จากกระดาษใช้หัวเจาะขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 mm เจาะกระดาษตัวอย่างละ 5 วงใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 500 µl โดยใช้เครื่อง vortex ครั้งละ 5 วินาที จำนวน 3 ครั้ง แล้วดูดน้ำกลั่นทิ้ง ใส่ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 50 µl นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 30 นาที DNA จะอยู่ในส่วนของน้ำ ดูดตัวอย่าง DNA เก็บที่ -20 °C

2. การทดสอบความจำเพาะของ primer ในการตรวจ genus *Plasmodium* และสปีชีส์โดยวิธี single PCR

2.1 primer ที่ใช้ตรวจ genus *Plasmodium* และสปีชีส์

ได้ใช้ primer จากการศึกษาค้นคว้าของ Snounou G และคณะ^(2, 9) มาใช้ในการศึกษา โดยนำ primers มาทดสอบความจำเพาะต่อจีโนมและสปีชีส์ทั้ง 4 ของเชื้อ *Plasmodium* บนบริเวณ 18S small subunit ribosomal RNA genes โดยใช้ DNA template ที่ได้จาก panel parasites ที่ทราบสปีชีส์ที่ติดเชื้อสำหรับเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* ส่วน *P. malariae* และ *P. ovale* ใช้ recombinant plasmid DNA โดยข้อมูลของ primers ที่ใช้แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 PCR primers ในการตรวจการติดเชื้อมาลาเรีย จาก Snounou และคณะ^(2, 9)

Primer	Sequence (5' → 3')	Amplicon size	Target gene/species
Genus for	TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG	1100 bp	18S rRNA gene/ <i>Plasmodium</i> sp.
Genus rev	CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC		
Pf for	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAATATATT	206 bp	18S rRNA gene/ <i>P. falciparum</i>
Pf rev	ACACAATGAATCAATCATGACTACCCGTC		
Pv for	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC	120 bp	18S rRNA gene/ <i>P. vivax</i>
Pv rev	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA		
Pm for	ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC	145 bp	18S rRNA gene/ <i>P. malariae</i>
Pm rev	AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA		
Po for	ATCTCTTTTGCTATTTTTTTAGTATTGGAGA	787 bp	18S rRNA gene/ <i>P. ovale</i>
Po rev	GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG		
GAPDH for	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	226 bp	Human GAPDH
GAPDH rev	GAAGATGGTGATGGGATTTC		

2.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

ส่วนประกอบของปฏิกิริยาปริมาตร 25 μ l ประกอบด้วย 10X PCR buffer 2.5 μ l, dNTP mix 0.2 mM each, forward primer 0.25 μ M, reverse primer 0.25 μ M, $MgCl_2$ 2 mM, template DNA 5 μ l และ High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas) 1.25 units นำเข้าเครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (PTC-200, MJ Research) โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยา ดังนี้ 95 °C 10 นาที 1 รอบ เข้าสู่ 35 รอบของ 95 °C 30 วินาที, 58 °C 1 นาที และ 72 °C 1 นาที ตามด้วย 72 °C 10 นาที วิเคราะห์ผลด้วย 2.5% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide

3. การพัฒนาเทคนิค multiplex PCR

3.1 การเตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

ทำการเตรียม PCR product จากการใช้คู่ primer ที่จำเพาะต่อ genus *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. vivax* และ human GAPDH (ตารางที่ 1) นำมาเชื่อมกับ pGEM-T easy vector (Promega; Madison, WI) และถ่ายเข้าสู่ *E. coli* คัดเลือกโคลนโดยวิธี Ampicillin positive selection system และวิธี colony PCR สกัด recombinant plasmid DNA จากโคลนที่คัดเลือกได้ด้วย QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Germany) ขึ้นตอนตามคู่มือของบริษัท ในกรณีของ *P. malariae* และ *P. ovale* ได้จากการสังเคราะห์ DNA ในส่วนของ 18S rRNA gene ที่จำเพาะต่อสปีชีส์โดยเชื่อมอยู่ใน pBSK vector

3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจการติดเชื้อ *Plasmodium* sp.

ทำการทดลองเพื่อหา annealing temperature ที่เหมาะสมโดยใช้ genus *Plasmodium*-recombinant plasmid และ human GAPDH-recombinant plasmid ที่ 10^4 copies เป็น template ในปฏิกิริยา 25 μ l ส่วนประกอบและสภาวะปฏิกิริยาดังวิธีการข้อ 2.2 ทดสอบอุณหภูมิช่วง annealing temperature ระหว่าง 49.4–66.1 °C โดยรวม genus-specific primer และ human GAPDH specific primer ไว้ในหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน

3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาสปีชีส์ที่ติดเชื้อ

ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการตรวจหาสปีชีส์ โดยการใช้ recombinant plasmid DNA ที่มีส่วนเฉพาะของสปีชีส์ทั้ง 4 (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* และ *P. ovale*) อย่างละ 10^4 copies เป็น template ในปฏิกิริยา 25 μ l โดยรวม species-specific primer ทั้ง 4 สปีชีส์ ไว้ในหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน และหาสภาวะที่เหมาะสมโดยการทดลองปรับส่วนประกอบและสภาวะของปฏิกิริยาจากเทคนิค PCR ที่แสดงดังข้อ 2.2 โดยปรับใช้ปริมาณ $MgCl_2$ ที่ 0–4 mM ปรับใช้อุณหภูมิช่วง annealing temperature ที่ 49.4 – 66.1 °C และปรับปริมาณ primer ที่ 0.25 – 0.6 μ M แล้วคัดเลือกส่วนประกอบและสภาวะที่เหมาะสมจากผลการทดลอง

4. การหาปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่วิธี multiplex PCR ตรวจพบ (Limit of detection)

ทำการเตรียม recombinant plasmid DNA เพื่อใช้ในการทดสอบโดยการนำ recombinant plasmid DNA แต่ละชนิดมาเจือจางให้มีความเข้มข้นระหว่าง 10^1 – 10^7 copies/ μ l เพื่อใช้เป็น template ในการหาปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบ ในการตรวจ genus *Plasmodium* และ human GAPDH การตรวจหาเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ และการติดเชื้อร่วมระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน โดยใช้ปฏิกิริยา multiplex PCR ในสภาวะที่เหมาะสมจากผลการทดลองในข้อ 3.2 และ 3.3

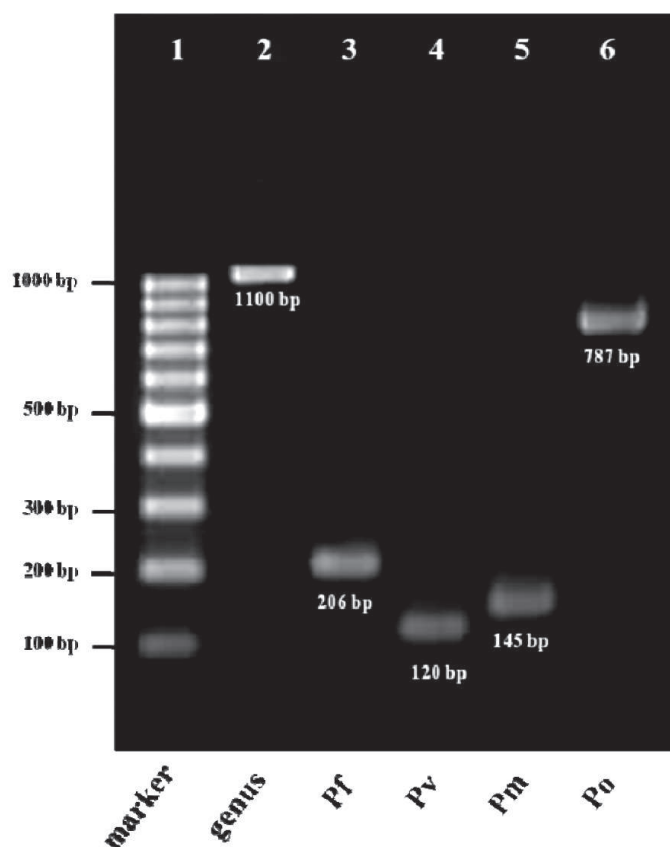
5. การตรวจการติดเชื้อ *Plasmodium* และจำแนกสปีชีส์ในตัวอย่างเลือด

นำ panel parasites ของ *P. falciparum* และ *P. vivax* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักโรคติดต่อ นำโดยแมลง ที่มีความหนาแน่นของเชื้อต่ำคือ 200 parasites/μl และ 500 parasites/μl ตามลำดับ มาทดลอง เก็บบนกระดาษ FTA Elute Micro card ทั้งในแบบแยกกัน และผสมกันเพื่อทดสอบการติดเชื้อร่วมระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* และทำการสกัด DNA จากกระดาษซับดังข้อ 1.2 ตัวอย่างละ 3 ขั้ว แล้วนำ DNA ที่สกัดได้มาตรวจหาเชื้อโดยวิธี multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้น

ผล

1. ทดสอบความจำเพาะของ primer ในการตรวจ genus *Plasmodium* และสปีชีส์โดยวิธี single PCR

จากการตรวจการติดเชื้อมาลาเรียโดย single PCR โดยใช้ primer ตามตารางที่ 1 พบว่า PCR product จากการใช้ *Plasmodium* genus-specific primer ซึ่งแสดงถึงการติดเชื้อ *Plasmodium* sp. มีขนาด 1100 bp และสามารถจำแนกสปีชีส์ทั้ง 4 ได้โดยใช้ species-specific primer ซึ่งแสดงขนาด PCR product ที่แตกต่างกันคือ *P. falciparum* ขนาด 206 bp, *P. vivax* ขนาด 120 bp, *P. malariae* ขนาด 145 bp และ *P. ovale* ขนาด 787 bp (ภาพที่ 1)

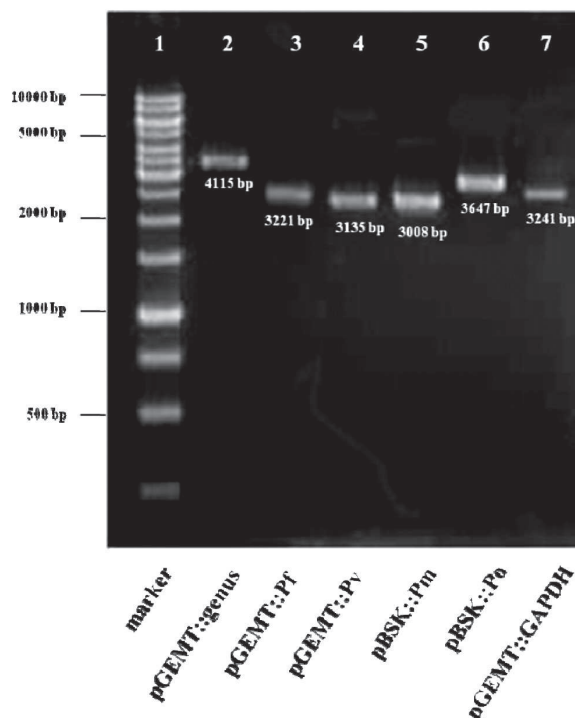


ภาพที่ 1 PCR product ที่เพิ่มจำนวนจาก DNA สกัดจากตัวอย่างเลือดที่ทราบสปีชีส์ที่ติดเชื้อในการตรวจหา genus *Plasmodium* (genus), *P. falciparum* (Pf) และ *P. vivax* (Pv) และ recombinant plasmid DNA ของ *P. malariae* (Pm) และ *P. ovale* (Po) โดยช่องที่ 1 คือ 100 bp DNA marker ช่องที่ 2-6 คือ PCR product ของ genus *Plasmodium* (genus), *P. falciparum* (Pf), *P. vivax* (Pv), *P. malariae* (Pm) และ *P. ovale* (Po) ตามลำดับ

2. การพัฒนาเทคนิค multiplex PCR

2.1 การเตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

จากการโคลน PCR product ส่วนของ 18S rRNA gene ที่จำเพาะต่อ genus *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. vivax* และ human GAPDH โดยการเชื่อมกับ pGEM-T easy vector มีขนาด recombinant plasmid DNA เท่ากับ 4115 bp, 3221 bp, 3135 bp และ 3241 bp ตามลำดับ ส่วน *P. malariae* และ *P. ovale* เชื่อมอยู่ใน pBSK vector มีขนาด 3008 bp และ 3647 bp ตามลำดับ ซึ่งทำให้ได้ recombinant plasmid DNA เพื่อใช้เป็น template ในการพัฒนา multiplex PCR (ภาพที่ 2)



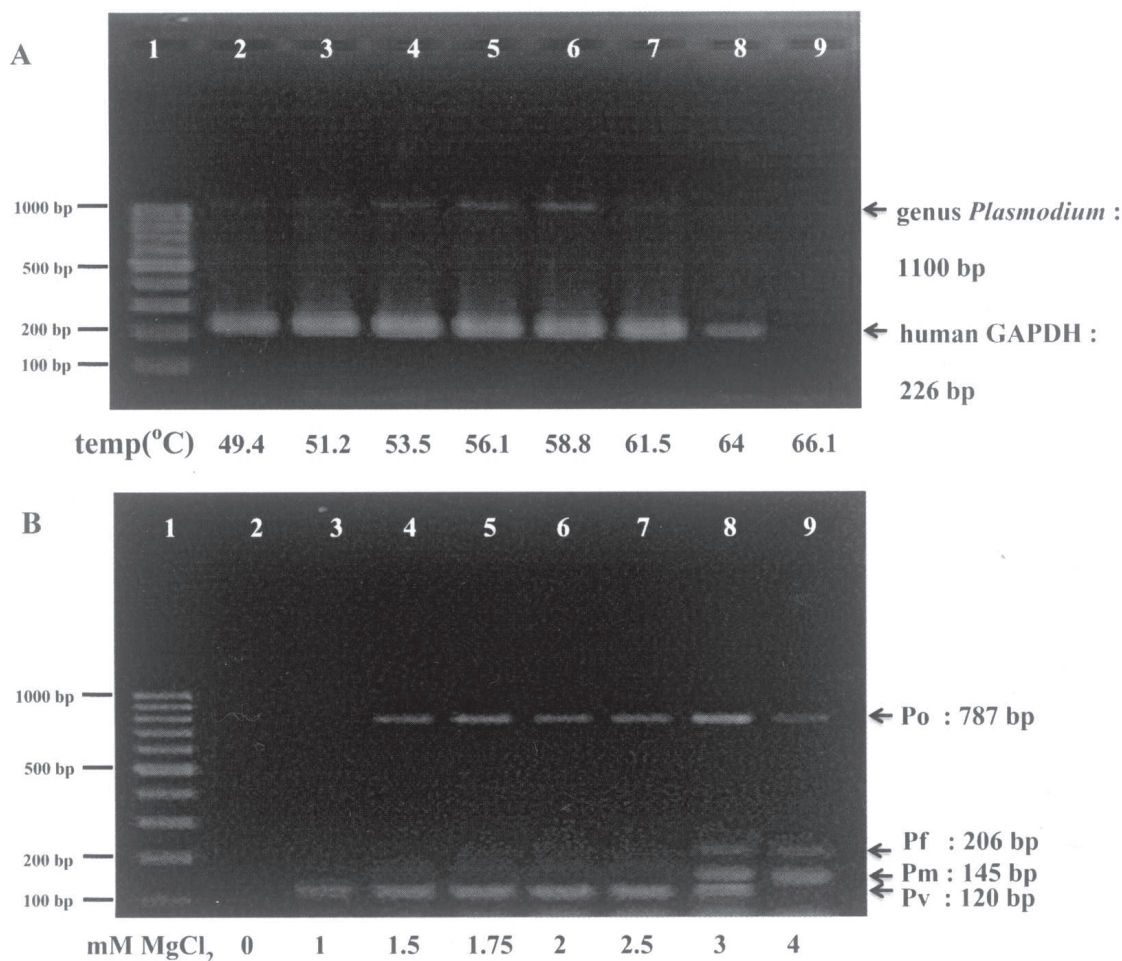
ภาพที่ 2 recombinant plasmid DNA ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา เมื่อช่องที่ 1 คือ 1 kb DNA marker ช่องที่ 2-7 คือ genus *Plasmodium*-recombinant plasmid (pGEMT::genus), *P. falciparum*- recombinant plasmid (pGEMT::Pf), *P. vivax*- recombinant plasmid (pGEMT::Pv), *P. malariae*- recombinant plasmid (pBSK::Pm), *P. ovale*- recombinant plasmid (pBSK::Po) และ human GAPDH-recombinant plasmid (pGEMT::GAPDH) ตามลำดับ

2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจการติดเชื้อ *Plasmodium sp.*

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยทดสอบอุณหภูมิช่วง annealing temperature ระหว่าง 49.4-66.1 °C ผลพบว่าอุณหภูมิที่เพิ่มจาก 49.4 °C ถึง 58.8 °C ทำให้ตรวจพบ PCR product ที่ระบุทั้ง genus *Plasmodium* และ human GAPDH ที่เข้มข้นขึ้นและชัดเจนที่สุดที่อุณหภูมิ 56.1-58.8 °C แต่เมื่ออุณหภูมิสูงถึง 64 °C เป็นต้นไป จะตรวจไม่พบ PCR product ของ *Plasmodium* genus-specific primer หรือตรวจไม่พบการติดเชื้อ ขณะที่อุณหภูมิ 66.1 °C จะตรวจไม่พบ PCR product ของ human GAPDH-specific primer (ภาพที่ 3 A) ดังนั้น การทดลองจึงเลือกอุณหภูมิช่วง annealing temperature ที่ 58 °C มาใช้สำหรับตรวจการติดเชื้อมาลาเรีย โดยมี human GAPDH เป็น internal control

