

วารสาร



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 57 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2558 Vol. 57 No. 3 July - September 2015

ISSN 0125-684X

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยและแลกเปลี่ยนความรู้ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ ที่ปรึกษาด้านบริหาร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นพ.อภิชัย มงคล พญ.วารุณี จินารัตน์	นางจุรีภรณ์ บุญยวงศ์โรจน์ 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.อุษาวดี 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 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2558

Vol. 57 No. 3 July - September 2015

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การศึกษาปริมาณ บีสฟีนอล เอ ฟีนอล และพี-ที-บิวทิลฟีนอล ที่แพร่ออกมาจากขวดนม และภาชนะบรรจุอาหารสำหรับเด็กชนิดพอลิคาร์บอเนตที่สภาวะต่าง ๆ
อุมา บริบูรณ์ ศศิธร หอมดำรงวงศ์ และภัสสริน สายสุวรรณ 205
- การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์และการลดปริมาณสารรมเมทิลโบรไมด์ในรูปของโบรไมด์อนินทรีย์ทั้งหมดในข้าวสารโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี
วีรุฒิ วิทยานันท์ และวิชาดา จงมีวาสนา 219
- สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนเพื่อใช้เป็นไวรัสอ้างอิงสำหรับการประเมินค่าความแรงของวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยว
ณัฐกานต์ มิ่งงามทรัพย์ สุกัลยาณี ไชยมี ภูริต ทรงธนินิตย์ และสุภาพร ภูมิอมร 233
- การถ่ายโอนและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพรดนิโซโลนในยาเม็ดโดยวิธี UPLC
สุภาวดี สุรางค์กุล สิริลักษณ์ สายหล่อ และสมศักดิ์ สุนทรพาณิชย์ 243
- วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารไล่แมลงโดยวิธี HPLC
วงเดือน นาคนิยม 257
- ความปลอดภัยทางจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภคที่จำหน่าย ณ สถานีขนส่งผู้โดยสารในเขตกรุงเทพมหานคร
กมลวรรณ กันแต่ง อัจฉรา อยู่คง และรัชฎาพร สุวรรณรัตน์ 269
- การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์และผลการสำรวจปริมาณสารไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ในเนื้อสัตว์ โดย LC-MS/MS
มาลี เจริญวิทย์วรกุล 279
- ปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันจากสารที่บ่งชี้ชนิดไม่แตกตัวเป็นประจุในผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์
ธีรพันธ์ บุตรแก้ว 293
- สรุปและวิเคราะห์สาเหตุที่แรงงานไทยถูกส่งกลับจากการตรวจโรคไม่ผ่านในต่างประเทศระหว่าง พ.ศ. 2554-2557
สุนัน วงษ์ชีรี สุศักดิ์ หมั่นพล อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์ พินิจ งามประสิทธิ์ มะลิวัลย์ หอมจัน พรหมภัสสร ดิษสระ เอกรินทร์ ทรัพย์มาก และชมใจไล ลินธุสาร 304

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

- การพัฒนาเทคนิคปฏิบัติในการวิเคราะห์หา Light Filth ในอาหาร
ทนงพันธ์ สัจจปาละ 313
- แนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพการทดสอบหา Light Filth
ทนงพันธ์ สัจจปาละ 321

CONTENTS

	Page
Original Articles	
A Study of the Migration of Bisphenol A, Phenol and P-tert-Butylphenol from Polycarbonate Child Utensils under Various Conditions	205
<i>Uma Boriboon Sasitorn Homdumrongvong and Passarin Saysuway</i>	
Method Development and Removal of Methyl Bromide Residue Determined as Total Inorganic Bromide in Rice by Gas Chromatographic Technique	219
<i>Weerawut Wittayanan and Wischada Jongmevasna</i>	
Optimal Conditions Propagation of Rotavirus Monovalent Vaccine Strain to use as a Referencerotavirus for Evaluation of Potency Values of Monovalent Rotavirus Vaccine	233
<i>Natthakarn Mingngamsup Sukanlayanee Chaimee Bhurit Songthanant and Supaporn Phumiamorn</i>	
UPLC Transfer and Method Validation of the Determination of Prednisolone Tablets	243
<i>Supawadee Surangkul Sirilak Sailo and Somsak Sunthornphanich</i>	
Simultaneous Determination of Insect Repellent by HPLC	257
<i>Wongduan Nakniyom</i>	
Microbiological Safety of Ready to Eat Foods Sold at Bus Terminals and Railway Station in Bangkok	269
<i>Kamonwan Kantaeng Atchara Ukhong and Ratchadaporn Suwannarat</i>	
Method validation and a Survey for Total Nitrofurantol Metabolites in Animal Tissues by LC-MS/MS	279
<i>Malee Jaroenvitvorakul</i>	
Acute Allergic-Like Reaction To Intravenous Non-ionic Iodinated Contrast Material In Patients Who Underwent Computed Tomography	293
<i>Teeraphan Bootphaew</i>	
Thailand Oversea Labors Returned from Disease Detected Abroad Between 2554-2557: Summarized and Analyzed for the Root Causes	304
<i>Suthon Vongsheree Surasak Muenphon Archawin Rojanawiwat and Pinit Ngamprasit Maliwan Homchan Prompussorn Dissara Aekkarin Submark and Chomchalai Sinthusarn</i>	
Laboratory Findings	
Practical Technique Development for Light Filth Determination in Foods	313
<i>Tanongpan Satjapala</i>	
Guidelines for Increasing the Efficiency of Light Filth Determination	321
<i>Tanongpan Satjapala</i>	



บทบรรณาธิการ



สวัสดีท่านผู้อ่านวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 57 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม-กันยายน 2558 ทุกท่าน จากฉบับที่ 2 จนถึงฉบับนี้ จะเห็นได้ว่าวารสารฯ ยังคงหนาแน่นและเต็มเปี่ยมไปด้วยบทความวิชาการ เนื่องจากมีผู้ให้ความสนใจที่จะลงตีพิมพ์ในวารสารฯ และหลังจากวารสารฉบับนี้ได้เผยแพร่แล้ว จะยังมีฉบับพิเศษตีพิมพ์ตามมาอีก

วารสารฯ ฉบับนี้แบ่งเป็น นิพนธ์ต้นฉบับ 9 เรื่อง และรายงานจากห้องปฏิบัติการ 2 เรื่อง ซึ่งทั้ง 11 เรื่องนี้เป็นที่น่าสนใจและชวนให้ติดตาม

ขอขอบพระคุณผู้ทบทวนบทความ (reviewer) ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่าตรวจแก้บทความเพื่อให้ได้ผลงานที่ดีลงตีพิมพ์ในวารสาร ขอขอบคุณผู้นิพนธ์ทุกท่านที่ส่งบทความลงเผยแพร่ และขอบคุณผู้ติดตามอ่านวารสารฯ ซึ่งวารสารฯ ยินดีที่จะได้รับข้อเสนอแนะจากทุกท่านเพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ต่อไป

ปราณี ขวลิตรำรง

การศึกษาปริมาณ บีสฟีนอล เอ ฟีนอล และ พี-ที-บิวทิลฟีนอล ที่แพร่ออกมาจากขวดนม และ ภาชนะบรรจุอาหารสำหรับเด็กชนิดพอลิคาร์บอเนต ที่สภาวะต่าง ๆ

อุมา บริบูรณ์ ศศิธร หอมดำรงวงศ์ และภัสสริน สายสุวรรณ

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ บีสฟีนอล เอ (BPA) จัดเป็นสารรบกวนการทำงานของฮอร์โมน (endocrine disruptor) จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า บีสฟีนอล เอ มีผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ พัฒนาการ และการเจริญเติบโต เนื่องจากในการผลิตพลาสติกชนิดพอลิคาร์บอเนต (PC) ที่ใช้ทำขวดนมมี บีสฟีนอล เอ เป็นสารเริ่มต้น ผู้บริโภคจึงมีความกังวลถึงผลกระทบต่อสุขภาพจากการได้รับบีสฟีนอล เอ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการแพร่ (migration) ของบีสฟีนอล เอ ฟีนอล และพี-ที-บิวทิลฟีนอล จากขวดนมและภาชนะบรรจุอาหารสำหรับเด็ก รวมทั้งศึกษาเปรียบเทียบการใช้งานซ้ำในสภาวะอุณหภูมิต่างๆ ดำเนินการในระหว่างปี พ.ศ. 2554 โดยสุ่มซื้อขวดนมและภาชนะบรรจุอาหารสำหรับเด็กจำนวน 32 ตัวอย่างที่วางจำหน่ายในกรุงเทพฯ และนนทบุรี ทดสอบการแพร่ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ใช้น้ำ และสารละลายกรดอะซิติกร้อยละ 4 โดยปริมาตร เป็นตัวแทนอาหาร (food simulants) เตรียมสารละลายตัวอย่างให้สะอาดและเข้มข้นโดยผ่าน solid-phase extraction (SPE) ตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC-FL ผลการศึกษาพบการแพร่ไปสู่ food simulants ของ บีสฟีนอล เอ และฟีนอล จากทุกตัวอย่าง ปริมาณรวมของสารทั้ง 3 ชนิดที่พบในน้ำ 0.73 - 2.54 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.41 ไมโครกรัมต่อลิตร และในสารละลายกรดอะซิติกร้อยละ 4 โดยปริมาตร พบ 0.72 - 3.68 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.58 ไมโครกรัมต่อลิตร ทั้ง 2 กรณีพบ พี-ที-บิวทิลฟีนอล ปริมาณน้อยกว่าบีสฟีนอล เอ และฟีนอล เมื่อศึกษาเปรียบเทียบการแพร่จำนวน 120 ครั้งในสภาวะอุณหภูมิต่างๆ จำลองจากการใช้งาน พบว่าที่สภาวะอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ใน autoclave มีการแพร่ของสารทั้ง 3 ชนิดมากกว่าที่สภาวะอื่น แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิและระยะเวลาที่สัมผัสมีผลต่อการแพร่ของสารมากกว่าปัจจัยอื่น อย่างไรก็ตามปริมาณสารที่พบทุกกรณีต่ำกว่าค่ากำหนด 2.5 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร (2,500 ไมโครกรัมต่อลิตร) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 295 (พ.ศ. 2548) มาก และปริมาณบีสฟีนอล เอ ที่พบก็ต่ำกว่าค่ามาตรฐาน 30 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามที่กำหนดในมาตรฐานสหภาพยุโรป EN 14350-2 (2004)

บทนำ

บิสฟีนอล เอ (Bisphenol A, BPA) สังเคราะห์มาจาก อะซิโตนกับฟีนอล (Phenol, PH) เป็นสารเริ่มต้นในการผลิต อีพอกซี-เรซิน ที่ใช้เคลือบกระป๋องบรรจุอาหารและพลาสติกหลายชนิด เช่น พอลิคาร์บอเนต พอลิเอสเทอร์ พอลิซิลิโคน พอลิอะคริเลต เป็นต้น บิสฟีนอล เอ มีโครงสร้างที่คล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน จัดเป็นสารในกลุ่ม endocrine disruptor ที่อาจรบกวนการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนได้⁽¹⁾ US EPA สรุปไว้ว่าจากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า บิสฟีนอล เอ มีผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ พัฒนาการ และการเจริญเติบโต ปริมาณบิสฟีนอล เอ ที่สะสมในร่างกายของมนุษย์และในสิ่งแวดล้อมพบว่าต่ำมากจนอาจจะไม่มีผลกระทบต่อสุขภาพ แต่อาจมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามผลกระทบที่เกิดจากการได้รับสารปริมาณน้อยยังไม่มีข้อสรุป⁽²⁾ พอลิคาร์บอเนต มีลักษณะใส แข็งแรง ตกไม่แตก ทนความร้อนสูงได้ นิยมใช้ทำภาชนะบรรจุอาหาร ขวดน้ำ ขวดนม และอุปกรณ์ต่างๆ จากความกังวลในอันตรายของ บิสฟีนอล เอ ทำให้หลายประเทศออกกฎหมายห้ามใช้สารนี้ในการผลิตขวดนมสำหรับเด็กและทารกไว้ก่อน เนื่องจากทารกตอบสนองต่อการได้รับ บิสฟีนอล เอ มากกว่าผู้ใหญ่ เพราะระบบต่างๆ กำลังพัฒนาและทารกไม่สามารถกำจัดสารออกไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ^(2, 3, 4) แคนาดาเป็นประเทศแรกที่ได้ประกาศห้ามจำหน่ายขวดนมที่มี บิสฟีนอล เอ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2552 เนื่องจากพบว่าสารนี้ เป็นสารเคมีอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม และสุขภาพของมนุษย์แม้ในปริมาณต่ำ⁽⁵⁾ คณะกรรมาธิการกิจการนโยบายสาธารณสุขและผู้บริโภคของสหภาพยุโรปประกาศห้ามผลิตและจำหน่ายขวดนมที่ทำจากพอลิคาร์บอเนตซึ่งมีบิสฟีนอล เอ ตั้งแต่วันที่ 1 มีนาคม 2554 ด้วยหลัก precautionary principle⁽⁶⁾ หลายประเทศในแต่ละภูมิภาค เช่น สหรัฐอเมริกาจำนวน 9 รัฐ จีน มาเลเซีย แอฟริกาใต้ เกาหลีใต้ และสหราชอาณาจักรได้ประกาศห้ามผลิตและจำหน่ายขวดนมที่ทำจากพอลิคาร์บอเนตซึ่งมีบิสฟีนอล เอ อีกหลายประเทศใช้มาตรการความร่วมมือโดยสมัครใจระหว่างรัฐบาลและผู้จำหน่ายในการทยอยเลิกใช้ขวดนมที่มี บิสฟีนอล เอ⁽⁷⁾ ขณะที่ FAO/WHO ยังไม่มีข้อสรุปในการกำหนดค่าความปลอดภัยหรือมาตรการในการควบคุมเนื่องจากพบว่ายังขาดข้อมูลการศึกษาในสัตว์ทดลองที่มีการประเมินความเสี่ยงอย่างถูกต้องและเหมาะสม⁽⁸⁾ ภายหลังการพิจารณาหลายครั้ง European Food Safety Authority (EFSA) ยังคงกำหนดปริมาณสูงสุดที่ยอมให้รับได้ต่อวัน (Tolerable Daily intake: TDI) เท่ากับ 0.05 mg/kg.bw/day⁽⁹⁾ แม้จากการศึกษาจะพบว่าการแพร่ (migration) ของบิสฟีนอล เอ ออกมาจากขวดนมที่ทำด้วยพอลิคาร์บอเนต อยู่ในเกณฑ์ที่ไม่เป็นอันตรายเมื่อเปรียบเทียบกับค่า TDI^(10, 11, 12) แต่อย่างไรก็ตามหลายหน่วยงานมีความเห็นว่าทารกและเด็กเล็ก ได้รับบิสฟีนอล เอ ซึ่งมาจากภาชนะบรรจุและลงไปสู่อาหารมากกว่าจากแหล่งอื่น^(2, 3) ดังนั้นหน่วยงานต่างๆ ที่กำกับดูแลด้านความปลอดภัยของผู้บริโภคยังคงติดตามและศึกษาวิจัยเกี่ยวกับแหล่งที่มา การได้รับสัมผัส และความเป็นพิษของบิสฟีนอล เอ ต่อไป

จากการศึกษาในประเทศญี่ปุ่นพบสารอื่นแพร่ออกมาจากขวดนม นอกจากบิสฟีนอล เอ คือ ฟีนอล และพี-ที-บิวทิลฟีนอล (p-tert-butylphenol, PTBP)⁽¹³⁾ ญี่ปุ่นจึงมีข้อกำหนดปริมาณการตกค้างของสารดังกล่าวรวมกันในพลาสติกชนิดพอลิคาร์บอเนตไว้ไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และปริมาณการแพร่ไม่เกิน 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร⁽¹⁴⁾ เช่นเดียวกับประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 295 (พ.ศ. 2548) เรื่อง กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของภาชนะบรรจุที่ทำจากพลาสติก⁽¹⁵⁾ ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการสำรวจวิจัยปริมาณ บิสฟีนอล เอ ที่รวมฟีนอล และพี-ที-บิวทิลฟีนอล จากผลิตภัณฑ์พอลิคาร์บอเนต ขณะที่ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 117 (พ.ศ. 2532) เรื่อง ขวดนม อนุญาตให้ใช้พอลิคาร์บอเนตผลิตขวดนมได้โดยไม่มีข้อกำหนดเกี่ยวกับบิสฟีนอล เอ⁽¹⁶⁾ อย่างไรก็ตามตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2554 หน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้พิจารณาในประเด็นเรื่องบิสฟีนอล เอ เพื่อทบทวนและปรับปรุงประกาศฉบับนี้ จึงได้ทำการวิจัยเพื่อศึกษาปริมาณ บิสฟีนอล เอ ฟีนอล และพี-ที-บิวทิลฟีนอล ที่แพร่จากขวดนมและ

ภาชนะบรรจุอาหารสำหรับเด็กซึ่งมีวางจำหน่ายในท้องตลาด ทำการศึกษาเฉพาะชนิดพอลิคาร์บอเนตเนื่องจากใช้ บีสฟีนอล เอ ในการผลิต โดยการตรวจยืนยันชนิดพลาสติกก่อนด้วย Infrared spectrum แล้วศึกษาการแพร่ของสาร ทั้ง 3 ชนิดตามที่กำหนดไว้ในประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 295 (พ.ศ. 2548)⁽¹⁵⁾ ให้ได้ข้อมูลการแพร่ของ บีสฟีนอล เอ และสารที่เกี่ยวข้องเพื่อยืนยันและสนับสนุนมาตรการควบคุมวัสดุที่ใช้ทำขวดนม ในการศึกษาตรวจวิเคราะห์ ปริมาณสารด้วย HPLC ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ทั่วไปและกำหนดไว้ในวิธี JETRO 2008⁽¹⁷⁾ และ EN 14350-2:2004⁽¹⁸⁾ ใช้ detector ชนิด fluorescence ซึ่งสามารถวิเคราะห์ปริมาณสารได้ต่ำถึง 0.04 นาโนกรัม⁽¹⁹⁾ เพิ่มขั้นตอนการเตรียม สารละลายตัวอย่างให้บริสุทธิ์และเข้มข้นด้วย Solid-Phase Extraction (SPE) พัฒนามาจากวิธีของ Rykowska I, Szymanski A, and Wasia W.⁽²⁰⁾ เพื่อเพิ่มความไวของการวิเคราะห์ให้สามารถตรวจวัดสารปริมาณต่ำได้ และ ด้วยเหตุที่ขวดนมมีการใช้ซ้ำๆ จนกระทั่งขวดแตก หรือเด็กเลืกรับประทานนมจากขวด ดังนั้น จึงทำการศึกษา เปรียบเทียบการใช้งานซ้ำที่สภาวะอุณหภูมิต่างๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลลักษณะการแพร่ของสารในช่วงอายุการใช้งาน และ อาจนำข้อมูลไปใช้ประเมินความเสี่ยงของการได้รับสารเคมีเหล่านี้จากขวดนมเด็กได้ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน : บีสฟีนอล เอ และฟีนอล ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 และพี-ที-บิวทิลฟีนอลความบริสุทธิ์ ร้อยละ 99.7 ผลิตภัณฑ์ Sigma Aldrich, สารเคมี : เมทานอล, แอซีโตน, ไดคลอโรมีเทน และแอซีโทไนไทรล์ ชั้นคุณภาพ HPLC, สารเคมีอื่นชั้นคุณภาพสำหรับการวิเคราะห์ (AR grade) น้ำที่ใช้คือน้ำปราศจากไอออน (deionized water (DI)) กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid), น้ำยาล้างขวดนม

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

เครื่อง HPLC พร้อมด้วย fluorescence detector: Shimadzu LC-20 A คอลัมน์ Luna C18, 5 μm ขนาด $250 \times 4.6 \text{ mm}$; mobile phase เป็นสารผสม แอซีโทไนไทรล์ : น้ำ อัตราส่วนเริ่มต้นที่ 30:70 ความเร็ว 1 มิลลิลิตร/นาที เพิ่มอัตราส่วนขึ้นตามระบบ gradient จนได้อัตราส่วน 100:0 ที่ 30 นาที อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส, detector ชนิด fluorescence ที่สภาวะ excite; 275 nm และ emission; 313 nm ปริมาตร ที่ฉีด 30 ไมโครลิตร ตรวจสอบความเหมาะสมของระบบเครื่อง (system suitability) ก่อนการใช้งาน, เครื่อง FT-IR: Perkin Elmer Spectrum 1000 พร้อมฐานข้อมูล Sealtel polymer วัดในช่วงเลขคลื่น 4000 cm^{-1} - 400 cm^{-1} , resolution 4 cm^{-1} , scan time 4, อ่างน้ำร้อนชนิดควบคุมอุณหภูมิที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 95 และ 40 องศาเซลเซียส, เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง, autoclave, vacuum pump, เยื่อกรองแบบ syringe filter ชนิด regenerated cellulose $0.45 \mu\text{m}$, 13 mm, SPE ชนิด hydrophilic polymer ที่มี sorbent เป็น polyamine-divinylbenzene copolymer: VertiPak HCP ที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพโดยพิจารณาจาก ร้อยละการกลับคืน ของ บีสฟีนอล เอ ฟีนอล และพี-ที-บิวทิลฟีนอล ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 80

ตัวอย่าง

ในเดือนเมษายน ถึง มิถุนายน 2554 เก็บตัวอย่างขวดนมและภาชนะบรรจุอาหารสำหรับเด็กจากร้านขายส่ง แผงลอย และซูเปอร์มาร์เกตในกรุงเทพมหานคร และจังหวัดนนทบุรีจำนวน 35 ตัวอย่าง สำหรับศึกษาการแพร่ รูปแบบที่ 1 ตัวอย่างขวดนมชนิดพอลิคาร์บอเนต ขนาด 8 ออนซ์ 1 ตัวอย่าง จำนวน 12 ขวด เพื่อใช้ศึกษา การแพร่ซ้ำที่สภาวะต่างๆ 4 สภาวะ ตามรูปแบบที่ 2

วิธีวิเคราะห์

การตรวจเอกลักษณ์ชนิดวัสดุ

ตัดตัวอย่างพลาสติกส่วนที่ไม่มีลายและหมึกพิมพ์ขนาด $2 \times 4 \text{ cm}^2$ อัดให้บางด้วยความร้อนนำไปตรวจ IR Spectrum ด้วยเครื่อง FT-IR เปรียบเทียบ IR Spectrum ที่ได้กับฐานข้อมูล Seatler polymer

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณ บิสฟีนอล เอ ฟีนอล และพี-ที-บิวทิลฟีนอล

การสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม บิสฟีนอล เอ ฟีนอล และพี-ที-บิวทิลฟีนอล ความเข้มข้น 2, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ไมโครกรัมต่อลิตร : ซึ่งสารมาตรฐาน บิสฟีนอล เอ ฟีนอล และพี-ที-บิวทิลฟีนอล แต่ละชนิด 0.0100 g ละลายในแอซีโตนไทรล์ ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายที่ได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวด ปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย สารละลาย แอซีโตนไทรล์ : น้ำ (30:70) แล้วปิเปตสารละลายที่ได้ ปริมาตร 0.02, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตรแต่ละขวด ปรับปริมาตรด้วย สารละลายแอซีโตนไทรล์ : น้ำ (30:70) นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC และสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้ peak ของสาร คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient: r) ค่า r ต้อง ≥ 0.995

การแพร่ (Migration)

ใช้สภาวะการแพร่ 2 รูปแบบดังนี้

(1) ตามสภาวะที่กำหนดในมาตรฐานเรื่องขวดนม

สารสกัดซึ่งเป็นตัวแทนอาหาร (food simulants) มี 2 ชนิดคือ น้ำ แตนน้ำมัน และสารละลายกรดอะซิติก ร้อยละ 4 โดยปริมาตร (4% HOAc) แตนน้ำมัน ตัวอย่างชนิดพอลิคาร์บอเนตที่ผ่านการตรวจสอบยืนยันแล้ว ทุกตัวอย่างวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้งติดกัน รายงานปริมาณสารจากค่าเฉลี่ย

การแพร่ด้วยน้ำ : ล้างตัวอย่างให้สะอาดด้วยน้ำยาล้างขวดนม ตามด้วย น้ำประปา ผึ่งให้แห้ง ขวดนม ต้มในน้ำเดือด 10 นาที กลั้วทิ้งด้วยน้ำ ผึ่งให้แห้งในที่ปลอดฝุ่น ภาชนะบรรจุอาหาร ลวกน้ำเดือด กลั้วทิ้งด้วยน้ำ แล้ว ผึ่งให้แห้งใส่น้ำให้ถึงระดับบรรจุสูงสุดของภาชนะที่ระบุไว้ ปิดด้วยแผ่นกระจก นำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ถ่ายสารละลายออกจากตัวอย่างลงในขวดรูปชมพู่ปิดฝา วางทิ้งไว้ให้เย็น เติมกรดอะซิติกเข้มข้นในสารละลายตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นเป็นร้อยละ 4 โดยปริมาตร ก่อนนำไปผ่าน SPE

การแพร่ด้วย 4% HOAc ดำเนินการเช่นเดียวกับการแพร่ด้วยน้ำ แต่ไม่ต้องเติมกรดอะซิติก ก่อนนำไปผ่าน SPE

ทดสอบแบลนด์ โดยใช้ภาชนะแก้ว ดำเนินการเช่นเดียวกับตัวอย่าง

(2) ตามสภาวะเลียนแบบการใช้งานของขวดนม ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในส่วนการแพร่ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ (1) ในส่วนการควบคุมอุณหภูมิแบ่งเป็น 4 สภาวะและให้มีระยะเวลาที่สัมผัส 2 ชั่วโมง (ตามข้อแนะนำของการเก็บน้ำนมที่เตรียมแล้วซึ่งสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้ไม่เกิน 2 ชั่วโมง) ดังนี้

2.1 ใส่ น้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ไว้ 2 ชั่วโมง เพื่อเลียนแบบการเตรียมน้ำนมจากนมผงตามปกติ

2.2 ใส่ 4% HOAc อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ไว้ 2 ชั่วโมง เพื่อเลียนแบบการใช้สื่อน้ำผลไม้

2.3 ใส่ น้ำเดือด (อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส) แล้ววางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อเลียนแบบการเตรียมน้ำดื่มที่ใช้น้ำเดือดใส่ขวดไว้ก่อนวางไว้จนน้ำอุ่นแล้วจึงใช้ชงนม

2.4 ใส่ น้ำให้ความร้อนใน autoclave ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำออกมาวางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อเลียนแบบการเตรียมน้ำนมและฆ่าเชื้อใน autoclave

ทุกสภาวะทำการทดสอบซ้ำโดยดำเนินการตั้งแต่ต้นจนจบต่อเนื่องกัน 120 ครั้ง เก็บสารละลายตัวอย่างจากครั้งที่ 1 ถึง 10 ต่อมาเก็บทุกๆ 5 ครั้งจนถึงครั้งที่ 120 นำมาตรวจวิเคราะห์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 รูปแบบการศึกษา การแพร่ (Migration) ของขวดนมและภาชนะบรรจุอาหารสำหรับเด็ก

รูปแบบ	วิธีการ	อุณหภูมิ/เวลา	ตัวแทนอาหาร	การทำซ้ำ (ครั้ง)
1	ตามมาตรฐานขวดนม	95 องศาเซลเซียส/30 นาที	น้ำ	3
			4% HOAc	3
2	เลียนแบบการใช้งาน			
	2.1 เตรียมนมวิธีปกติ	40 องศาเซลเซียส/2 ชั่วโมง	น้ำ	120
	2.2 เตรียมน้ำผลไม้	40 องศาเซลเซียส/2 ชั่วโมง	4% HOAc	120
	2.3 เตรียมนมโดยใช้น้ำเดือดใส่ขวดวางทิ้งไว้ให้เย็น	100 องศาเซลเซียส วางที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง	น้ำ	120
	2.4 เตรียมนมและฆ่าเชื้อใน autoclave	100 องศาเซลเซียส/15 นาที/วางที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง	น้ำ	120

การทำให้บริสุทธิ์และเข้มข้นโดยผ่าน SPE

เตรียม SPE ก่อนใช้งานโดย ผ่านสารละลายผสม แอซีโดไนโตรล : น้ำ (1:1) 5 มิลลิลิตร ตามด้วยเมทานอล 5 มิลลิลิตร และน้ำ 15 มิลลิลิตร แล้วใส่สารละลายตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร ให้ไหลผ่านจนหมด ใช้ vacuum pump สูบของเหลวที่ค้างอยู่ใน SPE ออกให้หมดเป็นเวลา 15 นาที elute ด้วย เมทานอล 2.5 มิลลิลิตร กรองผ่านเยื่อกรองวิเคราะห์ด้วย HPLC

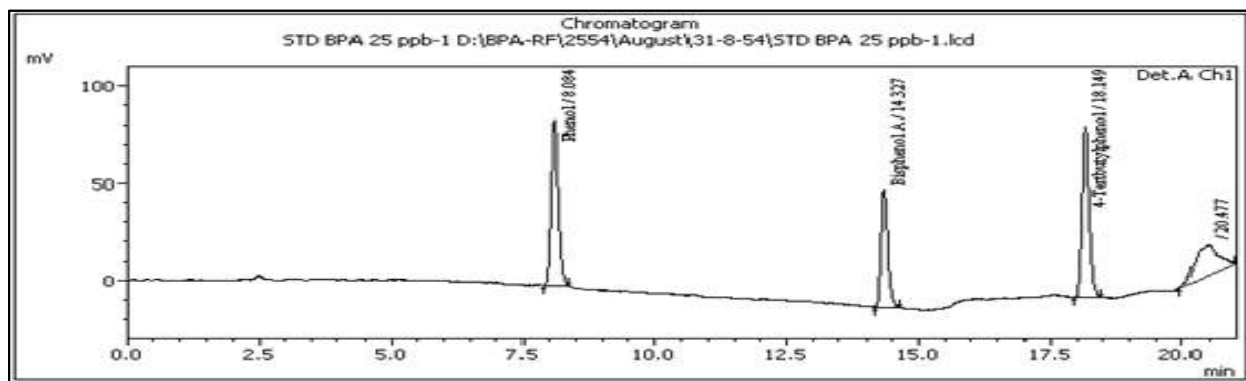
การประกันคุณภาพ และประสิทธิภาพวิธีวิเคราะห์

วิธีนี้มีช่วงของการวัดด้วยเครื่อง HPLC อยู่ในระดับ 2-30 ไมโครกรัมต่อลิตร แต่ละสารมีขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) ใช้ค่าที่มี signal/noise มากกว่า 3 และขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) ที่มี signal/noise มากกว่า 10 และมี % recovery, % RSD ตามเกณฑ์การยอมรับ ค่าที่ได้จากการอ่านเทียบกับกราฟมาตรฐานนำมาคำนวณกลับเป็นความเข้มข้นในสารละลายตัวอย่าง (เมื่อผ่าน SPE แล้วจะมีความเข้มข้นขึ้น 40 เท่า) โดยมีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.05 ไมโครกรัมต่อลิตร และ 0.12 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่เดิมสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ความเข้มข้น