2.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาสปีชีส์ที่ติดเชื้อ

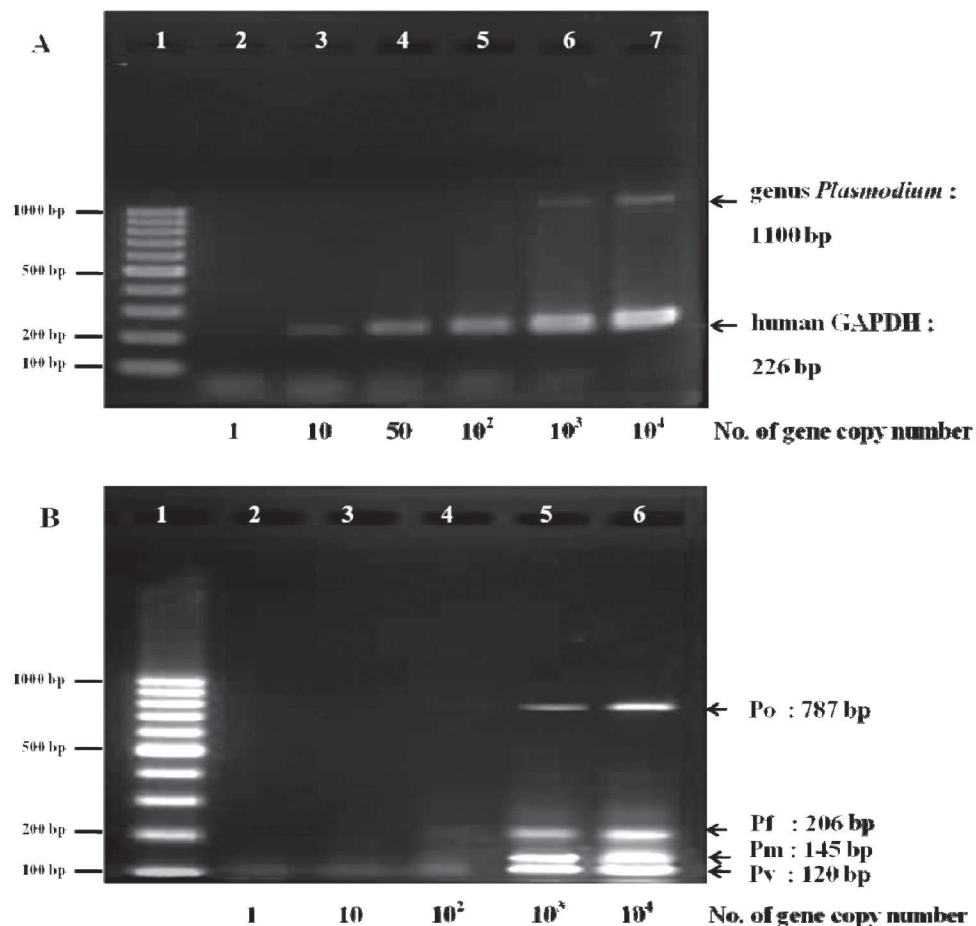
การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาสปีชีส์ที่ติดเชื้อได้ทดสอบความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ระหว่าง 0-4 mM ผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยาที่ใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 3 mM สามารถเพิ่มจำนวน PCR product ทั้ง 4 สปีชีส์ได้ในหลอดเดียว (ภาพที่ 3 B) และเมื่อทดลองปรับ annealing temperature ระหว่าง 49.4-66.1 °C เมื่อใช้ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 3 mM พบว่าที่อุณหภูมิ 61 °C ให้ species- specific band ทั้ง 4 ที่ชัดเจนขึ้น ขณะที่การทดลองปรับปริมาณ primer ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.25-0.6 μM เมื่อใช้ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 3 mM และ annealing temperature ที่ 61 °C นั้น ไม่เห็นผลการทดลองที่แตกต่าง (ไม่แสดงผลการทดลอง)



ภาพที่ 3 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR เมื่อ A คือการทดสอบอุณหภูมิช่วง annealing temperature ในปฏิกิริยาตรวจการติดเชื้อ genus *Plasmodium* ที่มี human GAPDH เป็น internal control โดยช่องที่ 1 คือ 100 bp DNA marker ช่องที่ 2-9 คือ annealing temperature ที่ 49.4 °C, 51.2 °C, 53.5 °C, 56.1 °C, 58.8 °C, 61.5 °C, 64 °C และ 66.1 °C ตามลำดับ และ B คือการทดสอบปริมาณ $MgCl_2$ ในปฏิกิริยาการตรวจหาสปีชีส์ โดยช่องที่ 1 คือ 100 bp DNA marker ช่องที่ 2-9 คือ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0 mM, 1 mM, 1.5 mM, 1.75 mM, 2 mM, 2.5 mM, 3 mM และ 4 mM ตามลำดับ

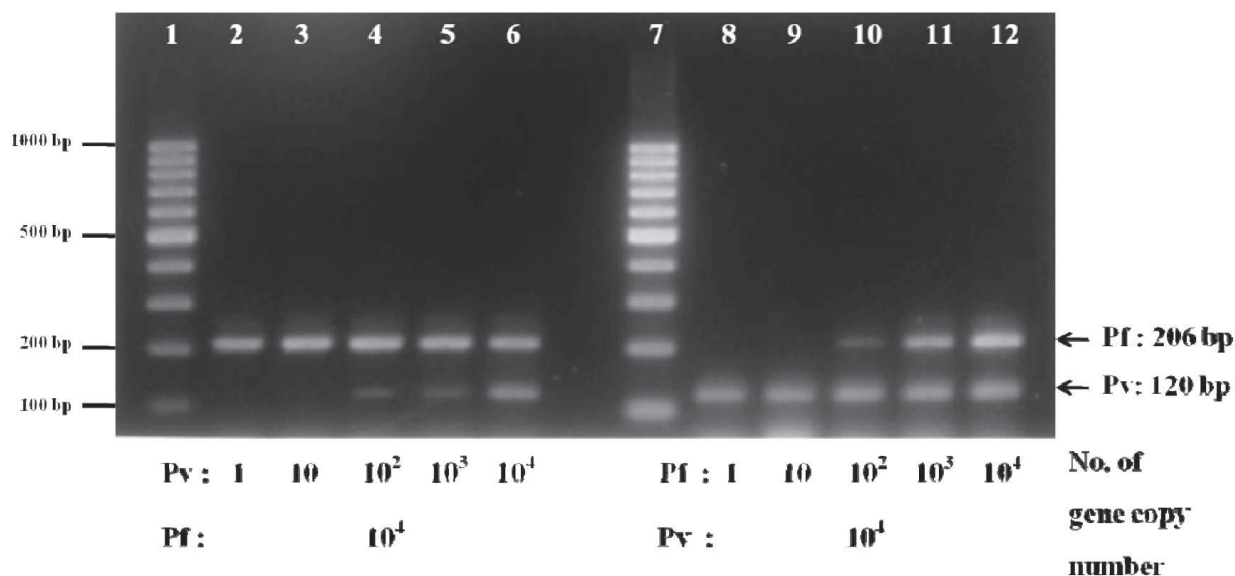
3. การหาปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่วิธี multiplex PCR ตรวจพบ

เมื่อทำการหาปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่วิธี multiplex PCR ตรวจพบได้ โดยการเจือจาง genus *Plasmodium*-recombinant plasmid และ human GAPDH- recombinant plasmid พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิ annealing temperature ที่เหมาะสมที่ 58 °C ปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบ genus *Plasmodium* และ human GAPDH คือ 10³ copies และ 10 copies ตามลำดับ (ภาพที่ 4 A) และ multiplex PCR ในการตรวจสปีชีส์ โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม คือ MgCl₂ ที่ความเข้มข้น 3 mM และ annealing temperature ที่ 61 °C พบว่าปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่ตรวจสอบทั้ง 4 สปีชีส์ได้คือที่ 10³ copies ในแต่ละสปีชีส์ (ภาพที่ 4 B)



ภาพที่ 4 การหาปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่วิธี multiplex PCR สามารถตรวจได้ เมื่อ A คือปฏิกิริยาตรวจหา genus *Plasmodium* และ human GAPDH โดยช่องที่ 1 คือ 100 bp DNA marker ช่องที่ 2-7 คือ genus *Plasmodium*-recombinant plasmid และ human GAPDH- recombinant plasmid ปริมาณ 1, 10, 50, 10², 10³ และ 10⁴ copies ตามลำดับ และ B คือปฏิกิริยาการตรวจสปีชีส์ทั้ง 4 ของเชื้อ *Plasmodium* คือ *P. falciparum* (Pf), *P. vivax* (Pv), *P. malariae* (Pm) และ *P. ovale* (Po) โดยช่องที่ 1 คือ 100 bp DNA marker ช่องที่ 2-6 คือ recombinant plasmid DNA ทั้ง 4 สปีชีส์ ที่มีปริมาณสปีชีส์ละ 1, 10, 10², 10³ และ 10⁴ copies ตามลำดับ

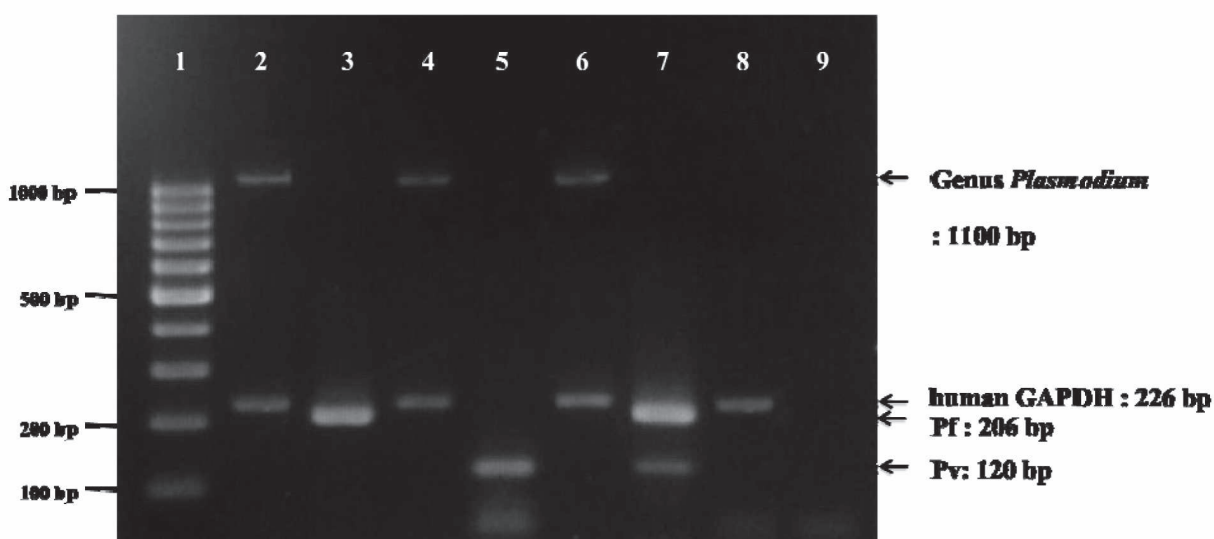
นอกจากนี้ได้ทดสอบในกรณีเกิดการติดเชื้อร่วมระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ระบาดในประเทศไทย การทดลองใช้ *P. falciparum*-recombinant plasmid ที่ 10^4 copies โดยเพิ่มจำนวน *P. vivax*- recombinant plasmid ตั้งแต่ $1-10^4$ copies และใช้ *P. vivax*- recombinant plasmid ที่ 10^4 copies โดยเพิ่มจำนวน *P. falciparum*- recombinant plasmid ตั้งแต่ $1-10^4$ copies ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเทคนิค multiplex PCR สามารถตรวจพบทั้ง 2 สปีชีส์ แม้มีปริมาณการติดเชื้อแตกต่างกัน ดังการทดลองตรวจพบสปีชีส์ที่เป็นส่วนน้อยตั้งแต่ 10^2 copies เมื่อใช้สปีชีส์ที่มีสัดส่วนมากกว่า 10^4 copies (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 การทดสอบความไวของเทคนิค multiplex PCR ในการตรวจการติดเชื้อร่วมระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* เมื่อ ช่องที่ 1, 7 คือ 100 bp DNA marker ช่องที่ 2-6 คือ *P. vivax*-recombinant plasmid (Pv) ที่ 1, 10, 10^2 , 10^3 และ 10^4 copies ตามลำดับ เมื่อ *P. falciparum*-recombinant plasmid (Pf) เท่ากับ 10^4 copies และช่องที่ 8-12 คือ *P. falciparum*-recombinant plasmid (Pf) ที่ 1, 10, 10^2 , 10^3 และ 10^4 copies ตามลำดับ เมื่อ *P. vivax*- recombinant plasmid (Pv) เท่ากับ 10^4 copies

4. การตรวจการติดเชื้อ *Plasmodium* และจำแนกสปีชีส์ในตัวอย่างเลือด

จากการนำเทคนิค multiplex PCR ทั้ง 2 ปฏิกริยามาใช้กับตัวอย่างเลือดที่ทดลองเก็บบนกระดาษ FTA Elute Micro card ทั้งในแบบแยกสปีชีส์ และผสมกันระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* ผลการตรวจพบการติดเชื้อ genus *Plasmodium* ในหลอดปฏิกิริยาแรกทั้ง 3 ตัวอย่างและจำแนกสปีชีส์ได้อย่างถูกต้องด้วยหลอดปฏิกิริยาที่ 2 ซึ่งตรวจพบ PCR product ขนาด 206 bp แสดงถึงการติดเชื้อ *P. falciparum*, PCR product ขนาด 120 bp แสดงถึงการติดเชื้อ *P. vivax* และตัวอย่างที่ตรวจพบ PCR product ทั้งขนาด 206 bp และ 120 bp บ่งบอกถึงการติดเชื้อร่วมระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* (ภาพที่ 6) ซึ่งได้ทำการทดลองจำนวน 3 ข้างโดยผลการทดลองที่ได้ไม่แตกต่างกัน



ภาพที่ 6 ผลตรวจการติดเชื้อ *Plasmodium* และจำแนกสปีชีส์ด้วยเทคนิค multiplex PCR ในตัวอย่างเลือดที่เก็บบนกระดาษ FTA Elute Micro card โดย

ช่องที่ 1 คือ 100 bp DNA marker

ช่องที่ 2 คือ panel parasites ของ *P. falciparum* (Pf) ที่ตรวจโดยหลอดปฏิกิริยาตรวจหา genus *Plasmodium*

ช่องที่ 3 คือ panel parasites ของ *P. falciparum* (Pf) ที่ตรวจโดยหลอดปฏิกิริยาตรวจหาสปีชีส์

ช่องที่ 4 คือ panel parasites ของ *P. vivax* (Pv) ที่ตรวจโดยหลอดปฏิกิริยาตรวจหา genus *Plasmodium*

ช่องที่ 5 คือ panel parasites ของ *P. vivax* (Pv) ที่ตรวจโดยหลอดปฏิกิริยาตรวจหาสปีชีส์

ช่องที่ 6 คือ panel parasites ของ *P. falciparum* (Pf), *P. vivax* (Pv) ที่ตรวจโดยหลอดปฏิกิริยาตรวจหา genus *Plasmodium*

ช่องที่ 7 คือ panel parasites ของ *P. falciparum* (Pf), *P. vivax* (Pv) ที่ตรวจโดยหลอดปฏิกิริยาตรวจหาสปีชีส์

ช่องที่ 8 คือ เลือดของผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพดีที่ตรวจโดยหลอดปฏิกิริยาตรวจหา genus *Plasmodium*

ช่องที่ 9 คือ เลือดของผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพดีที่ตรวจโดยหลอดปฏิกิริยาตรวจหาสปีชีส์

วิจารณ์

ในอดีตการใช้เทคนิค polymerase chain reaction ตรวจการติดเชื้อ *Plasmodium* ถูกนำมาใช้เมื่อการตรวจด้วยวิธีส่องกล้องให้ผลลบ เนื่องจากเทคนิค PCR เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูง แต่มีข้อจำกัดหลายอย่างคือ เทคนิคมีความซับซ้อน อุปกรณ์และน้ำยามีราคาสูง รวมทั้งความไม่สะดวกในการขนส่งตัวอย่างเลือดไปยังห้องปฏิบัติการ แต่ปัจจุบันอุปกรณ์และน้ำยามีราคาถูกลง บุคลากรมีความรู้ด้านชีวโมเลกุลมากขึ้นทำให้ PCR ไม่ใช่เทคนิคที่ซับซ้อนอีกต่อไป โดยการวิจัยนี้ได้พัฒนาการตรวจที่สามารถตรวจตัวอย่างเลือดที่เก็บบนกระดาษเก็บเลือดชนิด FTA Elute Micro card ได้ จึงสะดวกต่อการเก็บรักษาและขนส่งตัวอย่าง

จากเทคนิคทาง PCR ที่หลากหลายนั้น real-time PCR เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการตรวจมาลาเรียที่ให้ผลรวดเร็ว สามารถทราบถึงระดับ DNA copy number ได้ และไม่ต้องตรวจผลด้วย gel electrophoresis แต่เทคนิคนี้ อุปกรณ์เครื่องมือมีราคาสูงมากและน้ำยาราคาแพงเมื่อเทียบกับเทคนิค PCR อื่น นอกจากนี้ Lee PC และคณะ⁽¹⁰⁾ พบว่าเทคนิค multiplex PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำกว่า real-time PCR ในการตรวจจำแนกสปีชีส์ทั้งกรณี

ติดเชื้อสปีชีส์เดียวหรือมากกว่า 1 สปีชีส์ อีกทั้งยังมีรายงานการเกิด false negative ในปฏิกิริยา real-time PCR ที่ใช้ตรวจมาลาเรียเนื่องจาก sequence variation และ competitive inhibition⁽¹¹⁾ ส่วนเทคนิค nested PCR นั้น มีขั้นตอนที่ต้องใช้ระยะเวลามากกว่า multiplex PCR

การศึกษานี้ได้ดัดแปลงจากเทคนิค nested PCR ในการตรวจมาลาเรียของ Snounou G และคณะ⁽⁹⁾ ซึ่งได้ถูกอ้างอิงและนำมาใช้อย่างกว้างขวางทั้งในการศึกษาวิจัย การตรวจทางคลินิกและใช้เป็นวิธีตรวจอ้างอิงทางห้องปฏิบัติการของสหรัฐอเมริกา^(2, 12, 13, 14, 15) โดยคณะผู้วิจัยนำมาพัฒนาเป็นเทคนิค multiplex PCR ที่ง่าย รวดเร็ว แปลผลตรวจจากขนาด PCR product ที่มีความจำเพาะ ตรวจการติดเชื้อ *Plasmodium* ในหลอดปฏิกิริยาแรกและสามารถจำแนกสปีชีส์ทั้ง 4 รวมทั้งตรวจการติดเชื้อร่วมได้ด้วยหลอดปฏิกิริยาที่ 2 ซึ่งกรณีการติดเชื้อร่วมมากกว่า 1 สปีชีส์นั้น การใช้วิธีส่องกล้องอาจเกิดความผิดพลาดได้เนื่องจากจำนวนเชื้อของสปีชีส์หนึ่งมีจำนวนมากกว่า จึงตรวจไม่พบสปีชีส์อื่น^(5, 16) และหากสปีชีส์ที่มีจำนวนน้อยกว่าคือ *P. falciparum* การตรวจที่ผิดพลาดเป็นอันตรายต่อผู้ป่วยมากเพราะ *falciparum* หลายสายพันธุ์ต้องอาศัยการรักษาการติดเชื้อสปีชีส์อื่น⁽¹⁷⁾

ในการศึกษาได้นำเทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นมาทดสอบปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้ในระดับของ DNA copy number ที่ชัดเจน ต่างจากรายงานอื่นที่ส่วนใหญ่มักตรวจสอบในรูปของจำนวน parasites โดยเทคนิคนี้มีปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบ genus *Plasmodium* และ human GAPDH เท่ากับ 10^3 copies และ 10 copies ตามลำดับ และเมื่อทดสอบการติดเชื้อร่วมทั้ง 4 สปีชีส์ พบว่าสามารถตรวจพบทุกสปีชีส์ที่ 10^3 copies ซึ่งอาจเกิดจาก competition ในปฏิกิริยา ขณะที่ Kho WG และคณะ⁽¹⁷⁾ รายงานการใช้เทคนิค multiplex PCR ตรวจจำแนกมาลาเรีย 2 สปีชีส์ คือ *P. falciparum* และ *P. vivax* โดยปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่ตรวจพบเมื่อมีเชื้อเพียงสปีชีส์เดียวเท่ากับ 4 copies แต่ไม่ได้ทดสอบกรณีการติดเชื้อร่วมทั้ง 2 สปีชีส์ในรูปแบบของ DNA copy number และได้รายงาน sensitivity เท่ากับ 0.1 parasites/ μ l ในแต่ละสปีชีส์ ส่วน Padley D และคณะ⁽¹⁸⁾ พัฒนาเทคนิค multiplex PCR ที่ระบุตรวจได้ทั้ง 4 สปีชีส์ โดยมี sensitivity ในการตรวจ *P. falciparum* และ *P. ovale* เท่ากับ 0.02 และ 0.004 parasites/ μ l ตามลำดับ แต่ไม่ได้ทดสอบ sensitivity ของ *P. vivax* และ *P. malariae* ทั้งยังแสดงผลตรวจการติดเชื้อร่วมเพียงแค่ *P. falciparum* และ *P. vivax* เท่านั้น⁽¹²⁾ นอกจากนี้ Chew CH และคณะ⁽¹⁹⁾ ได้พัฒนาชุดตรวจมาลาเรียทางการค้าที่ชื่อ PlasmoNexTM⁽¹⁰⁾ จากเทคนิค multiplex PCR โดยมี detection limit ของแต่ละสปีชีส์ระหว่าง 0.025–0.27 parasites/ μ l

ในประเทศไทยพบการระบาดของสูงของ *P. falciparum* และ *P. vivax* ซึ่งเทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจการติดเชื้อร่วมทั้ง 2 สปีชีส์ แม้กรณีที่มีเชื้อมีสัดส่วนแตกต่างกัน โดยตรวจพบการติดเชื้อร่วมเมื่อสปีชีส์ที่สัดส่วนน้อยกว่ามีจำนวนตั้งแต่ 100 copies ขณะที่การทดลองใช้สปีชีส์ที่มีสัดส่วนมากกว่า 10,000 copies ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยการศึกษาขั้นต่อไปจะได้ดำเนินการศึกษากับตัวอย่างจริงในภาคสนาม เพื่อให้ได้ค่าความไวและความจำเพาะในการนำมาใช้งานต่อไป

จากการนำตัวอย่างเลือดที่เก็บบนกระดาษ FTA Elute Micro card ซึ่งเก็บแบบที่ติดเชื้อเฉพาะ *P. falciparum*, *P. vivax* และแบบติดเชื้อร่วมทั้ง 2 สปีชีส์ มาตรวจด้วยเทคนิคนี้ พบว่าให้ผลการตรวจที่ถูกต้องและแม่นยำ แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะและเชื่อถือได้ของวิธี multiplex PCR ที่สามารถตรวจการติดเชื้อมาลาเรีย โดยเฉพาะการติดเชื้อร่วมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุป

การตรวจเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิค multiplex PCR ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อความสะดวกรวดเร็วในการวิเคราะห์ผล โดยสามารถตรวจตัวอย่างเลือดที่สกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปหรือสกัดสารพันธุกรรมจากกระดาษเก็บตัวอย่างเลือดได้ ซึ่งเทคนิคนี้แบ่งเป็น 2 หลอดปฏิกิริยา คือ ตรวจการติดเชื้อ genus *Plasmodium* ในหลอด

ปฏิกิริยาแรกโดยใช้ human GAPDH เป็น internal control และตรวจสอบสปีชีส์ในหลอดปฏิกิริยาที่ 2 โดยให้ผลการตรวจที่ถูกต้องแม่นยำมากกว่า 1 สปีชีส์ และจำนวนเชื้อมีสัดส่วนที่แตกต่างกัน ซึ่งหากตรวจด้วยวิธีสองกล่องอาจให้ผลที่ผิดพลาดได้ เทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นจึงมีความแม่นยำสูงกว่าในการตีความผล และ เป็นเทคนิคที่เหมาะสมกับพื้นที่ระบาดของโรคที่มีข้อจำกัดด้านจำนวนและประสบการณ์ของผู้ส่งกล้อง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักโรคติดต่อมาลาเรีย กรมควบคุมโรค ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่าง Panel parasites

เอกสารอ้างอิง

1. กรมควบคุมโรค. โรคมาลาเรีย. [ออนไลน์]. 2557; [สืบค้น 4 ธ.ค. 2557]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://www.boe.moph.go.th/fact/Malaria.htm>
2. Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong MV, Slemenda SB, Wilkins PP, da Silva AJ. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. J Clin Microbiol 2006; 44(3): 1087-9.
3. Brown AE, Kain KC, Pipithkul J, Webster HK. Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections undetected by conventional microscopy. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992; 86(6): 609-12.
4. Pieroni P, Millis CD, Ohrt C, Harrington MA, Kain KC. Comparison of the Parasite-F test and the ICT malaria Pf test with the polymerase chain reaction for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travellers. Trans R Soc Trop Med Hyg 1998; 92(2): 166-9.
5. Tham JM, Lee SH, Tan TMC, Ting RY, Kara UAK. Detection and species determination of malaria parasites by PCR: comparison with microscopy and with Parasite-F and ICT malaria Pf test in clinical environment. J Clin Microbiol 1999; 37(5): 1269-73.
6. Weiss JB. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 113-30.
7. Isozumi R, Fukui M, Kaneko A, Chan CW, Kawamoto F, Kimura M. Improved detection of malaria cases in island settings of Vanuatu and Kenya by PCR that targets the *Plasmodium* mitochondrial cytochrome c oxidase III (cox3) gene. Parasitol Int 2015; 64(3): 304-8.
8. Blood parasites. In: World Health Organization. Basic laboratory methods in medical parasitology. Geneva: WHO; 1997. p.81.
9. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol 1993; 61(2): 315-20.
10. Lee PC, Chong ETJ, Anderios F, Lim YAL, Chew CH, Chua KH. Molecular detection of human *Plasmodium* species in Sabah using PlasmoNexTM multiplex PCR and hydrolysis probes real-time PCR. Malar J 2015; 14: 28-34.
11. Bialasiewicz S, Whitley DM, Nissen MD, Sloots TP. Impact of competitive inhibition and sequence variation upon the sensitivity of malaria PCR. J Clin Microbiol 2007; 45(5): 1621-3.
12. Mixson-Hayden T, Lucchi NW, Udhayakumar V. Evaluation of three PCR-based diagnostic assays for detecting mixed *Plasmodium* infection. BMC Res Notes 2010; 3: 88-94.

13. Mens P, Spieker N, Omar S, Heijnen M, Schallig H, Kager PA. Is molecular biology the best alternative for diagnosis of malaria to microscopy? A comparison between microscopy, antigen detection and molecular tests in rural Kenya and urban Tanzania. *Trop Med Int Health* 2007; 12(2): 238-44.
 14. Gal S, Fidler C, Truner S, Lo YM, Roberts DJ, Wainscoat JS. Detection of *Plasmodium falciparum* DNA in plasma. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 945: 234-8.
 15. Roper C, Elhassan IM, Hviid L, Giha H, Richardson W, Babiker H, *et al.* Detection of very low level of *Plasmodium falciparum* infections using the nested polymerase chain reaction and a reassessment of the epidemiology of unstable malaria in Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54(4): 325-31.
 16. Kimura M, Miyake H, Kim HS, Tanabe M, Arai M, Kawai S, *et al.* Species-specific PCR detection of malaria parasites by microtiter plate hybridization: clinical study with malaria patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33(9): 2342-6.
 17. Kho WG, Chung JY, Sim EJ, Kim MY, Kim DW, Jongwutiwes S, *et al.* A multiplex polymerase chain reaction for a differential diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Parasitol Int* 2003; 52(3): 229-36.
 18. Padley D, Moody AH, Chiodini PL, Saldanha J. Use of a rapid, single-round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97(2): 131-7.
 19. Chew CH, Lim YAL, Lee PC, Mahmud R, Chua KH. Hexaplex PCR detection system for identification of five human *Plasmodium* species with an internal control. *J Clin Microbiol* 2012; 50(12): 4012-9.
-

Development of Multiplex PCR for *Plasmodium* Species Detection

**Panadda Dhepakson Pantida Treeyoung Sakulrat Soonthorncharttrawat
and Anicha Luengchaichaweng**

*Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000
Thailand.*

ABSTRACT Malaria affects 300 to 500 million people annually worldwide and causes over 1 million deaths. In 2013, approximately 29,317 cases of malaria were reported in Thailand. Identification of the human malaria parasite species is important for early treatment of disease. In this study, multiplex PCR was developed by modification of technique described by Snounou et. al. The PCR reactions were optimized and determined for limit of detection. Then the developed method was applied for detection of parasites in sample with mix infection and eluted sample from collection card. The optimized condition had the first reaction for detection of genus *Plasmodium* using GAPDH as an internal control, the second reaction for identification of *Plasmodium* species, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* and *P. ovale*. The results showed the limit of detection for genus *Plasmodium* and human GAPDH at 10^3 copies and 10 copies, respectively. And the limit of detection for all four species was 10^3 copies per *Plasmodium* species. Furthermore, the multiplex PCR has shown ability to detect mixed infection of *P. falciparum* and *P. vivax* at detection threshold of 100 per 10,000 copies for the minority species of infection. In addition, this technique can be applied to blood sample on collection card. The results indicated that the developed multiplex PCR was a useful tool for species identification resulted in correct treatment. Furthermore, the method could easily be developed for mass screening and field surveillance.

Key words: multiplex PCR, *Plasmodium* sp., malaria detection, recombinant plasmid DNA

Establishment of RT-PCR and Real Time RT-PCR Assays for Diagnosis of Nipah Virus Encephalitis

Atchariya Lukebua Athiwat Primsirikunawut Patcha Incomserb
Sirima Pattamadilok and Pathom Sawanpanyalert

National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Tivanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT: Nipah virus (NiV) still remains a public health problem in Asia after its first outbreak in Malaysia during 1998-1999. NiV-associated encephalitis is known to cause a high mortality rate because of no specific treatment. Laboratory investigation for NiV infection, therefore, plays an important role on care, prevention and control. To strengthen laboratory capacity and capability on NiV diagnosis, we have established detection methods for NiV-associated encephalitis diagnosis which are Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Real time RT-PCR. The techniques aim to detect N gene of Nipah virus. Our study demonstrated that the limit of detection of RT-PCR and Real time RT-PCR assays was 10^4 copies/reaction and 10^2 copies/reaction, respectively. The assays were shown to be specific for NiV only. Determination of NiV in cerebrospinal fluid (CSF) from 30 patients with encephalitic symptoms found negative for N gene, suggesting that at present there is no Nipah infection in Thailand.

Key words: Nipah virus, RT-PCR, Real Time RT-PCR

Accepted for publication, 1 July 2015

Introduction

Nipah Virus (NiV) has been recognized as a zoonotic paramyxovirus that is a causative agent of highly fatal and febrile human encephalitis.⁽¹⁾ It was firstly emerged in Malaysia during September 1998–April 1999. The virus was identified and further named after the village that the outbreak occurred.^(1, 2, 3) The natural reservoir of NiV is presumed to be fruit bats of the genus *Pteropus*. Pigs are the primary animal species affected by NiV infection of which direct contact or ingestion of objects or materials contaminated with urine, feces or saliva of infected fruit bats are major routes.^(4, 5, 6,) Moreover, the virus can spread among pigs by direct contact and by aerosol. Human and other animal species become infected by having close contact with sick pigs or objects contaminated with the virus.^(6, 7) Human illness can vary from no signs to death. Flu-like symptoms, such as fever, headache and muscle pain, vomiting and sore throat are initially seen, and may possibly follow by neurological signs such as disorientation, dizziness that indicate acute encephalitis. A case-fatality rate of 40% was reported during the outbreak in Malaysia.^(7, 8, 10) Subsequent outbreaks were widely reported in Southeast Asia such as Singapore, India and Bangladesh.⁽⁴⁾

Human-to-human transmission of NiV was also documented during the outbreak in Faridpur, Bangladesh. The transmission was occurred through close contact with people's secretions and excretions.^(8–11) Additionally, transmission of the virus was also reported within a health-care setting, where 75% of cases occurred among hospital staff or visitors in Siliguri, India.⁽⁸⁾ Furthermore, recent cases of NiV in Bangladesh, have revealed person-to-person transmissions. It was thought that the outbreak initially started when children ate fruit contaminated by saliva and urine of fruit bats.⁽⁶⁾ Moreover, there were reports of positive detection of NiV antibodies among bats in Cambodia and Thailand^(12, 13), suggesting a possibility of human infection in Thailand and its neighboring countries.

It has been known that no effective treatment and vaccine are currently developed. Intensively supportive care with treatment of symptoms is the only approach to managing the infection in people.^(6,7) Laboratory investigation is, therefore, highly important for NiV detection in responses to public health concerns. Several technics can be used to diagnosis of NiV infection such as virus isolation, immunohistochemistry, electron microscopy, serum neutralization, ELISA, polymerase chain reaction (PCR) and sequencing. Each method has limitation and requirement on performance.

Nipah virus is classified as a hazard group 4 or Biosafety level 4 (BSL-4) pathogen, therefore, virus isolation and serum neutralization test⁽¹⁰⁾ require biosafety level 4 laboratory. In addition, there are no commercially viral antigens available for ELISA method. It is then suggested that samples preparation and RNA extraction can be performed in BSL-3 laboratory with the highest level of personnel protective equipment (PPE) according to biosafety and biosecurity rules and regulations.^(10, 20, 21) PCR and real time PCR methods can be conducted in a molecular laboratory. Owing to the fact that National Institute of Health (Thai NIH) of

Department of Medical Sciences plays major roles on detection of emerging and re-emerging pathogens affected Thailand public health and security concerns. Hence, laboratory preparedness for NiV infection is essential at Thai NIH, the national reference laboratory, according to International Health Regulation 2005 (IHR 2005). The present study was aimed to establish diagnostic methods for NiV encephalitis in humans.

Materials and Methods

Preparation of standard Nipah RNA (N gene)

Plasmid DNA, containing Nipah N gene region, was purified using the Invitrogen Endo-free Plasmid Maxi Kit (Cat. no. 12362). One ug of template DNA was required for one reaction (20 ul) of transcription reaction (using MEGAscript kit; Ambion, Cat. no. 1334). One reaction mixture was consisted of 1 ug of DNA template, 2 ul of ATP, CTP, GTP, UTP, 10x buffer, enzyme mix and nuclease free water. An amplification cycle was 37 °C for 4 hrs, followed by 4 °C forever. DNase (1 ul) was added into a reaction tube after completion of amplification cycles and further incubated at 37 °C for 20 min. followed by 4 °C forever. Removal of unincorporated nucleotides and buffer from transcription products with the MEGA clear kit (Ambion, Cat. no. 1908) was done according to the manufacturer's recommendations.⁽¹⁴⁾ RNA transcripts were further used to establish RT-PCR and real time RT-PCR assays for NiV infection.

Estimation of RNA concentration and copy number

RNA concentration was measured by Nanodrop. The RNA preparation was considered as protein-free where the OD260/280 ratio was higher than 1.8. In this study, concentration of RNA is 1,356 ng/ul. Calculation of copy number was based on the formulas: Molecular Weight (MW) of 1 mole of RNA = number of base pairs $\times$ 340 Daltons/base pair = X g. (340 Dalton is the average MW of ribonucleotide monophosphate). The number of molecules of the template per gram was calculated using Avogadro's number (6.022×10^{23} copies or molecules/mole). Avogadro's number/MW = copies/g

Copies/g can be converted to copies/ag by dividing with 10^{18}

One ag contains approximately 1 copy of transcript.⁽¹⁴⁾

Determination of detection limit of NiV by RT-PCR assay

Serial (ten-fold) dilution of standard RNA stock (10^{12} copies) with nuclease free water was done to obtain working concentrations of 10^6 to 10^0 copies/ul. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed with the One Step RT-PCR kit (QIAGEN, Germany). Forward and reverse primers, provided by US-CDC, were NVNBF4 (5'-GGAGTTATCAATCTA-AGTTTAG-3') and NVNBR4 (5'-CATAGAGATGAGTGTAAGC-3'), respectively. RT-PCR was performed in a 50 ul reaction mixture containing 5 ul of RNA sample, 1x reaction buffer, 0.4 mM dNTP mix, 0.2 uM of primers, 0.2U RNase inhibitor and 2 ul of Enzyme Mix. Thermal cycling

conditions were 50°C for 30 min., 95°C for 15 min. and 40 cycles of 95°C for 30 sec, 55°C for 30 sec, 72°C for 1 min and 72°C for 10 min. Reaction products of 203 bp were analyzed by 2% of agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining⁽¹⁵⁾.

Determination of detection limit of NiV by Real time RT-PCR assay

The real time RT-PCR was performed with the SuperScript® III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System Kit (Invitrogen, USA). The real time RT-PCR reaction, performed for 25 ul, was tested in duplicate using

NVBNF2B (5'-CTGGTCTCTGCAGTTATCACCATCGA-3') and

NVBN593R (5'-ACGTACTTAGCCCATCTTCTAGTTTCA-3') as forward and reverse primers, respectively. NVBN542P (5'-CAGCTCCCGACACTGCCGAGGAT-3') was used as a probe, labelling with a fluorescent reporter dye, 6-carboxy-fluorescein (FAM), and a non-fluorescent quencher, black hole 1 (BHQ1), at the 5' end and the 3', respectively. One reaction contained 1x of 2x SS buffer, 0.4U RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0.9 uM of forward and reverse primers, 0.4 uM of probe, 0.05U/ul of ROX and 0.1U/ul of SS III/Taq mix. The assay was run on ABI 7500 FAST (Applied Biosystems, Foster City, CA). The thermal cycling conditions were: (a) 1 cycle of 48°C for 30 min and 95°C for 10 min and (b) 45 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C 1 minute. To determine efficiency of the assay, the threshold was set by choosing the values closest to the idealized slope (-3.33) and correlation coefficient (r^2) was equal 1, while the non-template control (NTC) signal remains below the threshold setting (undetermined).

Results were interpreted as positive, equivocal and negative (undetermined) when Ct values were below 38, between 38 and 39, and equal or more than 40, respectively.⁽¹⁶⁾

Analytical specificity

To evaluate the analytical specificity of RT-PCR and real time RT-PCR assays, RNA samples derived from West Nile virus, Japanese Encephalitis virus and Dengue virus, obtained from Arbovirus section, Thai NIH, were used. Each of RNA transcripts was prepared and tested as described in aforementioned methods.

Investigation of NiV in clinical specimens

Thirty cerebrospinal fluids (CSF) were collected from patients with encephalitic symptoms and were suspected for Japanese Encephalitis (JE) infections. All were diagnosed as non-JEV infection and non-dengue virus infection by ELISA method at Arbovirus section of Thai NIH. RNA was extracted from CSF samples using a NucleoSpin RNA extraction kit (Macherey-Nalgal, Duren, Germany). Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and real time RT-PCR were performed according to the established methods. RNA transcripts at concentration of 10^5 copies/ul and 10^3 copies/ul were used as positive controls for RT-PCR and real time RT-PCR, respectively.