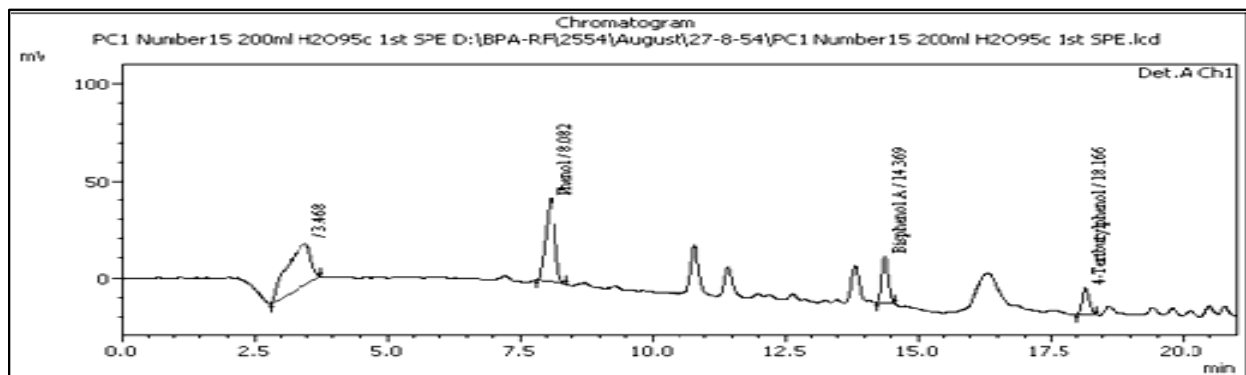
ที่ระดับ 0.12, 0.75 และ 2.00 ไมโครกรัมต่อลิตร แต่ละระดับวิเคราะห์ 7 ซ้ำ % recovery ของ ฟีนอล บีสฟีนอล เอ และพี-ที-บิวทิลฟีนอล ค่าเท่ากับ 53-105, 102-105 และ 105-110% ตามลำดับ และ % RSD ที่ได้เท่ากับ 4-8, 2.6-4.2 และ 2.0-3.7% ตามลำดับ การควบคุมคุณภาพในแต่ละชุดของการวิเคราะห์ ประกอบด้วยการวิเคราะห์ แบลงค์ และตรวจสอบ % recovery โดยเติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นช่วงกลางของกราฟมาตรฐาน ให้เป็นไปตามเกณฑ์กำหนดคือ 80-110%

ผล

ตามสถานะของเครื่อง HPLC ที่ใช้วิเคราะห์ได้โครมาโตแกรม (chromatogram) ของสารมาตรฐาน ฟีนอล บีสฟีนอล เอ และพี-ที-บิวทิลฟีนอล แต่ละสารสามารถแยกกันได้อย่างชัดเจนและ chromatogram ของตัวอย่าง ไม่มี peak รบกวนที่ retention time (RT) ตรงกับสารมาตรฐาน (ภาพที่ 1)

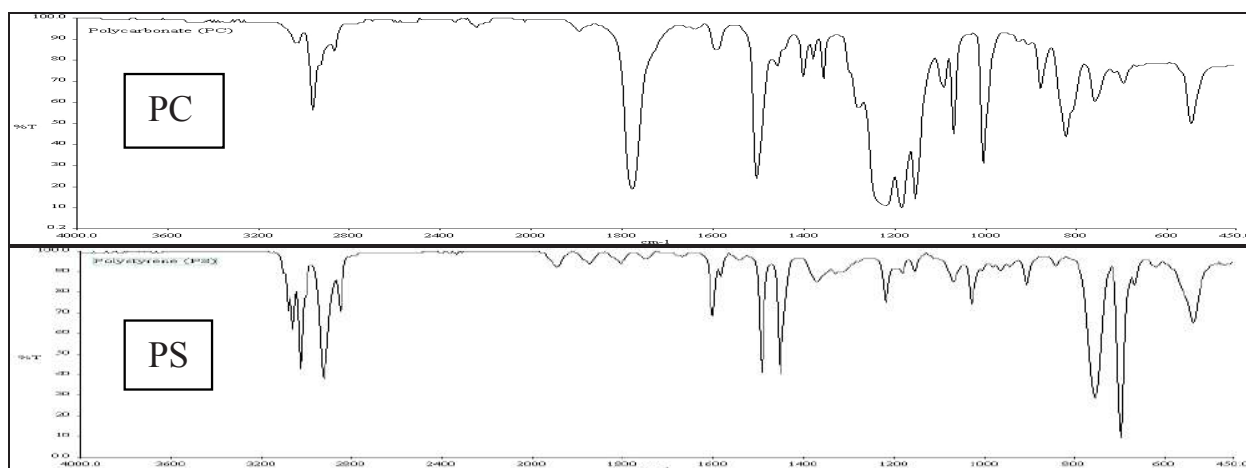


(A)



ภาพที่ 1 HPLC chromatogram ของสารมาตรฐาน (A) และของตัวอย่าง (B)

ผลการตรวจเอกลักษณ์ชนิดวัสดุโดย IR Spectrum จากจำนวน 35 ตัวอย่างพบว่าเป็นพลาสติกชนิด พอลิคาร์บอเนต จำนวน 32 ตัวอย่าง มีขนาดนม 29 ตัวอย่าง ถ้วยหัดดื่ม 2 ตัวอย่าง และชาม 1 ตัวอย่าง ถ้วยหัดดื่ม 3 ตัวอย่าง เป็นพลาสติกชนิด พอลิสไตรีน แสดง IR Spectrum (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 Infrared (IR) Spectrum ของพลาสติกชนิดพอลิคาร์บอเนต (PC) และพอลิสไตรีน (PS)

ขวดนมและภาชนะบรรจุอาหารสำหรับเด็กจำนวน 32 ตัวอย่างที่ทำด้วยพอลิคาร์บอเนต ระบุประเทศที่ผลิตเป็นประเทศไทยและผู้ผลิตจำนวน 18 ตัวอย่าง จากผู้ผลิตจำนวน 6 บริษัท ระบุประเทศที่ผลิตเป็นประเทศไทย แต่ไม่ระบุผู้ผลิตจำนวน 7 ตัวอย่าง ไม่แจ้งข้อมูลใดๆ จำนวน 7 ตัวอย่าง ผลการแพร่ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 นาที พบสารทั้ง 3 ชนิดรวมกันปริมาณต่ำสุด-สูงสุด เป็น 0.73 – 2.54 ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ย 1.41 ไมโครกรัมต่อลิตร และใน 4% HOAc พบอยู่ในช่วง 0.72 – 3.68 ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ย 1.58 ไมโครกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณการแพร่โดยรวมของสารทั้ง 3 ชนิด จากขวดนมและภาชนะบรรจุอาหารของเด็กชนิดพอลิคาร์บอเนต ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 นาที

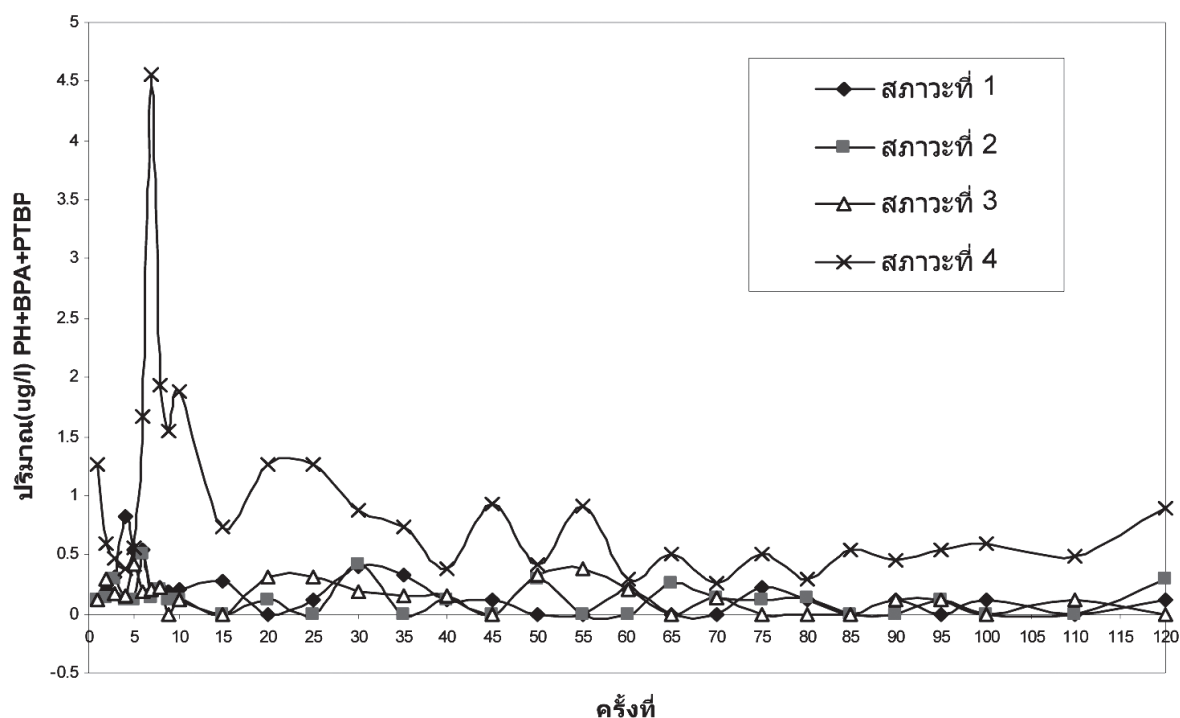
ประเทศ ที่ผลิต	ผู้ผลิต	ประเภท	จำนวน (ตัวอย่าง)	ปริมาณ ฟีนอล, บีสฟีนอล เอ และพี-ที-บิวทิลฟีนอล (ไมโครกรัมต่อลิตร)			
				ในน้ำ		ใน 4% HOAc	
				ต่ำสุด - สูงสุด	เฉลี่ย	ต่ำสุด - สูงสุด	เฉลี่ย
ประเทศไทย	บริษัท ก	ขวดนม	3	0.73 – 1.28	1.03	0.72 – 2.08	1.26
		ถ้วยหัดดื่ม	1	-2.35-	2.35	-1.96-	1.96
		ชาม	1	-1.27-	1.27	-1.97-	1.97
	บริษัท ข	ขวดนม	5	0.74-2.43	1.41	1.11-1.84	1.43
	บริษัท ค	ขวดนม	3	1.13-1.50	1.32	0.79-2.47	1.64
		ถ้วยหัดดื่ม	1	-1.69-	1.69	-1.74-	1.74
	บริษัท ง	ขวดนม	1	-0.77-	0.77	-0.76-	0.76
	บริษัท จ	ขวดนม	2	1.21-1.24	1.22	1.81-1.93	1.87
	บริษัท ฉ	ขวดนม	1	-1.31-	1.37	-1.09-	1.09
	-ไม่แจ้ง-	ขวดนม	7	0.84-2.05	1.52	0.84-2.43	1.70
-ไม่แจ้ง-	-ไม่แจ้ง-	ขวดนม	7	0.92-2.54	1.56	0.74-3.68	1.94
รวม			32	0.73-2.54	1.41	0.72-3.68	1.58

การแพร่ของสารแต่ละชนิดในน้ำดังนี้ ฟีนอล พบอยู่ในช่วง 0.2 – 1.8 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่าเฉลี่ย 0.63 ไมโครกรัมต่อลิตร บีสฟีนอล เอ พบอยู่ในช่วง 0.36 – 0.95 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่าเฉลี่ย 0.61 ไมโครกรัมต่อลิตร และ พี-ที-บิวทิลฟีนอล อยู่ในช่วง <0.12 – 0.62 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่าเฉลี่ย 0.19 ไมโครกรัมต่อลิตร การแพร่ใน 4% HOAc พบ ฟีนอล อยู่ในช่วง 0.16 – 2.73 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่าเฉลี่ย 0.90 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาณบีสฟีนอล เอ อยู่ในช่วง 0.23 – 0.80 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่าเฉลี่ย 0.41 ไมโครกรัมต่อลิตร พี-ที-บิวทิลฟีนอล ตรวจไม่พบ 2 ตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างที่พบปริมาณอยู่ในช่วง 0.19 – 0.60 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่าเฉลี่ย 0.36 ไมโครกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ปริมาณการแพร่ของสารแต่ละชนิด จากขวดนมและภาชนะบรรจุอาหารของเด็กชนิด พอลิคาร์บอเนต ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 นาที

สาร	ปริมาณ (ไมโครกรัมต่อลิตร)			
	ในน้ำ		ใน 4% HOAc	
	ต่ำสุด – สูงสุด	เฉลี่ย	ต่ำสุด – สูงสุด	เฉลี่ย
ฟีนอล	0.2 – 1.8	0.63	0.16 – 2.73	0.90
บีสฟีนอล เอ	0.36 – 0.95	0.61	0.23 – 0.80	0.41
พี-ที-บิวทิลฟีนอล	<0.12 – 0.62	0.19	0.19 – 0.60	0.36

ศึกษาการแพร่ของ บีสฟีนอล เอ ฟีนอล และพี-ที-บิวทิลฟีนอล จากขวดนมที่สภาวะต่างๆ เลียนแบบการใช้งานโดยทดสอบต่อเนื่อง 120 ครั้ง ได้ผลดังนี้ สภาวะที่ 1. ใส่ น้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ควบคุมอุณหภูมินี้ไว้ 2 ชั่วโมง การแพร่ของสารทั้ง 3 ชนิด ไม่พบ-0.83 ไมโครกรัมต่อลิตร สภาวะที่ 2. ใส่ 4% HOAc ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ควบคุมอุณหภูมินี้ไว้ 2 ชั่วโมง การแพร่ของสาร ไม่พบ-0.51 ไมโครกรัมต่อลิตร สภาวะที่ 3. ใส่ น้ำเดือดแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง การแพร่ของสาร ไม่พบ-0.42 ไมโครกรัมต่อลิตร สภาวะที่ 4. ใส่ น้ำให้ความร้อนใน autoclave ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง พบการแพร่ของสารปริมาณอยู่ในช่วง 0.26 – 4.56 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาณการแพร่ของสารโดยรวม (รูปที่ 3)



ภาพที่ 3 ปริมาณรวมการแพร่ของ บีสฟีนอล เอ ฟีนอล และพี-ที-บิวทิลฟีนอล จากขวดนมที่สภาวะต่างๆ 4 สภาวะ ดังนี้ (สุ่มวิเคราะห์จากการแพร่ครั้งที่ 1 ถึง 10 และทุกๆ 5 ครั้งถึงครั้งที่ 120) 1. ใส่ น้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ควบคุมอุณหภูมินี้ไว้ 2 ชั่วโมง 2. ใส่ 4% HOAc ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ควบคุมอุณหภูมินี้ไว้ 2 ชั่วโมง 3. ใส่ น้ำเดือด แล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง 4. ใส่ น้ำให้ความร้อนใน autoclave ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง

วิจารณ์

วิธีวิเคราะห์บีสฟีนอล เอ ฟีนอล และพี-ที-บิวทิลฟีนอล ที่แพร่ออกมาจากพลาสติกชนิดพอลิคาร์บอเนต โดย HPLC ที่มี fluorescence detector เตรียมสารละลายให้บริสุทธิ์และเข้มข้นด้วย SPE ชนิด polyamine-divinylbenzene copolymer สามารถวิเคราะห์และวัดปริมาณสารทั้ง 3 ชนิด ได้ในระดับไมโครกรัมต่อลิตร (ppb) โดยแต่ละสารมี LOD และ LOQ เมื่อคำนวณเป็นความเข้มข้นต่อสารละลายตัวอย่างเท่ากับ 0.05 ไมโครกรัมต่อลิตร และ 0.12 ไมโครกรัมต่อลิตรตามลำดับ

พลาสติกที่ใช้ทำขวดนมและภาชนะบรรจุอาหารทั้ง 35 ตัวอย่าง ลักษณะของพลาสติกที่มองเห็นเหมือนกัน แยกไม่ออก แต่เมื่อตรวจวิเคราะห์ IR Spectrum ด้วยเครื่อง FT-IR พบว่าขวดนมทุกตัวอย่างเป็นพลาสติกชนิด พอลิคาร์บอเนต ส่วนภาชนะบรรจุอาหารอื่น เช่น ถ้วยหัดดื่มและชาม มีทั้งพลาสติกชนิดพอลิคาร์บอเนตและ พอลิสไตรีน ซึ่งทนความร้อนได้ต่ำกว่า ตัวอย่างที่เก็บมามีทั้งระบุผู้ผลิต ประเทศที่ผลิต หรืออย่างใดอย่างหนึ่ง หรือไม่ แจ้งข้อมูลใดๆ เมื่อนำมาศึกษาเฉพาะตัวอย่างชนิดพอลิคาร์บอเนตพบว่า ค่าเฉลี่ยของปริมาณ บีสฟีนอล เอ ฟีนอล และ พี-ที-บิวทิลฟีนอล ที่แพร่ลงสู่ตัวแทนอาหารทั้ง 2 ประเภทคือ น้ำ แขนงนม และ 4% HOAc แขนงผลไม้ ไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างแหล่งผลิต และตัวแทนอาหารทั้ง 2 ประเภท และพบปริมาณน้อยไม่เกินค่า กำหนดในประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 295 (พ.ศ. 2548) ซึ่งกำหนดปริมาณ บีสฟีนอล เอ รวมฟีนอล และ พี-ที-บิวทิลฟีนอล ที่แพร่จากพลาสติกบรรจุอาหารทั่วไปชนิดพอลิคาร์บอเนตไว้ไม่เกิน 2.5 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์

เดซิเมตร (2,500 ไมโครกรัมต่อลิตร)⁽¹⁶⁾ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในประเทศญี่ปุ่น⁽¹³⁾ การศึกษาน้ำพืชน้ำที่แพร่ลงใน 4% HOAc สูงกว่าในน้ำ ขณะที่พบบิสฟีนอล เอ ในน้ำมากกว่าใน 4% HOAc และพบพี-ที-บิวทิลฟีนอล มีปริมาณน้อยกว่า ฟีนอล และบิสฟีนอล เอ ในตัวแทนอาหารทั้ง 2 ประเภท แม้ว่าประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 117 (พ.ศ. 2532) เรื่อง ขวดนม ไม่ได้กำหนดปริมาณการแพร่ของบิสฟีนอล เอ ไว้⁽¹⁵⁾ แต่กลุ่มประเทศยุโรปเคยมีการกำหนดปริมาณการแพร่ของบิสฟีนอล เอ ตาม European standard EN 14350-2 (2004) ไม่เกิน 30 ไมโครกรัมต่อลิตร⁽¹⁸⁾ ต่อมาในปี ค.ศ. 2011 ได้ประกาศห้ามใช้ บิสฟีนอล เอ ในการผลิตขวดนมสำหรับเด็ก⁽⁶⁾ อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้ปริมาณการแพร่ของ บิสฟีนอล เอ ที่พบแม้จะต่ำกว่าค่ามาตรฐานมากแต่มีการแพร่ออกมาจากทุกตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษา migration จากพลาสติกชนิดพอลิคาร์บอเนตในการศึกษาอื่น ถึงแม้ว่าแต่ละการศึกษาจะมีวิธีดำเนินการ เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ อุณหภูมิ หรือเวลา ที่ใช้ทดสอบแตกต่างกันออกไป^(10, 11, 21)

ผู้บริโภคมักทำความสะอาดขวดนมตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ คือล้างด้วยน้ำยาล้างขวดนม ตามด้วยน้ำสะอาดต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงใช้ชงนม หรือใส่อาหารอื่นเช่นน้ำผลไม้ ในชีวิตประจำวันการใช้ขวดนมจะใช้ซ้ำๆ จนกระทั่งขวดแตก หรือเด็กเลิกรับประทานนมจากขวด การทดสอบเพื่อให้ใกล้เคียงกับการใช้งานจริงมี 4 สถานะดังนี้ ในสถานะที่ 1. จำลองการใช้งานที่มีการปฏิบัติมากกว่าสถานะอื่นๆ ซึ่งเป็นการเตรียมนมในน้ำอุ่น สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ไม่เกิน 2 ชั่วโมง กรณีที่รับประทานไม่หมดจะเก็บไว้ในตู้เย็น ก่อนให้เด็กรับประทานอีกจะนำมาอุ่นซ้ำ การทดสอบใส่น้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสคงอุณหภูมิไว้ 2 ชั่วโมงนับว่าเป็นสถานะที่รุนแรงกว่าการใช้งานจริง แต่พบว่าการแพร่ของสารออกมาน้อยมากแม้ทดสอบไปถึง 120 ครั้งแล้วก็ตาม เช่นเดียวกับสถานะที่ 2. ซึ่งจำลองการใช้ใส่น้ำผลไม้เพื่อให้เด็กดูดจากขวด ผลการแพร่ของสารไม่แตกต่างจากสถานะแรก ในสถานะที่ 3. จำลองการเตรียมนมโดยใช้น้ำเดือดเทใส่ขวดนมวางทิ้งไว้จนเย็นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลการทดสอบพบว่าปริมาณสารที่แพร่ออกมาไม่ได้แตกต่างจาก 2 สถานะข้างต้น ขณะที่เมื่อเตรียมนมตามสถานะที่ 4. โดยการให้ความร้อนใน autoclave ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งมีการใช้วิธีนี้ตามโรงพยาบาลเพื่อเป็นการฆ่าเชื้อโรคที่อาจมีปนเปื้อนอยู่ในอาหารนมของเด็ก แล้ววางทิ้งไว้ให้เย็น 2 ชั่วโมง ผลการศึกษพบการแพร่ของสารทั้ง 3 ชนิด ออกมามากกว่าสถานะอื่นอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้เมื่อทดสอบต่อเนื่องไปถึง 120 ครั้ง พบว่าปริมาณการแพร่ของสารมีแนวโน้มที่สูงขึ้นกว่าสถานะการทดสอบอื่นๆ ลักษณะการแพร่ของสารในภาพรวมช่วงแรก มีปริมาณมากแค่ช่วงสั้นๆ ต่อมาปริมาณการแพร่แกว่ตัวขึ้นลงจนกระทั่งในช่วงปลายมีแนวโน้มของการแพร่ที่เพิ่มขึ้น นักวิจัยได้อธิบายกระบวนการแพร่ของบิสฟีนอล เอ ไว้ว่าการแพร่ที่เกิดขึ้นมาจากสารซึ่งหลงเหลือตกค้างในพลาสติกจากการทำปฏิกิริยาที่ไม่สมบูรณ์ ประกอบกับมีการแตกสลายของพลาสติกด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดยปัจจัยด้านอุณหภูมิ ระยะเวลาใช้งาน และความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่บรรจุ แต่ละปัจจัยดังกล่าวจะมีผลเสริมกัน เมื่อสัมผัสกับความร้อนเป็นเวลานานพลาสติกจะเกิดการเสื่อมสภาพทำให้สารแพร่ออกมาได้มากขึ้น^(9, 10) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าขณะที่ทำให้ขวดนมแห้งถ้ามีน้ำยาล้างขวดนมซึ่งเป็นด่างตกค้างอยู่ที่ผิวขวดจะทำให้มีบิสฟีนอล เอ เกิดขึ้นมารวมที่ผิวขวด และแพร่ออกมาได้ในปริมาณที่สูงกว่าปกติ⁽¹²⁾ ผลการศึกษานี้สถานะการใช้งานซ้ำในครั้งนี้นี้แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิสูงและระยะเวลาที่สัมผัสกับอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้สารสามารถแพร่ออกมาได้มากกว่า ปัจจัยด้านจำนวนครั้งที่ผ่านการใช้งาน ไม่เฉพาะ บิสฟีนอล เอ แต่ทั้ง ฟีนอล และพี-ที-บิวทิลฟีนอล ก็มีผลเหมือนกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาโดย Maragou NC et al. และ Kubwabo C et al. ที่พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการแพร่ของบิสฟีนอล เอ มากกว่าปัจจัยอื่น^(11, 22)

ปริมาณ บิสฟีนอล เอ ที่พบต่ำกว่าค่ามาตรฐานตามที่กำหนดใน EN 14350-2 (2004) (30 ไมโครกรัมต่อลิตร)⁽¹⁸⁾ เมื่อรวมกับ ฟีนอล และพี-ที-บิวทิลฟีนอล แล้ว ปริมาณที่พบก็ยังไม่ต่ำกว่าค่าที่กำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 295 (พ.ศ. 2548) (2,500 ไมโครกรัมต่อลิตร)⁽¹⁶⁾ มาก จากการคำนวณปริมาณ

บิสฟีนอล เอ ที่สามารถยอมให้พบได้ในอาหารของเด็กโดยอิงกับค่า TDI ได้เท่ากับ 300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ($50 \mu\text{g (TDI)} \times 6 \text{ kg bw}$ (น้ำหนักตัว เด็กอายุ 0-6 เดือน)/1 kg (ปริมาณการบริโภคต่อวัน) ซึ่งสูงกว่าปริมาณการแพร่ของสารทั้ง 3 ชนิดรวมกันมาก อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่า FAO/WHO ยังไม่มีข้อสรุปในการกำหนดค่าความปลอดภัยหรือมาตรการในการควบคุมเนื่องจากพบว่ายังขาดข้อมูลการศึกษาในสัตว์ทดลองที่มีการประเมินความเสี่ยงอย่างถูกต้องและเหมาะสม และยังต้องศึกษาความเป็นพิษในปริมาณน้อยต่อไป⁽⁸⁾ แต่หลายประเทศได้ประกาศห้ามหรือโดยมาตรการสมัครใจในการไม่ผลิตหรือจำหน่ายขวดนมที่ทำจากพอลิคาร์บอเนต ซึ่งมีสารบิสฟีนอล เอ เป็นส่วนประกอบไปแล้ว ขณะที่การศึกษาประเทศไทยยังไม่ได้ประกาศห้ามการใช้ขวดนมชนิดพอลิคาร์บอเนต แต่จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการแพร่ออกมาของ บิสฟีนอล เอ รวมทั้งฟีนอล และพี-ที-บิวทิลฟีนอล จากทุกตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ อีกทั้งมีการศึกษาใหม่ที่พบการมีผลกระทบต่อสัตว์ทดลองของบิสฟีนอล เอ ที่ปริมาณต่ำกว่าค่า TDI⁽²³⁾ จึงเป็นเหตุผลที่สนับสนุนในการทบทวนมาตรฐานหรือกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับขวดนมเด็กให้ทันต่อสถานการณ์ เช่นเดียวกับประเทศอื่นๆ ขณะเดียวกันผู้บริโภคส่วนใหญ่ได้เลิกใช้ขวดนมประเภทนี้ไปแล้ว และมีขวดนมที่ทำจากวัสดุอื่นเริ่มวางจำหน่ายในท้องตลาด ทดแทนขวดนมชนิดพอลิคาร์บอเนตแพร่หลายมากขึ้น จึงควรมีการศึกษาสำรวจชนิดวัสดุที่นำมาใช้รวมทั้งการแพร่ของสารเคมีเมื่อนำมาใช้งานต่อไป

สรุป

จากการศึกษาวิจัยในระหว่างปี พ.ศ. 2554 พบว่าขวดนมที่วางจำหน่ายในท้องตลาดส่วนใหญ่ทำด้วยพอลิคาร์บอเนต มีภาชนะบรรจุอาหารของเด็กเพียงส่วนน้อยทำด้วยพอลิสไตรีน ปริมาณ บิสฟีนอล เอ รวมฟีนอล และพี-ที-บิวทิลฟีนอล ที่แพร่ออกมาไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างแหล่งผลิต และพบว่าทุกตัวอย่างมีการแพร่ของสารทั้ง 3 ชนิดรวมกันแล้วมีปริมาณต่ำกว่าค่ากำหนดในประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 295 (พ.ศ. 2548) มากกว่า 1,000 เท่า ขณะที่การแพร่ออกมาของ บิสฟีนอล เอ พบปริมาณต่ำมากเช่นเดียวกับการศึกษาอื่นๆ ในต่างประเทศ การทดสอบโดยจำลองสภาวะการใช้งานพบว่า อุณหภูมิและระยะเวลาที่สัมผัสโดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูงมีผลต่อการแพร่ของสารทั้ง 3 ชนิดอย่างเห็นได้ชัด และมีความสอดคล้องกับการศึกษาในต่างประเทศซึ่งได้ให้ข้อสรุปไว้ว่า ปัจจัยสำคัญในการแพร่ออกมาของสารเคมีจากพลาสติกคืออุณหภูมิ และระยะเวลาที่สัมผัสของสารกับพลาสติก ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ ในการกำหนดมาตรการต่างๆ ทางด้านกฎหมาย และข้อบังคับของการใช้ขวดนมชนิดพอลิคาร์บอเนตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ให้การสนับสนุนการทําวิจัยในครั้งนี้ และเจ้าหน้าที่ฝ่ายวัสดุสัมผัสอาหารทุกท่านที่ทุ่มเทเวลาช่วยให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วง

เอกสารอ้างอิง

1. Rykowska I, Wasiak W. Properties, threats, and methods of analysis of bisphenol A and its derivatives. *Acta Chromatogr* 2006; 16: 7-27.
2. U.S. Environment Protection Agency. Bisphenol A action plan (CASRN 80-05-7). [online]. 2010; [cited 2013 Jun 13]. [22 screens]. Available from: URL: http://www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/actionplans/bpa_action_plan.pdf

3. Aschberger K, Castello P, Hoekstra E, Karakitsios S, Munns S, Pakalin S, et al. Bisphenol A and baby bottles: challenges and perspectives. JRC scientific and technical reports EUR 24389-2010 Luxembourg: European Union; 2010.
4. U.S. Food and Drug Administration. Bisphenol A (BPA): use in food contact application. [online] 2010; [cited 2013 Jun 13]. [8 screens]. Available from: URL: <http://www.fda.gov/newsevents/publichealthfocus/ucm064437.htm>
5. SOR/DORS/2010-53: Order amending schedule I to the hazardous products act (bisphenol A). Canada Gazette Part II 2010; 144(7): 413-26.
6. Commission directive 2011/8/EU of amending directive 2002/72/EC as regards the restriction of use of Bisphenol A in plastic infant feeding bottles. January 2011.
7. ความเห็นและข้อเสนอแนะการจัดการปัญหาสารบีพีเอในขวดนมและภาชนะบรรจุอาหารสำหรับทารกและเด็กเล็ก. กรุงเทพฯ : คณะทำงานการพัฒนาคุณภาพชีวิต สาธารณสุข และคุ้มครองผู้บริโภค; 2556.
8. Joint FAO/WHO Expert meeting to review toxicological and health aspects of bisphenol A, Summary report including report of stakeholder meeting on bisphenol A. [online]. 2010; [cited 2013 Aug 23]. Available from: URL: ftp://ftp.fao.org/ag/agn/agns/BPA_Summary_Report.pdf
9. EFSA considers more than 800 studies on BPA, to finalise opinion in September. [online]. 2010; [cited 2011 Dec 01]. [2 screens]. Available from: URL: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/cef20100713.htm>
10. Brede C, Fjeldal P, Skjevrak I, Herikstad H. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. Food Addit Contam 2003; 20(7): 684-9.
11. Maragou NC, Marki A, Lampi EN, Thomaidis NS, Koupparis MA. Migration of bisphenol A from polycarbonate baby bottles under real use conditions. Food Addit Contam 2008; 25(3): 373-83.
12. Biedermann-Brem S, Grob K, Fjeldal P. Release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles: mechanisms of formation and investigation of worst case scenarios. Eur Food Res Technol 2008; 227:1053-60.
13. Kawamura Y, Koyano Y, Takeda Y, Yamada T. Migration of bisphenol A from polycarbonate products. J Food Hyg Soc Jpn 1998; 39: 206-12.
14. Specifications and standards according to kinds of materials table AP02. In: JETRO. Specifications and standards for foods, food additives, etc. under the food sanitation act. (abstracts) 2008. Tokyo: Japan External Trade Organization; 2009. p. 127-30.
15. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 117 (พ.ศ. 2532) เรื่อง ขวดนม. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 106 ตอนที่ 32 (วันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2532)
16. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 295 (พ.ศ. 2548) เรื่อง กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของภาชนะบรรจุที่ทำจากพลาสติก. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 123 ตอนพิเศษ 1 ง (วันที่ 6 มกราคม 2549)
17. II Standards and testing methods for implements, containers and packaging. In: JETRO. Specifications, standards and testing methods for foodstuffs, implements, containers and packaging, toys, detergents 2008. Tokyo: Japan External Trade Organization; 2009. p. 85-136.