Results

Determination of detection limit of NiV by RT-PCR

The number of Nipah RNA copies obtained from plasmid DNA containing N gene, NiV RNA, ranging from 10^6 to 10^0 copies/ul, was diluted and used to determine detection limit of RT-PCR assay. The detection limit of the established assay was 10^4 copies per reaction, as demonstrated in Fig. 1.

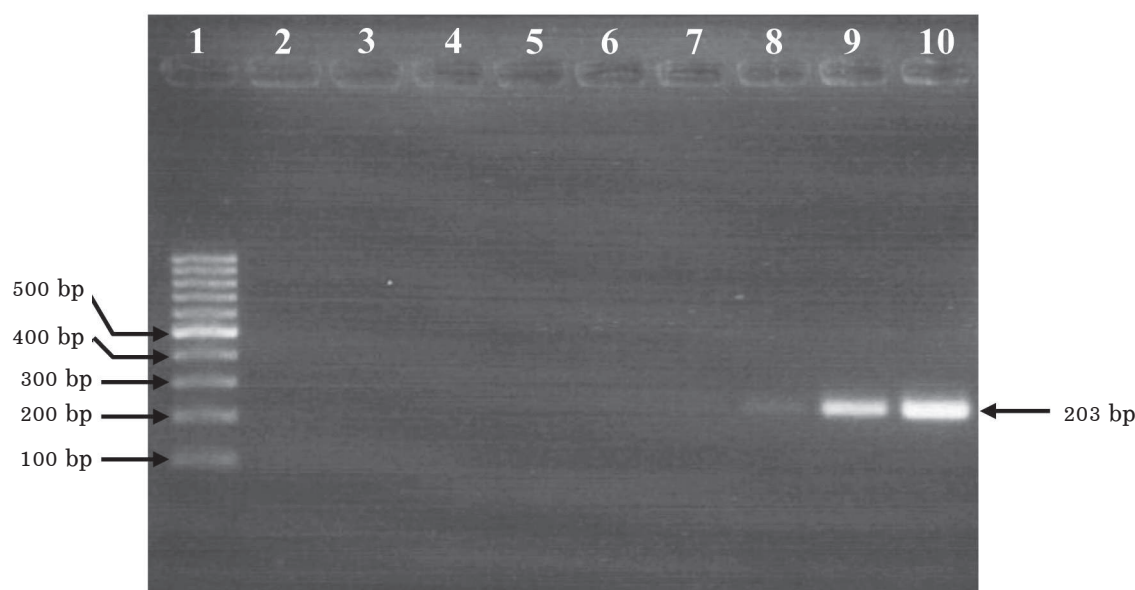


Fig. 1: Agarose gel electrophoresis of detection limit of NiV by RT-PCR assay was 10^4 copies per reaction. Lane 1 = 100 bp DNA marker, Lane 2 = Distilled water, Lane 3 = Negative control, Lane 4 = Standard RNA 10^0 copies, Lane 5 = Standard RNA 10^1 copies, Lane 6 = Standard RNA 10^2 copies, Lane 7 = Standard RNA 10^3 copies, Lane 8 = Standard RNA 10^4 copies, Lane 9 = Standard RNA 10^5 copies, Lane 10 = Standard RNA 10^6 copies.

Determination of detection limit of NiV by Real time RT-PCR

NiV RNA, ranging from 10^6 to 10^0 copies/ul, was used to determine detection limit of real time RT-PCR assay. Amplification plots of each RNA concentration were shown in Fig. 2. Our method also showed that the idealized slope was -3.362 and a correlation coefficient (r^2) was 0.999 (Fig. 3), indicating good efficiency of the established method.

Our study revealed that Ct values of 10 copies per reaction were 38.47 and 38.79, while those of 10^2 copies per reaction were 35.68 and 35.54. According to the interpretation criteria, the detection limit of real time RT-PCR assay of our performance was 10^2 copies per reaction.

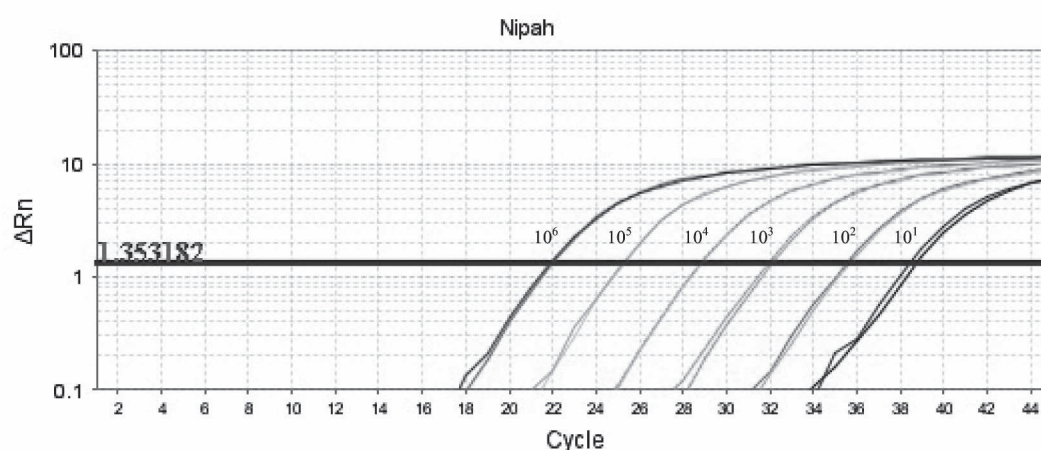


Fig. 2: Amplification plots of detection limit of Real time RT-PCR assay. Amplification plots were realized on 10-fold dilutions of NiV RNA standard. Tests were performed in duplicate from 10^0 to 10^6 copies/reaction

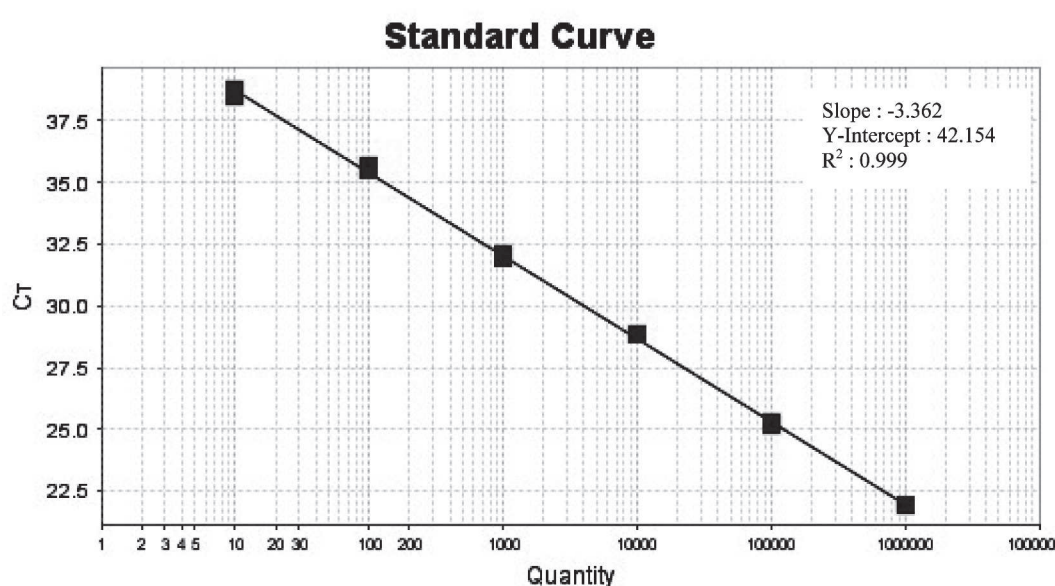


Fig. 3: Standard curve obtained from 10 fold dilutions of NiV RNA. Standard Ct values calculated from results obtained in Fig. 2.

Analytical specificity

The specificity of our established assays was verified using a series of 10-fold dilutions of RNA of West Nile, Japanese Encephalitis and Dengue viruses. Each RNA was diluted in a 10-fold dilution and PCR assays were performed, accordingly. Our results indicated that all samples were negative for Nipah virus by RT-PCR (Fig. 4) and real time RT-PCR (Fig. 5).

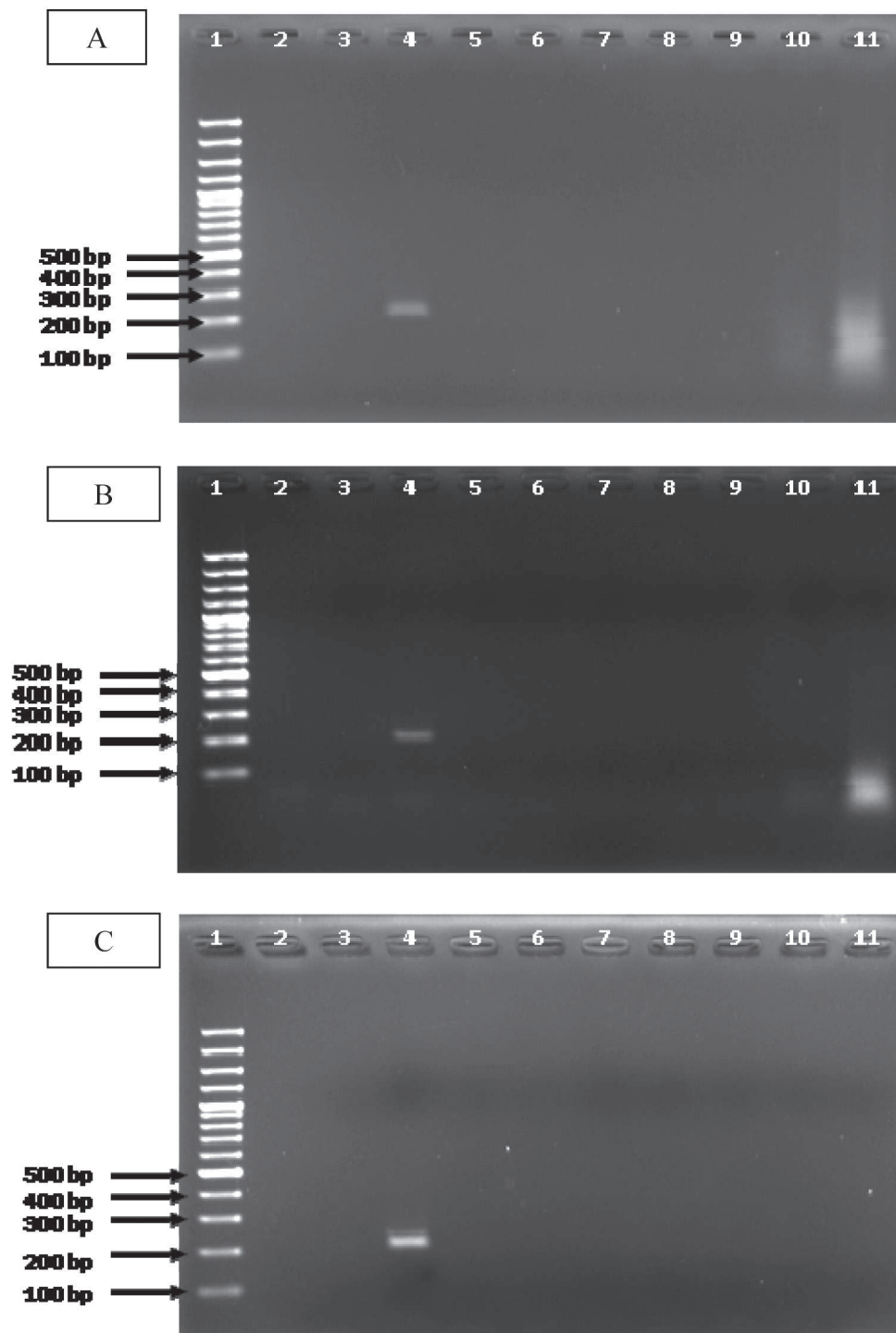
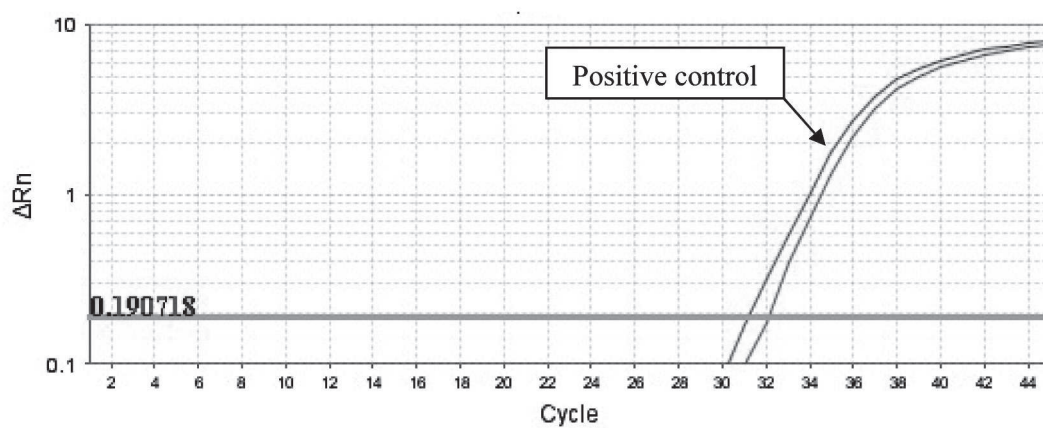
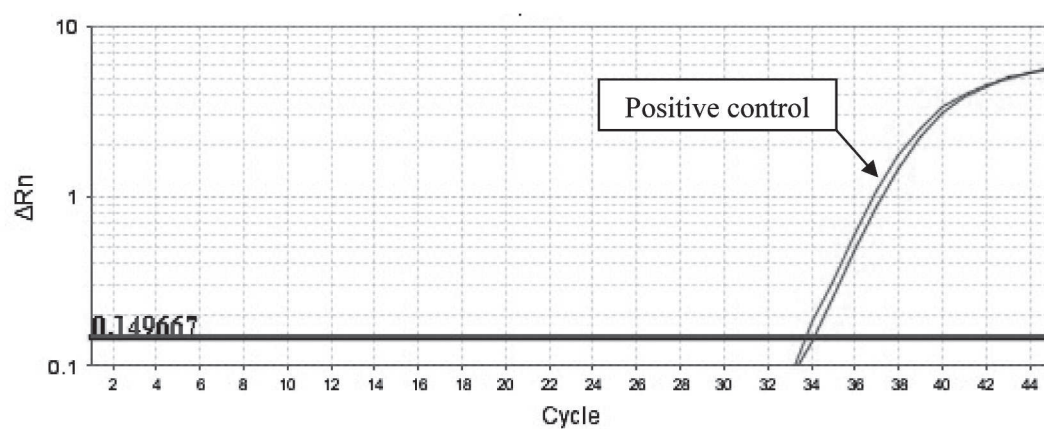


Fig. 4: RT-PCR detection of NiV infection using RNA samples of West Nile (A), Japanese Encephalitis (B) and Dengue virus (C) and electrophoresed on 2% agarose gel. Lane 1 = 100 bp DNA marker, Lane 2 = Distilled water, Lane 3 = Negative control, Lane 4 = Positive control, Lane 5 to Lane 11 = Sample concentration from 10^{-6} to undiluted, respectively. All samples shown negative results.

A) West Nile Virus



B) Japanese Encephalitis Virus



C) Dengue Virus

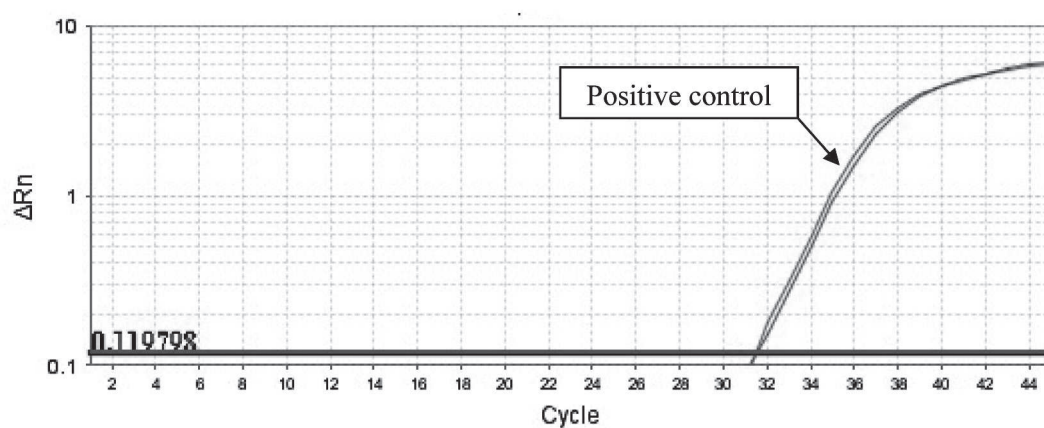


Fig. 5: Real time RT-PCR detection of NiV using RNA samples of West Nile virus (A), Japanese Encephalitis virus (B) and Dengue virus (C). Each sample was tested at concentration of 10^{-6} to undiluted.

Testing on encephalitis samples

Our established assays were further performed to investigate for NiV in CSF specimens of patients suspected of JEV infection. The specimens were previously determined for JEV and dengue virus using ELISA methods. We received the specimens after diagnosis as non-JEV and non-dengue virus infections. Our findings showed that all samples were negative for Nipah virus as determined by RT-PCR (Fig. 6). The real time RT-PCR was additionally tested in duplicated, with NiV RNA concentration of 10^3 copies/ul as a positive control. All samples were also shown for Nipah virus (Fig. 7)

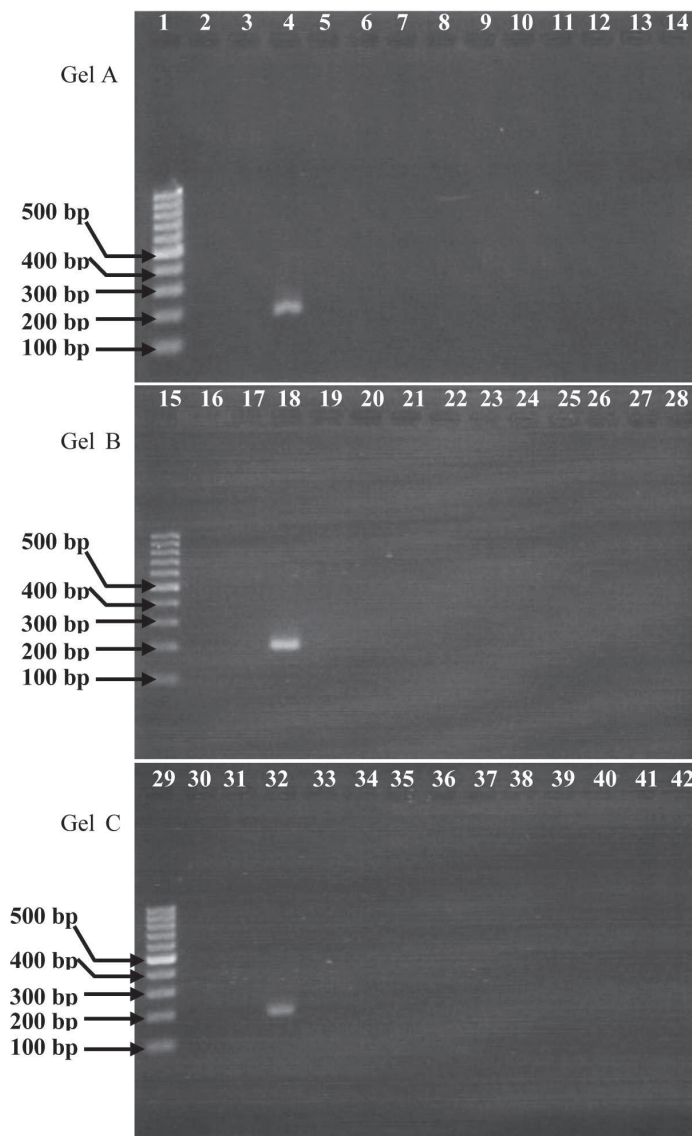


Fig. 6: RT-PCR detection of NiV infection in CSF collected from encephalitic patients with encephalitic symptoms. Lane 1, 15, 29 = 100 bp DNA marker, Lane 2, 16, 30 = Distilled water, Lane 3, 17, 31 = Negative control, Lane 4, 18, 32 = Positive control, Lane 5 to Lane 14 = Sample No. 1 to 10 (Gel A), Lane 19 to Lane 28 = Sample No. 11 to 20 (Gel B), Lane 33 to Lane 42 = Sample No. 21 to 30 (Gel C).