18. EN 14350-2:2004. Child use and care articles - drinking equipment-Part 2: chemical requirements and tests. United Kingdom: European Strandard; 2004.
 19. Annex I: Standard operation procedure: determination of bisphenol A in 50% aqueous ethanol. In: EURL – Food Contact Material. ILC 2009/02 BPA in 50% ethanol. Luxembourg: European Union; 2010. p. 43-7.
 20. Rykowska I, Szymanski A, Wasiak W. Method based on solid phase extraction, LC and GC for analysis of bisphenol A in drinking water. Chem Pap 2004; 58(6): 382-5.
 21. Ehlert KA, Beumer CWE, Groot MCE. Migration of bisphenol A into water from polycarbonate baby bottles during microwave heating. Food Addit Contam Part A 2008; 25(7): 904-10.
 22. Kubwabo C, Kosarac I, Stewart B, Gauthier BR, Lalonde K, Lalonde PJ. Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles. Food Addit Contam Part A 2009; 26(6): 928-37.
 23. Vom Saal FS, Hughes C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. Environ Health Perspect 2005; 113(8): 926-33.
-

A Study of the Migration of Bisphenol A, Phenol and P-tert-Butylphenol from Polycarbonate Child Utensils Under Various Conditions

Uma Boriboon Sasitorn Homdumrongvong and Passarin Saysuway

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

ABSTRACT Bisphenol A belongs to a group of endocrine disruptors with potential adverse effects on the reproductive system, development and growth was observed in exposed experimental animals. Due to the use of bisphenol A as a base substance in the manufacture of polycarbonate (PC), consumers are concerned about the health impacts of its migration. This study was conducted to observe the migration of bisphenol A, phenol and p-tert-butylphenol from PC child utensils. Furthermore, the migration was performed under various conditions that reflected realistic conditions of use. During the year 2011, a total of 32 child utensils with a focus on PC were collected in Bangkok and Nonthaburi provinces. Migration tests were conducted at 95 °C for 30 minutes using water and 4% acetic acid solution as food simulant. The sample solutions were cleaned up and concentrated using solid-phase extraction (SPE). The determination of migrants in the simulant was carried out using HPLC-FL. The migration of bisphenol A, phenol and p-tert-butylphenol were found in all samples. Their contents in water ranged from 0.73 – 2.54 µg/L, with a mean level of 1.41 µg/L, and the migrants in 4% acetic acid solution ranged from 0.72 – 3.68 µg/L, with a mean level of 1.58 µg/L. From both food simulants, the levels of p-tert-butylphenol migration were lower than bisphenol A and phenol. When comparing the amounts of migration under various test conditions performed on 120 cycles, it was observed that at 100 °C for 15 minutes, under autoclave condition the levels of migrations were higher than other test conditions. The migration of substances significantly increased with higher temperatures and contact periods. However, the levels of bisphenol A, phenol and p-tert-butylphenol migrating from PC child utensils were far below the restriction limit (2,500 µg/L) set by the ‘Notification of the ministry of Public Health No 295’ (BE 2548) and bisphenol A levels were also lower than the limit level (30 µg/L) pertaining to ‘European standard EN14350-2’ (2004).

Key words: bisphenol A, phenol, p-tert-butylphenol, PC child utensil, migration, HPLC

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์และการลดปริมาณสารรม เมทิลโบรไมด์ในรูปของโบรไมด์อนินทรีย์ทั้งหมด ในข้าวสารโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

วีรุฒิ วิทยานันท์ และวิชาดา จงมีวาสนา

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

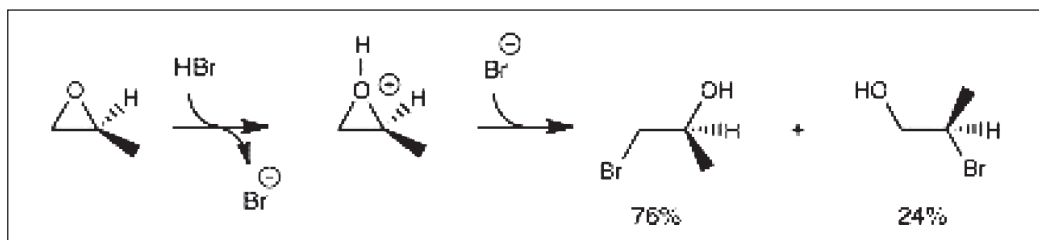
บทคัดย่อ เมทิลโบรไมด์เป็นสารรม (Fumigant) ตัวหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการเก็บรักษาข้าวสารทั้งก่อนและหลังบรรจุลงก่อนนำออกจำหน่ายเพื่อกำจัดแมลงและศัตรูพืช เมื่อมีการรมซ้ำหลายครั้งจะทำให้เกิดการตกค้างของสารดังกล่าวในรูปของโบรไมด์อนินทรีย์ (inorganic bromide) จึงได้พัฒนาวิธีที่ปรับปรุงจาก Stijve method ให้ใช้วิเคราะห์ปริมาณทั้งหมดของโบรไมด์อนินทรีย์ในข้าวสารเพื่อตรวจสอบคุณภาพข้าวสารที่ผ่านการรมสารดังกล่าว โบรไมด์อนินทรีย์ในตัวอย่างข้าวสารที่บดแล้วจะสามารถละลายออกมาในน้ำที่มีสภาวะเป็นกรด และทำปฏิกิริยากับ propylene oxide ทำให้เป็นอนุพันธ์ 1-bromopropane-2-ol และ 2-bromopropane-1-ol แล้วสกัดให้อยู่ในส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อตรวจปริมาณด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีชนิดไมโครอีซีดี (GC- μ ECD) สามารถตรวจวัดสารโบรไมด์อนินทรีย์โดยมีขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ที่ 2 และ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยความแม่นยำ (accuracy) แสดงด้วยค่าเฉลี่ยของ %recovery ที่ระดับ 5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อวิเคราะห์แบบใช้สารมาตรฐานภายนอก (external standard calibration) เท่ากับ 96.9, 93.4 และ 94.3% ตามลำดับ และเมื่อใช้ 3-bromopropane-1-ol ในการวิเคราะห์แบบใช้สารมาตรฐานภายใน (internal standard calibration) เท่ากับ 94.5, 89.2 และ 86.9% ตามลำดับ มีความเที่ยงแสดงด้วยค่า HORRAT น้อยกว่า 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ผลการวิเคราะห์ที่ระดับ LOQ ทั้งสองกรณีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$) มีความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and working range) ในช่วง 5-75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) เท่ากับ 0.999 วิธีที่พัฒนาขึ้นจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ และสามารถรองรับค่ามาตรฐานตามข้อกำหนดของคณะกรรมการอาหารระหว่างประเทศ (CODEX) และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 361) พ.ศ. 2556 เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้างที่ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

บทนำ

เมทิลโบรไมด์เป็นสารรม (fumigant) ชนิดหนึ่งที่มีรายงานการใช้งานครั้งแรกเมื่อ พ.ศ. 2475 ที่ประเทศฝรั่งเศส⁽¹⁾ เนื่องจากมีสถานะเป็นก๊าซที่อุณหภูมิปกติ ไม่มีสีและกลิ่น ไม่ติดไฟ ไม่ระเบิด มีความสามารถแทรกซึมสูง รวดเร็วและทั่วถึง จึงนิยมใช้ป้องกันและกำจัดแมลงและสัตว์ใต้ในทุกระยะการเติบโตใช้ฉีดพ่นดินในขั้นตอนการเพาะปลูกและใช้รมผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรในขั้นตอนการเก็บรักษา ก่อนการขนส่งและการจัดจำหน่ายผลิตภัณฑ์ เช่น อาหารและเฟอร์นิเจอร์ และใช้รมโครงสร้างไม้ก่อนการปลูกสร้างอาคารเพื่อป้องกันแมลงกัดกินเนื้อไม้^(2, 3) อันตรายต่อคนจะเกิดจากการหายใจทำความระคายเคืองต่อปอดและเป็นพิษต่อระบบประสาท ในระยะสั้นจะมีอาการ ได้แก่ ปวดหัว คลื่นไส้ อาเจียน การเป็นพิษอย่างเฉียบพลันทำให้เป็นอัมพาต ชัก หากอาการรุนแรงอาจถึงแก่ชีวิต^(4, 5, 6, 7)

ประเทศไทยนำเข้าเมทิลโบรไมด์ (สารเดี่ยว) และในรูปสารผสมของเมทิลโบรไมด์กับคลอโรพิกรีน (methyl bromide+chloropicrin) ในช่วง พ.ศ. 2550-2555 ปริมาณเฉลี่ย 357.69 และ 103.85 ตันต่อปีตามลำดับ ซึ่งสารดังกล่าวถูกจัดให้เป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 3 ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตรายควบคุมโดยกรมวิชาการเกษตร⁽⁸⁾ และเป็นสารพิษตกค้างจากวัตถุอันตรายทางการเกษตรในอาหารที่ระบุในบัญชีหมายเลข 1 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 361) พ.ศ. 2556 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 2)⁽⁹⁾ แต่เนื่องจากประเทศไทยได้ให้สัตยาบันเข้าร่วมเป็นภาคีสมาชิกพิธีสารมอนทรีออล (Montreal Protocol) ว่าด้วยการปกป้องชั้นบรรยากาศโอโซนเมื่อปี พ.ศ. 2532 ทำให้ต้องปฏิบัติตามพันธกรณี คือ ควบคุมปริมาณการนำเข้าสารเมทิลโบรไมด์ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 ไม่ให้เกินระดับค่าเฉลี่ยของปริมาณการใช้ของปี พ.ศ. 2538-2541 และในปี พ.ศ. 2548 ให้ลดลงร้อยละ 20 และยกเลิกการใช้ภายในสิ้นปี พ.ศ. 2558⁽¹⁰⁾

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิต ผู้บริโภค และผู้ส่งออกข้าวรายใหญ่ของโลก เพื่อรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์จำเป็นต้องใช้สารเมทิลโบรไมด์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชหลังการเก็บเกี่ยวและระหว่างการขนส่งและจัดจำหน่ายข้าว การใช้สารดังกล่าวซ้ำหลายครั้งจะทำให้เกิดการสะสมและตกค้างอยู่ในรูปของสารโบรไมด์อนินทรีย์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์โดยการย่อยและเผาแล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง X-ray fluorescence⁽¹¹⁾ โดยวิธี neutron activation analysis⁽¹²⁾ โดยวิธี selective ion electrode⁽¹³⁾ นอกจากนี้ยังมีการตรวจวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) เช่น วิธีที่พัฒนาขึ้นโดย Mitsuhashi^(14, 15) เมื่อ พ.ศ. 2530 โดยย่อยตัวอย่างด้วยต่างแล้วนำไปเผาให้เป็นแก๊สก่อนการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) วิธีเหล่านี้มีขั้นตอนที่ซับซ้อน อุปกรณ์ตรวจวัดบางชนิดมีราคาสูง ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน และมีข้อจำกัดเรื่องความจำเพาะเจาะจง (specificity) จึงได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์และทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของข้าวสารที่จำหน่ายในประเทศไทยและติดตามสถานการณ์การตกค้างของโบรไมด์อนินทรีย์ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการอ้างอิงสารตกค้างจากสารกำจัดศัตรูพืชของสหภาพยุโรป⁽¹⁶⁾ (European Reference Laboratories, EURL for Residues of Pesticides) และวิธีนี้กำลังถูกเสนอให้ Codex Alimentarius Commission รับเป็นวิธีแนะนำตาม CL 2005/52-PR, December 2005, CX 4/40.2 เป็นการตรวจวิเคราะห์ที่อ้างอิงวิธีที่พัฒนาขึ้นโดย Stijve⁽¹⁷⁾ เมื่อ พ.ศ. 2524 โดยการทำให้โบรไมด์อนินทรีย์ที่ตกค้างในเมล็ดข้าวสารเป็นอนุพันธ์ในรูปของ 1-bromopropane-2-ol และ 2-bromopropane-1-ol ก่อนการตรวจวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง GC-μECD สามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วและมีความจำเพาะเจาะจงสูงเนื่องจากอนุพันธ์ที่ได้จะมีสองชนิด คือ 1-bromopropane-2-ol และ 2-bromopropane-1-ol และมีอัตราส่วนเป็น 3 ต่อ 1 เสมอ (ภาพที่ 1) ทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือในการตรวจยืนยันที่ซับซ้อนและมีราคาแพง



ภาพที่ 1 ปฏิกิริยา nucleophilic addition ชนิด SN2 ของสาร propylene oxide ที่เป็น enantiomers (R, S) กับโบรไมด์นิตริในสภาวะกรดให้ไอโซเมอร์ 2 ชนิดที่มีสัดส่วน 3 ต่อ 1

วิธีที่อ้างอิง⁽¹⁶⁾ ต้องใช้ 3-bromopropane-1-ol เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) สำหรับการคำนวณผล การวิเคราะห์ต้องใช้เวลานานเนื่องจากพีคของ internal standard จะมีโอกาสซ้อนทับกับพีคของสารที่สนใจ การวิเคราะห์แบบ external standard calibration สามารถลดระยะเวลาการวิเคราะห์ ประหยัดสารเคมีและค่าใช้จ่าย จึงทำการทดสอบความมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างการคำนวณผลแบบ internal standard calibration (ISTD) กับ external standard calibration (ESTD) ที่ระดับ limit of quantitation (LOQ=5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เมื่อการคำนวณทั้งสองแบบไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติก็สามารถงดเว้นการใช้ internal standard นอกจากนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบการเตรียมตัวอย่างโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวสารทั้งเมล็ดกับชนิดที่บดละเอียด ศึกษาการลดปริมาณโบรไมด์นิตริที่ตกค้างในเมล็ดข้าวสารที่สภาวะต่างๆ ได้แก่ การล้างน้ำด้วยปริมาณและจำนวนครั้งที่ต่างกัน การเก็บที่อุณหภูมิที่ต่างกัน การเปิดภาชนะทิ้งไว้ที่เวลาต่างๆ กัน เพื่อศึกษาการคงตัว และเพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคในการทำให้ปริมาณการตกค้างของโบรไมด์นิตริลดลงก่อนการหุงต้มและปลอดภัยต่อการบริโภค

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน : potassium bromide (purity 99.999%) บริษัท Merck KGaA ประเทศเยอรมนี

สารเคมี : ethyl acetate HPLC grade, 3M sulfuric acid, 3-bromopropane-1-ol (for synthesis), ammonium sulfate (for analysis) และ sodium sulfate anhydrous (AR) granular ขนาด 12-60 mesh (เผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง), 1, 2-propylene oxide (for synthesis) เก็บที่ต่ำกว่า 11 องศาเซลเซียส ใช้เตรียม propylene oxide solution โดยละลาย 1, 2-propylene oxide 4 กรัม หรือปริมาตร 4.8 มิลลิลิตรในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ซึ่งจะต้องทำการเตรียมใหม่ก่อนการใช้งานทุกครั้ง

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1. potassium bromide stock solution: เตรียมสารละลายคิดเป็นความเข้มข้นของ bromide ion 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งสาร potassium bromide 149 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
2. potassium bromide working solution: เตรียมสารละลายคิดเป็นความเข้มข้นของ bromide ion 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการเจือจาง stock solution 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
3. internal standard solution: เจือจาง 3-bromopropane-1-ol ปริมาณ 0.637 มิลลิลิตร (เท่ากับ 1 กรัม, density=1.57 กรัมต่อมิลลิลิตร) ด้วย ethyl acetate จนครบ 100 มิลลิลิตร เพื่อเตรียม stock solution

หลังจากนั้นนำ stock solution ปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย ethyl acetate จนครบ 100 มิลลิลิตร เพื่อเตรียม working solution (เท่ากับ 3-bromopropane-1-ol เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องบดป่นอาหาร (Waring Commercial, Model: HGTWT), เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง สำหรับชั่งตัวอย่าง และ 5 ตำแหน่งสำหรับชั่งสารมาตรฐาน, micropipette, liquid dispenser, screw cap glass vial ที่มี PTFE/Silicone Septa ขนาด 60 ml, ตู้แช่แข็ง -15 องศาเซลเซียส, certified volumetric flask, shaker, GC- μ ECD; Agilent Technology 6890N โดยใช้ analytical column: DB-Wax, 30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 0.25 μ m

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างข้าวสารจากบรรจุภัณฑ์ขนาด 5 กิโลกรัม มาคลุกผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งเป็นสี่ส่วนเท่า ๆ กัน สุ่มตัวอย่างสองส่วนนำมาคลุกผสมกันอีกครั้ง แล้วชั่งแบ่งตัวอย่างประมาณ 500 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปิดสนิทไปเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า -15 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 12 ชั่วโมง มาบดละเอียดให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องบดป่นอาหาร ให้มีขนาดเล็กกว่า 20 mesh ชั่งแบ่งตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 กรัม เพื่อเป็น analytical portions และตัวอย่างที่ยังไม่ได้นำมาวิเคราะห์จะถูกเก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -15 องศาเซลเซียส

วิธีวิเคราะห์

การสกัดและการทำให้เป็นอนุพันธ์ (Extraction and Derivatization)

การเตรียม calibration solutions

เติม potassium bromide working solution ปริมาณ 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 มิลลิลิตร หรือเท่ากับ bromide ion ปริมาณ 5, 25, 50, 100 และ 150 ไมโครกรัม ลงในน้ำกลั่น 7.9, 7.5, 7.0, 6.0 และ 5.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ เพื่อให้ได้ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ลงใน screw cap glass vials ขนาด 60 มิลลิลิตร และเตรียม method blank โดยการเติมน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร เพียงอย่างเดียว

การทำให้เป็นอนุพันธ์ (Derivatization)

นำตัวอย่างข้าว 2 กรัม (analytical portions) มาใส่ลงใน screw cap glass vials ขนาด 60 ml เติมน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วแช่ตัวอย่างไว้ 20 นาที นำหลอดที่บรรจุตัวอย่างและหลอดที่บรรจุสารมาตรฐาน ที่เตรียมทำ calibration curve มาเติม propylene oxide solution 5 มิลลิลิตร และสารละลาย 3M sulfuric acid 1 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่าเร็ว ๆ ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

การสกัด (Extraction)

เติม ethyl acetate 40 มิลลิลิตร และ ammonium sulfate 4 กรัม ลงใน screw cap glass vials จากการเตรียม calibration solutions และการทำให้เป็นอนุพันธ์ (derivatization) เขย่าด้วยมือเป็นเวลา 1 นาที หรือจน ammonium sulfate ละลายหมด และตามด้วย shaker ความเร็ว 90 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บชั้นสารละลายอินทรีย์ (organic phase) ด้านบน จากนั้นนำสารสกัดของตัวอย่างและ calibration solutions 1 มิลลิลิตร ใส่ใน GC-vials ดึงน้ำออกด้วยการเติม sodium sulfate anhydrous (Na_2SO_4) ประมาณ 0.1 กรัม ลงใน GC-vials เติม internal standard working solution ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงใน GC-vials ก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC- μ ECD โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (clean up)

การตรวจวัดปริมาณโบรไมด์นินทรีนด้วยเครื่อง GC-μECD

ใช้เครื่องมือ GC-μECD โดยมีสภาวะเครื่องมือ ดังนี้

column: DB-Wax, 30 m, ID 0.25 mm, 0.25 μm film thickness

temperature: injector: 220 °C, pulsed splitless mode,

oven: initial 50 °C, hold 1 min, rate 5 °C/min to 140 °C, rate 30 °C/min to 180 °C

detector: μECD with nitrogen make up 60 ml/min, 200 °C

flow rate: helium (constant flow): 1.5 ml/min

injection volume: 1 μl

การคำนวณปริมาณ

ความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบ คำนวณโดยใช้เทคนิค internal และ/หรือ external calibration เปรียบเทียบกับ calibration curve (ความเข้มข้น 5 ระดับ) จากสมการเส้นตรง $Y = aX + b$ ปริมาณสารที่ตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือไมโครกรัมต่อกรัม) เท่ากับ $(Y-b)/2a$ เมื่อ X คือ ปริมาณสารมาตรฐาน (ไมโครกรัม) Y คือพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน a คือความชันของกราฟมาตรฐาน 2 คือ ปริมาณข้าวสารที่ใช้วิเคราะห์ (กรัม) และ b คือ จุดตัดแกน Y

การทดสอบความถูกต้องของวิธี⁽¹⁸⁾

การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

นำสารละลายที่ได้จากการเตรียม calibration solution สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค โดยปริมาณของโบรไมด์นินทรีนคือผลรวมของพีคทั้งสองอนุพันธ์ คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson's correlation coefficient: r)

การวิเคราะห์ Method blank และ Matrix blank

ทำ method blank โดยดำเนินการตามวิธีทำให้เป็นอนุพันธ์และวิธีสกัดโดยใช้สารเคมีทั้งหมดโดยปราศจากตัวอย่างและทำ matrix blank โดยดำเนินการตามวิธีทำให้เป็นอนุพันธ์และวิธีสกัด (8 ขั้ว) โดยใช้ตัวอย่างเป็นข้าวสารที่ไม่มีการตกค้างของโบรไมด์นินทรีน ทั้งนี้การตรวจวิเคราะห์ method blank และ matrix blank เพื่อตรวจสอบสารรบกวนที่อาจมาจากการปนเปื้อนของสารเคมีและจากอุปกรณ์ที่ใช้ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์ เพื่อป้องกันความผิดพลาดของผลการวิเคราะห์

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

หาค่า LOD จากสองวิธีดังต่อไปนี้ วิธีแรกกำหนดค่า LOD โดยคำนวณจากสัญญาณของ spiked sample blank โดยเติมสารมาตรฐานที่ระดับ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 8 ขั้ว คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) แล้วคำนวณค่า LOD จากสมการ $LOD=3SD$

วิธีที่สองคำนวณค่า LOD จากจุดตัดของกราฟมาตรฐานที่เตรียมโดยใช้ sample blank ด้วยการสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้วิธี simple least squares method ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอย่างก่อนวัด โดยใช้ 4 ระดับความเข้มข้นคือ 2, 5, 10 และ 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ระดับละ 3 ขั้ว คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ $y_{intercept}$ ($SD_{intercept}$) จากสมการที่ 1 แล้วคำนวณค่า LOD จากสมการที่ 2 โดยที่ $y_{intercept}$ คือสัญญาณที่อ่านได้บนแกน y เมื่อ $x=0$ นำผลที่ได้จากทั้งสองวิธีมาเปรียบเทียบและพิจารณากำหนดค่า LOD ตามความเหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน

$$SD_{\text{intercept}} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y^{\wedge})^2}{(n-2)}}$$

.....สมการที่ 1

y_i คือ ค่าสัญญาณที่อ่านจากเครื่อง GC- μ ECD คำนวณให้เป็นมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

$y^{\wedge}$ คือ ค่าสัญญาณที่ควรจะเป็นบนกราฟมาตรฐาน

n คือ จำนวนจุดระดับความเข้มข้นบนกราฟมาตรฐาน

$$LOD = y_{\text{intercept}} + 3SD_{\text{intercept}}$$

.....สมการที่ 2

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

กำหนดค่า LOQ จากเกณฑ์ LOQ น้อยกว่าหนึ่งในสิบส่วน ($LOQ < 1/10$) ของค่าอ้างอิง (target value) โดยค่า MRL ที่กำหนดโดย CODEX ของโบรไมด์อินทรีย์ในข้าวคือ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ยืนยันค่า LOQ โดยเติมสารมาตรฐานในตัวอย่างข้าวสาร (sample blank) ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์จำนวน 8 ซ้ำ แล้วคำนวณ %recovery กำหนดเกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วงร้อยละ 80-110 และ HORRAT (Horwitz ratio) กำหนดเกณฑ์ยอมรับตาม AOAC, CODEX และ EU มีค่าน้อยกว่า 2 จากสมการที่ 3

$$HORRAT = \frac{RSD_{\text{observed}}}{RSD_{\text{expected}}}$$

.....สมการที่ 3

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and working range)

ศึกษา linearity ของ calibration curve โดยการเตรียมสารมาตรฐานสารโบรไมด์อินทรีย์ปริมาณต่าง ๆ 5 ระดับ ได้แก่ 5, 25, 50, 100 และ 150 ไมโครกรัม ผ่านการทำให้กลายเป็นอนุพันธ์ 1-bromopropane-2-ol และ 2-bromopropane-1-ol นิดสารมาตรฐานเข้าเครื่อง GC- μ ECD ตามสภาวะเครื่องมือที่ระบุความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีคคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ r มีค่ามากกว่า 0.995

ศึกษา linearity ของ working range โดยการเติมสารมาตรฐานโบรไมด์อินทรีย์ในตัวอย่างข้าวสาร (sample blank) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่างกับความเข้มข้นที่ตรวจพบ คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson's correlation coefficient: r) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ r มีค่ามากกว่า 0.995

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

เติมสารมาตรฐานในตัวอย่างข้าวสาร (sample blank) ที่ระดับ LOQ, $5 \times LOQ$ และ $10 \times LOQ$ ที่ความเข้มข้น 5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ วิเคราะห์ระดับละ 8 ซ้ำ แล้วคำนวณ % recovery, %RSD และ HORRAT โดยเกณฑ์ยอมรับความแม่นยำ (accuracy): mean recovery 80-110 % และเกณฑ์ยอมรับความเที่ยง (precision): HORRAT มีค่าน้อยกว่า 2

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (Measurement of uncertainty)⁽¹⁹⁾

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดคำนึงถึงแหล่งความไม่แน่นอนทุกแหล่ง เมื่อรวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมดแล้ว ค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งปริมาณสารที่พบคำนวณจากการวิเคราะห์โดย GC- μ ECD และคำนวณผลโดยเทคนิค calibration curve

การทดสอบความมีนัยสำคัญทางสถิติของการวิเคราะห์ที่ระดับ LOQ (5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ระหว่างการวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธี ESTD กับวิธี ISTD⁽²⁰⁾

คุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์หาได้โดยการนำผลที่ได้จากการคำนวณที่ระดับ LOQ (5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ของการวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี ESTD และ ISTD ในการวิเคราะห์ครั้งเดียวกัน ทำการประเมินค่าเฉลี่ย (mean) และค่าความแปรปรวน (standard deviation) ด้วยสถิติ โดยข้อมูลทั้งสองชุดจะถูกนำมาทดสอบความมีนัยสำคัญทางสถิติ ทดสอบค่าความแปรปรวนด้วย F-test และทดสอบค่าเฉลี่ยด้วย t-test

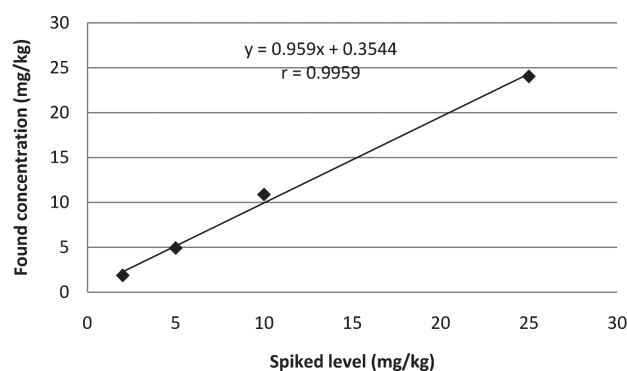
การศึกษาการลดลงของปริมาณโบรไมไดอนินทรีย์ในเมล็ดข้าวสารที่สภาวะต่าง ๆ

วิเคราะห์ปริมาณโบรไมไดอนินทรีย์ที่ตกค้างในเมล็ดข้าวสารชนิดทั้งเมล็ดเปรียบเทียบกับชนิดบดละเอียด เปรียบเทียบปริมาณการลดลงของปริมาณโบรไมไดอนินทรีย์ในข้าวสารปริมาณ 2 กรัม ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่น แบบที่ 1 ล้างตัวอย่าง 1 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร แบบที่ 2 ล้างตัวอย่าง 2 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร และแบบที่ 3 ล้างตัวอย่าง 1 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร เปรียบเทียบปริมาณโบรไมไดอนินทรีย์ในข้าวสารที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า -15 องศาเซลเซียส กับข้าวสารที่เปิดไว้ทั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7, 14, 30 และ 120 วัน ตามลำดับ

ผล

จากการศึกษาการตรวจวิเคราะห์โบรไมไดอนินทรีย์ด้วย GC- μ ECD ภายใต้สภาวะที่กำหนด สามารถสร้างกราฟมาตรฐานของสารดังกล่าวได้ในช่วง 5, 25, 50, 100 และ 150 ไมโครกรัม โดยมีค่า r เท่ากับ 0.999 และตรวจไม่พบสารรบกวนที่ให้พีคตรงหรือใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน เมื่อทำการวิเคราะห์ method blank และ matrix blank

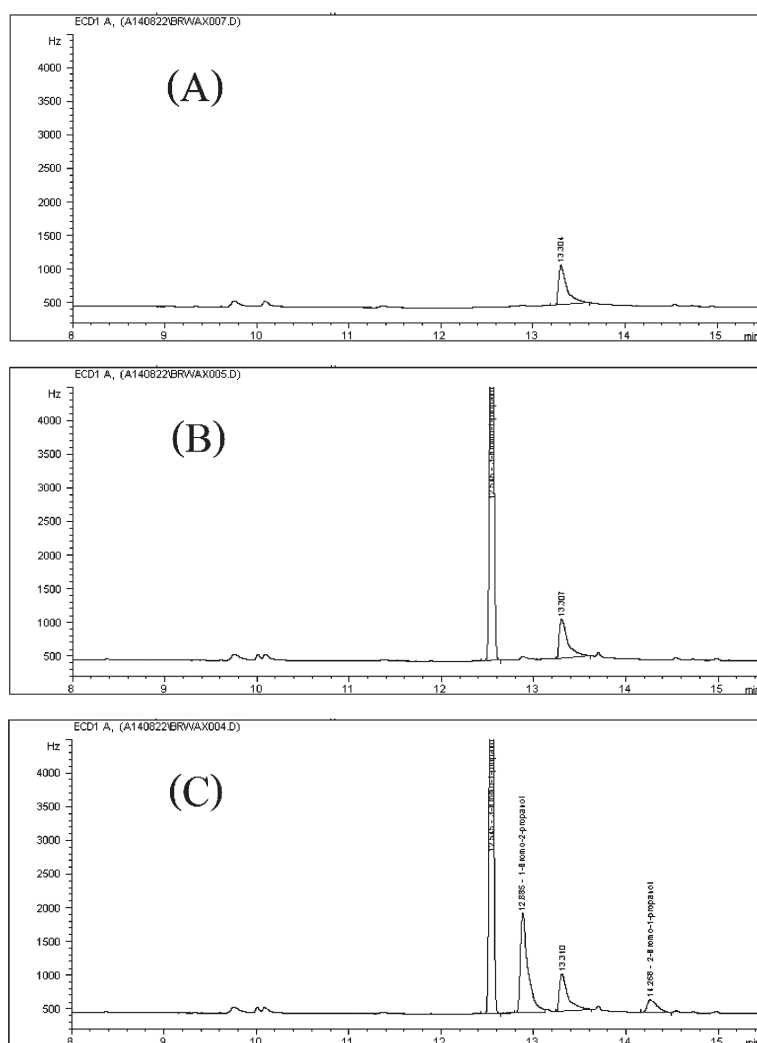
ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ที่ได้จากการคำนวณจากสามเท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (3SD) ของการวัดที่ระดับ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำการวิเคราะห์จำนวน 8 ซ้ำ เมื่อ SD=0.07 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเท่ากับ 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นคำนวณจากจุดตัดของกราฟมาตรฐานที่เตรียมโดยใช้ sample blank โดยสร้างกราฟมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอย่างก่อนวัดที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ 2, 5, 10 และ 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ระดับละ 3 ซ้ำ ได้ $y_{\text{intercept}} = 0.3544$ และ $r = 0.9959$ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 กราฟ spiked sample blank ที่ระดับความเข้มข้น 2, 5, 10 และ 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีสมการเส้นตรงคือ $y = 959x + 0.3544$ โดยมีค่า $r = 0.9959$ ใช้คำนวณ LOD

คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ $y_{\text{intercept}}$ จากสมการที่ 1 จะได้ $SD_{\text{intercept}} = 0.771$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แล้วคำนวณค่า LOD จากสมการ $LOD = y_{\text{intercept}} + 3SD_{\text{intercept}}$ ได้ $LOD = 2.67$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากผลการคำนวณค่า LOD จากทั้งสองกรณีพบว่า มีค่า 0.20 และ 2.67 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีค่าที่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาจากความเหมาะสมสอดคล้องกับการใช้งานจึงกำหนดค่า LOD เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แล้วทำการยืนยันค่า LOD โดยการวิเคราะห์ที่ระดับ LOD จำนวน 8 ซ้ำ ได้ %recovery และ HORRAT เป็น 93% และ 0.4 ตามลำดับ ($\text{mean} \pm SD = 1.86 \pm 0.07 \text{ mg/kg}$) โดยมีขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความแม่นยำ (%recovery) จากการวิเคราะห์ซ้ำสารที่เติมสารมาตรฐาน จำนวน 8 ซ้ำ ที่ระดับ LOQ เท่ากับ 96.9% (external standard calibration, ESTD) และ 94.5% (internal standard calibration, ISTD) และความเที่ยงจาก HORRAT เท่ากับ 0.4 (ESTD) และ 0.5 (ISTD)

จาก chromatogram (ภาพที่ 3) อนุพันธ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างโบรไมด์อินทรีย์กับ propylene oxide คือ 1-bromopropane-2-ol และ 2-bromopropane-1-ol โดยมี retention time (RT)=12.89 นาที และ 14.27 นาทีตามลำดับ ใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมดประมาณ 20 นาที (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 3 ผลการตรวจวิเคราะห์โบรไมด์อินทรีย์ด้วยเครื่อง GC- μ ECD (a) ข้าวสารที่เป็น blank (b) พิกของ internal standard (3-bromopropane-1-ol) มี RT=12.55 นาที และ (c) Blank ที่เติม bromide ion เข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แสดงพิกอนุพันธ์ 1-bromopropane-2-ol และ 2-bromopropane-1-ol ที่ RT=12.89 นาที และ 14.27 นาทีตามลำดับ

ตารางที่ 1 ค่า Retention time (RT) ของ internal standard และสารอนุพันธ์ของโบรไมด์นินทรีย์

Compound	Retention time (RT) (min)
3-bromopropane-1-ol (internal standard, IS)	12.55
1-bromopropane-2-ol	12.89
2-bromopropane-1-ol	14.27

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and working range) พบว่าการวิเคราะห์โบรไมด์นินทรีย์ในข้าวสารมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 5-75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า r เท่ากับ 0.999 (ESTD และ ISTD) มีความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีที่ระดับ LOQ, $5 \times \text{LOQ}$ และ $10 \times \text{LOQ}$ ที่ความเข้มข้น 5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบความแม่นยำ (accuracy) ที่ประเมินจาก % recovery ที่ทั้ง 3 ระดับเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี ESTD เท่ากับ 96.9, 93.4 และ 94.3% ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี ISTD เท่ากับ 94.5, 89.2 และ 86.9% ตามลำดับ ความเที่ยง (precision) ที่ประเมินด้วย HORRAT เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี ESTD เท่ากับ 0.4, 0.4 และ 0.4 ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี ISTD เท่ากับ 0.5, 0.4 และ 0.3 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์โบรไมด์นินทรีย์ในข้าวสารที่ระดับความเข้มข้น 5 (LOQ), 25 ($5 \times \text{LOQ}$) และ 50 ($10 \times \text{LOQ}$) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์โดยใช้ ESTD และ ISTD

Calibration	Spike level method	mean $\pm$ SD (mg/kg)	% Recovery	%RSD (n=8)	HORRAT
External standard	5	4.8 ± 0.2	96.9	3.29	0.4
	25	23.3 ± 0.9	93.4	3.64	0.4
	50	47.1 ± 1.6	94.3	3.35	0.4
Internal standard	5	4.7 ± 0.2	94.5	4.48	0.5
	25	22.3 ± 0.8	89.2	3.53	0.4
	50	43.4 ± 1.2	86.9	2.83	0.4

การทดสอบความมีนัยสำคัญทางสถิติของการวิเคราะห์ที่ระดับ LOQ (5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ระหว่างการวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธี ESTD กับวิธี ISTD นั้นทำได้โดยการทดสอบค่าความแปรปรวน (SD) และค่าเฉลี่ย (mean) ของข้อมูลทั้งสองชุด เมื่อค่า mean $\pm$ SD ของการวิเคราะห์โบรไมด์นินทรีย์ในข้าวสารที่ระดับความเข้มข้น LOQ (5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ของการวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธี ESTD และวิธี ISTD เท่ากับ 4.8 ± 0.7 และ 4.7 ± 0.2 ตามลำดับ ทำการทดสอบความมีนัยสำคัญของความแตกต่างระหว่างค่าความแปรปรวน (variance) ของข้อมูล 2 ชุดโดยใช้ F-test คำนวณค่า $F_{\text{calculated}}$ จากสมการที่ 4 จะได้ค่า $F_{\text{calculated}} = 1.760$ เมื่อ $n_1 = n_2 = 8$ โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่นมากกว่า 95% ($\alpha = 0.05$) ได้ค่า $F_{\text{critical}} = 5.119$ จะได้ $F_{\text{calculated}}$ น้อยกว่า F_{critical} หรือข้อมูล 2 ชุดที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ ESTD และ ISTD ไม่มีความแตกต่างของค่าความแปรปรวนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

$$F_{\text{calculated}} = \frac{(SD_{\text{ISTD}})^2}{(SD_{\text{ESTD}})^2}$$

.....สมการที่ 4

ทำการทดสอบความมีนัยสำคัญโดยใช้ t-test ในการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย (mean) ของข้อมูล 2 ชุด โดยคำนวณค่า $t_{\text{calculated}}$ จากสมการ 5 และ SD_{pool} จากสมการ 6 เมื่อ SD_{pool} ที่คำนวณได้เท่ากับ 0.187 จะได้ค่า $t_{\text{calculated}} = 0.32$ เมื่อ degrees of freedom = $n_1 + n_2 - 2 = 14$ โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$) ได้ค่า $t_{\text{critical}} = 2.14$ ได้ $t_{\text{calculated}}$ น้อยกว่า t_{critical} หรือข้อมูล 2 ชุดที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี ESTD และวิธี ISTD ไม่มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

$$t_{\text{calculated}} = \frac{(\text{mean}_1 - \text{mean}_2)}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) SD_{\text{pooled}}^2}}$$

.....สมการที่ 5

$$SD_{\text{pooled}} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times SD_1^2 + (n_2 - 1) \times SD_2^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)}}$$

.....สมการที่ 6

ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโบรมไดอนินทรีย์ที่ตรวจพบในตัวอย่างข้าวสารที่เป็น incurred sample ระหว่างข้าวสารทั้งเมล็ด (whole grain) และข้าวบดละเอียด (ground sample) โดยนำตัวอย่างข้าวที่ตรวจพบ bromide ion ทำการวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนาขึ้นแบบใช้ internal standard calibration โดยใช้ข้าวสารทั้งเมล็ดที่ยังไม่บดเปรียบเทียบกับตัวอย่างเดียวกันที่บดละเอียด จำนวน 3 ซ้ำ พบค่าเฉลี่ยของการตรวจพบโบรมไดอนินทรีย์ในข้าวสารทั้งเมล็ดเท่ากับ 24.4 ± 1.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ในข้าวสารที่บดละเอียดเท่ากับ 37.6 ± 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าปริมาณโบรมไดอนินทรีย์ที่ตรวจพบในข้าวสารชนิดบดละเอียดมีค่ามากกว่าข้าวทั้งเมล็ด

รายงานของ Nakamura และคณะ⁽²¹⁾ ได้ระบุถึงผลการลดปริมาณโบรมไดอนินทรีย์ในข้าวจากการทดลองแบบต่างๆ แต่ยังไม่มียางานออกมามาก หลังจากนั้นจึงได้ทำการทดลองเปรียบเทียบปริมาณโบรมไดอนินทรีย์ระหว่างตัวอย่างข้าวบดละเอียดที่ผ่านกระบวนการวิเคราะห์ตามปกติ ตัวอย่างข้าวที่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 4 มิลลิลิตร 1 ครั้ง, 4 มิลลิลิตร 2 ครั้ง และ 8 มิลลิลิตร 1 ครั้ง อย่างละ 3 ซ้ำ พบค่าเฉลี่ยของการตรวจพบโบรมไดอนินทรีย์ในข้าวสารคือ 37.6 ± 2.5 , 19.7 ± 0.2 , 8.5 ± 0.4 และ 17.2 ± 1.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ การล้างน้ำปริมาณ 4 มิลลิลิตร 1 ครั้ง, 4 มิลลิลิตร 2 ครั้ง และ 8 มิลลิลิตร 1 ครั้ง ทำให้ปริมาณโบรมไดอนินทรีย์ที่ตกค้างในข้าวลดลง 47.6, 77.3 และ 54.2% ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ปริมาณโบรไมด์นินทรีย์ที่ตรวจพบในข้าวสารที่ได้จากการทดลองประเภทต่าง ๆ

การทดลอง	ปริมาณ bromide ion (mg/kg) (3 ซ้ำ) mean $\pm$ SD
ข้าวสารทั้งเมล็ด	24.4 $\pm$ 1.5
ข้าวสารบดละเอียด (<20 mesh)	37.6 $\pm$ 2.4
ข้าวสารบดละเอียด (<20 mesh) ล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ml 1 ครั้ง	19.7 $\pm$ 0.2
ข้าวสารบดละเอียด (<20 mesh) ล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ml 2 ครั้ง	8.5 $\pm$ 0.4
ข้าวสารบดละเอียด (<20 mesh) ล้างด้วยน้ำกลั่น 8 ml 1 ครั้ง	17.2 $\pm$ 1.2

เมื่อทำการทดลองศึกษาผลของอุณหภูมิที่เก็บรักษาตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบปริมาณโบรไมด์นินทรีย์ระหว่างตัวอย่างข้าวสารบดละเอียดที่บรรจุในถุงพลาสติกปิดสนิทเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส และที่เปิดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7, 14, 30 และ 120 วัน อย่างละ 3 ซ้ำ พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณโบรไมด์นินทรีย์ในข้าวสารทั้งสองอุณหภูมิในทุกช่วงเวลามีค่าอยู่ระหว่าง 35–37 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (%RSD <25%) ซึ่งค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนั้นยังได้ทำการวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างธัญพืชชนิดอื่น เช่น ข้าวโพด พบว่ามีความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ โดยมี %recovery ที่ LOQ เท่ากับ 95.5% และ HORRAT น้อยกว่า 2

วิจารณ์

การพัฒนาวิธีและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โบรไมด์นินทรีย์ในข้าวสารโดยการดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการอ้างอิงสารตกค้างจากสารกำจัดศัตรูพืชของสหภาพยุโรป (EURL) ที่อ้างอิงถึงวิธีของ Stijve โดยมีค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ในช่วง 5–75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งคุณลักษณะของวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ตรวจวัดเพื่อควบคุมคุณภาพของข้าวสารที่จำหน่ายในประเทศไทยตามพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 361) พ.ศ. 2556 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้างที่ระบุค่ากำหนดปริมาณการตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limits, MRL) ไว้ที่ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทั้งนี้การพัฒนาวิธีดังกล่าวได้มีการปรับขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ปริมาณตัวอย่างและขั้นตอนการสกัดบางส่วนเพื่อให้เหมาะสมกับอุปกรณ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการและสามารถทำการวิเคราะห์ได้พร้อมกันประมาณ 30 ตัวอย่างต่อชุดการทดสอบเพื่อรองรับงานสำรวจหรือตรวจสอบคุณภาพข้าวได้ทันต่อสถานการณ์ เมื่อทำการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธี internal และ external standard calibration โดยได้สกัดตัวอย่างที่มีโบรไมด์นินทรีย์ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าข้อมูล 2 ชุดที่ได้จากการคำนวณไม่มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยและค่าความแปรปรวนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้ในการนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปใช้จึงไม่จำเป็นต้องใช้ internal standard เป็นการประหยัดสารเคมีค่าใช้จ่ายและเวลาโดยการปรับสภาวะของเครื่อง GC ให้มีเวลาการวิเคราะห์ที่สั้นลงได้โดยไม่ต้องระงับการเกิดการซ้อนทับของ internal standard กับสารที่สนใจ เนื่องจากมีโครงสร้างคล้ายกันและเกิดพีคที่ตำแหน่งใกล้เคียงกันมาก อย่างไรก็ตามเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ดี ผู้ที่จะนำวิธีนี้ไปใช้ควรทราบเทคนิคและข้อควรระวังเนื่องจากในขั้นตอนการทำอนุพันธ์มีการใช้สารที่มีความเป็นพิษสูง ระคายเคืองต่อผิวหนังและทางเดินหายใจ เช่น สาร propylene oxide ซึ่งต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 11 องศาเซลเซียส และต้องทำการเตรียมสารละลายใหม่

ทุกครั้งก่อนการใช้งาน หากเก็บไว้เกิน 24 ชั่วโมง ประสิทธิภาพของสารละลายดังกล่าวจะลดลงส่งผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์ หลังการใช้งานหากมีสารละลายเหลือให้ทำลายโดยการเติมเกลือแกง (NaCl) ในการใช้ propylene oxide เพื่อทำให้เกิดอนุพันธ์นั้นมีข้อดีกว่าการใช้ ethylene oxide ที่สามารถเพิ่มความเชื่อมั่นในการตรวจวิเคราะห์โดยไม่ต้องตรวจยืนยันซ้ำ เนื่องจากให้อนุพันธ์ 2 ชนิดที่เป็นไอโซเมอร์กันและมีสัดส่วน 3 ต่อ 1 เสมอ และสัดส่วนนี้เป็นการยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์แล้ว ในขณะที่ ethylene oxide ให้อนุพันธ์เพียงชนิดเดียวที่ไม่สามารถระบุได้ว่าสารที่ตรวจพบเป็นอนุพันธ์ของโบรมไดไนทรีลหรือไม่จึงต้องตรวจยืนยันอีกครั้ง นอกจากนั้นการเตรียมตัวอย่างโดยการเติมโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) ปริมาณ 0.1 กรัม ลงใน GC vials โดยตรงเพื่อดึงน้ำออกจากสารละลายตัวอย่างจะต้องระวังไม่ให้ความสูงของสารสูงถึงปลายเข็มที่ใช้ดูดตัวอย่างและจะต้องทำการวิเคราะห์โดยเครื่อง GC ทันที และจากผลการวิเคราะห์ปริมาณโบรมไดไนทรีลโดยใช้ข้าวทั้งเมล็ดและข้าวสารบดละเอียดซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกันแล้วพบว่าปริมาณโบรมไดไนทรีลของตัวอย่างที่บดละเอียดมีค่ามากกว่ากรณีวิเคราะห์ทั้งเมล็ด แสดงว่าขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างโดยทำการบดตัวอย่างก่อนนำมาวิเคราะห์นั้นจะทำให้สามารถสกัดโบรมไดไนทรีลออกมาจากตัวอย่างได้ดี นอกจากนั้นเมื่อนำมาศึกษาการลดลงของปริมาณโบรมไดไนทรีลโดยการล้างน้ำโดยใช้ข้าวสารบดละเอียดเป็นตัวอย่าง เพราะข้าวสารชนิดเม็ดให้ผลการวิเคราะห์ที่ต่ำกว่าความเป็นจริง พบว่าจำนวนครั้งในการล้างข้าวด้วยน้ำนั้นมีความสำคัญมากกว่าปริมาณน้ำที่ใช้ ดังนั้นในการหุงข้าวเพื่อบริโภคควรล้างน้ำหรือที่เรียกว่าขาวน้ำหลายครั้งน่าจะช่วยลดปริมาณสารตกค้างในข้าวได้ และรายงานของ Nakamura ที่พบว่าทำให้สุกด้วยการหุงหรืออบด้วยไอน้ำสามารถลดปริมาณการตกค้างลงได้อีก 41.2% ทำให้การบริโภคข้าวที่สุกแล้วจึงมีความเสี่ยงต่อการได้รับสัมผัสสารโบรมไดไนทรีลลดลง แต่สารโบรมไดไนทรีลที่ตกค้างในข้าวไม่สามารถทำให้ลดลงได้โดยการเปิดภาชนะทิ้งไว้เนื่องจากโบรมไดไนทรีลได้ทำปฏิกิริยาทางเคมีกับเนื้อข้าวสารที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลักโดยไม่สามารถระเหยออกได้

สรุป

วิธีที่พัฒนาขึ้นทั้งแบบ ESTD และ ISTD สามารถตรวจวิเคราะห์โบรมไดไนทรีลที่ตกค้างในข้าวสารได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ของสารดังกล่าวในข้าวสารที่นำมาบริโภคเพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภค รวมถึงสามารถใช้ในการสนับสนุนการตรวจสอบคุณภาพของข้าวสารที่ประเทศไทยส่งออกไปยังต่างประเทศได้ รวมทั้งสามารถใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นวิเคราะห์ตัวอย่างประเภทเมล็ดธัญพืช อาทิ ข้าวโพด ข้าวสาลี ถั่วเมล็ดแห้ง ได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Methyl bromide. In: Bond EJ. Manual of fumigation for insect control. [online]. 1989; [cited 2014 Jul 25]; [8 screens]. Available from: URL: <http://www.fao.org/docrep/X5042E/x5042E08.htm>.
2. Mayr GE. Methyl bromide and ethylene oxide as fumigants. Pure & Appl Chem 1978; 50: 519-23.
3. U.S. Environmental Protection Agency. Pesticide fact sheet number 98: methyl bromide. Washington, DC: U.S. Government Printing Office; 1986.
4. Gehring PJ, Nolan RJ, Watanabe PG, Schumann AM. Solvents fumigants and related compounds. In: Hayes WJ, Laws ER, editors. Handbook of pesticide toxicology. San Diego, CA: Academic Press; 1991. p. 668-671.
5. World Health Organization. Methyl bromide, environmental health criteria, 166. Geneva, Switzerland: WHO; 1995.

6. U.S. Department of Human Health & Human Services. Monohalomethanes: methyl chloride, methyl bromide, methyl iodide. Current intelligence bulletin no. 43. Atlanta, GA: National Institute for Occupational Safety and Health; 1984.
7. Wagner SL. The fumigants. In: Clinical toxicology of agricultural chemicals. Corvallis, OR: Oregon State University, Environmental Health Sciences Center. 1981. p. 284-290.
8. พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535. ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 109 ตอน 39 (วันที่ 6 เมษายน 2535).
9. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 361 (พ.ศ. 2556) เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง. ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 130 ตอนพิเศษ 106 ง (วันที่ 26 สิงหาคม 2556).
10. พิธีสารมอนทรีออลว่าด้วยสารทำลายชั้นบรรยากาศโอโซน. [ออนไลน์]. [สืบค้น 29 พ.ค. 2557]; [7 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <http://www2.diw.go.th/treaty/montreal/พิธีสารมอนทรีออลweb.pdf>.
11. Mapes DA, Shrader SA. Determination of total and inorganic bromide a residues in fumigated products. J Assoc Offic Agr Chem 1957; 40: 189-91.
12. Lindren DL, Gunther FA, Vincent LE. Bromine residues in wheat fumigated with methyl bromide. J Econ Entomol 1962; 55: 773-6.
13. Banks HJ, Desmarchelier JM, Elek JA. Determination of bromide ion content of cereals and other foodstuffs by specific ion electrode. Pestic Sci 1976; 7(6): 595-603.
14. Mitsuhashi T, Adachi K, Kaneda Y. Determination of total bromide in cereals by gas chromatography. J Food Hygienic Society Japan 1987; 28(2): 130-5.
15. บุญไพ สวรรานนท์, พัชรวรรณ จงมีวาสนา และกอบทอง รูปหอม. การวิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์โบรไมด์ในข้าวสารเจ้าและข้าวสารเหนียว. ว กรมวิทย์ พ 2541; 40(2): 171-7.
16. Bromide-containing fumigants S 18. In: Thier HP, Zeumer H, editors. Manual of pesticide residue analysis volume I. Weinheim, NY: VCH; 1987. p. 377-381.
17. Stijve T. Gas chromatographic determination of inorganic bromide residues - a simplified procedure. Dtsch Lebenm Rundsch 1981; 77: 99-101.
18. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
19. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550.
20. Miller JN, Miller JC. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. 4th ed. Harlow, NY: Prentice Hall; 2000.
21. Nakamura Y, Sekiguchi Y, Hasegawa S, Tsumura Y, Tonogai Y, Ito Y. Reductions in postarvest-applied dichlorvos, chlorpyrifos-methyl, malathion, fenitrothion and bromide in rice during storage and cooking processes. J Agric Food Chem 1993; 41(11): 1910-5.

Method Development and Removal of Methyl Bromide Residue Determined as Total Inorganic Bromide in Rice by Gas Chromatographic Technique

Weerawut Wittayanan and Wischada Jongmevasna

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

ABSTRACT Methyl bromide is mainly used as a fumigant for postharvest treatment of plant products. Especially, rice and grains are fumigated to eliminate undesired pests before commercializing. Inorganic bromide is resulted from repeating fumigation of methyl bromide and reacts chemically with some constituents of the material. This study was consequently conducted by using modified Stijve T. method to determine total inorganic bromide in rice. The comminuted ground samples are suspended in an acidified aqueous solution of propylene oxide, with bromide being simultaneously extracted and derivitized into 1-bromopropane-2-ol and 2-bromopropane-1-ol which can be detected by GC- μ ECD. As a result of method validation, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) are 2 and 5 mg/kg, respectively. The accuracy expressed as mean of %recovery by using external standard calibration at 5, 25 and 50 mg/kg were found to be 96.9, 93.4 and 94.3% respectively and those results obtained by using 3-bromopropane-1-ol as the internal standard were also found to be 94.5, 89.2 and 86.9% respectively. The method precision expressed as HORRAT were in the acceptable range which less than 2 in both cases. In addition, the linearity was found to be in the working range of 5-75 mg/kg with Pearson's correlation coefficient (r) = 0.999. The result of the validation study demonstrated that, there was non-significant difference between the result obtained from external and internal standard calibrations at the LOQ (level of confidence=95%, α =0.05). The performance characteristics of this method were fit for intended use according to maximum residue limit established by CODEX and Thai Ministry of Public Health set at 50 mg/kg.

Key words: methyl bromide, inorganic bromide, GC- μ ECD, rice

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงไวรัสโรตา สายพันธุ์วัคซีนเพื่อใช้เป็นไวรัสอ้างอิงสำหรับ การประเมินค่าความแรงของวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียว

ณัฐกานต์ มิ่งงามทรัพย์ สุกัลยาณี ไชยมี ภูริต ทรงธนินิตย์ และสุภาพร ภูมิอมร
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ วัคซีนป้องกันโรคอุจจาระร่วงจากไวรัสโรตา อาจถูกบรรจุเข้าในแผนการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคแห่งชาติในอนาคต เพื่อลดอัตราการตายของทารกและเด็กเล็กที่เกิดจากโรคอุจจาระร่วง จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการควบคุมคุณภาพวัคซีน เพื่อให้แน่ใจในความปลอดภัยและประสิทธิภาพของวัคซีน ในการนี้จำเป็นต้องเตรียมไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียว เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของวัคซีนในห้องปฏิบัติการ ในการศึกษานี้ได้หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวโดยให้ติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของ trypsin ที่แตกต่างกัน และศึกษาการเก็บไวรัสในน้ำเลี้ยงเซลล์และเซลล์ที่ถูกติดเชื้อในสภาวะต่างๆ คือหลังถูกแช่แข็งและละลายจำนวน 1 ครั้ง 2 ครั้ง และ 3 ครั้ง ตามลำดับ เทียบกับการเก็บไวรัสโดยตรงจากน้ำเลี้ยงเซลล์และเซลล์ที่ถูกติดเชื้อเพื่อนำสภาวะที่เหมาะสมมาเตรียมและกำหนดค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียว ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้น $7.5 \mu\text{g/ml}$ trypsin/washing medium ทั้งใน titration medium และ maintenance medium สามารถเพิ่มจำนวนไวรัสโรตาติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 และเก็บไวรัสแบบแช่แข็งและละลายเพียงครั้งเดียวเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเตรียมไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวเนื่องจากให้ค่าความแรงของไวรัสโรตาสูงที่สุด เป็น $7.93 \log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิลิตร กับค่าพิสัยอยู่ในช่วง $7.46-8.40 \log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิลิตร และค่าที่ได้แต่ละค่าจากผู้วิเคราะห์ 3 ราย มีความแตกต่างไม่เกิน $0.5 \log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิลิตร จึงสรุปได้ว่าไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการนี้สามารถนำมาใช้เป็นไวรัสอ้างอิงในการควบคุมคุณภาพวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียว

บทนำ

วัคซีนป้องกันโรคอุจจาระร่วงโรตา หรือวัคซีนไวรัสโรตา (Rotavirus vaccine) ได้ขึ้นทะเบียนในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548⁽¹⁾ วัคซีนนี้เป็นไวรัสโรตาเชื้อเป็นชนิดรับประทาน สามารถให้โดยการหยอดกินทางปาก วัคซีนไวรัสโรตาที่ใช้ในประเทศและทั่วโลกอย่างแพร่หลายมี 2 ชนิด คือ Monovalent human rotavirus vaccine สายพันธุ์ P1A [8]G1 เป็นวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยว และ Multivalent human-bovine rotavirus reassortant vaccine ซึ่งเป็นวัคซีนไวรัสโรตาต่อหลายซีโรทัยป์เนื่องจากเป็นไวรัสลูกผสม (reassortant) ที่มีโปรตีนชั้นนอก G1, G2, G3 และ G4 ที่ได้จากไวรัสโรตาของคน และ P protein ชนิด P7 [5] ได้จากไวรัสโรตาของวัว⁽¹⁾ เมื่อปี พ.ศ. 2553 ประเทศไทยได้ทดลองให้วัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยว (monovalent vaccine) ในเด็กอายุต่ำกว่า 6 เดือน จำนวน 15,000 คน ในระยะเวลา 3 ปี โดยมีจังหวัดสุโขทัยเป็นจังหวัดนำร่อง ขณะนี้ยังไม่ทราบผลการทดลอง หากผลการให้วัคซีนเป็นที่น่าพอใจ คาดว่าในปี พ.ศ. 2558 จะบรรจุวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวเข้าในแผนการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคแห่งชาติ เพื่อลดอัตราการป่วยของเด็กไทยจากโรคอุจจาระร่วงซึ่งสูงถึงปีละกว่า 1 แสนราย⁽²⁾ และมีความเป็นไปได้ที่จะมีการนำวัคซีนไวรัสโรตามาใช้ในอนาคตอันใกล้นี้ ดังนั้นการควบคุมคุณภาพวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวทุก lot ที่นำเข้ามาใช้ในประเทศจึงมีความสำคัญ⁽³⁾ โดยเฉพาะค่าความแรงของวัคซีนเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อประสิทธิภาพของวัคซีน และวัคซีนแต่ละชนิดมีการกำหนดค่าความแรงที่แตกต่างกัน ซึ่งการทดสอบค่าความแรงของวัคซีนทุกชนิดต้องดำเนินการควบคุมไปกับวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานทุกครั้ง ซึ่งอาจใช้วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสากลที่องค์การอนามัยโลกผลิต⁽⁴⁾ แต่เนื่องจากวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสากลสำหรับวัคซีนโรตานั้นยังไม่มีการผลิต จึงเป็นหน้าที่ของหน่วยควบคุมกำกับภาครัฐในแต่ละประเทศต้องจัดหาหรือจัดเตรียมขึ้น เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพวัคซีนดังกล่าวในห้องปฏิบัติการ การศึกษานี้ได้ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไวรัสอ้างอิงสำหรับวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวโดยการเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงจากการทบทุนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อของไวรัสโรตาในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าต้องอาศัย trypsin ช่วยกระตุ้นในการติดเชื้อ⁽⁵⁻⁷⁾ จึงได้ทดลองให้ไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณความเข้มข้นของ trypsin ที่แตกต่างกัน รวมทั้งศึกษาการเก็บไวรัสในน้ำเลี้ยงเซลล์และเซลล์ที่ติดเชื้อในสภาวะต่างๆ หลังถูกแช่แข็งและละลายจำนวน 1 ครั้ง 2 ครั้ง และ 3 ครั้ง เทียบกับการเก็บไวรัสโดยตรงจากน้ำเลี้ยงเซลล์ แล้วจึงทำการจัดเตรียมไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวและทำการกำหนดค่าความแรงขึ้น เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวในห้องปฏิบัติการต่อไป