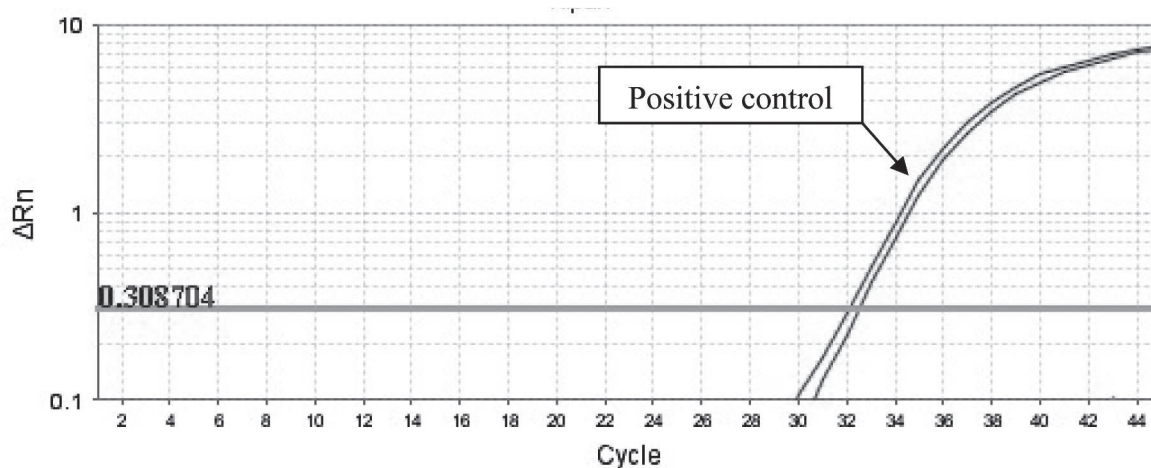


Fig. 7: Real time RT-PCR detection of NiV infection in CSF collected from patients with Encephalitic symptoms.

Discussion

It has been noted that recent emerging infection in humans are often transmitted from infected animals, including Nipah virus (NiV). Detection of those zoonotic pathogens that cause diseases in human is considered as importance for reference laboratories of the country, according to International Health Regulations 2005 (IHR 2005).⁽²²⁾

RT-PCR and real time RT-PCR assays have been developed to diagnosis several kinds of viruses such as dengue, hepatitis C, human papilloma and influenza viruses. In this regards, we studied to established methods that are useful for NiV determination under current and acceptable laboratory facilities of NiV detection i.e., BSL-2 and BSL-3 laboratories, within Thai NIH. Our study demonstrated that the limit of detection of RT-PCR and real time RT-PCR assays was shown as low as 10^4 copies/reaction and 10^2 copies/reaction, respectively, which were in paralleled with the report of Guillaume V et al.⁽²¹⁾

We examined specificity of our assays and found that our established assays are definitely specific for NiV. Furthermore, NiV-associated encephalitis symptoms are similar to JEV-associated one and causative viral agents are also found in CSF.⁽¹⁹⁾ We, then, tested 30 CSF samples of encephalitic patients that were reported as negative for JEV and dengue virus infection. Using our established methods, we did not found any positive NiV-infected CSF. Our finding is supported current information that no Nipah virus infection is reported although anti-NiV antibodies were found in fruit bats in Thailand and Combodia.⁽¹²⁾

Conclusion

In this study, we reported the development of RT-PCR and real time RT-PCR assays for Nipah virus. The limit of detection of RT-PCR and real rime RT-PCR assays was 10^4 copies/reaction and 10^2 copies/reaction respectively. RT-PCR and real time RT-PCR are essential tools

for diagnosis of NiV infections in laboratory facilities of Thailand. Our study is also well-associated with global agenda on health security.

Acknowledgements

We are grateful to Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Center for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia, USA. especially Dr. Paul A. Rota for providing primers, probe and plasmid DNA with NiV N gene. We also thank Mr. Luis Lowe, Ms. Bettina Bankamp, Ms. Elena Lopareva for their technical assistance, the Arbovirus section, National Institute of Health for providing the CSF samples. This study was supported by the fiscal budget of Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand.

References

1. Chua KB, Bellini WJ, Rota PA, Harcourt BH, Tamin A, Lam SK, et al. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science*. 2000; 288: 1432-5.
2. World Health Organization. Recommendations from WHO's consultation on zoonoses. [online]. 2004; [cited 2013 Apr 12]; [3 screens]. Available from: URL: <http://www.who.int/mediacentre/news/briefings/2004/mb3/en/>.
3. Chua KB, Chua BH, Wang CW. Anthropogenic deforestation, El Nino and the emergence of Nipah virus in Malaysia. *Malays J Pathol* 2002; 24(1): 15-21.
4. Chadha MS, Comer JA, Lowe L, Rota PA, Rollin PE, Bellini WJ, et al. Nipah virus-associated encephalitis outbreak, Siliguri, India. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(2): 235-40.
5. Harcourt BH, Lowe L, Tamin A, Liu X, Bankamp B, Bowden N, et al. Genetic characterization of Nipah virus, Bangladesh, 2004. *Emerg Infect Dis* [serial online]. 2005 Oct [cited 2006 Nov 21]; 11(10): [4 screens]. Available from: URL: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/11/10/pdfs/05-0513.pdf>
6. CFSPH Technical Fact Sheets. Nipah. [online]. 2008 [cited 2009 Aug 20]; [1 screen]. Available from: URL: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/default.htm>.
7. Lo MK, Harcourt BH, Mungall BA, Tamin A, Peeples ME, Bellin WJ, et al. Determination of the henipavirus phosphoprotein gene mRNA editing frequencies and detection of the C, V and W proteins of Nipah virus in virus-infected cells. *J Gen Virol* 2009; 90: 398-404.
8. World Health Organization. Fact sheet, Nipah virus. [online]. 2009 [cited 2013 Apr 12]; [4 screens]. Available from: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs262/en/index.html>.
9. Gurley ES, Montgomery JM, Hossain MJ, Bell M, Azad AK, Islam MR, et al. Person-to-person transmission of Nipah virus in a Bangladeshi community. *Emerg Infect Dis* [serial online]. 2007 Jul [cited 2009 Nov 21]; 13(7): [7 screens]. Available from: URL: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/7/pdfs/06-1128.pdf>.
10. CFSPH Technical Fact Sheets. Nipah virus infection [online]. 2007 Nov [cited 2009 Aug 20]; [7 screens]. Available from: URL: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/nipah.pdf>.
11. World Health Organization. Nipah virus (NiV) infection. [online]. [cited 2013 Apr 12]; [1 screen]. Available from: URL: <http://www.who.int/csr/disease/nipah/en/>.

12. Wacharapluesadee S, Lumlertdacha B, Boongird K, Wanghongsa S, Chanhom L, Rollin P, et al. Bat Nipah virus, Thailand. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(12): 1949-51.
13. Luby SP, Gurley ES, Hossain MJ. Transmission of human infection with Nipah virus. *Clin Infect Dis* 2009; 49 (11): 1743-8.
14. Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA. Standard Operation Procedure for the preparation of positive controls, MMRHLB, SOP 10 ver 1.0, 6 March 2008.
15. Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA. Standard Operation Procedure for RT-PCR assay for genotyping measles and Nipah virus, MMRHLB, SOP 8 ver 1.0, 6 March 2008.
16. Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA. Standard Operation Procedure for Real Time (Taqman) RT-PCR assay for the detection of viral RNA targets: Measles virus nucleoprotein gene (MV N), Mumps virus SH gene (MuV SH), and Nipah virus nucleoprotein gene (NiV N); and Human RNase P housekeeping gene, MMRHLB, SOP 7 ver 1.0, 6 March 2008.
17. World Health Organization. Fact sheet No 386. Japanese encephalitis. [online]. 2014 [cited 2015 Jan 18]; [3 screens]. Available from: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs386/en/>.
18. Centers for Disease Control and Prevention. Japanese encephalitis. [online]. 2015 [cited 2015 Jan 18]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/japaneseencephalitis/>.
19. Centers for Disease Control and Prevention. Diagnostic testing-Japanese encephalitis. [online]. 2015 [cited 2015 Jan 18]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/japaneseencephalitis/healthCareProviders/healthCareProviders-Diagnostic.html>.
20. สุภาภรณ์ วัชรพฤษชาติ. การวินิจฉัยไวรัสนิปาห์ห้องปฏิบัติการ. [ออนไลน์]. 2549 [สืบค้น 18 ม.ค. 2558]; [6 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <http://www.cueid.org/content/view/47/40/>.
21. Guillaume V, Lefeuvre A, Faure C, Marianneau P, Buckland R, Lam SK et al. Specific detection of Nipah virus using real-time RT-PCR (TagMan). *J Viro Methods*. 2004; 120: 229-37.
22. World Health Organization. International health regulations (IHR 2005). 2nd ed. [online]. 2005 [cited 2015 Jun 22]. Available from: URL: <http://www.who.int/ihr/publications/9789241596664/en/>.

พัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยโรคสมองอักเสบนิปาห์ โดยเทคนิค RT-PCR และ Real Time RT-PCR

อัจฉริยา ลูกบัว อธิวัฒน์ ปริณสิริคุณาวุฒิ พัทธา อินคำสืบ ศิริมา ปัทมดิลก
และปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ไวรัสนิปาห์เป็นสาเหตุของการระบาดของโรคไข้สมองอักเสบนิปาห์ และเป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนที่ยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขในภูมิภาคเอเชีย หลังจากที่มีรายงานการระบาดครั้งแรกในประเทศมาเลเซีย ในปี พ.ศ. 2541-2542 ไวรัสนิปาห์จัดเป็นเชื้อไวรัสที่มีอัตราการป่วยตายสูง ปัจจุบันยังไม่มียาที่รักษาการติดเชื้อไวรัสนิปาห์โดยตรง อีกทั้งยังไม่มีวัคซีนในการป้องกันโรค ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสนิปาห์ในห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญในการป้องกันและควบคุมโรค และเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพและศักยภาพห้องปฏิบัติการในการตรวจวินิจฉัยไวรัสนิปาห์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้พัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อไวรัสนิปาห์ทางห้องปฏิบัติการโดยเทคนิค RT-PCR และ Real Time RT-PCR เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัสนิปาห์โดยเลือก N gene เป็นยีนเป้าหมาย ผลการศึกษาพบว่าวิธี RT-PCR และ Real Time RT-PCR สามารถตรวจจับสารพันธุกรรมไวรัสนิปาห์ได้ที่ปริมาณน้อยที่สุดที่ 10^4 copies/reaction และ 10^2 copies/reaction ตามลำดับ เมื่อนำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาทดสอบตัวอย่างน้ำไขสันหลังของผู้สงสัยป่วยโรคไข้สมองอักเสบ จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลเป็นลบทุกตัวอย่างทั้งสองวิธี จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะต่อไวรัสนิปาห์เท่านั้น และอาจกล่าวได้ว่ายังไม่มีกรณีการติดเชื้อไวรัสนิปาห์ในประเทศไทย

การสำรวจปริมาณสารหล่อลื่นในถุงยางอนามัย ที่จำหน่ายในประเทศไทย

สถาพร กล่อมแก้ว สุภาวรรณ จงธรรมวัฒน์

สำนักวิจัยและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ จังหวัดนนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การศึกษานี้เพื่อสำรวจปริมาณสารหล่อลื่นในถุงยางอนามัย ว่าเป็นไปตามเกณฑ์กำหนดขององค์การอนามัยโลกหรือไม่ ทั้งนี้มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 625-2554 เรื่อง ถุงยางอนามัย ไม่มีข้อกำหนดคุณภาพเกี่ยวกับปริมาณสารหล่อลื่น สำนักวิจัยและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้สุ่มซื้อตัวอย่างถุงยางอนามัยจากร้านสะดวกซื้อและร้านขายยาทุกภาคทั่วประเทศ เพื่อหาปริมาณสารหล่อลื่นจำนวนทั้งหมด 66 ตัวอย่าง ๆ ละ 13 ซอง ครอบคลุมของผู้ผลิต 6 ราย และนำเข้า 1 ราย ใช้เกณฑ์กำหนดขององค์การอนามัยโลกที่กำหนดปริมาณสารหล่อลื่น (550 ± 150) มิลลิกรัม ทดสอบโดยวิธีซึ่งตาม มอก. 625-2554 ปริมาณสารหล่อลื่นเป็นค่าแตกต่างระหว่างน้ำหนักของถุงยางอนามัย (รวมถุงยางอนามัยและสารหล่อลื่นภายในซอง) กับน้ำหนักของถุงยางอนามัยและถุงยางอนามัยที่ล้างสารหล่อลื่นออกแล้วด้วยไอโซโพรพานอล ผลการสำรวจพบว่าปริมาณสารหล่อลื่นอยู่ในเกณฑ์ มีจำนวน 57 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 86 ปริมาณสารหล่อลื่นต่ำกว่าเกณฑ์ มีจำนวน 6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 9 ปริมาณสารหล่อลื่นที่สูงกว่าเกณฑ์ มีจำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5

บทนำ

ถุงยางอนามัย (Condom) ผลิตจากน้ำยางพารา เป็นอุปกรณ์คุมกำเนิดช่วยป้องกันการตั้งครรภ์และป้องกันโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ เช่น ซิฟิลิส หนองใน เอดส์ ถุงยางอนามัยเป็นเครื่องมือแพทย์ตามพระราชบัญญัติเครื่องมือแพทย์ พ.ศ. 2551⁽¹⁾ (เดิม พ.ศ. 2531) ผู้ผลิตและผู้นำเข้าต้องขอรับใบอนุญาตจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข อ้างอิงตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 625-2554 เรื่อง ถุงยางอนามัยจากน้ำยางธรรมชาติ-คุณลักษณะที่ต้องการและวิธีทดสอบ⁽²⁾ มาตรฐานเทียบเท่า ISO 4074: 2002/Cor.1: 2003/Cor.2: 2008⁽³⁾ เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพถุงยางอนามัยให้มีคุณภาพมาตรฐาน และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

สารหล่อลื่นที่นิยมเติมในช่องถุงยางอนามัย คือ ซิลิโคน ออยล์ เป็นสารหล่อลื่นที่ละลายในน้ำมัน แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่น ๆ จึงไม่ทำลายคุณภาพของเนื้อยาง โดยจะมีการเติมสารหล่อลื่นในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการผลิตถุงยางอนามัยก่อนที่จะปิดผนึกช่อง

มาตรฐาน มอก. 625-2554 กำหนดคุณสมบัติทางกายภาพในเรื่องของขนาด ความกว้าง ความยาว ความปลอดภัย ความดันและปริมาตรขณะแตก ความสมบูรณ์ของการปิดผนึกช่องย้อย โดยไม่มีข้อกำหนดเกี่ยวกับปริมาณสารหล่อลื่นในช่อง แต่มีวิธีทดสอบปริมาณสารหล่อลื่น ทั้งนี้มาตรฐานขององค์การอนามัยโลก (WHO)⁽⁴⁾ มีข้อกำหนดเรื่องปริมาณสารหล่อลื่น ต้องมีสารหล่อลื่น (550 ± 150) มิลลิกรัมต่อถุงยางอนามัย 1 ช่อง บนฉลากบรรจุถุงยางอนามัยจะไม่ระบุปริมาณสารหล่อลื่น อาจมีบางรุ่นระบุว่า มีสารหล่อลื่นมากเป็นพิเศษ จึงได้ทำการสำรวจปริมาณสารหล่อลื่นในช่องถุงยางอนามัย ครอบคลุมของแต่ละผู้ผลิตที่วางจำหน่ายในประเทศไทยโดยใช้ข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

ตัวอย่างถุงยางอนามัยจากร้านสะดวกซื้อและร้านขายยาทั่วทุกภาคของประเทศ จำนวน 66 ยี่ห้อ ๆ ละ 13 ช่อง จำแนกตามผู้ผลิต 7 ราย แบ่งเป็น 17 ตัวอย่าง, 13 ตัวอย่าง, 11 ตัวอย่าง, 10 ตัวอย่าง, 8 ตัวอย่าง, 6 ตัวอย่าง และ 1 ตัวอย่าง

การชักตัวอย่าง

ชักตัวอย่างถุงยางอนามัยตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 465 เล่ม 1-2554⁽⁵⁾ ที่ระดับการตรวจสอบพิเศษ S-2 ใช้ตัวอย่างละ 13 ช่อง

เกณฑ์ยอมรับและวิธีทดสอบ

องค์การอนามัยโลกกำหนดให้มีปริมาณสารหล่อลื่น (550 ± 150) มิลลิกรัม หรือ 400 มิลลิกรัม ถึง 700 มิลลิกรัมต่อถุงยางอนามัย 1 ช่อง วิธีทดสอบตามมาตรฐาน มอก. 625-2554

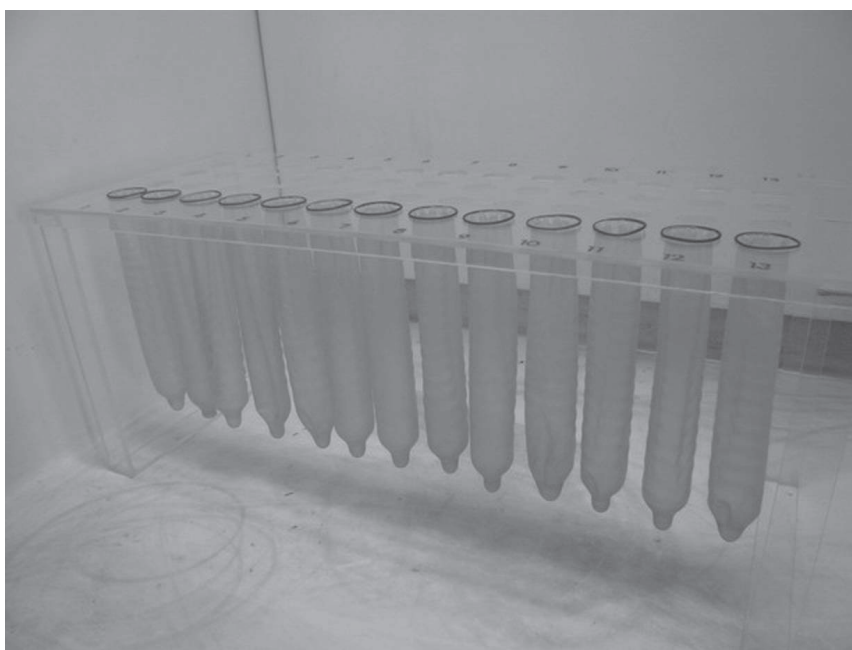
เครื่องมือทดสอบ

1. เครื่องชั่งไฟฟ้า ยี่ห้อ Mettler Toledo ความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม
2. อ่างน้ำความถี่สูง (Ultrasonic bath) ยี่ห้อ Ultrasonic cleaner
3. ไอโซโพรพานอล (Iso propanol)
4. บีกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิลิตร 3 ใบ

5. กระดาษซับ
6. มีดคัทเตอร์
7. ตู้ดูดควัน (Laboratory chemical fume hood)

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักของอุ้งยางอนามัยแต่ละช่อง (เป็นน้ำหนักของ น้ำหนักอุ้งยางอนามัย และน้ำหนักสารหล่อลื่น) จนครบ 13 ช่อง บันทึกน้ำหนักเป็น M1 หน่วยกรัม จากนั้นนำแต่ละช่องใส่ในบีกเกอร์เปล่าที่เขียนหมายเลข 1 ถึง 13 ตามลำดับ
2. เปิดแต่ละช่องทั้ง 3 ด้าน ด้วยมีดคัทเตอร์ นำอุ้งยางอนามัยออกมาแล้วคลี่ให้สุด เช็ดสารหล่อลื่นออกจากอุ้งยางอนามัยและช่องด้วยกระดาษซับ ตามลำดับหมายเลข 1 ถึง 13 แล้วใส่กลับในบีกเกอร์หมายเลขเดิม
3. เติมน้ำในอ่างน้ำความถี่สูง ประมาณครึ่งอ่าง เติมนโซโพรพานอลประมาณ 200 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ 3 ใบ แล้ววางในอ่างน้ำความถี่สูง
4. จุ่มอุ้งยางอนามัยและช่องย่อยหมายเลข 1 ลงในบีกเกอร์ใบที่ 1 เปิดเครื่องให้ทำงานประมาณ 5 นาที ใช้แท่งแก้วช่วยกวนบ้าง เปลี่ยนล้างอุ้งยางอนามัยชั้นเดิมในบีกเกอร์ใบที่ 2 และใบที่ 3 ตามลำดับ
5. นำอุ้งยางอนามัยและช่องขึ้นมา วางช่องในบีกเกอร์เปล่าหมายเลขเดิม นำอุ้งยางอนามัยแขวนกับชุดแขวนตามภาพที่ 1 โดยแขวนตามลำดับหมายเลข
6. ล้างอุ้งยางอนามัยและช่องหมายเลข 2 ถึงหมายเลข 13 ต่อตามข้อ 4 และข้อ 5
7. ผึ่งอุ้งยางอนามัยให้โซโพรพานอลระเหยเป็นเวลา 12-16 ชม. จนอุ้งยางอนามัยและช่องแห้ง ทั้งนี้ให้กลับด้านในของอุ้งยางอนามัยด้วย
8. นำอุ้งยางอนามัยชั้นที่ 1 ถึงชั้นที่ 13 ที่แห้งแล้ว ใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีช่องอยู่ให้ตรงตามหมายเลข
9. ชั่งอุ้งยางอนามัยและช่องแต่ละชั้น บันทึกน้ำหนักเป็น M2 หน่วยกรัม
10. คำนวณปริมาณสารหล่อลื่นทั้งหมด โดยมีค่าเท่ากับ $(M1 - M2) \times 1000$ เป็นมิลลิกรัม ปัดละเอียด 50 มิลลิกรัม



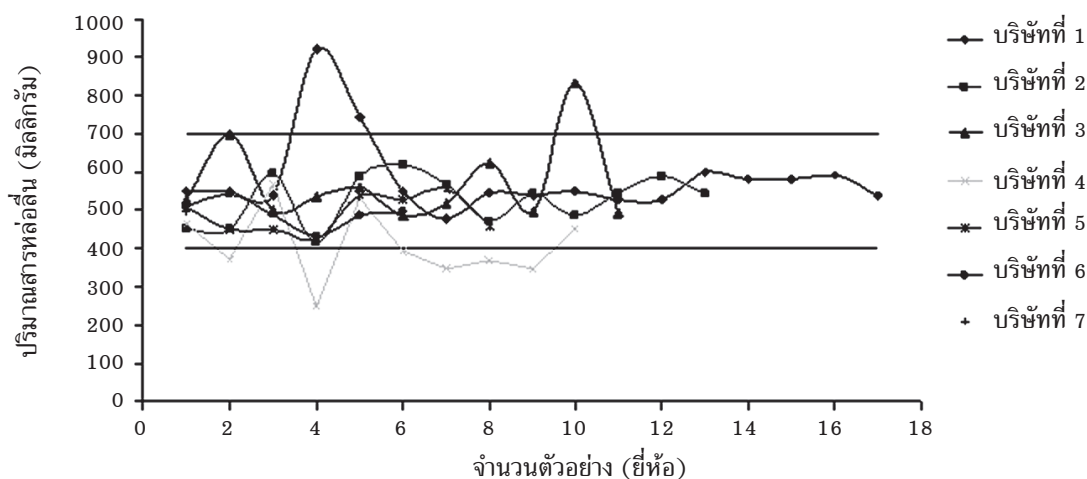
ภาพที่ 1 การแขวนอุ้งยางอนามัยผึ่งแห้งหลังล้างโซโพรพานอล

ผล

ผลการสำรวจปริมาณสารหล่อลื่นในช่องที่บรรจุยางอนามัย จากทั้งหมด 66 ตัวอย่าง ยี่ห้อ (ตารางที่ 1) พบว่า ยางอนามัยของบริษัทที่ 1 มีปริมาณสารหล่อลื่นต่ำสุด สูงสุดเท่ากับ 477, 923 มิลลิกรัม ตามลำดับ อยู่ในเกณฑ์ 15 ตัวอย่าง และสูงกว่าเกณฑ์ 2 ตัวอย่าง บริษัทที่ 2 มีปริมาณสารหล่อลื่นต่ำสุด สูงสุดเท่ากับ 250, 569 มิลลิกรัม ตามลำดับ อยู่ในเกณฑ์ทั้ง 13 ตัวอย่าง บริษัทที่ 3 มีปริมาณสารหล่อลื่นต่ำสุด สูงสุดเท่ากับ 427, 558 มิลลิกรัม ตามลำดับ อยู่ในเกณฑ์ 10 ตัวอย่าง และสูงกว่าเกณฑ์ 1 ตัวอย่าง บริษัทที่ 4 มีปริมาณสารหล่อลื่นต่ำสุด สูงสุดเท่ากับ 485, 835 มิลลิกรัม ตามลำดับ อยู่ในเกณฑ์ 4 ตัวอย่าง และต่ำกว่าเกณฑ์ จำนวน 6 ตัวอย่าง บริษัทที่ 5 มีปริมาณสารหล่อลื่นต่ำสุด สูงสุดเท่ากับ 415, 619 มิลลิกรัม ตามลำดับ อยู่ในเกณฑ์ทั้ง 8 ตัวอย่าง บริษัทที่ 6 มีปริมาณสารหล่อลื่นต่ำสุด สูงสุดเท่ากับ 431, 542 มิลลิกรัม ตามลำดับ อยู่ในเกณฑ์ทั้ง 6 ตัวอย่าง และยางอนามัยของบริษัทที่ 7 มีปริมาณสารหล่อลื่นเท่ากับ 496 มิลลิกรัม อยู่ในเกณฑ์ 1 ตัวอย่าง จากผลการทดสอบปริมาณสารหล่อลื่นทั้งหมด 66 ตัวอย่าง จะเห็นได้ว่า ยางอนามัยมีปริมาณสารหล่อลื่นอยู่ในเกณฑ์ จำนวน 57 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 86 ปริมาณสารหล่อลื่นต่ำกว่าเกณฑ์ จำนวน 6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 9 และปริมาณสารหล่อลื่นสูงกว่าเกณฑ์ จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5 และได้เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณสารหล่อลื่นของแต่ละตัวอย่างของแต่ละบริษัทผู้ผลิต (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างเมื่อเทียบปริมาณสารหล่อลื่นกับเกณฑ์กำหนดขององค์การอนามัยโลก และแสดงปริมาณสารหล่อลื่นเฉลี่ยที่ตรวจพบจากแต่ละผู้ผลิต

บริษัทที่	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจ				ปริมาณสารหล่อลื่น		ค่าเฉลี่ย (มิลลิกรัม)
	ทั้งหมด	อยู่ในเกณฑ์	ต่ำกว่าเกณฑ์	สูงกว่าเกณฑ์	ต่ำสุด	สูงสุด	
1	17	15	0	2	477	923	583
2	13	13	0	0	250	569	528
3	11	10	0	1	427	558	570
4	10	4	6	0	485	835	409
5	8	8	0	0	415	619	490
6	6	6	0	0	431	542	492
7	1	1	0	0	-	-	496
รวม	66	57	6	3			
ร้อยละ	100	86	9	5			



ภาพที่ 2 ค่าเฉลี่ยปริมาณสารหล่อลื่นของแต่ละตัวอย่างของแต่ละบริษัทผู้ผลิต

วิจารณ์

ถุงยางอนามัยที่วางจำหน่ายในท้องตลาดมีหลากหลายยี่ห้อ หลายรุ่น แต่ละรุ่นจะมีปริมาณสารหล่อลื่นมากน้อยแตกต่างกันไปตามผลการสำรวจปริมาณสารหล่อลื่นข้างต้น จากผลการศึกษาปริมาณสารหล่อลื่นเมื่อเปรียบเทียบยี่ห้อของแต่ละบริษัทผู้ผลิต พบว่า ปริมาณสารหล่อลื่นส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์คิดเป็นร้อยละ 86 และมีเพียงร้อยละ 9 ที่ต่ำกว่าเกณฑ์ โดยมี 1 ตัวอย่างใน 6 ตัวอย่างที่มีปริมาณสารหล่อลื่นเพียง 250 มิลลิกรัม ถุงยางอนามัยที่มีสารหล่อลื่นปริมาณน้อยไปเมื่อนำไปใช้งานอาจทำให้เกิดการระคายเคืองได้ เนื่องจากไม่มีข้อกำหนดให้ระบุปริมาณสารหล่อลื่นบนฉลาก หากผู้บริโภครู้สึกว่าถุงยางอนามัยมีการหล่อลื่นไม่เพียงพอ จำเป็นต้องหาสารหล่อลื่นมาทาเพิ่มเอง การเลือกใช้สารหล่อลื่นควรเลือกให้ถูกประเภทต้องใช้สารหล่อลื่นประเภทละลายได้ในน้ำ^(6, 7) อย่างไรก็ตามผู้บริโภคควรเลือกซื้อถุงยางอนามัยที่ได้มาตรฐาน มีเลขใบอนุญาต อย. และยังไม่หมดอายุ

สรุป

จากผลการสำรวจปริมาณสารหล่อลื่นในซองที่บรรจุถุงยางอนามัย จำนวน 66 ตัวอย่าง โดยใช้ข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลกเป็นเกณฑ์ 400 มิลลิกรัม ถึง 700 มิลลิกรัม พบว่า ถุงยางอนามัยที่มีปริมาณสารหล่อลื่นที่อยู่ในเกณฑ์ มีจำนวน 57 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 86 ปริมาณสารหล่อลื่นต่ำกว่าเกณฑ์ จำนวน 6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 9 และปริมาณสารหล่อลื่นที่สูงกว่าเกณฑ์ มีจำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5

เอกสารอ้างอิง

1. พระราชบัญญัติเครื่องมือแพทย์ พ.ศ. 2551. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 125, ตอนที่ 43 ก. (ลงวันที่ 5 มีนาคม 2551).
2. ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 4390 (พ.ศ. 2554) ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 129 ตอนพิเศษ 93 ง. (ลงวันที่ 13 มิถุนายน 2555) มาตรฐานเลขที่ มอก. 625-2554.
3. ISO 4074: 2002/Cor.1: 2003/Cor.2: 2008 Natural latex rubber condoms-requirements and test methods. Geneva: ISO; 2008.
4. Male latex condom: specification, prequalification and guidelines for procurement, 2010. Geneva: World Health Organization, UNFPA and Family Health International; 2013. p. 33.
5. ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 4398 (พ.ศ. 2555) ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 129, ตอนพิเศษ 97 ง. (ลงวันที่ 20 มิถุนายน 2555) มาตรฐานเลขที่ มอก. 465 เล่ม 1-2554.
6. สุมาลี พรภิฑยประสาน, สมล รัตการโกวิท, ระวีวรรณ ปรีดีสนธิ, ชัยพันธ์ อีระเกียรติกำจร, นุชนาฏ เรืองศิลาสิงห์. การเสื่อมสภาพของถุงยางอนามัยเพื่อใช้ร่วมกับผลิตภัณฑ์เพิ่มการหล่อลื่น. วารสารอาหารและยา. 2539; 3(1): 49-62.
7. สุภาวรรณ จงธรรมวัฒน์, สถาพร กล่อมแก้ว และวันเพ็ญ ดวงสว่าง. การศึกษาคุณภาพถุงยางอนามัยที่ใช้ร่วมกับสารหล่อลื่นประเภทต่าง ๆ. วารสารควบคุมโรค. ต.ค.-ธ.ค. 2557; 40(4): 293-301.

Determination of Lubricant for Condoms in Markets in Thailand

Sataporn Klomkaew and Supawan Chongthamawat

Bureau of Radiation and Medical Devices, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Nonthaburi 11000 Thailand.

ABSTRACT This study determines total lubricant for condoms in individual containers. According to TIS 625-2554, there is no requirement on label of the amount of lubricant on the package. Bureau of Radiation and Medical Devices, Department of Medical Sciences tested 66 condoms purchased from convenience stores and pharmacies. These samples came from 6 manufactures in Thailand and 1 from importor. The requirements of World Health Organization (WHO) for the total lubricant is (550 ± 150) mg for each container. The test using mass method as follows Thai Industrial Standard, TIS 625 B.E. 2554 is applied to determine the lubricant. The total lubricant is the difference between the weight of condoms before washing lubricant with isopopanol and the weight of condom after washing lubricant with isopopanol. The results found that 57 samples (86%), are conformed to the WHO requirement, with 6 samples (9%) are less and 3 samples (5%) are over.

Key words: condom, lubricant

การเตรียมความพร้อมเพื่อรองรับความสามารถ ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ตามมาตรฐาน ISO 15189: 2012 ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง

สุภาภรณ์ นิยมแก้ว และธรรณชนก พิทักษ์

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง อ.เมือง จ.ตรัง 92000

บทคัดย่อ การเตรียมความพร้อมเพื่อรองรับความสามารถห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ตามมาตรฐาน ISO 15189: 2012 เพื่อเพิ่มขีดความสามารถและความพร้อมของห้องปฏิบัติการเพื่อสร้างความเชื่อมั่นแก่ลูกค้า โดยการศึกษาข้อกำหนดและดำเนินการตามข้อกำหนดที่เพิ่มขึ้นใหม่ ด้านบริหารจัดการและด้านวิชาการ รวมทั้งข้อกำหนดด้านความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ ISO 15190: 2003 ให้ครอบคลุม ISO 15189: 2012 โดยศึกษาข้อกำหนดที่เพิ่มขึ้นจากปี 2007 ด้านบริหารจัดการ 13 ข้อ ด้านวิชาการ 28 ข้อ และศึกษาข้อกำหนดด้านความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ ISO 15190: 2003 จำนวน 65 ข้อ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง ได้วิเคราะห์ข้อกำหนดที่ต้องปรับปรุงเพิ่มของห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิก ด้านบริหารจัดการสูงสุด จำนวน 3 ข้อ ร้อยละ 23.07 โดยการเพิ่มตัวชี้วัดคุณภาพ ISO 15189: 2012 ในคู่มือคุณภาพ จัดทำแผนบริหารความเสี่ยงกระบวนการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ และมีการปรับปรุงแบบประเมินความพึงพอใจให้เป็นรูปแบบเดียวกัน รองลงมาคือ ด้านความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ ส่วนใหญ่จะเป็นการจัดหาอุปกรณ์ความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ จำนวน 6 ข้อ ร้อยละ 9.23 และด้านวิชาการ 2 ข้อ ร้อยละ 7.14 โดยการทบทวนวิธีตรวจวิเคราะห์ให้สอดคล้องกับอาการของผู้ป่วย และได้เพิ่มความไม่แน่นอนในการวัดในรายการวิเคราะห์ที่มีข้อมูลทางสถิติ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ใช้ในการเตรียมความพร้อมในการรองรับความสามารถห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ตามมาตรฐาน ISO 15189: 2012 ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง ครอบคลุมตามข้อกำหนดด้านบริหารจัดการ และวิชาการ รวมถึงข้อกำหนดด้านความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ ISO 15190: 2003 ทำให้ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง ผ่านการรับรอง ISO 15189: 2012 มีคู่มือความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ และมีแผนบริหารความเสี่ยงที่สอดคล้องกับระบบบริหารงานคุณภาพ ISO 9001: 2015