วัสดุและวิธีการ

วัคซีน

นำวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวจากผู้ผลิตที่นำเข้ามาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งผู้ผลิตกำหนดค่าความแรงของวัคซีนโรตาต้องไม่น้อยกว่า $6 \log_{10} \text{CCID}_{50}/\text{dose}/1.5$ มิลลิลิตร

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยง MA104 (CCT WLB1998/12cell bank) ซึ่งมีกำเนิดจาก African green monkey foetal kidney ซึ่งมีความจำเพาะต่อไวรัสโรตา⁽⁸⁾ ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ผลิต

แอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดี 2C9 ซึ่งมีความจำเพาะต่อแอนติเจนของไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียวสำหรับใช้ในการย้อมเซลล์ติดเชื้อโดยใช้เทคนิค immunoperoxidasestaining⁽³⁾ ได้รับความเอื้อเฟื้อจากผู้ผลิต

อาหารเลี้ยงเซลล์

อาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Minimum (DMEM) (Cat. No.31660-026, Gibco) ที่มี 2% ซีรัมจากลูกวัว (fetal bovine serum, Cat. No. 26140-079, Gibco), 1% L-glutamine (Cat.No. G-3126, Sigma), 7.5% NaHCO₃ (Cat.No.S-5716, Sigma) 3%, 1% Penicillin (10,000 units/มิลลิลิตร) (Cat.No.P-3032, Sigma) 1% Streptomycin (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) (Cat.No.S-9137, Sigma) และ 1% 1M HEPES (Cat.No.H-6147, Sigma)

น้ำยาเพื่อใช้ล้างเซลล์ในการทดสอบ (washing medium) เตรียมโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีส่วนผสมของซีรัมจากลูกวัว

อาหารเลี้ยงเชื้อไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียว (virus growth medium/titration medium)

อาหารเลี้ยงเชื้อไวรัสโรตา (titration medium) เตรียมโดยเติม trypsin (Cat.No.27250-018, Gibco) ความเข้มข้นต่างๆ กันลงไปใน washing medium ใช้ในช่วงการกระตุ้นไวรัสและให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์

อาหารเลี้ยงเชื้อไวรัสโรตา (maintenance medium) ใช้ในช่วงของการบ่มเพื่อเพิ่มจำนวนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียว

ผลของ trypsin ต่อการเพิ่มจำนวนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียวในเซลล์เพาะเลี้ยง

นำวัคซีนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียวมาเจือจางใน titration medium อัตราส่วน 1:1 บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 50-60 นาที เป็นการกระตุ้นไวรัสโรตา จากนั้นเติมลงในฟลาस्कที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 เจริญอยู่ 80-95% ปริมาตร 1 มล./ฟลาस्क 175 cm² อัตราส่วนของไวรัสต่อเซลล์เป็น 0.01 โดยประมาณ บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมงเพื่อให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์ ในขั้นตอนนี้ titration medium ที่ใช้จะมีความเข้มข้นของ trypsin แตกต่างกันไปเป็น 3 สภาวะ ดังนี้ 7.5 µg/ml trypsin/washing medium, 0.75 µg/ml trypsin/washing medium และ 0.375 µg/ml trypsin/washing medium เมื่อครบเวลาเติม maintenance medium ปริมาตร 10-15 มล. แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5% CO₂ นาน 4 วัน ขั้นตอนนี้ maintenance medium ที่ใช้มี 3 สภาวะ คือ titration medium, washing medium ที่เติม 1% ของซีรัมจากลูกวัว และ washing medium เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียว

การเก็บไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียวในสภาวะต่างๆ

หลังการเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์นาน 4 วัน จะเกิดการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงประมาณ 80-90% เก็บ (harvest) ไวรัสใน 4 สภาวะ คือ 1) เก็บไวรัสจากเซลล์เพาะเลี้ยง โดยดูดทั้ง maintenance medium และเซลล์ที่ติดเชื้อจากฟลาस्कไปปั่นที่ 3,000 รอบ นาน 10 นาที และเก็บส่วนใสที่มีไวรัสไว้ 2) เก็บไวรัสหลังการแช่แข็งและละลาย (freeze-thaw) 1 ครั้ง ทำโดยการนำฟลาस्कที่ติดเชื้อไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส นาน 1 วันแล้วนำมาละลาย 1 ครั้ง (1F-T) ดูดทั้ง maintenance medium และเซลล์ที่ติดเชื้อไปปั่นที่ 3,000 รอบ นาน 10 นาที และเก็บส่วนใสที่มีไวรัสไว้ 3) เก็บไวรัสหลังการแช่แข็งและละลาย 2 ครั้ง โดยทำเหมือนข้อ 2) แต่นำฟลาस्कที่ติดเชื้อไวรัสไปแช่แข็งและนำมาละลายจำนวน 2 ครั้ง (2 F-T) 4) เก็บไวรัสหลังการเก็บแช่แข็งและละลาย 3 ครั้ง โดยทำเหมือน

ข้อ 2) แต่นำพลาสติกที่ติดเชื้อไวรัสไปแช่แข็งและนำมาละลายจำนวน 3 ครั้ง (3F-T) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียว

การประเมินค่าความแรงของไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียว

เลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 จำนวน 2.0×10^5 เซลล์ในปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรในเพลทชนิด 96 หลุม นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์จากนั้นนำวัคซีนตัวอย่างที่มีเชื้อไวรัสโรตาอ่อนฤทธิ์มากระตุ้นด้วย trypsin ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยเจือจางไวรัสเป็น 1:10 ใน titration medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 50-60 นาที ในสภาวะที่มี trypsin จากนั้นเจือจางไวรัสแต่ละชั้นเป็น 1:10^{0.5} โดยเริ่มที่ระดับความเจือจาง 10^{-3.0} - 10^{-7.5} ด้วย titration medium โดยก่อนเติมวัคซีนตัวอย่างในแต่ละความเจือจาง ล้างเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 ในเพลท 96 หลุม ด้วย washing medium ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร/หลุม 2 ครั้ง เพื่อเอาซีรัมที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เนื่องจากซีรัมจะหยุดการทำงานของ trypsin จากนั้นดูด washing medium ออกประมาณ 0.18 มิลลิลิตร ก่อนเติมวัคซีนตัวอย่างในแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/หลุม ความเจือจางละ 8 หลุม นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์นาน 6 วัน จากนั้นล้างเพลทด้วย washing medium ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร/หลุม จำนวน 1 ครั้งแล้ว fix เซลล์ด้วย 80% acetone ที่แช่เย็นทิ้งให้เพลทแห้ง จากนั้นย้อมหาปริมาณแอนติเจนของ rotavirus ด้วยวิธีimmunoperoxidasestaining⁽⁹⁾ โดยเติม monoclonal antibody 2C9 ที่เจือจาง 250 เท่า ด้วย 5% skimmed milk (Cat.No.70166, Fluka) ใน PBS- ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/หลุมลงในเพลท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมงจากนั้นล้างเพลท 4 ครั้งด้วย PBS- และเติม anti-mouse IgG-peroxidase (Cat. No. 12-349, Millipore) ที่เจือจาง 400 เท่า ซึ่งได้จากการหาค่าความเจือจางที่เหมาะสมโดยใช้ 5% skimmed milk (Cat. No.70166, Fluka) ใน PBS- ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงจากนั้นล้างเพลท 4 ครั้งด้วย PBS- ก่อนเติม 0.05 มิลลิลิตร/หลุมของสารละลายที่มี 3,3'-Diaminobenzidine tablet (DAB) และ urea hydrogen peroxide tablet อย่างละ 1 เม็ด (Cat. No. D4418, Sigma) ในน้ำกลั่นปริมาตร 15 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที และล้าง 3 ครั้ง ด้วยน้ำประปา อ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยนับจำนวนหลุมที่มีเซลล์ติดสีน้ำตาล ซึ่งเกิดจากการที่เซลล์ติดเชื้อไวรัสโรตา นำจำนวนหลุมที่ให้ผลบวกมาคำนวณหาค่าความแรงหรือปริมาณไวรัสโรตาทั้งหมด มีหน่วยเป็น Cell culture infective dose 50% (CCID₅₀) 1.5 มิลลิลิตร

การกำหนดค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวที่เตรียมขึ้น

ประเมินค่าความแรงของไวรัสอ้างอิงมาตรฐานไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดียวที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้เป็น in-house reference standard โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ โดยผู้ปฏิบัติงาน 3 ราย

การคำนวณค่าความแรง

คำนวณค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ โดยใช้สูตรที่ดัดแปลงมาจาก Kaber⁽¹⁰⁾ ดังนี้

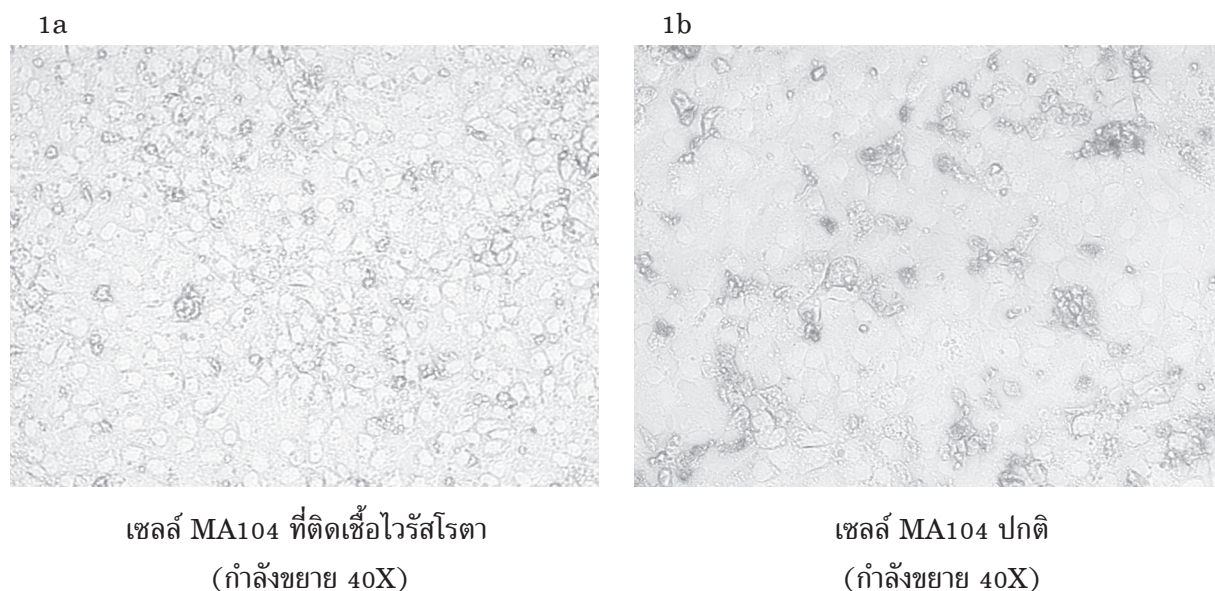
$$\text{Log}_{10}\text{CCID}_{50} = - \text{ส่วนกลับของความเจือจางต่ำสุดที่ใช้} + \left[\frac{\left[\sum \text{จำนวนหลุมทั้งหมดที่มี CPE} - 0.5 \right] \times 0.5}{\text{จำนวนหลุมในแต่ละความเจือจาง}} \right]$$

คำนวณค่าความแรงที่ได้ในรูปของ CCID₅₀/50 ไมโครลิตรและรายงานผลเป็น CCID₅₀/โดส/1.5 มิลลิตร ค่าความแรงที่ได้ในแต่ละครั้งที่ทดสอบต้องมีความแตกต่างกันไม่เกิน 0.5 log₁₀CCID₅₀

ผล

ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงหลังการติดเชื้อด้วยไวรัสโรตาสายพันธุ์วักชินซีโรทัยป์เดียว

ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 หลังการติดเชื้อไวรัสโรตาสายพันธุ์วักชินซีโรทัยป์เดียว โดยสังเกตเห็นเซลล์เริ่มมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปที่เรียกว่า cytopathic effect (CPE) หลังการติดเชื้อนาน 4 วัน เมื่อย้อมสัด้วยวิธี immunoperoxidase จะเห็นสีน้ำตาลภายในเซลล์ (ภาพที่ 1 a) ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะไม่เห็นในเซลล์ควบคุม (ภาพที่ 1 b) ที่ไม่ติดเชื้อที่กำลังขยาย 40x



ภาพที่ 1 ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 ภายหลังการติดเชื้อไวรัสโรตาสายพันธุ์วักชินซีโรทัยป์เดียว (1a) เทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 ปกติ (1b)

ผลของ **trypsin** ต่อการเพิ่มจำนวนไวรัสโรตาสายพันธุ์วักชินซีโรทัยป์เดียวในเซลล์เพาะเลี้ยง

จากผลการศึกษาพบว่าการใช้ trypsin ที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 7.5 µg/ml trypsin/ washing medium ในช่วงการให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์โดย titration medium และช่วงการเพิ่มจำนวนไวรัสโดย maintenancemedium ให้ปริมาณไวรัสสูงที่สุดคือ 6.86 log₁₀CCID₅₀/1.5 มิลลิตร ในขณะที่ปริมาณไวรัสลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้น trypsin ที่ 0.75 µg/ml trypsin/washing medium (4.05 log₁₀CCID₅₀/1.5 มิลลิตร) และ 0.375 µg/ml trypsin/washing medium (3.86 log₁₀CCID₅₀/1.5 มิลลิตร) ในสภาวะที่ 7.5 µg/ml trypsin/washing medium แต่ในอาหาร maintenancemedium เป็น washing medium ที่เติม 1% ของซีรัม และ washing medium จะให้ปริมาณไวรัสเท่ากับ 3.93 และ 4.30 log₁₀CCID₅₀/1.5 มิลลิตร ซึ่งไม่แตกต่างจากการใช้ที่ 0.75 µg/ml trypsin/washing medium และ 0.375 µg/ml trypsin/washing medium ในอาหาร maintenancemedium เป็น washing medium ที่เติม 1% ของซีรัม และ washing medium คือ 4.05, 3.80, 4.55 และ 4.24 log₁₀CCID₅₀/1.5 มิลลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลของ trypsin ต่อการเพิ่มจำนวนไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวในเซลล์เพาะเลี้ยง

Titration medium	สถานะของอาหาร Maintenance medium	ค่าเฉลี่ยของ virus titer (log ₁₀ CCID ₅₀ /1.5 ml)
7.5 µg/mltrypsin/ washing medium	7.5 µg/mltrypsin/washing medium	6.86
	washing medium+ 1% FBS	3.93
	washing medium	4.3
0.75 µg/mltrypsin/ washing medium	0.75 µg/mltrypsin/washing medium	4.05
	washing medium+ 1% FBS	4.05
	washing medium	3.8
0.375 µg/mltrypsin/ washing medium	0.375 µg/mltrypsin/ washing medium	3.86
	washing medium+ 1% FBS	4.55
	washing medium	4.24

การเปรียบเทียบปริมาณไวรัสจากการเก็บไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวในสถานะต่าง ๆ

จากการเพิ่มจำนวนไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวในเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 ในสถานะที่ความเข้มข้น trypsin เป็น 0.75 µg/ml trypsin/washing medium และเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีไวรัสโดยวิธีที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบ คือ 1) เก็บโดยตรง 2) 1F-T 3) 2F-T และ 4) 3F-T ผลการทดลองพบว่าในสถานะการทดลอง 3 ซ้ำที่เป็นอิสระแก่กันโดยผู้วิเคราะห์ 3 ราย การเก็บไวรัส โดยตรงให้ค่าปริมาณไวรัสเฉลี่ยเท่ากับ 6.68 log₁₀CCID₅₀/1.5 มิลลิตร ซึ่งต่ำกว่าปริมาณไวรัสที่ได้จากการเก็บโดยวิธี 1F-T และวิธี 3F-T ที่ให้ปริมาณไวรัสเฉลี่ยเท่ากัน คือ 6.97 log₁₀CCID₅₀/1.5 มิลลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดย One-Way ANOVA (p < 0.05) เช่นเดียวกับปริมาณไวรัสที่เก็บโดยวิธี 2F-T คือ 106.47 CCID₅₀/1.5 ml (p < 0.05) และการเก็บโดยวิธี 2F-T ให้ค่าความแรงที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการจัดเก็บไวรัสโดยวิธี 1F-T และวิธี 3F-T (p < 0.05) การเก็บโดยวิธี 1F-T และวิธี 3F-T ให้ปริมาณไวรัสเฉลี่ยมากที่สุด ดังนั้นเพื่อลดเวลาการเก็บวัคซีนไวรัสลงจะใช้วิธี 1F-T มาเตรียมไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวอ้างอิงเพื่อนำมาใช้เป็น in-house reference standard ในห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบปริมาณไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดียวจากการเก็บไวรัสในสถานะต่าง ๆ

สถานะการจัดเก็บไวรัส	virus titer (log ₁₀ CCID ₅₀ /1.5 ml)			
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	การทดลองที่ 3	G.M.
เก็บโดยตรง	6.74	6.68	6.61	6.68
1F-T *	6.99	6.8	7.11	6.97
2F-T	6.49	6.49	6.43	6.47
3F-T *	7.05	6.99	6.86	6.97

การเก็บไวรัสหลังการแช่แข็งและละลาย (freeze-thaw) 1 ครั้ง 1F-T* และเก็บไวรัสหลังการแช่แข็งและละลาย (freeze-thaw) 3 ครั้ง 3F-T* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดย One-Way ANOVA (p>0.05)

การกำหนดค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ

เมื่อนำไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้เป็นไวรัสอ้างอิงในห้องปฏิบัติการ (in-house reference) มาหาค่าความแรงโดยผู้ปฏิบัติ 3 ราย ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ จำนวน 2 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน ค่าความแรงเฉลี่ยของวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานที่เตรียมในห้องปฏิบัติการจากผู้ปฏิบัติ 3 ราย เท่ากับ 8.03, 7.86 และ 7.88 $\log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5 \text{ ml}$ ($n = 3$) โดยมีค่าความแรงรวมเฉลี่ย ($n = 18$) เท่ากับ 7.93 $\log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิตร เมื่อนำมาหาค่าพิสัย (G.M. $\pm$ 3SD) มีค่าเท่ากับ 7.46- 8.40 $\log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิตร (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การกำหนดค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่เตรียมขึ้น

ค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่เตรียมขึ้น ในห้องปฏิบัติการ โดยผู้สอบเทียบ 3 ราย ($\log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5 \text{ ml}$)		
รายชื่อ 1 ($n = 6$)	รายชื่อ 2 ($n = 6$)	รายชื่อ 3 ($n = 6$)
8.05, 7.99, 8.11	7.74, 8.05, 7.80	7.74, 7.93, 7.68
8.11, 7.99, 7.93	8.05, 7.86, 7.68	7.99, 8.18, 7.80
G.M. = 8.03	G.M. = 7.86	G.M. = 7.88
SD = 0.07	SD = 0.16	SD = 0.18
G.M. รวม = 7.93		
SD รวม = 0.16		
G.M. $\pm$ 3SD = 7.46- 8.40		

วิจารณ์

ไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวจะทำให้เซลล์ MA104 เกิด CPE ในระยะเวลา 4-6 วัน ซึ่งสามารถพิสูจน์ได้เมื่อย้อมหาแอนติเจนของไวรัสที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสด้วยวิธี immunoperoxidase จากการทบทวนวรรณกรรมไวรัสโรตาจะติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ดีต้องอาศัย trypsin ในการช่วยให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายขึ้น⁽⁵⁻⁷⁾ จึงทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้น trypsin พบว่าการใช้ 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trypsin/washing medium ทั้งใน titration medium และ maintenance medium ได้ค่าปริมาณไวรัสสูงสุด 6.86 $\log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิตร ส่วนที่สภาวะอื่นๆ ที่ลดความเข้มข้น trypsin ลง 10 และ 20 เท่า (0.75 μg , 0.375 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trypsin) ทั้งใน titration medium และ maintenance medium ปริมาณไวรัสที่ได้จะลดลงและมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าความเข้มข้น trypsin มีส่วนสำคัญมากในการส่งเสริมการเพิ่มจำนวนไวรัสโรตาในการทดลองนี้จึงใช้ 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trypsin/washing medium เป็นสภาวะเหมาะสมของอาหารที่ใช้เพิ่มจำนวนไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวในเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 สอดคล้องกับที่มีการศึกษามาก่อนคือใช้ความเข้มข้น trypsin ระหว่าง 1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ⁽⁵⁻⁷⁾

วิธีการจัดเก็บไวรัสก็เป็นวิธีหนึ่งในการเพิ่มปริมาณไวรัสให้มากขึ้นการศึกษานี้ได้ทดลองหาสภาวะการเก็บไวรัสโรตาซีโรทัยป์เดี่ยวที่เหมาะสมใน 4 สภาวะ ผลการทดสอบพบว่าวิธีการเก็บโดยการแช่แข็งและละลายเพียง 1 ครั้ง ก็เพียงพอต่อการเก็บไวรัสโรตาอีกทั้งยังประหยัดเวลา โดยให้ปริมาณไวรัสสูงสุดเท่ากับการแช่แข็งและละลาย 3 ครั้ง ซึ่งโดยทั่วไปการเก็บไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงมักเก็บโดยการแช่แข็งและละลายอย่างน้อย 3 ครั้ง เนื่องจากเป็นวิธีเก็บที่ให้ปริมาณไวรัสเพิ่มขึ้นจากเดิมที่เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์โดยตรง⁽⁵⁾

การกำหนดค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่จัดเตรียมขึ้น พบว่าไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่จัดเตรียมขึ้นในสภาวะที่เหมาะสมในการติดเชื้อไวรัสโรตาในเซลล์โดยใช้ความเข้มข้น 7.5 $\mu\text{g/ml}$ trypsin/washing medium และจัดเก็บไวรัสโดยวิธีแช่แข็งและละลาย 1 ครั้ง พบว่าไวรัสที่ได้มีค่าความแรงเฉลี่ยสูงถึง 7.93 $\log_{10}\text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิลิตร โดยมีค่าพิสัยอยู่ระหว่าง 7.46– 8.40 $\log_{10}\text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิลิตร นอกจากนี้ค่าที่ได้แต่ละค่ามีความแตกต่างของผลการทดสอบในแต่ละคนไม่เกิน 0.5 $\log_{10}\text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานสากลที่ยอมรับผลการทดสอบว่าไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละครั้งที่ทำการทดสอบ⁽¹¹⁾ จึงสรุปว่าช่วงค่าความแรงที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่จัดเตรียมขึ้นโดยกำหนดว่า เมื่อใดที่ทำการทดสอบวัคซีนตัวอย่างแต่ละครั้ง ค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวอ้างอิงจะต้องอยู่ในช่วงค่าที่กำหนดทุกครั้ง หากไม่อยู่ในช่วงค่าที่กำหนดจะถือว่าผลการทดสอบในครั้งนั้นไม่ผ่านการทดสอบค่าความแรงจะต้องมีการทดสอบซ้ำ นอกจากนี้ค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่เตรียมขึ้นเองสูงกว่าค่ามาตรฐานที่ WHO กำหนดคือวัคซีนตัวอย่างต้องมีค่าความแรงไม่น้อยกว่า 6 $\log_{10}\text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิลิตร โดยไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่เตรียมขึ้นจะนำมาใช้ทดสอบควบคุมไปกับวัคซีนตัวอย่างทุกครั้ง จึงควรมีองค์ประกอบของสารสำคัญที่ใกล้เคียงกัน เพื่อยืนยันผลการทดสอบในแต่ละครั้งว่าให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง และน่าเชื่อถือ การศึกษานี้ไม่สามารถระบุได้ว่าไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการมีความคงตัว (stability) มากน้อยเพียงใด ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไป รวมทั้งการหาวิธีจัดเตรียมไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวในรูปผงแห้งเพื่อให้มีความคงตัวมากขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเก็บไว้ใช้เป็นระยะเวลานานๆ อย่างไรก็ตาม การจัดเตรียมไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวในรูปของเหลวนี้ จัดเก็บเป็นหลอดบรรจุไว้ใช้เพียงพอในแต่ละครั้งที่ทำการทดสอบ เพื่อป้องกันการลดลงของไวรัสในขณะเดียวกันจะมีการประเมินค่าความแรงของวัคซีนตัวอย่างเป็นระยะๆ และศึกษาแนวโน้มการใช้ไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่จัดเตรียมขึ้นตามคำแนะนำของ WHO

สรุป

วัคซีนไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยว กำลังจะถูกนำมาใช้ในแผนสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคในเด็กของประเทศไทย ทำให้การควบคุมคุณภาพวัคซีนไวรัสโรตาของประเทศจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น การจัดเตรียมและกำหนดค่าความแรงของไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวจึงมีความสำคัญในห้องปฏิบัติการ การศึกษานี้ได้เตรียมไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวขึ้นโดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงพร้อมวิธีการเก็บไวรัสเพื่อให้ได้ปริมาณไวรัสที่มากและเพียงพอต่อการนำไปใช้ในระยะเวลา 3–5 ปี จากการศึกษาพบว่าไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวเพิ่มจำนวนได้ดีในเซลล์เพาะเลี้ยง MA104 ในสภาวะที่มีความเข้มข้น 7.5 $\mu\text{g/ml}$ trypsin/washing medium ซึ่งให้ค่าความแรงสูงสุดเมื่อเทียบกับสภาวะอื่นๆ ที่มีความเข้มข้น trypsin น้อยกว่า นอกจากนี้การเก็บไวรัสโดยการแช่แข็งและละลาย 1 ครั้ง เพียงพอและเหมาะสมสำหรับการเก็บไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวเมื่อตรวจสอบค่าความแรงที่ได้ พบว่าไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่เตรียมได้ค่าความแรงเฉลี่ยสูงเท่ากับ 7.93 $\log_{10}\text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิลิตร โดยมีค่าพิสัยในช่วง 7.46– 8.40 $\log_{10}\text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิลิตร ซึ่งค่าที่ได้แต่ละค่ามีความแตกต่างไม่เกิน 0.5 $\log_{10}\text{CCID}_{50}/1.5$ มิลลิลิตร จึงสรุปได้ว่าไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการสามารถนำมาใช้เป็นไวรัสอ้างอิงในการควบคุมคุณภาพค่าความแรงของวัคซีนไวรัสโรตาสายพันธุ์วัคซีนซีโรทัยป์เดี่ยวได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันชีววัตถุ นางธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์ ที่ให้การสนับสนุน คำปรึกษา และแนะนำ ทำให้ผลงานวิจัยนี้สำเร็จลงได้

เอกสารอ้างอิง

1. วิชัย สันติมาลีวรกุล และทศวรรณ จิตรวคินกุล. วัคซีนโรตาไวรัส : การพัฒนาและการนำมาใช้ทางคลินิก. ไทยโกซ์ชยนิพนธ์ 2550; 4(1): 1-12.
2. สำนักสารนิเทศ สำนักงานปลัดกระทรวง. หมอสุรวิทย์ เผย สธ. เตรียมบรรจุวัคซีน “ไวรัสโรตา” เข้าแผนสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคแห่งชาติปี 2558 [cited 2014 Feb 4]; Available from: URL: http://www.moph.go.th/ops/iprg/include/admin_hotnew/show_hotnew.php?idHot_new=49880.
3. World Health Organization. Rotavirus vaccines WHO position paper – January 2013. Weekly Epidemiological Record (WER) 2013; 88(5): 49-64.
4. World Health Organization. Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards. WHO Technical Report Series No. 932, 2006.
5. Twist EM, Kolonich K, Rubin DH. Propagation of rotaviruses in the presence of chicken serum. J Gen Virol 1984; 65(Pt 7): 1207-10.
6. Almeida JD, Hall T, Banatvala JE, Totterdell BM, Chrystie IL. The effect of trypsin on the growth of rotavirus. J Gen Virol 1978; 40(1): 213-8.
7. Clark SM, Roth JR, Clark ML, Barnett BB, Spendlove RS. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. J Virol 1981; 39(3): 816-22.
8. วันดี วราวิทย์ และอัจฉริย์ อินทุโสมา. Rotavirus vaccine. กรุงเทพฯ: หน้า 28-33.
9. Martin J. Evaluating cell-line sensitivity. In: World Health Organization. Polio laboratory manual. 4th ed. Geneva, Switzerland: WHO; 2004. p. 73-80.
10. World Health Organization. Manual of laboratory methods for testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization (EPI). Geneva: WHO; 2001.

Optimal Conditions for Propagation of Rotavirus Monovalent Vaccine Strain to use as a Reference rotavirus for Evaluation of Potency Values of Monovalent Rotavirus Vaccine

**Natthakarn Mingngamsup Sukanlayanee Chaimee Bhurit Songthanant
and Supaporn Phumiamorn**

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

ABSTRACT Rotavirus vaccine will be introduced to National Immunization Program in the future to reduce child mortality in Thailand caused a severe diarrhea in infants and children. Quality control of the vaccine to ensure the safety and effectiveness of rotavirus vaccine will be increased as well. Therefore, it is necessary to prepare rotavirus monovalent vaccine strain for using in quality control laboratory. This study was to determine optimal conditions for preparation of rotavirus monovalent vaccine strain infected cell culture in the presence of various concentrations of trypsin and to study harvesting virus in culture fluid in various conditions after freeze-thaw cycle 1 time, 2 times and 3 times, respectively comparing with harvesting viral vaccine directly from culture supernatant. Optimal conditions were used for the preparation of rotavirus monovalent vaccine strain that would be assigned with the potency values. The result showed that use of trypsin could enhance rotavirus quantity in MA104 cells. Trypsin at 7.5 µg/ml trypsin/washing medium both in the titration medium and the maintenance medium and harvesting virus with 1F-T method were optimal conditions for preparation of rotavirus vaccine due to a highest potency values. When optimal conditions used for preparation of rotavirus monovalent vaccine strain, it was found that the geometric mean was $7.93 \log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5 \text{ ml}$ with the range between $7.46-8.40 \log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5 \text{ ml}$. Each individual value from three analysts was not more than $0.5 \log_{10} \text{CCID}_{50}/1.5 \text{ ml}$. It can be concluded that rotavirus monovalent vaccine strain prepared in the laboratory can be used as a reference rotavirus for quality control of monovalent rotavirus vaccine potency.