บทนำ

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง เป็นห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุข มีบทบาทในการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ และให้บริการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ เพื่อเฝ้าระวังและแก้ไขปัญหาสาธารณสุขในพื้นที่รับผิดชอบ⁽¹⁾ การให้บริการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์อย่างมีคุณภาพ ตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ISO 15189: 2012⁽²⁾ แก่ผู้รับบริการในพื้นที่รับผิดชอบ ให้ได้รับการบริการที่มีคุณภาพ ถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว เชื่อถือได้ และการพัฒนาระบบคุณภาพด้านความปลอดภัยในการปฏิบัติงานทางห้องปฏิบัติการให้เป็นไปตามกฎหมายและกฎระเบียบที่เกี่ยวข้องและสอดคล้องกับมาตรฐานสากล ISO 15190: 2003⁽³⁾ เป็นกระบวนการหนึ่งที่ใช้ในการพัฒนาห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ในการดำเนินการทดสอบความจำเป็นในการดูแลผู้ป่วย การสอบสวนโรค การควบคุมและป้องกัน รวมถึงความมั่นคงในด้านสุขภาพ การดำเนินตามมาตรฐาน ISO 15189: 2012 ด้านการบริหารจัดการ ด้านวิชาการ และด้านความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ มีคุณภาพและความสามารถในการทดสอบที่น่าเชื่อถือและมีคุณภาพอย่างต่อเนื่องตามหลักการของ ISO 9001: 2008 Quality management systems-Requirements ตามที่ระบุไว้ใน Joint IAF-APLAC-ISO Communiqué 2008 และมีคุณภาพตามมาตรฐานสากลด้านความปลอดภัย ISO 15190: 2003 ดำเนินการได้ครบถ้วนตามข้อกำหนด⁽⁴⁾ มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการยื่นขอรับรองมาตรฐาน ISO 15189: 2012

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง ได้ผ่านการรับรองตามมาตรฐาน ISO 15189: 2007⁽⁵⁾ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550 ต่อมา International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) มีมาตรฐานฉบับแก้ไขล่าสุดคือ ISO 15189: 2012⁽²⁾ ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิก กลุ่มชั้นสูตรสาธารณสุขจึงได้ดำเนินการให้สอดคล้องกับฉบับปัจจุบัน โดยการศึกษาข้อกำหนดที่เพิ่มจาก ISO 15189: 2007⁽⁵⁾ ดำเนินการตามข้อกำหนดที่เพิ่มขึ้นด้านการจัดการและด้านวิชาการ รวมทั้งข้อกำหนดด้านความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ ISO 15190: 2003⁽⁶⁾ เพื่อเพิ่มขีดความสามารถและความพร้อมของห้องปฏิบัติการและสร้างความเชื่อมั่นแก่ลูกค้า

วิธีการศึกษา

ศึกษาวิจัยเชิงพรรณนาโดยใช้วิธีวิเคราะห์ข้อมูลทุติยภูมิ (Secondary data) ผลจากการสำรวจรักษาความสามารถของห้องปฏิบัติการของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง ตามข้อกำหนดมาตรฐาน ISO 15189: 2007⁽⁵⁾ เปรียบเทียบกับข้อกำหนดมาตรฐาน ISO 15189: 2012⁽²⁾ วิเคราะห์ข้อมูลตามข้อกำหนดที่ต้องทำเพิ่ม โดยการประเมินตนเองจาก Gap Analysis of ISO 15189: 2012 and ISO 15189: 2007⁽⁷⁾ และข้อกำหนดด้านความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ ISO 15190: 2003⁽⁶⁾ ดำเนินการประเมินตนเองตามข้อกำหนดที่เพิ่มขึ้น และเตรียมความพร้อมข้อกำหนดที่ยังไม่มี เพื่อรับการตรวจประเมินตามข้อกำหนดมาตรฐาน ISO 15189: 2012

ผล

ผลการศึกษาตามข้อกำหนดมาตรฐาน ISO 15189: 2012 วิเคราะห์ข้อมูลตามข้อกำหนดที่ต้องดำเนินการเพิ่มเติม โดยการประเมินตนเองจากเอกสาร Gap Analysis of ISO 15189: 2012 and ISO 15189: 2007 และข้อกำหนดด้านความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ ISO 15190: 2003 พบว่าตามมาตรฐาน ISO 15189: 2012 ข้อกำหนดด้านการบริหารจัดการ จำนวน 13 ข้อ ห้องปฏิบัติการฯ ยังไม่ได้ดำเนินการจำนวน 3 ข้อ ข้อกำหนดด้านวิชาการ จำนวน 28 ข้อ ห้องปฏิบัติการฯ ยังไม่ได้ดำเนินการจำนวน 2 ข้อ และข้อกำหนดด้านความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ

ISO 15190: 2003 จำนวน 65 ข้อ ห้องปฏิบัติการฯ ยังไม่ได้ดำเนินการ จำนวน 6 ข้อ (ภาพที่ 1) ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิกจึงได้ร่วมมือกับผู้จัดการคุณภาพของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง เพื่อดำเนินการจัดทำเอกสาร/จัดทาสตูดอุปกรณ์เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานดังกล่าวข้างต้น ดังนี้

ข้อกำหนดด้านระบบบริหารจัดการตามมาตรฐาน ISO 15189: 2012 ได้ดำเนินการเพิ่มเติม ดังนี้

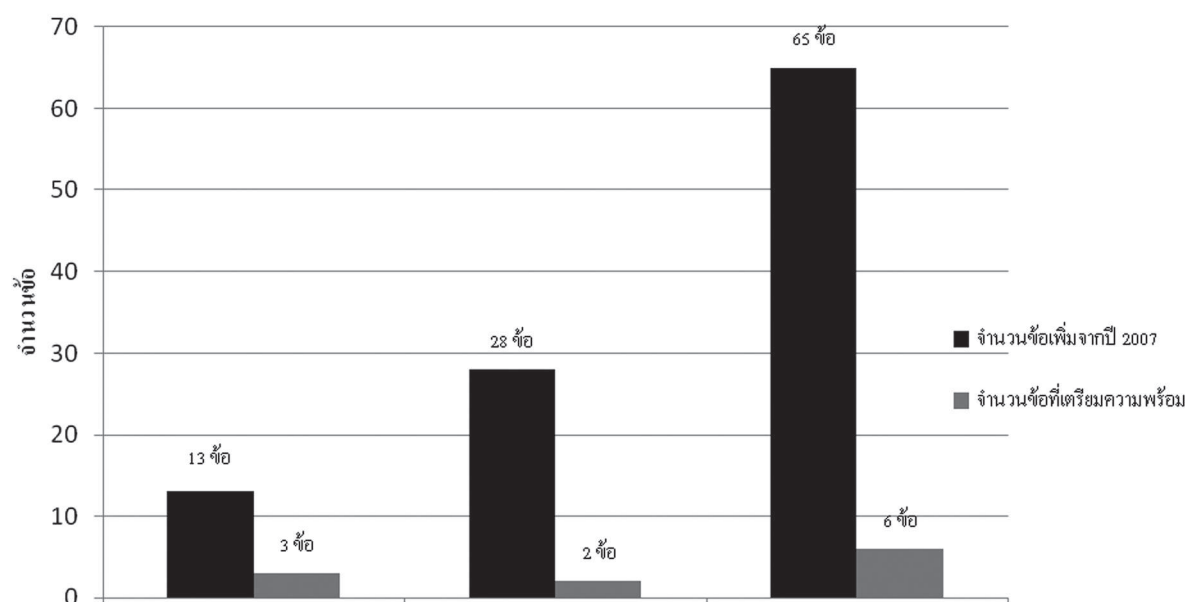
- 1) ข้อกำหนดที่ 4.14.7 โดยเพิ่มการกำหนดตัวชี้วัดคุณภาพ ได้แก่ ระดับความพึงพอใจของผู้รับบริการ มากกว่าร้อยละ 85 การส่งมอบรายงานผลการทดสอบมีความถูกต้อง ร้อยละ 100 และระยะเวลาแล้วเสร็จของงานตามเวลาที่กำหนด ไม่น้อยกว่าร้อยละ 96 ซึ่งผลการทบทวนระบบบริหารของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง ปีงบประมาณ 2557 ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิกสามารถดำเนินงานได้ตามตัวชี้วัดที่กำหนด ได้แก่ ระดับความพึงพอใจของผู้รับบริการ ร้อยละ 89.25 รายงานผลการทดสอบมีความถูกต้อง ร้อยละ 100 และระยะเวลาแล้วเสร็จของงาน ร้อยละ 99.20
- 2) ข้อกำหนดที่ 4.14.6 ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิกได้จัดทำแผนบริหารความเสี่ยงกระบวนการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ และสามารถดำเนินการตามแนวทางจัดการความเสี่ยงดังกล่าวได้ตามแผนทุกกิจกรรม
- 3) ข้อกำหนดที่ 4.2.1 ได้ทำการปรับปรุงแบบประเมินความพึงพอใจของผู้รับบริการทั้งภายในและภายนอกให้เป็นรูปแบบเดียวกัน โดยรายละเอียดแบบประเมินฯ ประกอบด้วย ความไม่พึงพอใจ ข้อเสนอแนะ และสิ่งที่ประทับใจ ทำให้แต่ละห้องปฏิบัติการมีรูปแบบการประเมินแบบเดียวกัน และมีการนำข้อเสนอแนะของลูกค้ามาทำแผนปรับปรุงในปีงบประมาณต่อไป

ข้อกำหนดด้านวิชาการตามมาตรฐาน ISO 15189: 2012 ได้ดำเนินการเพิ่มเติม ดังนี้

- 1) ข้อกำหนดที่ 5.5.1.2 ได้ดำเนินการเก็บข้อมูลผู้ป่วยเพื่อเป็นข้อมูลทางวิชาการในการสื่อสารความเสี่ยง ให้นักวิเคราะห์ทบทวนวิธีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ รวมถึงพิจารณาข้อมูลและอาการของผู้ป่วยว่าสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์หรือไม่ และบันทึกตัวอย่างที่ไม่สอดคล้องลงในข้อมูลแต่ละรายการวิเคราะห์ ผลการดำเนินการทำให้นักวิเคราะห์มีความเชื่อมั่นผลการทดสอบมากขึ้น
- 2) ข้อกำหนดที่ 5.5.1.4 เพิ่มการตรวจสอบองค์ประกอบการวัด ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ที่ใช้รายงานค่าปริมาณที่วัดได้ (ความไม่แน่นอนในการวัด) สำหรับการวิเคราะห์ *Legionella* spp. มีการใช้สถิติในการคำนวณข้อมูลที่ได้จากการวัด ทำให้ผลมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น (ตารางที่ 1)

ข้อกำหนดด้านความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ ISO 15190: 2003 ได้ดำเนินการเพิ่มเติม ดังนี้

- 1) ข้อกำหนดที่ 7.2(h) ได้จัดทำเอกสารข้อมูลความปลอดภัยของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย และสารเคมี (Material Safety Data Sheets: MSDS)
- 2) ข้อกำหนดที่ 8 ได้จัดหาเครื่องหมายแสดงสัญลักษณ์เตือนอันตราย (Biological Hazard) มีการควบคุมการเข้า-ออก และการเข้าถึงตัวอย่างเชื้อโรค รวมถึงการจัดทาสตูดอุปกรณ์ที่จำเป็น เช่น ถังขยะติดเชื้อสำหรับใส่ถุงแดง ตู้เย็นเก็บเชื้อ และกล่องสำหรับขนส่งตัวอย่าง เป็นต้น
- 3) ข้อกำหนดที่ 12.5 จัดหา รองเท้าชนิดปลายปิดสำหรับใส่ในห้องปฏิบัติการครอบคลุมทุกห้องปฏิบัติการ
- 4) ข้อกำหนดที่ 12.10 ติดตั้งอุปกรณ์ ชุดล้างตัว และล้างตาฉุกเฉิน พร้อมทั้งได้ชี้แจงให้เจ้าหน้าที่ของศูนย์ฯ รับทราบวิธีการใช้
- 5) ข้อกำหนดที่ 19.3 ติดตั้ง สัญญาณเตือนอัคคีภัย (Smoke detector) ครอบคลุมทุกห้องปฏิบัติการ และ
- 6) ข้อกำหนดที่ 22 นอกจากมีการตรวจสอบประสิทธิภาพการทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งทำลายเชื้อแล้ว ห้องปฏิบัติการฯ ได้เพิ่มการทดสอบประสิทธิภาพการทำให้ปลอดเชื้อในขยะติดเชื้อ (ถุงแดง) เพื่อให้มีความมั่นใจในการทำลายขยะติดเชื้อ ผลการดำเนินงานการเตรียมความพร้อมตามข้อกำหนดด้านความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ ISO 15190: 2003 (ตารางที่ 2) ทำให้ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง มีคู่มือความปลอดภัยขององค์กร มีเอกสารข้อมูลความปลอดภัยของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย และสารเคมีครอบคลุมทั้งองค์กร มีอุปกรณ์ป้องกันความปลอดภัยครอบคลุมทุกห้องปฏิบัติการ นอกจากนั้นมีการแผนการอบรมด้านความปลอดภัยรวมถึงการซ้อมแผนภัยพิบัติต่าง ๆ



ISO 15189 ข้อกำหนดด้านบริหารจัดการ ISO 15189 ข้อกำหนดด้านวิชาการ ISO 15190-2003 ข้อกำหนดด้านความปลอดภัย

ภาพที่ 1 จำนวนข้อกำหนดใหม่ตามมาตรฐาน ISO 15189: 2012 และจำนวนข้อกำหนดที่ห้องปฏิบัติการได้เตรียมความพร้อม

ตารางที่ 1 การประเมินตนเองจาก Gap Analysis of ISO 15189: 2012 and ISO 15189: 2007 ข้อกำหนดด้านการบริหารจัดการ และข้อกำหนดด้านวิชาการ

ข้อกำหนดในการบริหารจัดการ (ข้อ 4) เพิ่มจาก ISO 15189: 2007

ข้อ	หลักฐานเชิงประจักษ์	ประเมินตนเอง	วิธีดำเนินการของห้องปฏิบัติการ
4.1.1.4	มีหนังสือแต่งตั้งมอบอำนาจหน้าที่ และผู้รับมอบมีคุณสมบัติและความสามารถตรง	Y	
4.1.2.2	มีหลักฐานความพึงพอใจของผู้รับบริการ ดำเนินการเพื่อตอบสนองความต้องการ	N	มีแบบประเมินความพึงพอใจของผู้รับบริการ 2 แบบ ปรับปรุงให้เป็นรูปแบบเดียวกัน
4.1.2.4	กำหนดวัตถุประสงค์คุณภาพที่วัดได้ และสอดคล้องกับนโยบายคุณภาพ	Y	
4.1.2.5	มีหลักฐานการมอบหมายความรับผิดชอบ อำนาจหน้าที่และความสัมพันธ์ของบุคลากรทุกคนในห้องปฏิบัติการ	Y	
4.1.2.6	มีระบบการสื่อสารในห้องปฏิบัติการและผู้รับบริการ	Y	
4.12	มีการทบทวนปรับปรุงอย่างต่อเนื่องในกิจกรรมบนพื้นฐานของความเสี่ยง	Y	
4.13	มีระบบควบคุมการบันทึกคุณภาพและวิชาการครบถ้วน ตั้งแต่การบ่งชี้จนถึงการกำจัด	Y	

ตารางที่ 1 การประเมินตนเองจาก Gap Analysis of ISO 15189: 2012 and ISO 15189: 2007 ข้อกำหนดด้านการบริหารจัดการ และข้อกำหนดด้านวิชาการ (ต่อ)

ข้อกำหนดในการบริหารจัดการ (ข้อ 4) เพิ่มจาก ISO 15189: 2007

ข้อ	หลักฐานเชิงประจักษ์	ประเมินตนเอง	วิธีดำเนินการของห้องปฏิบัติการ
4.14.3	มีแผนและผลการประเมินความพึงพอใจของผู้รับบริการ และมีมาตรการรักษาความลับ บันทึกข้อเสนอแนะที่ได้จากผู้รับบริการ	Y	
4.14.4	มีช่องทางรับความคิดเห็นจากพนักงาน เกือบและรักษานันทิกความเห็น มีมาตรการดำเนินการ	Y	
4.14.5	ผู้ตรวจติดตามเป็นอิสระ ไม่ตรวจงานตนเอง มีกระบวนการเพียงธรรมและยุติธรรม	Y	
4.14.6	มีแผนบริหารความเสี่ยงกระบวนการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ	N	จัดทำแผนบริหารความเสี่ยงกระบวนการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ
4.14.7	มีตัวชี้วัดคุณภาพ ตามข้อกำหนด 4.14.7 ISO 15189: 2012	N	กำหนดตัวชี้วัดคุณภาพตามมาตรฐาน
4.14.8	มีการตรวจติดตามจากองค์กรภายนอก และมีมาตรการแก้ไขทันที ป้องกัน สิ่งที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนด	Y	

ข้อกำหนดด้านวิชาการ (ข้อ 5) เพิ่มจาก ISO 15189: 2007

ข้อ	หลักฐานเชิงประจักษ์	ประเมินตนเอง	วิธีดำเนินการของห้องปฏิบัติการ
5.1.2	มีเอกสารระบุคุณสมบัติสำหรับบุคลากรแต่ละตำแหน่ง	Y	
5.1.4	มีบันทึกการแนะนำพนักงานใหม่ ข้อกำหนดต่าง ๆ เงื่อนไขการจ้าง ความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ บันทึกการสอนงาน	Y	
5.1.5	มีการทบทวนโปรแกรมการฝึกอบรมเป็นระยะ ๆ	Y	
5.1.7	มีการทบทวนการปฏิบัติงานนอกเหนือจากความสามารถทางเทคนิค มีการทบทวนความต้องการของบุคลากร	Y	
5.1.8	มีแผนการศึกษาอย่างต่อเนื่อง และการพัฒนาวิชาชีพ และได้รับการทบทวนเป็นระยะ ๆ	Y	
5.2.4	มีสิ่งอำนวยความสะดวกสำหรับพนักงาน เช่น น้ำดื่ม ที่ล้างตัว ที่เก็บอุปกรณ์ป้องกัน	Y	
5.2.5	มีพื้นที่แยกจากกันในการรับ/รอคอย และแยกเก็บตัวอย่าง	Y	
5.3.1.4	มีการสอบเทียบเครื่องมือและตรวจสอบย้อนกลับทางมาตรวิทยา	Y	
5.3.2.2	มีการรับ เบิกจ่าย น้ำยาและวัสดุสิ้นเปลือง มีตู้เก็บน้ำยาตามข้อกำหนดของผู้ผลิต	Y	
5.3.2.4	มีโปรแกรมจัดการวัสดุ น้ำยา อาหารเลี้ยงเชื้อ คงเหลือ และบันทึกการตรวจสอบก่อนใช้งาน	Y	
5.3.2.5	มีเอกสารการใช้น้ำยาและวัสดุสิ้นเปลือง พร้อมใช้ ณ จุดใช้งาน	Y	

ตารางที่ 1 การประเมินตนเองจาก Gap Analysis of ISO 15189: 2012 and ISO 15189: 2007 ข้อกำหนดด้านการบริหารจัดการ และข้อกำหนดด้านวิชาการ (ต่อ)