Key words: Rotavirus vaccine, potency

การถ่ายโอนและการตรวจสอบความถูกต้องของ วิธีวิเคราะห์เพรดนิโซโลนในยาเม็ด โดยวิธี UPLC

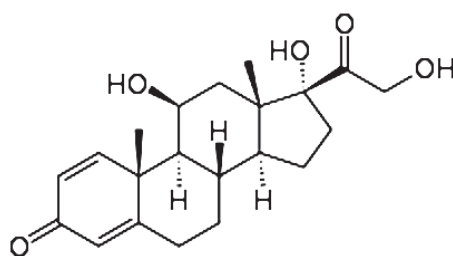
สุภาวดี สุรางค์กุล สิริลักษณ์ สายหล่อ และสมศักดิ์ สุนทรพาณิชย์
สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การถ่ายโอนและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพรดนิโซโลนในยาเม็ดด้วยวิธีอัลตราเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโทกราฟีโดยใช้คอลัมน์ ZORBAX Eclipse Plus C18 ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยมีส่วนผสมของเมธานอลและน้ำในอัตราส่วน 55:45 โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่าการทดสอบความจำเพาะของวิธีไม่พบ การรบกวนของสารละลายตัวที่ถูกเร่งให้สลายตัวภายใต้สภาวะต่างๆ เช่น กรด ด่าง ความร้อน ไฮโดรไลซิส ออกซิเดชัน และแสง พบความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.15-0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 การทดสอบความแม่นยำของวิธีพบค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยที่ 3 ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 100.5 และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับร้อยละ 1.2 การทดสอบความเที่ยง พบว่าการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 6 ซ้ำภายในวันเดียวกัน การวิเคราะห์ตัวอย่างเมื่อเปลี่ยนวันที่วิเคราะห์และเปลี่ยนนักวิเคราะห์ มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับร้อยละ 0.7, 0.6 และ 0.7 ตามลำดับ วิธีวิเคราะห์มีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะการทดสอบต่างๆ คือ การเปลี่ยนคอลัมน์ อุณหภูมิคอลัมน์ สัดส่วนและอัตราการไหลของสารละลายตัวพา โดยไม่มีผลกระทบต่อความเหมาะสมของระบบและปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ เมื่อ เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์นี้กับวิธีที่ระบุไว้ในเภสัชตำรับของประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศอังกฤษ พบว่าวิธีนี้สามารถตรวจ วิเคราะห์ได้รวดเร็วกว่า ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ปริมาณเพรดนิโซโลนในยาเม็ดโดยวิธี UPLC นี้ จึงมีความถูกต้อง แม่นยำ และให้ ผลวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ สามารถนำไปใช้เป็นวิธีทางเลือกอีกวิธีหนึ่งในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในยาเม็ดได้

บทนำ

เพรดนิโซโลน (Prednisolone) เป็นสารสังเคราะห์กลุ่ม Glucocorticoid นำมาใช้ทางการแพทย์ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยยับยั้งการเคลื่อนตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Polymorphonuclear Leukocytes ที่ผ่านมาทางหลอดเลือดฝอยหรือใช้กีดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยลดการผลิตและการทำงานของเม็ดเลือดขาว ชนิด lymphocytes และ eosinophils^(1, 2) เพรดนิโซโลนจัดเป็นยาควบคุมพิเศษ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ยาควบคุมพิเศษ⁽³⁾ ตามข้อ 3 ลำดับที่ 34 ต้องมีแพทย์เป็นผู้สั่งจ่าย ไม่สามารถซื้อหาได้เองตามร้านขายยาทั่วไป เพรดนิโซโลนที่มีใช้ในโรงพยาบาลมีทั้งรูปแบบยาเม็ดและยาแคปซูล ปัจจุบันมีเพรดนิโซโลนในรูปแบบยาเม็ดที่ขึ้นทะเบียนตำรับทั้งสิ้น 126 ตำรับ จำแนกเป็นผลิตในประเทศ 125 ตำรับและนำเข้า 1 ตำรับ⁽⁴⁾

เพรดนิโซโลนมีลักษณะเป็นผงสีขาว ละลายในน้ำ (1:1300) เอทานอล (1:30) คลอโรฟอร์ม (1:180) มีชื่อทางเคมีคือ (11 β)-11, 17, 21-trihydroxypregna-1, 4-diene-3, 20-dione มีสูตรโมเลกุล คือ C₂₁H₂₈O₅ น้ำหนักโมเลกุล 360.4 และมีสูตรโครงสร้างทางเคมี (ภาพที่ 1)⁽⁵⁾



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของเพรดนิโซโลน

การวิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในยาเม็ดที่ระบุไว้ในเภสัชตำรับของประเทศสหรัฐอเมริกา (USP36) ใช้ normal phase HPLC และใช้ Butyl chloride, Water-saturated Butyl chloride, Tetrahydrofuran, Methanol และ Glacial acetic acid ในอัตราส่วน 95:95:14:7 เป็นสารละลายตัวพา ซึ่งมีส่วนผสมของ chlorinated hydrocarbon ซึ่งมีอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ส่วนวิธีวิเคราะห์ตามเภสัชตำรับของประเทศอังกฤษ (BP 2013) ใช้ reverse-phase HPLC โดยมีเมทานอลและน้ำ ในอัตราส่วน 42:58 เป็นสารละลายตัวพา^(6, 7) เนื่องจากในปัจจุบันเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์มีการพัฒนาเพื่อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นคือ Ultra Performance Liquid Chromatography: UPLC ซึ่งเป็นระบบที่สามารถทนแรงดันได้มากกว่า High Performance Liquid Chromatography: HPLC จึงสามารถใช้กับคอลัมน์ที่มีขนาดอนุภาคเล็กกว่าและความยาวสั้นลง ทำให้ประสิทธิภาพในการแยกสารเพิ่มขึ้น ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นลงและสิ้นเปลืองสารเคมีน้อยลงอีกด้วย โดยเมื่อวิเคราะห์เพรดนิโซโลนด้วยวิธี UPLC พบพีคของเพรดนิโซโลนที่เวลาประมาณ 3.4 นาที ส่วนการวิเคราะห์เพรดนิโซโลนโดยวิธีมาตรฐานตามตำราของประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศอังกฤษพบพีคของเพรดนิโซโลนที่เวลาประมาณ 9.0 และ 5.2 นาทีตามลำดับ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ถ่ายโอนวิธีวิเคราะห์เพรดนิโซโลนในยาเม็ดโดยใช้เทคนิค UPLC และทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามหลักเกณฑ์ของ USP⁽⁸⁾ และ ICH Guideline⁽⁹⁾ โดยศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธี ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ ความแม่นยำ และความเที่ยง และความคงทนของวิธีวิเคราะห์ เพื่อสามารถนำวิธีนี้ไปใช้เป็นวิธีทางเลือก สำหรับการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการที่มีจำนวนตัวอย่างปริมาณมาก ๆ ได้ในคราวเดียวกัน

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง UPLC: Agilent Model Agilent 1290 infinity ประกอบด้วย Binary Pump G4220B, Hip Sampler G4226A, Column Compartment G1316C, DAD Detector G4212A, Software OpenLab-EzChrom, USA Column: ZORBAX Eclipse Plus C18 ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร S.N. USDAZ03529 และ S.N. USDAZ04974

Microbalance: Mettler Toledo Model MX5, Switzerland

Balance: Mettler Toledo Model MT261 Delta range, Switzerland

Shaker: GFL Gesellschaft fur Labortechnik mbH Model 3018, Germany

Ultrasonic bath: CREST ULTRASONICS Model CP2600D, Malaysia

Hot air oven: Binder Model FED-115, Germany

Syringe filter: PVDF 0.22 μm , Agela Technologies, USA

สารเคมีและสารมาตรฐาน

Methanol HPLC grade ผลิตภัณท์ของ Macron, USA

Hydrochloric acid 37% AR grade ผลิตภัณท์ของ Carlo Erba, Switzerland

Sodium Hydroxide AR grade ผลิตภัณท์ของ Merck, Germany

Hydrogen Peroxide 35% AR grade ผลิตภัณท์ของ Carlo Erba, Switzerland

น้ำจาก Mili-Q purification system ผลิตภัณท์ของ Milipore, Netherlands

สารมาตรฐาน Prednisolone USP reference standard Lot.No. N1J277

สารมาตรฐาน Prednisolone DMSc reference standard Control.No. WSP48-4/55

ตัวอย่าง

ตัวอย่างยาเม็ดเพรดนิโซโลน ขนาดความแรง 5 มิลลิกรัมต่อเม็ด

วิธีการทดสอบ

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐาน **Prednisolone** ชั่งสารมาตรฐาน Prednisolone USP RS ให้มีน้ำหนักที่ถูกต้องประมาณ 10 มิลลิกรัม ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Mobile phase กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สารละลายมาตรฐาน **Prednisolone** สำหรับกราฟมาตรฐาน ชั่งสารมาตรฐาน Prednisolone DMSc RS ให้มีน้ำหนักที่ถูกต้อง ประมาณ 125 มิลลิกรัม ลงใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Mobile phase จากนั้นเจือจางสารละลายที่ได้ให้มีปริมาณที่แน่นอนของ Prednisolone ประมาณ 0.15, 0.175, 0.2, 0.225 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารละลายมาตรฐาน **Prednisolone stock solution** ชั่งสารมาตรฐาน Prednisolone DMSc RS ให้มีน้ำหนักที่ถูกต้อง ประมาณ 100 มิลลิกรัม ลงใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Mobile phase กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ซึ่งตัวอย่างยาเม็ดเพรดนิโซโลน ไม่น้อยกว่า 20 เม็ด คำนวณหาน้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ด แล้วบดผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นซึ่งผงยาตัวอย่างให้มิน้ำหนักที่ถูกต้องโดยให้มีปริมาณตัวยาประมาณ 10 มิลลิกรัม ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Mobile phase ประมาณ 25 มิลลิลิตร นำไปแช่ 15 นาที จากนั้นนำไป sonicate 10 นาที แล้วปรับปริมาตรด้วย Mobile phase กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

การเปรียบเทียบ Retention time ของวิธีวิเคราะห์โดย UPLC กับวิธีมาตรฐาน

เตรียมสารละลายเพรดนิโซโลนใน Mobile phase ของแต่ละวิธีแล้วฉีดสารละลายเข้าระบบโครมาโทกราฟี (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงระบบโครมาโทกราฟีตามวิธีต่างๆ

พารามิเตอร์	วิธีวิเคราะห์โดย UPLC	USP 36	BP 2014
คอลัมน์	ZORBAX Eclipse Plus C18 ขนาด 2.1 × 100 mm, 1.8 μm	Hypersil silica ขนาด 4.6 × 250 mm, 5 μm	Hypersil BDS C18 ขนาด 4.6 × 200 mm, 5 μm
สารละลายตัวพา	MeOH:H ₂ O (55:45)	C ₄ H ₉ Cl: Water-saturated C ₄ H ₉ Cl:(CH ₂) ₄ O:MeOH: GAA (95:95:14:7)	MeOH:H ₂ O (58:42)
อัตราการไหล	0.3 มิลลิลิตร/นาที	1.0 มิลลิลิตร/นาที	1.0 มิลลิลิตร/นาที
อุณหภูมิของคอลัมน์	35 °C	ambient	ambient
ปริมาตรที่ฉีด	2 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร	20 ไมโครลิตร
เครื่องตรวจวัด	DAD 254 nm	UV 254 nm	UV 254 nm

วิธีตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (Method validation)

1. การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

ซึ่งสารมาตรฐาน Prednisolone DMSc RS ประมาณ 10 mg ลงในหลอดทดลองแล้ว นำไป ทำให้สลายตัวในสภาวะต่างๆ ดังนี้

1. เติม 3 N Sodium Hydroxide จำนวน 100 μl แล้วให้ความร้อนที่ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. เติม 3 N Hydrochloric acid จำนวน 100 μl แล้วให้ความร้อนที่ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. เติม Hydrogen peroxide 35% จำนวน 100 μl แล้วให้ความร้อนที่ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. เติมน้ำจำนวน 100 μl แล้วให้ความร้อนที่ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. ให้ความร้อนที่ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
6. นำไปผึ่งแดด เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

จากนั้นละลายสารมาตรฐานจากสภาวะต่างๆ ข้างต้นด้วย Mobile phase จำนวน 10 มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร วิเคราะห์สารละลายที่ได้ด้วยเครื่อง UPLC เพื่อศึกษาการรบกวนของสารละลายตัว

2. การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

ฉีดสารละลายมาตรฐาน Prednisolone ความเข้มข้นประมาณ 0.15, 0.175, 0.2, 0.225 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับเข้าเครื่อง UPLC แล้วสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ซึ่งต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995

3. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน Prednisolone stock solution (standard addition method) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.16, 0.2 และ 0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 80, 100 และ 120 ของความเข้มข้นที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในตัวอย่าง โดยทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ คำนวณปริมาณเพรดนิโซโลนทั้งหมดที่มีในสารละลายเพื่อคำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) ที่แต่ละระดับความเข้มข้น หาค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการคืนกลับ (% mean recovery) และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% Relative standard deviation, % RSD) โดยที่ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับต้องอยู่ในช่วง 97.0–103.0 และค่า % RSD ไม่เกิน 2.0

4. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

4.1 ความทำซ้ำได้ (Repeatability)

วิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในตัวอย่างยาเม็ด จำนวน 6 ซ้ำ โดยทดสอบในวันเดียวกัน คำนวณปริมาณเพรดนิโซโลนต่อเม็ด ค่าเฉลี่ยและ % RSD โดย % RSD ต้องไม่เกิน 2.0

4.2 Intermediate Precision

วิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในตัวอย่างยาเม็ด จำนวน 6 ซ้ำ โดยทดสอบต่างวัน จำนวน 3 วัน และเปลี่ยนนักวิเคราะห์ จำนวน 3 คน คำนวณปริมาณเพรดนิโซโลนต่อเม็ด ค่าเฉลี่ยและ % RSD โดย % RSD ต้องไม่เกิน 2.0

5. การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

วิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในตัวอย่างยาเม็ด จำนวน 6 ซ้ำ โดยเปลี่ยนแปลงสภาวะของระบบ UPLC คือ อัตราส่วนของสารละลายตัวพา อัตราการไหลของสารละลายตัวพา คอลัมน์ และอุณหภูมิของคอลัมน์ เปรียบเทียบพารามิเตอร์ต่างๆ ที่กำหนดไว้ สำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ UPLC ได้ค่า tailing factor ต้องไม่เกิน 2.0 พร้อมทั้งคำนวณปริมาณเพรดนิโซโลนต่อเม็ด เปรียบเทียบผลวิเคราะห์ที่ได้โดยคำนวณค่า % RSD ต้องไม่เกิน 2.0

6. การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)

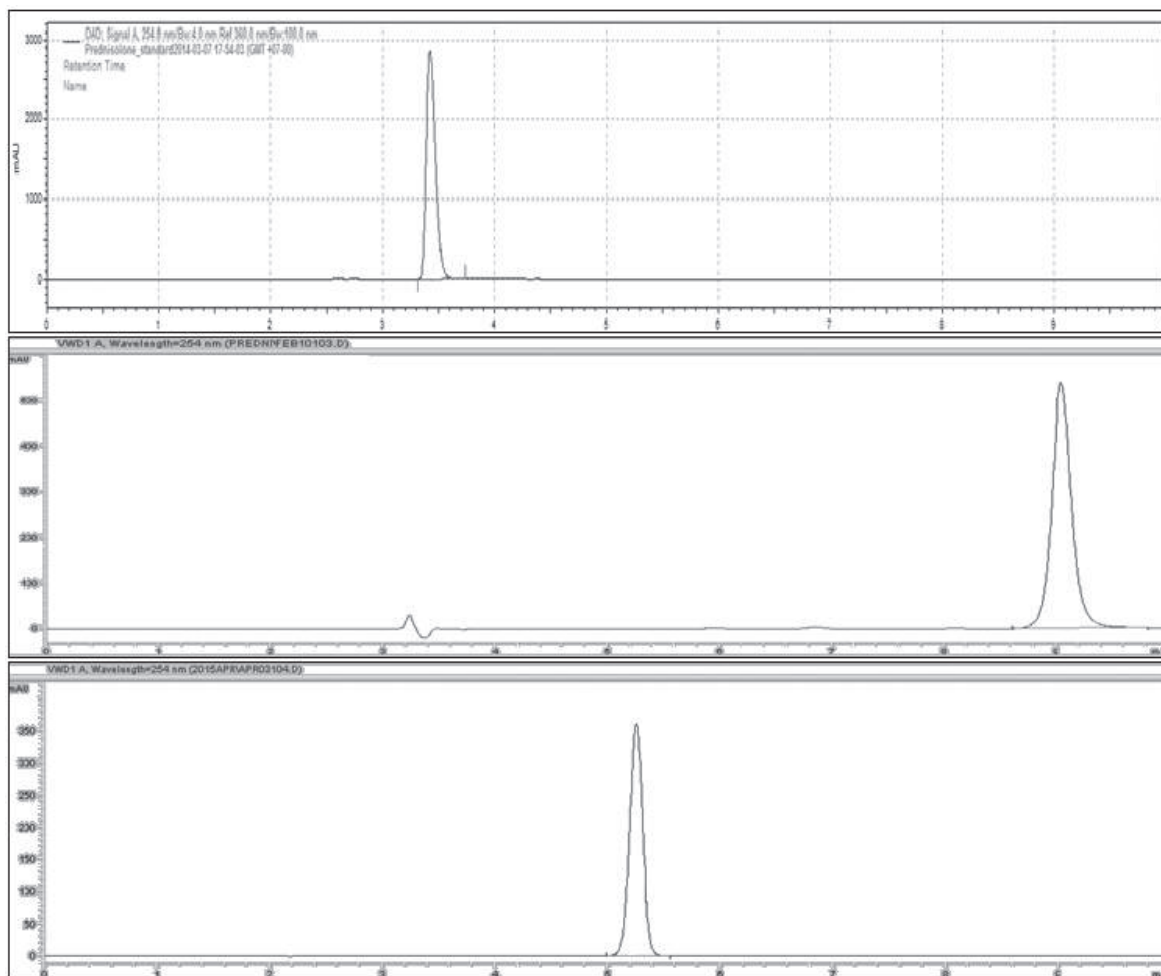
การศึกษานี้ได้ทำการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์เพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025:2005 ที่กำหนดให้ห้องปฏิบัติการทดสอบต้องประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดโดยเป็นไปตามแนวทางการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี^(10, 11)

ผล

การเปรียบเทียบ Retention time ของวิธีวิเคราะห์โดย UPLC กับวิธีมาตรฐาน

การวิเคราะห์เพรดนิโซโลนภายใต้สภาวะ UPLC พบพีคของเพรดนิโซโลนที่เวลาประมาณ 3.4 นาที ส่วนการวิเคราะห์เพรดนิโซโลนโดยวิธีมาตรฐานตามตำราของประเทศไทยและประเทศอังกฤษพบพีค

ของเพรดนิโซโลนที่เวลาประมาณ 9.0 และ 5.2 นาที ตามลำดับ ซึ่งวิธีวิเคราะห์โดย UPLC พบพีคของเพรดนิโซโลนเร็วกว่าวิเคราะห์ด้วยวิธีตามตำรายาของประเทศสหรัฐอเมริกาประมาณ 2.6 เท่าและตามตำรายาของประเทศไทย 1.5 เท่า (ภาพที่ 2)

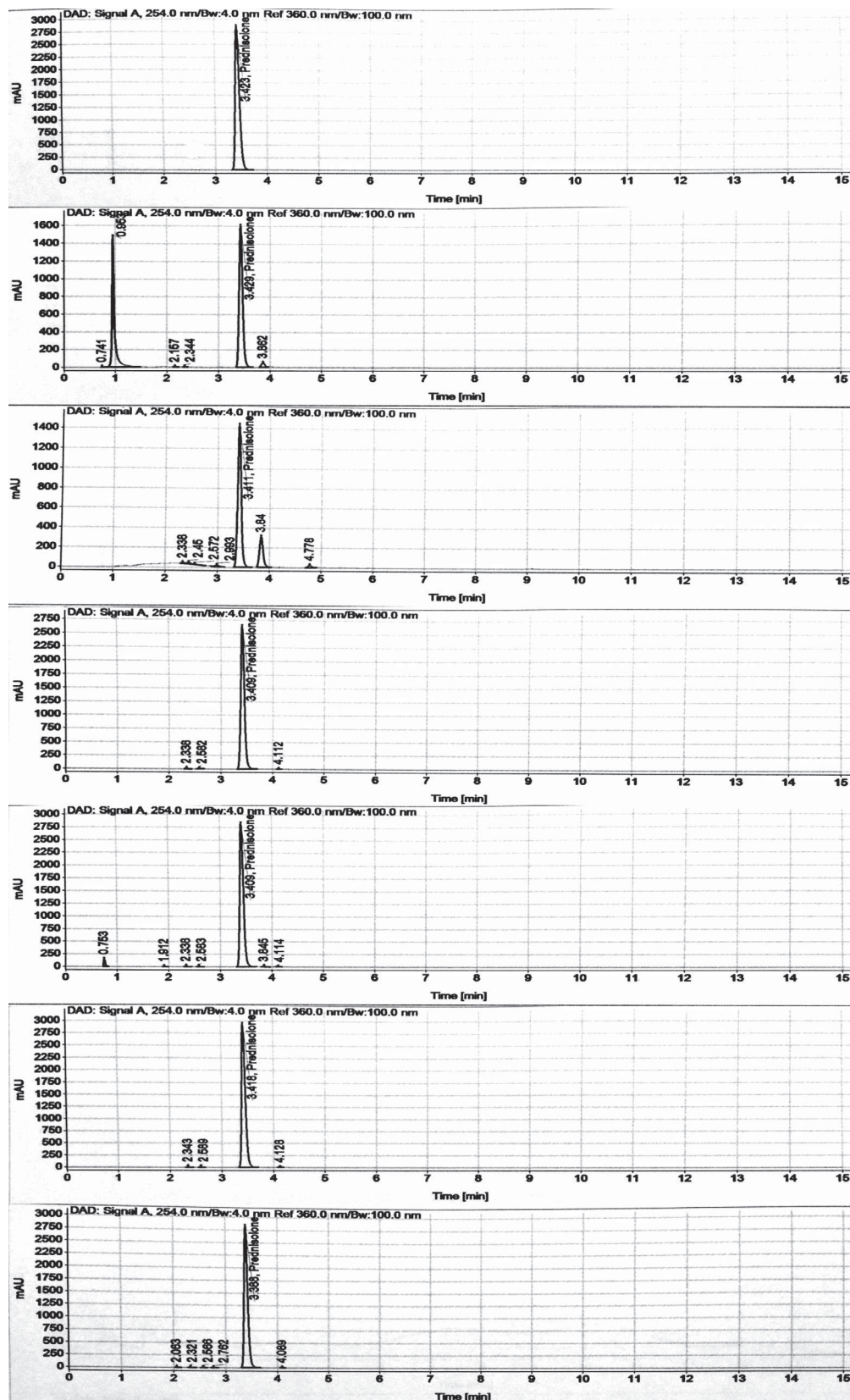


ภาพที่ 2 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเพรดนิโซโลนในระบบโครมาโทกราฟีตามวิธีต่างๆ คือ วิธีวิเคราะห์โดย UPLC (A) ตำรายาของสหรัฐอเมริกา (USP 36) (B) และตำรายาของประเทศไทย (BP 2014) (C)

วิธีตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (Method validation)

1. การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

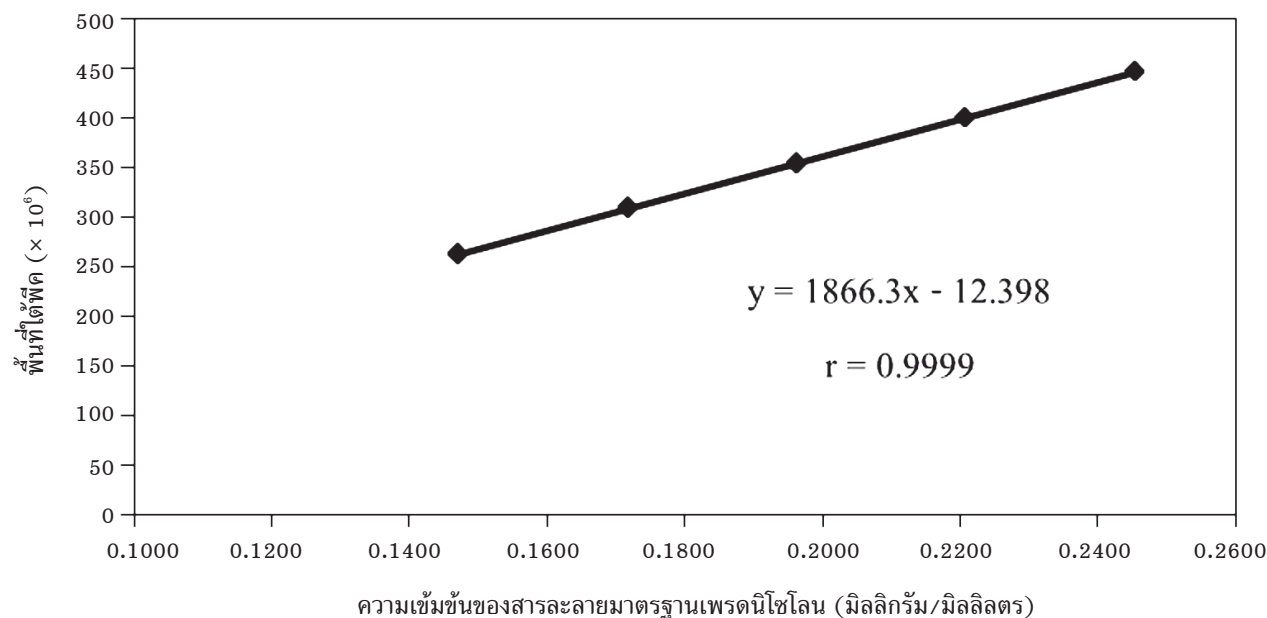
การวิเคราะห์เพรดนิโซโลนภายใต้สภาวะ UPLC พบพีคของเพรดนิโซโลนที่เวลา ประมาณ 3.4 นาที จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีโดยฉีดสารละลายของสารมาตรฐานเพรดนิโซโลนที่ทำให้เกิดการสลายตัวที่สภาวะต่างๆ พบว่าสามารถแยกสารสลายตัวที่เกิดขึ้นออกจากพีคของเพรดนิโซโลนได้ (ภาพที่ 3) โดยมีค่า resolution มากกว่า 2.0



ภาพที่ 3 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเพรดนิโซโลน (A) และสารละลายของสารมาตรฐานเพรดนิโซโลนที่ทำให้เกิดการสลายตัวที่สภาวะต่างๆ คือ สภาวะกรด ที่ 80 °C นาน 1 ชั่วโมง (B), สภาวะด่าง ที่ 80 °C นาน 1 ชั่วโมง (C), สภาวะออกซิเดชัน ที่ 80 °C นาน 1 ชั่วโมง (D), สภาวะไฮโดรไลซิส ที่ 80 °C นาน 1 ชั่วโมง (E), สภาวะที่ 80 °C นาน 1 ชั่วโมง (F) และสภาวะที่ถูกแสงนาน 8 ชั่วโมง (G)

2. การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

จากการฉีดสารละลายมาตรฐาน Prednisolone ที่มีความเข้มข้นประมาณ 0.15, 0.175, 0.2, 0.225 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีค พบว่ากราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเพรดนิโซโลนและพื้นที่ใต้พีค

3. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

จากการฉีดสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐานเพรดนิโซโลน ที่ 3 ระดับความเข้มข้น 0.16, 0.2 และ 0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยเท่ากับ 99.9 ± 1.1 , 100.8 ± 1.4 และ 100.9 ± 0.3 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ระดับความเข้มข้น	ความเข้มข้น (มก./มล.)	ค่าร้อยละของการคืนกลับ			ค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละ ของการคืนกลับ	% RSD
		1	2	3		
80%	0.16	98.9	101.0	99.8	99.9	1.1
100%	0.20	102.4	99.7	100.4	100.8	1.4
120%	0.24	101.2	100.6	100.9	100.9	0.3
		เฉลี่ย			100.5	1.0

4. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

4.1 ความทำซ้ำได้ (Repeatability)

วิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในตัวอย่างยาเม็ด จำนวน 6 ซ้ำ โดยทดสอบในวันเดียวกัน มี % RSD เท่ากับ 0.7 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความทำซ้ำได้

ตัวอย่าง	ปริมาณเพรดนิโซโลน (มิลลิกรัมต่อเม็ด)
1	4.7359
2	4.7743
3	4.7820
4	4.8012
5	4.7576
6	4.8257
เฉลี่ย	4.7795
%RSD	0.66

4.2 Intermediate Precision

วิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในตัวอย่างยาเม็ด จำนวน 6 ซ้ำ โดยทดสอบต่างวัน จำนวน 3 วัน มี % RSD เท่ากับ 0.6 และเมื่อเปลี่ยนนักวิเคราะห์ จำนวน 3 คน มี % RSD เท่ากับ 0.7 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ Intermediate precision

รายการที่ทดสอบ		ปริมาณเพรดนิโซโลน (มิลลิกรัมต่อเม็ด)								Intermediate precision	
		1	2	3	4	5	6	เฉลี่ย	% RSD	เฉลี่ย	% RSD
เปลี่ยนวัน	1	4.7359	4.7743	4.7820	4.8012	4.7576	4.8257	4.7795	0.66		
	2	4.8279	4.8197	4.8140	4.8255	4.8213	4.8053	4.8190	0.17	4.8042	0.57
	3	4.8157	4.8348	4.8102	4.8391	4.7979	4.7879	4.8143	0.42		
เปลี่ยนนักวิเคราะห์	1	4.7359	4.7743	4.7820	4.8012	4.7576	4.8257	4.7795	0.66		
	2	4.8381	4.8402	4.8650	4.8049	4.8264	4.8342	4.8348	0.40	4.8124	0.70
	3	4.7954	4.8100	4.8186	4.8204	4.8456	4.8479	4.8230	0.42		

5. การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

ทดลองเปลี่ยนแปลงสภาวะของระบบ UPLC คือ อัตราส่วนของสารละลายตัวพา อัตราการไหลของสารละลายตัวพา คอลัมน์ และอุณหภูมิของคอลัมน์ ศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆ ที่อาจมีผลกระทบต่อความเหมาะสมของระบบ รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณเพรดนิโซโลนต่อเม็ดเพื่อเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ พบว่าสภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่เบี่ยงเบนไปยังคงให้ผลวิเคราะห์ที่มีค่า % RSD ไม่เกิน 0.9 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบความทนของวิธี

สภาวะของระบบ		RetentionTailing		ปริมาณเพรดนิโซโลน (มิลลิกรัมต่อเม็ด)				% RSD	
		Time	factor	ปริมาณเพรดนิโซโลน		เฉลี่ย	เฉลี่ยรวม		
สัดส่วนของสารละลายตัวพา (MeOH: water)	65/35	1.6	1.35	4.8228	4.8003	4.8081	4.8102		
				4.8101	4.8193	4.8003			
	55/45*	3.1	1.26	4.8279	4.8197	4.8140	4.8190	4.8105	0.2
				4.8255	4.8213	4.8053			
	45/55	7.8	1.20	4.8133	4.7944	4.7957	4.8023		
Flow rate (ml/min)				4.7982	4.8149	4.7971			
	0.25	3.7	1.25	4.8251	4.7945	4.8027	4.8108		
				4.8196	4.8237	4.7993			
	0.30*	3.1	1.26	4.8279	4.8197	4.8140	4.8190	4.8142	0.2
				4.8255	4.8213	4.8053			
Column Temperature (°C)				4.8201	4.7958	4.8092	4.8128		
	0.35	2.6	1.25	4.8201	4.7958	4.8092	4.8128		
				4.8196	4.8289	4.8032			
	30	3.3	1.26	4.8265	4.7983	4.8170	4.8180		
				4.8224	4.8320	4.8199			
UPLC Column	35*	3.1	1.26	4.8279	4.8197	4.8140	4.8190	4.8171	0.2
				4.8255	4.8213	4.8053			
	40	2.9	1.28	4.8161	4.7974	4.8163	4.8129		
				4.8221	4.8288	4.7968			
UPLC Column	No.1*	3.1	1.26	4.8279	4.8197	4.8140	4.8190		
				4.8255	4.8213	4.8053		4.7816	0.9
	No.2	3.3	1.22	4.7542	4.7634	4.7343	4.7443		
				4.7493	4.7249	4.7398			

(* หมายถึง สภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่ทำการตรวจวิเคราะห์ความถูกต้อง)

6. การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์เพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025: 2005 ที่กำหนดให้ห้องปฏิบัติการทดสอบต้องมีการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด ดังนั้นแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในตัวอย่างยาเม็ด พิจารณาได้จากสูตรคำนวณ

$$\text{ปริมาณเพรดนิโซโลน (มิลลิกรัมต่อเม็ด)} = \frac{\text{peak area}_{\text{sample}}}{\text{peak area}_{\text{std}}} \times \frac{W_{\text{std}}}{VF_{\text{std}}} \times \frac{P}{100} \times VF_{\text{sample}} \times \frac{Av.Wt/unit}{W_{\text{sample}}}$$

peak area_{sample} = พื้นที่ใต้พีคเพรดนิโซโลนในสารละลายตัวอย่าง

peak area_{std} = พื้นที่ใต้พีคเพรดนิโซโลนในสารละลายมาตรฐาน

W_{std} = น้ำหนักของสารมาตรฐานเพรดนิโซโลน (มิลลิกรัม)

VF_{std}	=	ปริมาตรที่ใช้ในการเจือจางสารมาตรฐาน (มิลลิลิตร)
P	=	ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน (% purity)
VF_{sample}	=	ปริมาตรที่ใช้ในการเจือจางตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
Av.Wt/unit	=	น้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ดของยาเม็ดเพรดนิโซโลน (กรัม)
W_{sample}	=	น้ำหนักผงยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ (กรัม)

พิจารณาถึงความไม่แน่นอนที่เกิดจากแต่ละแหล่ง จากนั้นคำนวณหาความไม่แน่นอนรวม (Combined relative standard uncertainty) และค่าความไม่แน่นอนขยาย (Expanded uncertainty) เพื่อรายงานเป็นผลการทดสอบ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์เพรดนิโซโลนในยาเม็ด

Source of Uncertainty	Value, x	Unit	Uncertainty	Distribution	u(xi)	u(xi)/x
Standard						
W_{std}	10.288	mg	0.014878	Normal	0.014878	2.0914×10^{-6}
VF_{std}						
- Calibration	50	ml	0.05	Rectangular	0.028868	
- Temperature	50	ml	0.15	Rectangular	0.086602	
Total					0.091287	1.8257×10^{-3}
Peak area _{std}	369804568.7	-	689791.25	Normal	689791.25	1.8653×10^{-3}
Purity	-	-	-	-	-	-
Sample						
Av. Wt/unit	0.1097	g	0.000015	Normal	0.000015	6.7383×10^{-6}
W_{sample}	0.22037	g	0.000015	Normal	0.000015	1.3536×10^{-4}
VF_{sample}						
- Calibration	50	ml	0.05	Rectangular	0.028868	
- Temperature	50	ml	0.15	Rectangular	0.086602	
Total					0.091287	1.8257×10^{-3}
Peak area _{sample}	344032956.7	-	129060.88	Normal	129060.88	3.7514×10^{-4}
Repeatability	4.7359	-	0.03168	Normal	0.012933	2.7309×10^{-3}
Total relative standard uncertainty : 0.00001986						
Combined relative standard uncertainty : 0.00446						
Test result is 94.7% la. ; Combined standard uncertainty : $0.00446 \times 94.7 = 0.4224$						
Expanded uncertainty at 95% confidence limit : $k = 2, 2 \times 0.4224 = 0.8448\%$ la.						
Reported value : $94.7 \pm 0.8\%$ la.						

วิจารณ์

การถ่ายโอนวิธีวิเคราะห์เพรดนิโซโลนในยาเม็ดด้วยเทคนิค UPLC โดยใช้คอลัมน์ ZORBAX Eclipse Plus C18 ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสโดยมีส่วนผสมของ เมธานอลและน้ำในอัตราส่วน 55:45 เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาทีและตรวจวัด ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นเมื่อถูกเร่งให้สลายตัวภายใต้สภาวะต่างๆ ได้แก่ กรด ต่าง ความร้อน ไฮโดรไลซิส ออกซิเดชันและแสง แสดงถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีต่อเพรดนิโซโลน ซึ่งมีการศึกษา ความคงตัวของเพรดนิโซโลนพบว่าเพรดนิโซโลนสามารถสลายตัวได้ทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและสภาวะที่เป็นด่าง โดยใน สภาวะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างน้อยกว่า 5.5 เพรดนิโซโลนจะสลายตัวเป็น 17-deoxy-21-dehydroprednisolone และเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้น เพรดนิโซโลนจะสลายตัวได้สารหลายชนิด ได้แก่ 17-deoxy-21-dehydro-prednisolone, 17-dehydroprednisolone, 17-ketosteroid และ D-homosteriod⁽¹²⁾

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ พบว่ามีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.15 ถึง 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 ซึ่งค่ามากกว่าค่าที่ยอมรับได้ที่กำหนด ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995

การทดสอบความแม่นยำของวิธีที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือที่ 80, 100 และ 120% ของค่าความเข้มข้นที่ทดสอบ พบร้อยละของการคืนกลับอยู่ระหว่าง 98.9 ถึง 102.4 โดยมีค่าเฉลี่ยแต่ละระดับความเข้มข้นเท่ากับ 99.9, 100.8 และ 100.9 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยรวมเท่ากับ 100.5 และ % RSD เท่ากับ 1.0 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ ร้อยละ 97.0-103.0 และค่า % RSD ไม่มากกว่า 2.0 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความแม่นยำ

การทดสอบความเที่ยงของวิธี ผลการทดสอบความซ้ำได้พบว่ามีค่า % RSD เท่ากับ 0.7 เมื่อทดสอบ โดยเปลี่ยนวันที่วิเคราะห์จำนวน 3 วัน ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 6 ซ้ำ ได้ % RSD รวมเท่ากับ 0.6 และเมื่อทดสอบ โดยเปลี่ยนนักวิเคราะห์จำนวน 3 คน ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 6 ซ้ำ ได้ % RSD รวมเท่ากับ 0.7 จากค่า % RSD ที่ได้ พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ ไม่มากกว่า 2.0 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถทำซ้ำได้และความเที่ยง

การทดสอบความทนวิธีโดยเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของสารละลายตัวพา อัตราการไหลของสารละลายตัวพา คอลัมน์ และอุณหภูมิของคอลัมน์ พบว่ามีค่า % RSD ของผลการวิเคราะห์ไม่เกิน 2.0 เป็นการยืนยันได้ว่าเมื่อสภาวะ ของระบบโครมาโทกราฟีมีการเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย จะไม่มีผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์ แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้ มีความทนต่อสภาวะที่เปลี่ยนแปลง

การประเมินค่าความไม่แน่นอนในการวัดนั้นเป็นข้อกำหนดหนึ่งของระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการตาม มาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 ความไม่แน่นอนของการวัดเป็นค่ารวมของผลกระทบทั้งหมดที่มีต่อผลทดสอบที่ เป็นเชิงปริมาณ แหล่งที่มาของความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มาจากการชั่งสารมาตรฐานและตัวอย่าง ปริมาตรในการเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง พื้นที่ใต้พีคจากการฉีดซ้ำของสารละลายมาตรฐานและ สารละลายตัวอย่าง และความสามารถในการทำซ้ำได้ จากตัวอย่างการประเมินค่าความไม่แน่นอนของผลการวิเคราะห์ หาปริมาณเพรดนิโซโลนในตัวอย่างยาเม็ด พบค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เท่ากับ 0.8%

วิธีที่ถ่ายโอนเป็นวิธี UPLC นี้ มีข้อดีกว่าวิธีมาตรฐานเดิมซึ่งเป็นวิธี HPLC คือใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ สั้นกว่า และใช้สารเคมีน้อยกว่า ซึ่งจะมีประโยชน์ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณมาก เช่น การตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างยาเคี การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างยาในเลือด และการสุ่มตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างยาระหว่างการผลิต เป็นต้น ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้จึงสามารถใช้เป็นวิธีทางเลือกได้อย่างเหมาะสม

สรุป

วิธีวิเคราะห์เพรดนิโซโลนในยาเม็ดด้วยวิธี Ultra Performance Liquid Chromatography ที่ถูกถ่ายโอนสามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในยาเม็ดได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และมีความจำเพาะเจาะจงต่อตัวยาสำคัญ เป็นวิธีที่รวดเร็ว ประหยัดเวลา และสารเคมี สามารถนำไปใช้เป็นวิธีทางเลือกอีกวิธีหนึ่งในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในยาเม็ดได้

เอกสารอ้างอิง

1. Elaine KS, Gerald KE, Jan M, Linda K, Kathy L, Olin HW, et al. AHFS drug information. Maryland: The American Society of Health-System Pharmacists; 2008.
2. Prednisolone. [online]. 2014; [cited 2014 Sep 4]; [2 screens]. Available from: URL: <http://www.mims.com/THAILAND/Home/GatewaySubscription/?generic=prednisolone>.
3. พระราชบัญญัติยา พ.ศ.2510 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ยาควบคุมพิเศษ (พ.ศ. 2521). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 95 ตอน 68 (วันที่ 4 กรกฎาคม 2521).
4. งานบริการข้อมูลผลิตภัณฑ์สุขภาพผ่านอินเทอร์เน็ต. ผลิตภัณฑ์ยา. [ออนไลน์]. [สืบค้น 9 ก.ย. 2557]; เข้าถึงได้จาก : URL: <http://fdaolap.fda.moph.go.th/logistics/drgdrug/DSerch.asp>.
5. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Galichet LY, editors. Clarke's analysis of drugs and poisons. 3rd ed. London: Pharmaceutical Press; 2004.
6. Prednisolone tablets. In: United States Pharmacopeia 36 – National Formulary 31. 36th ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2013. p. 4880–4881.
7. Prednisolone tablets. In: British Pharmacopeia 2013. London: The stationary Office; 2012. p. 3329–3331.
8. Validation of compendial procedures. In: United States Pharmacopeia 36 – National Formulary 31. 36th ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2013. p. 983–987.
9. 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 Secretariat; 2005.
10. สุวรรณ จารุณขุ, และคณะ. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนในการวัดทางเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : บริษัทวี พลัส กรุ๊ป (ไทยแลนด์) จำกัด; 2554. หน้า 22–31.
11. ยุพดี พยัคพันธ์, ھرรษา ไซยวานิช, นวพร อนันตสินกุล, บรรณาธิการ. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2549. หน้า 77–86.
12. Dekker D, Beunen JH. Stability of corticosteroids under anaerobic conditions VI. Kinetics of the decomposition of prednisolone and the appearance of some decomposition products in aqueous solution under anaerobic conditions. Pharmaceutisch Weekblad 1980; 2(1): 1116–20.

UPLC Transfer and Method Validation of the Determination of Prednisolone Tablets

Supawadee Surangkul Sirilak Sailo and Somsak Sunthornphanich

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

ABSTRACT The method transfer and validation for the determination of Prednisolone in tablets was established using Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). The separation was achieved on a ZORBAX Eclipse Plus C18 (1.8 μm , 2.1×100 mm) at 35 degree Celsius. The mobile phase was the mixture of methanol and water (55:45, v/v) at the flow rate of 0.3 ml per minute with UV detection at 254 nm. Specificity test showed that prednisolone peak was not interfered by its degradation product peaks under stress conditions: acid, base, heat, hydrolysis, oxidation and light. The linearity test showed linear relationship between the area under the peak and the concentration levels in the range of 0.15–0.25 mg per ml with correlation coefficient, r , 0.9999. The percentage mean recovery from three concentration levels was 100.5 (% RSD = 1.17%). The precision test was performed by the assay of six samples within the same day, and different days and analysts gave % RSD of 0.7, 0.6 and 0.7, respectively. The robustness test indicated that the described method was robust when the chromatographic conditions were changed such as column batch, column temperature, composition and flow rate of mobile phase with no effect on the system suitability and the test result. This method takes less analytical time than the method specified in the United States Pharmacopoeia and British Pharmacopoeia. Therefore, the proposed method was suitable for the quantification of prednisolone in tablets and could be used as an alternative method.

Key word: prednisolone tablets, UPLC, method validation

วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารไล่แมลงโดยวิธี HPLC

วงเดือน นาคนิม

สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ วิธีวิเคราะห์สารไล่แมลง ได้แก่ ethyl butylacetylaminopropionate, dimethyl phthalate (DMP) และ N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) ในผลิตภัณฑ์ทาไล่แมลง สามารถวิเคราะห์สารทั้ง 3 ชนิดได้ในคราวเดียวกัน ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในระบบ reversed phase โดยใช้คอลัมน์ชนิด XTerra RP C8 ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร สารละลายตัวพาประกอบด้วย ส่วนผสมของ acetonitrile และน้ำกลั่นในอัตราส่วน 25:75 อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1 มิลลิเมตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร ปริมาตรที่ฉีดสารละลาย 5 ไมโครลิตร ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีซึ่งดำเนินการในผลิตภัณฑ์ทาไล่แมลงชนิดโลชั่นและครีมชั้น พบว่า พีคของสาร ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET แยกออกจากกันได้ดีและไม่ถูกรบกวนจากสารอื่นในตัวอย่าง โดยมีค่า retention time เท่ากับ 8.86, 11.6 และ 14.2 นาที ตามลำดับ พบว่า มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารและพื้นที่ใต้พีคตลอดช่วงความเข้มข้น 0.1 - 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.99995, 0.99998 และ 0.99998 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์สารทั้ง 3 ชนิด ในตัวอย่างทั้ง 2 ประเภท วิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า RSD อยู่ในช่วงร้อยละ 0.06 - 0.12, 0.04 และ 0.03 - 0.14 ตามลำดับ พบว่า ไม่มีความแตกต่างของผลวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวัน 5 วัน โดยผลวิเคราะห์สารทั้ง 3 ชนิดในตัวอย่างทั้ง 2 ประเภท มีค่า p-value อยู่ในช่วง 0.35 - 0.80, 0.06 และ 0.13 - 0.996 ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างระหว่างผลวิเคราะห์ของนักวิเคราะห์ 3 คน โดยมีค่า p-value อยู่ในช่วง 0.22, 0.40 และ 0.18 - 0.92 ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงความเที่ยง (precision) ของวิธี ผลวิเคราะห์ spiked sample ได้ค่า recovery ของการวิเคราะห์ ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET อยู่ในช่วงร้อยละ 99.7 - 104.6, 94.6 - 98.9 และ 97.5 - 101.6 ตามลำดับ ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) เท่ากับร้อยละ 0.08, 0.05 และ 0.05 โดยน้ำหนักตามลำดับ ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) เท่ากับร้อยละ 0.30, 0.20 และ 0.20 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ค่าความไม่แน่นอนขยายสัมพัทธ์ของวิธีวิเคราะห์ ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET เท่ากับ 0.027, 0.041 และ 0.024 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีอยู่ในเกณฑ์ยอมรับสามารถนำไปใช้วิเคราะห์สาร ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ในผลิตภัณฑ์ทาไล่แมลงได้

บทนำ

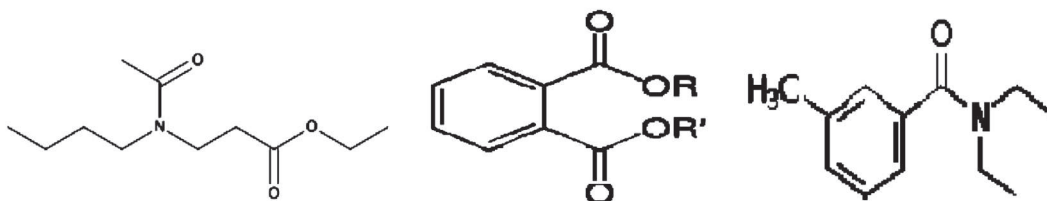
ยุงเป็นพาหะของโรคหลายชนิด เช่น โรคไข้เลือดออก โรคมาลาเรีย เป็นต้น การป้องกันตนเองไม่ให้ยุงกัดทำได้หลายวิธี เช่น การนอนกางมุ้ง การสวมเสื้อปกปิดร่างกายให้มิดชิด การใช้ยาจุดกันยุง และผลิตภัณฑ์ทาไล่ยุง ปัจจุบันผลิตภัณฑ์ทาไล่แมลงมีรูปแบบหลากหลาย เช่น ครีม โลชั่น แป้งโรยตัว ผ้า/กระดาษชุบของเหลว โรลออน สเปรย์ฉีดพ่น และเจล เป็นต้น⁽¹⁾

สารออกฤทธิ์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ทาไล่แมลงที่สกัดจากพืช เช่น citronella oil, lemon eucalyptus oil, cinnamon oil, castor oil, rosemary oil, lemongrass oil, cedar oil, peppermint oil, clove oil และ geranium oil เป็นต้น มีระยะเวลาในการป้องกันยุงขึ้นกับความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ เช่น citronella oil ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก มีระยะเวลาในการป้องกันประมาณ 7 - 60 นาที ทำให้ต้องทาซ้ำบ่อยขึ้น จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยมใช้ แต่ข้อดีคือ มีความปลอดภัย ลดการระคายเคือง สามารถใช้กับเด็กได้ และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม⁽²⁾ ส่วนสารเคมีที่นิยมใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์ทาไล่แมลง เช่น ethyl butylacetylaminopropionate, dimethyl phthalate (DMP) และ N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการไล่แมลง แต่ในขณะเดียวกันสารเคมีสามารถทำให้เกิดอันตรายต่อการใช้อย่างกว้างขวางกว่าสารธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร DEET ซึ่งมีคำแนะนำการใช้เช่น สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกาได้แนะนำว่าไม่ควรใช้กับเด็กที่อายุต่ำกว่า 2 เดือน⁽³⁾ ส่วนสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศไทยให้ระบุที่ฉลากผลิตภัณฑ์เตือนการใช้กับเด็กอายุต่ำกว่า 4 ปี⁽⁴⁾

Ethyl butylacetylaminopropionate หรือรู้จักกันในชื่อการค้าว่า IR3535[®] เป็นสารที่ยังไม่มีรายงานการเกิดพิษต่อคนและไม่ระคายเคืองต่อผิวหนัง ผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณสารนี้ ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก สามารถป้องกันยุงได้ยาวนานกว่า 7 ชั่วโมง สามารถใช้กับเด็กอายุตั้งแต่ 2 ปีและสตรีมีครรภ์ได้ นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการไล่เห็บหมัด และแมลงอื่นๆ⁽⁵⁾

Dimethyl phthalate (DMP) ทำให้เกิดการระคายเคืองได้เช่นเดียวกัน โดยสามารถดูดซึมผ่านผิวหนังได้ทันที สารนี้ไม่ก่อให้เกิดมะเร็ง แต่การได้รับสารนี้อย่างต่อเนื่องอาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ มีอันตรายต่อระบบสืบพันธุ์และมีผลต่อทารกในครรภ์ กดระบบประสาทส่วนกลางและทำอันตรายต่อไต⁽⁶⁾

N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) เป็นสารออกฤทธิ์ที่นิยมใช้มากกว่าสารอื่น โดยทั่วไปในผลิตภัณฑ์จะมีความเข้มข้นของ DEET อยู่ระหว่างร้อยละ 5 - 25 โดยน้ำหนัก การสัมผัสสารนี้ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังและดวงตา การสูดดมอาจทำให้เกิดการระคายเคืองที่แผ่นเยื่อเมือกและบริเวณทางเดินหายใจส่วนบน การได้รับสารเป็นเวลานานหรือซ้ำหลายครั้งอาจเกิดอาการแพ้ จากการทดลองในหนูการได้รับสารแบบเรื้อรังก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ มีอันตรายต่อระบบสืบพันธุ์และมีผลต่อทารกในครรภ์⁽⁷⁾ ผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณ DEET สูงจะป้องกันยุงได้นานขึ้น เช่น ผลิตภัณฑ์ที่มี DEET ร้อยละ 20, 7 และ 5 โดยน้ำหนัก สามารถป้องกันได้ 4, 2 และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับผู้ใหญ่ควรใช้ผลิตภัณฑ์ที่มี DEET อยู่ระหว่างร้อยละ 15 - 20 โดยน้ำหนัก ส่วนเด็กไม่ควรใช้ผลิตภัณฑ์ที่มี DEET สูงกว่าร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้าง ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET

ผลิตภัณฑ์ที่ใช้สารเคมีดังกล่าวจัดเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 3 ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 ซึ่งต้องขึ้นทะเบียนและขออนุญาตในการผลิต นำเข้า ส่งออก หรือมีไว้ในครอบครองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา⁽⁸⁾ ผลิตภัณฑ์จะต้องแสดงฉลากตามที่กฎหมายกำหนด และมีความเข้มข้นของสารสำคัญตามที่ฉลากระบุ โดยมีเกณฑ์การยอมรับให้คลาดเคลื่อนจากที่ระบุในฉลาก เป็นไปตามกฎหมาย⁽⁹⁾ ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา พ.ศ. 2538 เรื่อง การแสดงฉลากของผลิตภัณฑ์ไล่แมลงประเภทสำเร็จรูปที่ประกอบด้วย DEET หรือ DMP หรือสารผสมกัน ให้ระบุค่าเตือนที่ฉลากผลิตภัณฑ์ว่า ห้ามใช้กับเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 4 ปี⁽⁴⁾ และประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา พ.ศ. 2545 เรื่อง การแสดงฉลากของผลิตภัณฑ์ไล่แมลงประเภทสำเร็จรูปที่ประกอบด้วย ethyl butylacetylaminopropionate ให้ระบุค่าเตือนที่ฉลากผลิตภัณฑ์ว่า ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วย ethyl butylacetylaminopropionate ความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 12.5 ห้ามใช้กับเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 4 ปี และความเข้มข้นเท่ากับหรือน้อยกว่าร้อยละ 12.5 ห้ามใช้กับเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 2 ปี⁽¹⁰⁾ การตรวจวิเคราะห์สารไล่แมลงในผลิตภัณฑ์ไล่แมลงมีวิธีวิเคราะห์สำหรับสารแต่ละชนิด โดยใช้เทคนิค Gas chromatography ใช้ capillary column ชนิด HP-5 หรือ HP-50 +⁽¹¹⁾ ซึ่งวิธีวิเคราะห์นี้เป็นวิธีเฉพาะของสารแต่ละชนิด ไม่สามารถที่จะแยกสารทั้ง 3 ชนิดได้พร้อมกันในคราวเดียว เมื่อมีตัวอย่างที่ไม่ทราบสารสำคัญทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ได้หรือต้องใช้เวลาและสารเคมีมากขึ้น

ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่สามารถวิเคราะห์สาร ethyl butylacetylaminopropionate, dimethyl phthalate (DMP) และ N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) ได้พร้อมกันในคราวเดียว และทดสอบความถูกต้องของวิธีเพื่อให้ได้วิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการให้บริการตรวจวิเคราะห์และการเฝ้าระวังคุณภาพผลิตภัณฑ์ทางกฎหมาย โดยลดระยะเวลาการวิเคราะห์กรณีที่มีสารไล่แมลงหลายชนิดในตัวอย่างเดียวกัน

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐาน : N, N-diethyl-m-toluamide (DEET), dimethyl phthalate (DMP) ผลิตภัณฑ์ของ ChemService ความบริสุทธิ์มากกว่า 95%, ethyl butylacetylaminopropionate ผลิตภัณฑ์ของ Merck ความบริสุทธิ์มากกว่า 95%

สารเคมี : acetonitrile (HPLC grade), methanol (HPLC grade) ผลิตภัณฑ์ของ Merck และน้ำบริสุทธิ์

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง (HPLC) ผลิตภัณฑ์ของ Waters รุ่น DetaPrep ประกอบด้วย pump รุ่น 600 เครื่องตรวจวัดชนิด Photo Diode Array รุ่น 2996 ระบบฉีดสารอัตโนมัติ รุ่น 717 plus คอลัมน์ XTerra RP C8 ขนาด 4.6 มิลลิเมตร × 150 มิลลิเมตร บรรจุอนุภาคขนาด 5 ไมโครเมตร, เครื่องชั่งความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม ผลิตภัณฑ์ของ Sartorius, แผ่นกรองชนิด nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

สภาวะเครื่อง HPLC

Column	: XTerra RP C8 ขนาด 4.6 มิลลิเมตร × 150 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร
Mobile phase	: acetonitrile : water ในอัตราส่วน 25:75 โดยปริมาตร
Flow rate	: 1 มิลลิลิตรต่อนาที
Detector	: UV 220 นาโนเมตร
Injection volume	: 5 ไมโครลิตร

ตัวอย่าง

ทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยใช้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทาโล่งชนิดโลชั่นใสและครีมข้น มีสารออกฤทธิ์ ethyl butylacetylaminopropionate ผลิตภัณฑ์ทาโล่งชนิดโลชั่นใส มีสารออกฤทธิ์ DEET และ DMP ผลิตภัณฑ์ทาโล่งชนิดครีมข้น มีสารออกฤทธิ์ DEET และผลิตภัณฑ์ทาโล่งชนิดโลชั่นใสและครีมข้นที่ไม่มีสารทั้ง 3 ชนิด เพื่อศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐาน stock standard solution

ชั่งสารมาตรฐาน ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ชนิดละประมาณ 0.63 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร แต่ละใบ ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิด 63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐาน mixed stock standard solution

ปิเปต stock standard solution ของสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิด 12.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐาน mixed working standard solution

โดยเจือจางจาก mixed stock standard solution ให้ได้ความเข้มข้นของสารแต่ละชนิด 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐาน DEET

ชั่งสารมาตรฐาน DEET ประมาณ 5 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน DEET 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐานผสมของ ethyl butylacetylaminopropionate และ DMP

ชั่งสารมาตรฐาน ethyl butylacetylaminopropionate ประมาณ 1.2 กรัม และ DMP ประมาณ 3.2 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ethyl butylacetylaminopropionate และ DMP 12 และ 32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน

การเตรียมสารละลาย spiked sample

เติมสารมาตรฐานที่ต้องการทดสอบลงในตัวอย่างชนิดโลชั่นใสและครีมข้นที่ไม่มีสารที่ต้องการทดสอบ โดยเติมในระดับความเข้มข้นร้อยละ 50, 100 และ 150 ของปริมาณที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ วิเคราะห์ซ้ำระดับละ 3 ครั้ง

ชั่งตัวอย่างชนิดโลชั่นใสและครีมข้น 1 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานผสมของ ethyl butylacetylaminopropionate ความเข้มข้น 12 และ DMP ความเข้มข้น 32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5.0, 10.0 และ 15.0 มิลลิลิตร ให้ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน ethyl butylacetylaminopropionate ในตัวอย่างร้อยละ 6, 12 และ 18 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน DMP ในตัวอย่าง

ร้อยละ 16, 32 และ 48 โดยน้ำหนักตามลำดับ แล้วเจือจางสารละลายอีก 10 เท่า และ 20 เท่า เพื่อให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน

ซึ่งตัวอย่างชนิดโลชั่นใส 1 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำละลายมาตรฐาน DEET ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5.0, 10.0 และ 15.0 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานในตัวอย่างร้อยละ 12.5, 25 และ 37.5 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และเจือจางสารละลาย spiked sample อีก 10 เท่า

ซึ่งตัวอย่างชนิดครีมข้น 1 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำละลายมาตรฐาน DEET ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3.0, 6.0 และ 9.0 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานในตัวอย่างร้อยละ 7.5, 15 และ 22.5 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และเจือจางสารละลาย spiked sample อีก 10 เท่า

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์⁽¹²⁾

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity)

ฉีดสารละลาย mixed working standard solution ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายตัวอย่างชนิดโลชั่นใสและครีมข้น เข้าเครื่อง HPLC ภายใต้สภาวะที่กำหนดเพื่อตรวจสอบการแยกของสารทั้ง 3 ชนิด ออกจากการรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง สารทั้ง 3 ชนิดต้องมีค่า retention time แยกจากกันชัดเจน

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and range)

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของระบบ (System linearity)

ฉีดสารละลายมาตรฐาน mixed working standard solution ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เข้าเครื่อง HPLC โดยฉีดความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ แล้วสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นสารมาตรฐาน ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ควรใกล้ 1

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

การทดสอบความเที่ยงของการวิเคราะห์ทั้งการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน การวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวัน และการวิเคราะห์ซ้ำโดยนักวิเคราะห์อื่น