ข้อกำหนดในการบริหารจัดการ (ข้อ 4) เพิ่มจาก ISO 15189: 2007

ข้อ	หลักฐานเชิงประจักษ์	ประเมินตนเอง	วิธีดำเนินการของห้องปฏิบัติการ
5.3.2.6	มีการบันทึกรีเอเจนต์และอุปกรณ์สิ้นเปลืองที่ก่อให้เกิดประสิทธิภาพการทดสอบ	Y	
5.3.2.7	มีการบันทึกยี่ห้อ วันที่ผลิต วันหมดอายุ สภาพเมื่อได้รับการทดสอบคุณภาพก่อนใช้งาน	Y	
5.4.4.1	การเก็บตัวอย่างปฐมภูมิและการจัดการ	NA	
5.4.4.3 (d)	มีคำแนะนำสำหรับการเก็บตัวอย่าง และเงื่อนไขการส่งตัวอย่าง	Y	
5.5.1.2	มีการทวนสอบขั้นตอนการทดสอบ	N	การทบทวนวิธีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ว่ายังเหมาะสม, ตอบสนองความต้องการผู้รับบริการหรือไม่
5.5.1.4	การตรวจสอบองค์ประกอบการวัด ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ที่ใช้รายงานค่าปริมาณที่วัดได้ (ความไม่แน่นอนในการวัด)	N	เพิ่มความไม่แน่นอนในการวัดจากค่าเชิงปริมาณ รายการวิเคราะห์ <i>Legionella</i> spp.
5.5.3	มีหลักฐานแสดงการเปลี่ยนขั้นตอนการทดสอบ และอธิบายให้ผู้รับบริการทราบหลังจากขั้นตอนนั้นได้ตรวจสอบความถูกต้องแล้ว	Y	
5.6.1	มีการปฏิบัติตามคู่มือการตรวจวิเคราะห์ทุกรายการ ไม่มีการตกแต่งข้อมูล	Y	
5.6.2.2	มีบันทึกผลการตรวจสอบสภาพของวัสดุคุณภาพจากผู้ผลิตเครื่องมือ และผู้ผลิตอื่น	Y	
5.6.2.3	มีข้อมูลการบันทึกควบคุมคุณภาพทุกครั้งในการทดสอบ	Y	
5.6.3.1	มีการเข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญทุกรายการทดสอบ	Y	
5.6.3.2	มีการวิเคราะห์ตัวอย่างเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ	Y	
5.6.3.3	มีการประเมิน วิเคราะห์ผล การทดสอบความชำนาญ และวิเคราะห์หาสาเหตุโดยผู้ปฏิบัติงาน	Y	
5.7.1	มีการทบทวนผลหลังการทดสอบ ประเมินผลกับการควบคุมคุณภาพภายใน	Y	
5.7.2	มีการบันทึกการเก็บรักษาตัวอย่าง ระบุสถานะ และระยะเวลาที่เก็บ	Y	
5.8.3	มีการระบุอัตลักษณ์ผู้ป่วย สถานที่ผู้ป่วยในแต่ละหน้า การระบุอัตลักษณ์ของการทดสอบดำเนินการโดยห้องปฏิบัติการตรวจเพิ่มเติม	Y	
5.9.2	มีการเลือกผลและรายงานโดยอัตโนมัติจากเครื่องมือ	NA	

หมายเหตุ

ในช่อง Y/N โปรดระบุคำตอบที่ห้องปฏิบัติการปฏิบัติจริง

Y = มี หรือ ใช่
N = ไม่มี หรือ ไม่ใช่
NA = ไม่เกี่ยวข้อง

ตารางที่ 2 ผลจากการประเมินตนเอง วิเคราะห์ความพร้อมของห้องปฏิบัติการตามข้อกำหนดมาตรฐาน ISO 15190: 2003

ข้อ	หลักฐานเชิงประจักษ์	ประเมินตนเอง	วิธีดำเนินการของห้องปฏิบัติการ
4	การจำแนกกลุ่มเสี่ยงของเชื้อออกเป็น 4 กลุ่ม	Y	
5. ข้อกำหนดด้านการจัดการ			
5.1	ผู้บริหารต้องมีความรับผิดชอบต่อความปลอดภัยของพนักงานทั้งหมด และผู้เข้าชมห้องปฏิบัติการ	Y	
5.2	พนักงานทุกคนมีการอบรมด้านความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการปฏิบัติงาน และมีประวัติการฉีดวัคซีน	Y	
6. การออกแบบเพื่อความปลอดภัย			
6.1, 6.2	ข้อกำหนดด้านการออกแบบโครงสร้างอาคาร	Y	
6.3 เงื่อนไขทางกายภาพ			
6.3.1, 6.3.2, 6.3.3, 6.3.4	มีแสงสว่าง อุณหภูมิ การระบายอากาศ เสียง อยู่ในระดับที่เหมาะสมสำหรับการทำงานที่ปลอดภัย	Y	
6.3.5, 6.3.6, 6.3.7 และ 6.3.8	มีปัจจัยที่เอื้อกับการทำงาน การออกแบบสำหรับการทำงานกับเชื้อโรคที่ยังเป็นอยู่ ป้ายสัญญาณประตู การรักษาความมั่นคงในห้องปฏิบัติการ	Y	
7. ขั้นตอนการจัดทำเอกสาร การตรวจสอบ และการบันทึก			
7.1, 7.2, 7.3, 7.3.2	ขั้นตอนและการตรวจสอบโปรแกรมความปลอดภัย	Y	
7.2 h	มีเอกสารข้อมูลความปลอดภัย (MSDS) สำหรับวัสดุที่ใช้	N	จัดทำเอกสารข้อมูลความปลอดภัย (MSDS) สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ
7.4	คู่มือความปลอดภัย	Y	
7.5 การบันทึก			
7.5.1, 7.5.2, 7.5.3 และ 7.5.4	การบันทึกการการได้รับบาดเจ็บ ประเมินความเสี่ยงของเสียอันตราย	Y	
8.	มีสัญลักษณ์เตือนการระบุพื้นที่อันตราย และของอันตราย	N	มีเครื่องหมายแสดงถึงสัญลักษณ์เตือนอันตราย Biological Hazard การควบคุมการเข้า-ออก และการเข้าถึงตัวอย่างเชื้อโรค

ตารางที่ 2 ผลจากการประเมินตนเอง วิเคราะห์ความพร้อมของห้องปฏิบัติการตามข้อกำหนดมาตรฐาน ISO 15190: 2003 (ต่อ)

ข้อ	หลักฐานเชิงประจักษ์	ประเมินตนเอง	วิธีดำเนินการของห้องปฏิบัติการ
9.	มีแบบฟอร์มการบันทึกการรายงานเหตุการณ์จากกราดเจ็บ อุบัติเหตุ และความเจ็บป่วย	Y	
10.	เจ้าหน้าที่ผ่านการอบรมมาตรฐาน ISO 15190: 2003 และการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ รวมถึงการป้องกันไฟไหม้	Y	
11. ความรับผิดชอบของบุคลากร			
11.1 และ 11.2	มีสถานที่สำหรับเก็บอาหาร เครื่องดื่ม นอกห้องปฏิบัติการ ไม่สวมใส่เครื่องประดับในห้องปฏิบัติการ	Y	
11.3	เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกคนผ่านการฉีดวัคซีนไข้หวัดใหญ่ ตามฤดูกาล คอตีบ หัดเยอรมัน และไวรัสตับอักเสบบี	Y	
11.4	สมบัติส่วนบุคคลไม่ถูกนำไว้ในที่ที่มีการปนเปื้อน	Y	
11.5	การตกแต่งในงานประเพณีต่าง ๆ ต้องไม่ถูกนำมาใช้ในสถานที่ทำงาน	Y	
12. อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล (PPE)			
12.1 และ 12.2	มีเสื้อผ้าป้องกันที่เหมาะสมกับความเสี่ยงสำหรับผู้ปฏิบัติงาน และผู้เยี่ยมชมต้องถอดออกก่อนออกจากพื้นที่ทำงาน นอกห้องปฏิบัติการต้องสวมเสื้อคลุมที่สะอาดขณะทำงานกับผู้ป่วย	Y	
12.3 และ 12.4	มีอุปกรณ์ป้องกัน แว่นตา และถุงมือ	Y	
12.5	มีรองเท้าปลายปิด	N	จัดหารองเท้าชนิดปลายปิด
12.6	มีการป้องกันระบบหายใจ (เครื่องช่วยหายใจ)	NA	
12.7	มีการล้างมือเมื่อสัมผัสผิวเชื้อ และหลังจากถอดถุงมือ มีน้ำยาล้างมือแบบไร้น้ำ ไว้ ณ จุดล้างมือ	Y	
12.8 และ 12.9	มีการฝึกอบรมการปฐมพยาบาล และมีกล่องปฐมพยาบาล อุปกรณ์ ยาสามัญประจำบ้าน คำแนะนำสำหรับการใช้งาน	Y	
12.10 และ 12.11	มีชุดล้างตัวและล้างตาฉุกเฉิน	N	จัดหาชุดล้างตัวและล้างตาฉุกเฉิน
13 และ 14	มีแนวปฏิบัติการรักษาความสะอาดด้านการทำงานที่ปลอดภัย ข้อกำหนดต่าง ๆ สำหรับงานทางจุลชีววิทยา	Y	
15 และ 16	มีตู้ความปลอดภัยทางจุลชีววิทยา และสารเคมี ใช้ภาชนะปิดฝา เมื่อมีการปั่นแยกตัวอย่าง	Y	
17.1, 17.2 และ 17.3	มีมาตรการกำจัดสารเคมีถูกต้องตามกฎหมาย มีขั้นตอนการเก็บ และดูแลสารเคมี มีชุดล้างตัวและล้างตาในพื้นที่เสี่ยง	Y	
18.1, 18.2 และ 18.3	การป้องกันอันตรายจากรังสี	Y	

ตารางที่ 2 ผลจากการประเมินตนเอง วิเคราะห์ความพร้อมของห้องปฏิบัติการตามข้อกำหนด มาตรฐาน ISO 15190: 2003 (ต่อ)

ข้อ	หลักฐานเชิงประจักษ์	ประเมินตนเอง	วิธีดำเนินการของห้องปฏิบัติการ
18.4 และ 18.5	มีการตรวจสอบอุปกรณ์ไมโครเวฟ และมีการป้องกันที่เหมาะสมในการเปิดหลอดยิวมาเชื้อ	Y	
19	มีการซ่อมแผนอะคิภัยทุกปี มีทางหนีไฟ มีอุปกรณ์ดับไฟ มีการเก็บสารไวไฟ ปฏิบัติตามมาตรฐานแห่งชาติ	Y	
19.3	มีระบบเตือนภัยอัตโนมัติในการตรวจจับควัน ความร้อน ติดตั้งสัญญาณเตือนอะคิภัย (Smoke detector)	N	
20	มีการซ่อมแผนอพยพฉุกเฉิน	Y	
21.	มีการให้ความรู้วงจรไฟฟ้าในอาคาร และฝึกอบรมการใช้อุปกรณ์ไฟฟ้า	Y	
22.	มีภาชนะบรรจุในการขนส่งตัวอย่าง การกำจัดขยะติดเชื้อ	N	เพิ่มสัญลักษณ์เตือนอันตราย Biological Hazard ภาชนะขนส่งตัวอย่าง และมีการทดสอบประสิทธิภาพการทำให้ปลอดเชื้อในขยะติดเชื้อ ถูกลง

หมายเหตุ

ในช่อง Y/N โปรดระบุคำตอบที่ห้องปฏิบัติการปฏิบัติจริง

Y = มี หรือ ใช่

N = ไม่มี หรือ ไม่ใช่

NA = ไม่เกี่ยวข้อง

วิจารณ์

การเตรียมความพร้อมในการรองรับความสามารถห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ตามมาตรฐาน ISO 15189: 2012 ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิก ร่วมกับกลุ่มพัฒนาคุณภาพและวิชาการ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง ได้ศึกษาจากข้อกำหนดที่เพิ่มขึ้นจากมาตรฐาน ISO 15189: 2007 ดำเนินการเตรียมความพร้อมข้อกำหนดที่ยังไม่ได้ดำเนินการ ด้านระบบบริหารจัดการ การจัดทำแผนบริหารความเสี่ยง กระบวนการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิก โดยการนำปัจจัยการวิเคราะห์ ดังนี้คือ 4 M วัตถุประสงค์คุณภาพ ISO 9001: 2008 ความเชื่อมโยง เกณฑ์คุณภาพการบริหารจัดการภาครัฐ (PMQA) หมวด 2 และหมวด 6 ตัวชี้วัดคุณภาพ ISO 15189: 2012 มาระบุความเสี่ยง ตามมิติธรรมาภิบาล 10 องค์ประกอบ ตามมาตรฐาน COSO (The Committee of Sponsoring Organizations of the Treadway Commission) ผลการจัดทำแผนบริหารความเสี่ยงสามารถเชื่อมโยง ISO 9001: 2015 และ PMQA หมวด 2 (SP7) นอกจากนั้นยังนำข้อมูลไปจัดทำแผนปฏิบัติการป้องกันและแผนปรับปรุงระบบคุณภาพ ปี 2558 ปรับปรุงและออกแบบกระบวนการสร้างคุณค่า PMQA หมวด 6 ในปี 2559 ต่อไป และได้ประชุมทบทวนบริหารจัดการ (Management review) กำหนดตัวชี้วัดคุณภาพ ISO 15189: 2012 ข้อกำหนดทางด้านวิชาการ รายการวิเคราะห์ การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Legionella* spp. จากแหล่งน้ำ ซึ่งไม่มีการทำองค์ประกอบความไม่แน่นอนในกระบวนการวัด ตามมาตรฐาน ISO 15189: 2007 ไม่มีข้อกำหนดนี้ แต่ใน ISO 15189: 2012 มีการกล่าวถึงองค์ประกอบความไม่แน่นอนในกระบวนการวัด ห้องปฏิบัติการพยาธิฯ จึงได้คำนวณความไม่แน่นอนในการวัดจากค่าเชิงปริมาณ การเปิดตัวอย่าง การทดสอบโคลนนิ่งของเชื้อ การนับโคลน และการคำนวณค่า dilution

factor เพิ่มเติมหลังจากวิเคราะห์ การเตรียมความพร้อมการขอรับรองตามมาตรฐาน ISO 15190: 2003 ด้านความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ การจัดหาอุปกรณ์ด้านความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ ISO 15190: 2003 เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการได้รับรองความสามารถทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอยู่ในแผนพัฒนาองค์การ PMQA หมวด 6 ประจำปีงบประมาณ 2557 ห้องปฏิบัติการจึงได้ติดตามผลการดำเนินงานตามแผน

ผลจากการเตรียมความพร้อมเมื่อได้รับการตรวจประเมินจากหน่วยรับรองแล้ว ทางห้องปฏิบัติการก็ยังพบข้อบกพร่องนอกเหนือจากการเตรียมความพร้อม ส่วนใหญ่จะเป็นข้อบกพร่องด้านวิชาการตามมาตรฐาน ISO 15189 จึงได้แก้ไขข้อบกพร่องภายในระยะเวลาที่กำหนด จนได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO 15189: 2012 สำนักจากมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

สรุป

การเตรียมความพร้อมเพื่อขอรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐาน ISO 15189: 2012 ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง ใน ปี พ.ศ. 2557 ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ใช้เป็นแนวทางในการเตรียมความพร้อมในการขอรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิก กลุ่มชั้นสูตรสาธิตสุข ครอบคลุมตามข้อกำหนดด้านบริหารจัดการ และด้านวิชาการ รวมถึงข้อกำหนดด้านความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ ISO 15190: 2003 และความสามารถในการทดสอบที่น่าเชื่อถือและมีคุณภาพอย่างต่อเนื่อง ตามหลักการของ ISO 9001: 2008 การจัดทำแผนบริหารความเสี่ยงเตรียมความพร้อมในการขอรับรองมาตรฐาน ISO 15189: 2012 และระบบบริหารงานคุณภาพ ISO 9001:2015

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ดร.กัลยา อนุลักขณาปกรณ์ ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง ที่ให้ความสำคัญในเรื่องการเตรียมความพร้อมเพื่อขอรับรองตามมาตรฐาน ISO 15189: 2012 สนับสนุนทั้งทรัพยากรและแนวคิด ตลอดจนเป็นที่ปรึกษาในการดำเนินงาน และบุคลากรของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง ที่ได้ให้ความร่วมมือในการดำเนินงานตามมาตรฐาน ISO 15189: 2012

เอกสารอ้างอิง

1. กฎกระทรวงแบ่งส่วนราชการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2552. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 126, ตอนที่ 98 ก. (ลงวันที่ 28 ธันวาคม 2552).
2. ISO 15189: 2012. Medical laboratories -- requirements for quality and competence. Geneva, Switzerland: ISO; 2012.
3. ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง. คู่มือคุณภาพ รหัส QM 39-01 แก้ไขครั้งที่ 10 ปี พ.ศ. 2557. ตรัง : ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2557.
4. สุธน วงษ์ชีรี, บรรณาธิการ. สธ 15189 : 2556 มาตรฐานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ข้อกำหนดด้วยคุณภาพและความสามารถของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์. นนทบุรี : สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2557.
5. ISO 15189: 2007. Medical laboratories -- particular requirements for quality and competence. Geneva, Switzerland: ISO; 2007.
6. ISO 15190: 2003. Medical laboratories – requirements for safety. Geneva, Switzerland: ISO; 2003.
7. Gap analysis of ISO 15189: 2012 and ISO 15189: 2007 in the field of medical testing. Australia: NATA; 2013.

Preparation for Laboratory Accreditation of Public Health Laboratory According to ISO 15189: 2012 of the Regional Medical Sciences Center 12/1 Trang

Supaporn Niyomkaew and Thanchanok Pitak

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

ABSTRACT: Preparation for medical laboratory accreditation according to ISO 15189: 2012 to increase the capacity and availability of laboratories for build the confidence to customers by studying specifications and proceed new requirements for quality management and technical management. Including laboratory safety requirements ISO 15190: 2003 provides a comprehensive ISO 15189: 2012 by studying the requirements increased from year 2007, as follows: quality management number of 13 items, technical management number of 28 items, and study the laboratory safety requirements ISO 15190:2003 number of 65 items. The regional medical sciences center 12/1 Trang has analyzed the requirements to improve of the clinical pathology laboratory. Firstly, the maximum of quality management consisted of 3 items representing 23.07 per cent, by increasing the quality indicators ISO 15189: 2012 in the quality manual for work processes of risk management procedures, and has improved the assessment of satisfaction as the same pattern. Secondly, it is the laboratory safety, mainly to supply security equipment in the laboratory number of 6 items representing 9.23 per cent. Finally, it is technical management number of 2 items representing 7.14 per cent by reviewing the test methods in accordance with the patient's condition, and increase the measurement uncertainty of analysis with statistical data. The data from this study were used to prepare the ability certifies medical laboratory standard ISO 15189: 2012 of the regional medical sciences center 12/1 Trang and cover according to requirements of quality management, and technical management includes the requirements of ISO 15190: 2003. Therefore, the regional medical sciences center 12/1 Trang certified ISO 15189: 2012 has a laboratory safety manual, and a risk management plan that complies with the quality management system ISO 9001: 2015.

Key words: laboratory accreditation, ISO 15189: 2007, ISO 15189: 2012, ISO 15190: 2003, ISO 9001: 2015

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.dmsh.moph.go.th