Repeatability

วิเคราะห์ปริมาณสารทั้ง 3 ชนิดในตัวอย่าง ซ้ำ 7 ครั้ง ในวันเดียวกัน คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ต้องไม่เกินร้อยละ 3

Intermediate precision: between days

วิเคราะห์ปริมาณสารทั้ง 3 ชนิดในตัวอย่าง ซ้ำ เป็นเวลา 5 วัน ประเมินความแตกต่างของผลวิเคราะห์ทั้ง 5 วัน ด้วยสถิติ ANOVA ค่า p-value ต้องมากกว่า 0.05

Intermediate precision: between analysts

นักวิเคราะห์จำนวน 3 คน วิเคราะห์ปริมาณสารทั้ง 3 ชนิดในตัวอย่าง ประเมินความแตกต่างของผลวิเคราะห์ของนักวิเคราะห์ทั้ง 3 คน ด้วยสถิติ ANOVA ค่า p-value ต้องมากกว่า 0.05

การทดสอบร้อยละของการคืนกลับ (Percent recovery)

วิเคราะห์ปริมาณสารทั้ง 3 ชนิดในตัวอย่าง spiked sample ค่าร้อยละของการคืนกลับ (percent recovery) ต้องอยู่ในช่วงร้อยละ 95-105

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

คำนวณค่าประมาณของ LOD จากการสร้างกราฟมาตรฐาน ดังนี้

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

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

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมและสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOD แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC สัญญาณจากเครื่องตรวจวัดจะต้องสังเกตเห็นได้

การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

คำนวณค่าประมาณของ LOQ จากการสร้างกราฟมาตรฐาน ดังนี้

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

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

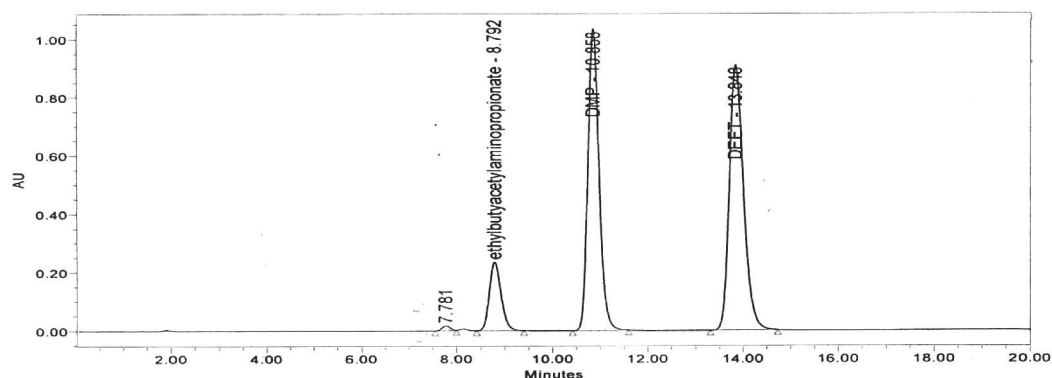
เตรียมสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOQ แล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณ ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ในตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ซ้ำ 7 ครั้ง คำนวณค่า % RSD ต้องไม่เกิน 3 และค่าร้อยละของการคืนกลับ ต้องอยู่ในช่วงร้อยละ 95 - 105

ค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)⁽¹³⁾

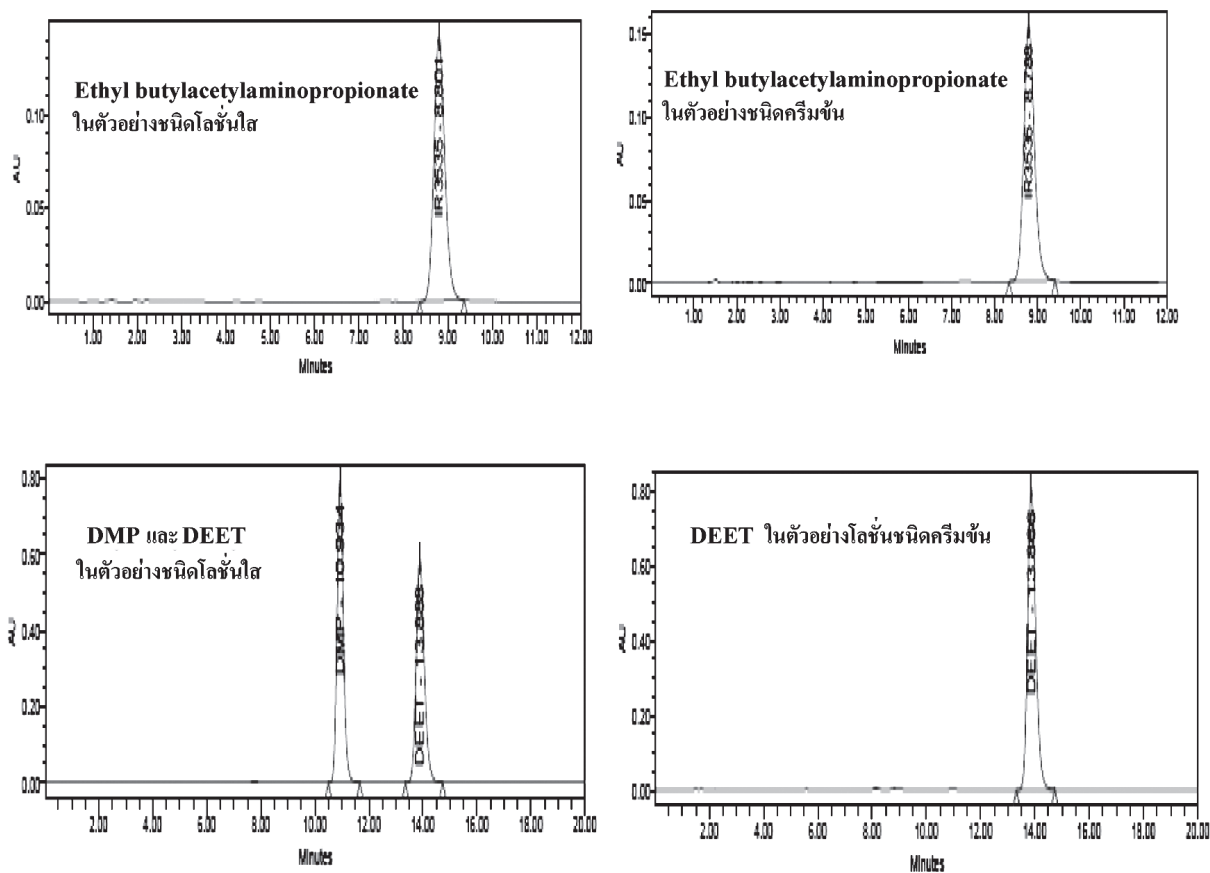
แหล่งที่มาของความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ปริมาณ ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ในตัวอย่าง โดยวิธี HPLC เช่น ความไม่แน่นอนจากความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน การสอบเทียบเครื่องชั่ง เครื่องแก้วที่ใช้เตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ความเข้มข้นของสารทั้ง 3 ชนิดในสารละลายตัวอย่างที่อ่านได้จากเครื่อง HPLC การวิเคราะห์ซ้ำ (precision) และจากค่าร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ของการทดสอบความถูกต้องของวิธีนำมาคำนวณค่าความไม่แน่นอนรวม (combined uncertainty, u_c) แล้วคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty, U) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า coverage factor (k) เท่ากับ 2

ผล**การทดสอบความจำเพาะเจาะจง**

จากการฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างชนิดโลชั่นสไลและครีมขัน พบว่า ภายใต้อสภาวะของเครื่อง HPLC สามารถแยกสาร ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ออกจากกันได้และไม่มีมารบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง โดยมีค่า retention time เท่ากับ 8.86, 11.6 และ 14.2 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 2 และ 3)



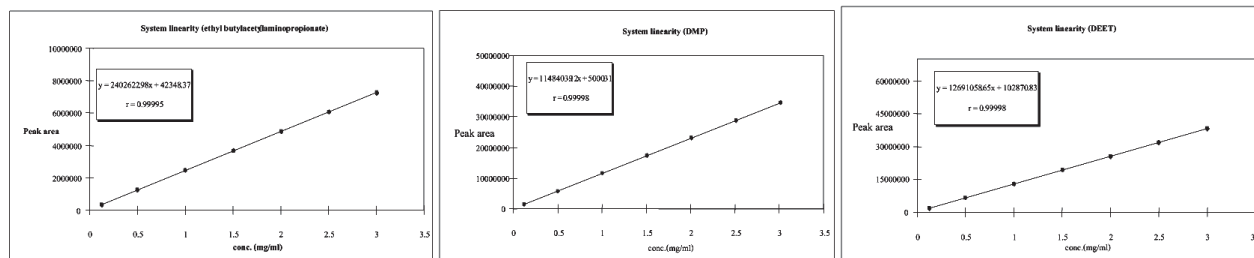
ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของ ethyl butylacetylaminopropionate DMP และ DEET ในตัวอย่าง

ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์

ความเป็นเส้นตรงของระบบ จากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีค พบว่าความเข้มข้นของสาร ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับพื้นที่ใต้พีค โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.99995, 0.99998 และ 0.99998 ตามลำดับ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ความเป็นเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET และพื้นที่ใต้พีค

การทดสอบความเที่ยง

จากการวิเคราะห์ปริมาณ ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ซ้ำในวันเดียวกัน ได้ค่า % RSD ในตัวอย่างชนิดโลชั่นสีเท่ากับร้อยละ 0.12, 0.04 และ 0.03 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างชนิดครีมชั้นได้ค่า % RSD ของผลการวิเคราะห์ ethyl butylacetylaminopropionate, และ DEET เท่ากับร้อยละ 0.06 และ 0.19 ตามลำดับ และพบว่าไม่มีความแตกต่างของผลวิเคราะห์จากการวิเคราะห์ซ้ำ 5 วัน โดยการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ในตัวอย่างชนิดโลชั่นสี ให้ค่า p-value เท่ากับ 0.80, 0.06 และ 0.13 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างชนิดครีมชั้นค่า p-value ของการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ ethyl butylacetylaminopropionate และ DEET เท่ากับ 0.35 และ 0.996 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าไม่มีความแตกต่างของผลวิเคราะห์ที่ได้จากนักวิเคราะห์ 3 คนโดยผลวิเคราะห์ ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ในตัวอย่างชนิดโลชั่นสี มีค่า p-value เท่ากับ 0.22, 0.40 และ 0.92 ตามลำดับ และผลวิเคราะห์ DEET ในตัวอย่างชนิดครีมชั้นมีค่า p-value เท่ากับ 0.18 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์สาร ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET

สารไล่แมลง	ตัวอย่าง	การวิเคราะห์ซ้ำ		
		ในวันเดียวกัน % RSD, n=7	ระหว่าง 5 วัน p-value	ระหว่าง นักวิเคราะห์ 3 คน p-value
ethyl butylacetylaminopropionate	ชนิดโลชั่นสี	0.12	0.80	0.22
	ชนิดครีมชั้น	0.06	0.35	–
DMP	ชนิดโลชั่นสี	0.04	0.06	0.40
	ชนิดครีมชั้น	–	–	–
DEET	ชนิดโลชั่นสี	0.03	0.13	0.92
	ชนิดครีมชั้น	0.19	0.996	0.18

การทดสอบร้อยละของการคืนกลับ

จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง spiked sample ชนิดโลชั่นใสและครีมชั้น พบว่า ร้อยละของการคืนกลับของสาร ethyl butylacetylaminopropionate อยู่ในช่วงร้อยละ 99.7–103.5 และ 102.2–104.6 , ร้อยละของการคืนกลับของสาร DMP อยู่ในช่วงร้อยละ 94.6–98.1 และ 96.2–98.9 และร้อยละของการคืนกลับของ DEET อยู่ในช่วงร้อยละ 97.6–99.3 และ 98.4–101.6 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ร้อยละของการคืนกลับ (percent recovery) ของวิธีวิเคราะห์สาร ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET

สารไล่แมลง	ตัวอย่าง	% recovery	% RSD
ethyl butylacetylaminopropionate	ชนิดโลชั่นใส	99.7–103.5	1.27
	ชนิดครีมชั้น	102.2–104.6	0.82
DMP	ชนิดโลชั่นใส	94.6–98.1	1.15
	ชนิดครีมชั้น	96.2–98.9	0.86
DEET	ชนิดโลชั่นใส	97.5–99.3	0.50
	ชนิดครีมชั้น	98.4–101.6	1.02

ขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ

พบว่า LOD ของการวิเคราะห์ ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET เท่ากับ ร้อยละ 0.08, 0.05 และ 0.05 โดยน้ำหนัก ค่า LOQ เท่ากับ ร้อยละ 0.30, 0.20 และ 0.20 โดยน้ำหนัก โดยมีค่า %RSD เท่ากับ ร้อยละ 1.66, 1.76, 1.5 และร้อยละของการคืนกลับ อยู่ในช่วงร้อยละ 95.6–101.2, 95.4–98.5 และ 97.2–104.6 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ร้อยละของการคืนกลับ (percent recovery) และ %RSD ของวิธีวิเคราะห์สาร ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ที่ระดับ LOQ

สารไล่แมลง	ตัวอย่าง	ปริมาณที่เติม (%w/w)	% recovery	% RSD
ethyl butylacetylaminopropionate	ชนิดโลชั่นใส	0.3	96.5–101.2	0.78
	ชนิดครีมชั้น	0.3	95.6–98.2	1.66
DMP	ชนิดโลชั่นใส	0.2	95.4–98.5	1.76
	ชนิดครีมชั้น	–	–	–
DEET	ชนิดโลชั่นใส	0.2	97.2–104.6	1.51
	ชนิดครีมชั้น	0.2	102.1–104.4	1.43

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และค่า k เท่ากับ 2 พบว่า ในตัวอย่างชนิดโลชั่นมีค่าความไม่แน่นอนขยายสัมพัทธ์ (relative expanded uncertainty) เท่ากับ 0.027, 0.041 และ 0.024 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างชนิดครีมชั้น ค่าความไม่แน่นอนขยายสัมพัทธ์สำหรับผลวิเคราะห์ ethyl butylacetylaminopropionate และ DEET เท่ากับ 0.025 และ 0.024 ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ในตัวอย่าง

สารไล่แมลง	ตัวอย่างชนิดโลชั่นใส			ตัวอย่างชนิดครีมข้น		
	ปริมาณ	relative	expanded	ปริมาณสาร	relative	expanded
	สารไล่แมลง	expanded	uncertainty	สารไล่แมลง	expanded	uncertainty
	(% w/w)	uncertainty k=2	(% w/w)	(% w/w)	uncertainty k=2	(% w/w)
ethyl butylacetylaminopropionate	12.10	0.0268	0.32	11.94	0.0248	0.30
DMP	30.08	0.0412	1.24	-	-	-
DEET	25.43	0.0242	0.61	14.65	0.0242	0.35

วิจารณ์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารไล่แมลง ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET โดยวิธี HPLC ในระบบ reversed phase ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ สามารถแยกสารทั้ง 3 ชนิดออกจากกันโดยไม่ถูกรบกวนจากสารอื่นในตัวอย่างและสามารถตรวจวิเคราะห์สารทั้ง 3 ชนิดนี้ได้พร้อมกัน ในการวิเคราะห์คร่าวเดียว เป็นการประหยัดเวลา ค่าใช้จ่ายและลดปริมาณการใช้สารเคมี ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจวิเคราะห์โดยวิธี Gas chromatography โดยเลือกใช้ capillary column ชนิด HP-5 หรือ HP-50 +⁽¹¹⁾ พบว่า วิธี GC ไม่สามารถแยกแยะระหว่างพีคของ ethyl butylacetylaminopropionate กับ DEET และไม่สามารถ ตรวจเอกลักษณ์สารที่กำลังวิเคราะห์ว่าเป็น ethyl butylacetylaminopropionate หรือ DEET ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่มี การใส่สาร 2 ชนิดนี้ร่วมกัน หรือการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ระบุสารสำคัญ การเลือกใช้วิธี HPLC ในระบบ reversed phase ในการตรวจวิเคราะห์จึงเหมาะสมกว่า

สรุป

วิธีตรวจวิเคราะห์สาร ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ในผลิตภัณฑ์ทาโลแมลง โดยวิธี HPLC ในระบบ reversed phase ที่ได้พัฒนาขึ้น มีการทดสอบความถูกต้องของวิธีในคุณสมบัติต่าง ๆ ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนดทั้งหมด และสามารถวิเคราะห์พร้อมกันในคราวเดียว ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี พบว่าความเข้มข้นในช่วง 0.1 - 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากกว่า 0.999 การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกันให้ค่า % RSD น้อยกว่า 1 ส่วนการวิเคราะห์ระหว่างวัน และการวิเคราะห์โดยเปลี่ยนนักวิเคราะห์ให้ค่า p-value มากกว่า 0.05 ค่าร้อยละของการคืนกลับ อยู่ในช่วงร้อยละ 95 - 105 ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาปริมาณ

ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ได้ตั้งแต่ร้อยละ 0.3, 0.2 และ 0.2 โดยน้ำหนักตามลำดับ ความไม่แน่นอนขยายสัมพัทธ์ (relative expanded uncertainty) ของผลการวิเคราะห์ น้อยกว่า 0.05 และสามารถวิเคราะห์พร้อมกันในคราวเดียวโดยมีค่า retention time เท่ากับ 8.86, 11.6 และ 14.2 นาที ตามลำดับ ดังนั้นจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับตรวจวิเคราะห์สาร ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์เดียวกัน และได้จัดทำเป็นคู่มือปฏิบัติการสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อให้บริการตรวจวิเคราะห์และการเฝ้าระวังคุณภาพผลิตภัณฑ์ทางกฎหมาย

เอกสารอ้างอิง

1. Mosquito prevention & control (deet information). [online]. 2015; [cited 2015 Apr 29]; [3 screens]. Available from: URL: <http://www.brevardcounty.us/MosquitoControl/Prevention>.
2. Insect-repellent. [online]. [cited 2015 Apr 29]; [6 screens]. Available from: URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Insect-repellent>.
3. U.S. Food and Drug Administration. Insect repellent use and safety in children. [online]. [cited 2015 Apr 29]; [3 screens]. Available from: URL: <http://www.fda.gov/Drugs/EmergencyPreparedness/ucm085277.htm>.
4. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง การแสดงฉลากของผลิตภัณฑ์ไล่แมลงประเภทสำเร็จรูปที่ประกอบด้วย DEET หรือ Dimethyl phthalate หรือ Diethyl phthalate หรือ Dibutyl phthalate หรือ Ethohexadiol หรือสารเหล่านี้ผสมกัน. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 112 ตอนที่ 93 ง (วันที่ 21 พฤศจิกายน 2538).
5. สารทากันยุง (Repellents). [ออนไลน์]. [สืบค้น 29 เม.ย. 2558]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://www.wongkarnpat.com/viewya.php?id=834>.
6. Sigma-Aldrich. Dimethyl Phthalate, standard for GC. [ออนไลน์]. 2547; [สืบค้น 29 เม.ย. 2558]; [7 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://www.chemtrack.org/MSDSSG/Trf/msdst/msdst131-11-3.html>.
7. Sigma-Aldrich. N,N-Diethyl-M-Toluamide, 97%. [ออนไลน์]. 2547; [สืบค้น 29 เม.ย. 2558]; [6 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://www.chemtrack.org/MSDSSG/Trf/msdst/msdst134-62-3.html>.
8. พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 109 ตอนที่ 39 (วันที่ 6 เมษายน 2535).
9. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2555 เรื่อง กำหนดเกณฑ์ค่าตลาดเคลื่อนจากปริมาณที่กำหนดไว้ของสารสำคัญในวัตถุอันตรายที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้รับผิดชอบ. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 129 ตอนที่พิเศษ 107 ง (วันที่ 6 กรกฎาคม 2555).
10. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง การแสดงฉลากของผลิตภัณฑ์ไล่แมลงประเภทสำเร็จรูป ที่ประกอบด้วย Ethyl butylacetylaminopropionate. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 119 ตอนที่ 45 ง (วันที่ 4 มิถุนายน 2545).
11. SOP 06-02-050 การตรวจวิเคราะห์ diethyltoluamide โดยวิธี GC.นนทบุรี : สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2541.
12. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
13. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550.

Simultaneous Determination of Insect Repellent by HPLC

Wongduan Nakniyom

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

ABSTRACT Determination of ethyl butylacetylaminopropionate, dimethyl phthalate (DMP) and N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) in insect repellent products was developed to analyse simultaneously by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique. The separation was achieved on a XTerra RP C8, 5 μ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm column. Mixture of acetonitrile and water (25:75 v/v) was used as a mobile phase at flow rate of 1.0 mL per minute and with UV detection at 220 nm. Under the HPLC conditions, ethyl butylacetylaminopropionate, DMP and DEET were simultaneous separated without interference of other peaks with the retention time of 8.86, 11.6 and 14.2 minutes, respectively. The method validation was performed in samples of light lotion and cream. The validation showed the linear relationship between their concentration and peak area cover the range of 0.1 – 3 mg/mL with correlation coefficient (r) of 0.99995, 0.99998 and 0.99998 for ethyl butylacetylaminopropionate, DMP and DEET respectively. Repeatability was tested by replicate analysis of ethyl butylacetylaminopropionate, DMP and DEET in lotion and cream samples % RSD of three substances in both sample matrices were in the range 0.06 – 0.12%, 0.04% and 0.03 – 0.19%. There is no different of the results analysed for five days with p-value of 0.35 – 0.80, 0.06 and 0.13 – 0.996, respectively. Test results from different analyst were not different with p-value in the range of 0.22, 0.40 and 0.18 – 0.92. Analysis of spiked samples showed percent recovery of 99.7 – 104.6%, 94.6 – 98.9 and 97.5 – 101.6%, respectively. Limit of detection (LOD) is 0.08%w/w, 0.05%w/w and 0.05%w/w, respectively. Limit of quantitation (LOQ) is 0.30 %w/w, 0.20%w/w and 0.20%w/w, respectively. The relative expanded uncertainty are 0.027, 0.041 and 0.024, respectively. The developed methods with acceptable validation results could be routinely used to analyse the ethyl butylacetylaminopropionate, DMP และ DEET in insect repellent samples.

Key Words : insect repellent, DEET, DMP, ethyl butylacetylaminopropionate

ความปลอดภัยทางจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภค ที่จำหน่าย ณ สถานีขนส่งผู้โดยสาร ในเขตกรุงเทพมหานคร

กมลวรรณ กันแต่ง อัจฉรา อยู่คง และรัชฎาพร สุวรรณรัตน์

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ เพื่อประเมินความปลอดภัยของอาหารทางจุลชีววิทยา ณ สถานีขนส่งที่มีผู้โดยสารจำนวนมาก สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารได้จัดทำโครงการ “เฝ้าระวังความปลอดภัยอาหาร ณ สถานีขนส่งผู้โดยสารขนาดใหญ่ในเขตกรุงเทพมหานคร” โดยเก็บตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภค จำนวนทั้งหมด 459 ตัวอย่าง ระหว่างปี พ.ศ. 2553-2555 จากสถานที่จำหน่ายอาหารภายในสถานีขนส่งหมอชิต สถานีขนส่งสายใต้ สถานีขนส่งเอกมัย และสถานีรถไฟหัวลำโพง เพื่อตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา แบ่งเป็นอาหารพร้อมบริโภคในช่วงปีใหม่ จำนวน 226 ตัวอย่าง และช่วงสงกรานต์ จำนวน 233 ตัวอย่าง ตรวจหา *Escherichia coli* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์บ่งชี้สุขลักษณะการผลิตอาหารและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae* O1/O139, *V. parahaemolyticus* ผลการตรวจในช่วงปีใหม่พบ *E. coli* 96 ตัวอย่าง (42.5%), *S. aureus* 4 ตัวอย่าง (1.8%) และ *Salmonella* spp. 19 ตัวอย่าง (8.4%) ส่วนช่วงสงกรานต์ตรวจพบ *E. coli* 108 ตัวอย่าง (46.4%), *S. aureus* 21 ตัวอย่าง (9.0%) และ *Salmonella* spp. 17 ตัวอย่าง (7.3%) โดยทั้งสองเทศกาลตรวจไม่พบ *V. cholerae* O1/O139 และ *V. parahaemolyticus* เมื่อนำข้อมูลทั้งสองช่วงเทศกาลมาหาความสัมพันธ์ทางสถิติของการตรวจพบและไม่พบจุลินทรีย์ดังกล่าว พบอาหารพร้อมบริโภคในช่วงเทศกาลสงกรานต์พบ *S. aureus* มากกว่าช่วงเทศกาลปีใหมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วน *E. coli* และ *Salmonella* spp. ในช่วงเทศกาลทั้งสองพบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ผลการศึกษานี้ใช้เป็นข้อมูลให้แก่ผู้ประกอบการเพื่อใช้ปรับปรุงสุขลักษณะการผลิตอาหาร และคุ้มครองผู้บริโภคในการเลือกซื้ออาหารที่ปลอดภัย

บทนำ

ในแต่ละวันจะมีผู้เดินทางระหว่างจังหวัดเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะในช่วงเทศกาลสำคัญ เช่น วันปีใหม่ วันสงกรานต์ จะมีประชาชนที่ทำงานในเขตกรุงเทพมหานครจำนวนมากเดินทางกลับบ้านต่างจังหวัด ซึ่งส่วนใหญ่จะเดินทางโดยใช้บริการรถโดยสารประจำทางตามสถานีขนส่งขนาดใหญ่ในเขตกรุงเทพมหานคร^(1, 2) ได้แก่ สถานีขนส่งหมอชิต สถานีขนส่งสายใต้ สถานีขนส่งเอกมัย และสถานีรถไฟหัวลำโพง สถานีขนส่งผู้โดยสารเหล่านี้นอกจากจะเป็นสถานที่ซึ่งใช้เป็นศูนย์รวม กระจาย และสับเปลี่ยนรถสำหรับการขนส่งผู้โดยสาร ยังจัดสิ่งอำนวยความสะดวกให้กับผู้โดยสารเช่น ร้านค้า ร้านอาหาร เป็นต้น ปัจจุบันจึงมีศูนย์อาหารในทุกสถานีขนส่งขนาดใหญ่ทุกแห่ง เพื่อให้บริการผู้โดยสารระหว่างนั่งรอ ถ้าอาหารมีความปลอดภัยต่อการบริโภคผู้โดยสารจะเดินทางได้อย่างราบรื่น แต่ถ้าอาหารนั้นไม่ปลอดภัยมีการปนเปื้อนเชื้อโรคอาหารเป็นพิษส่งผลให้ผู้บริโภคที่เป็นผู้โดยสารจำนวนมากมีอาการปวดท้อง อาเจียนและอุจจาระร่วง⁽³⁾ ทำให้อาจไม่สามารถเดินทางได้ตามกำหนดหรือเดินทางได้อย่างยากลำบาก กรณีที่เป็นเด็กหรือผู้สูงอายุอาจมีอาการรุนแรง และอาจเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ มีรายงานการเกิดโรคอาหารเป็นพิษในต่างประเทศโดยมีสาเหตุจากจุลินทรีย์สูงถึง 79 เปอร์เซ็นต์⁽⁴⁾ และในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2552 สำนักระบาดวิทยาได้รับรายงานโรคอาหารเป็นพิษ จำนวน 103,420 ราย อัตราป่วย 162.98 ต่อประชากรแสนคน มีผู้เสียชีวิต 1 ราย⁽⁵⁾ ซึ่งการปรับปรุงสุขลักษณะการผลิตอาหารขึ้นพื้นฐานช่วยลดความเสี่ยงจากโรคอาหารเป็นพิษได้⁽⁶⁾ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งเป็นหน่วยงานที่ให้บริการตรวจวิเคราะห์อาหารเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคและยกระดับคุณภาพการผลิตอาหาร จึงจัดทำโครงการเฝ้าระวังความปลอดภัยอาหาร ณ สถานีขนส่งผู้โดยสารขนาดใหญ่ในเขตกรุงเทพมหานครขึ้น เพื่อเป็นข้อมูลให้เจ้าหน้าที่ในหน่วยงานที่รับผิดชอบในแต่ละสถานีขนส่งเฝ้าระวังอาหารที่จำหน่ายในสถานีที่รับผิดชอบ และนำข้อมูลที่ได้ให้คำแนะนำแก่ผู้ประกอบการปรับปรุงสุขลักษณะการผลิตอาหารพร้อมบริโภคในศูนย์อาหารภายในสถานีขนส่งให้มีคุณภาพดียิ่งขึ้น โดยให้ความสำคัญกับการจัดการด้านสุขลักษณะและความปลอดภัยด้านจุลชีววิทยาเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคหรือผู้เดินทางที่เข้ามาใช้บริการภายในสถานีขนส่งผู้โดยสารขนาดใหญ่ในเขตกรุงเทพมหานคร ในช่วงเทศกาลปีใหม่และสงกรานต์ให้ได้บริโภคอาหารที่สะอาดปลอดภัย และถูกสุขลักษณะทั้งเป็นการส่งเสริมภาพลักษณ์ของสถานีขนส่งแก่ผู้โดยสารทั้งคนไทยและต่างประเทศ และข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้บริหารจัดการความเสี่ยงต่อไป

วัสดุและวิธีการ

เชื้อมาตรฐาน

เชื้อมาตรฐานใช้สำหรับการควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ในงานวิจัย เป็นเชื้อจุลินทรีย์จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* DMST 24373, *S. aureus* DMST 8840, *Salmonella* Typhimurium DMST 562, *V. cholerae* non O1/non O139 DMST 2873, *V. parahaemolyticus* DMST 5665

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ดังนี้

1. *E. coli* : Sim plate
2. *S. aureus* : brain heart infusion broth (BHI), Baird-Parker medium, coagulase plasma (rabbit) with EDTA

3. *Salmonella* spp. : Buffered peptone water, Hektoen enteric (HE) agar, Lysine indole motility medium or motility indole lysine medium (MIL), Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth (MKTn broth), Rappaport-Vassilidis medium with soya (RVS broth), Triple sugar iron agar (TSI), Urea agar, Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar

4. *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* : alkaline saline peptone water, chrom vibrio agar, thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS), saline MIL, esaline TSI

น้ำยาและสารเคมี

Gram's stain reagent, 3% hydrogen peroxide solution, iodine-iodide solution, Kovacs' reagent, methyl red solution, 0.1% peptone water, saline peptone water (0%, 2%, 6%, 8% และ 10%), VP reagent, *Salmonella* polyvalent O antisera, *Salmonella* individual O antisera group, sodium chloride 0.85% aqueous solution, polyvalent *V. cholerae* O1 และ O139, *V. cholerae* Inaba และ Ogawa antiserum

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

Autoclave, balance (sensitivity 0.1 กรัม), glass bottle with screw cap, glass spreading rod, glass slide, incubator ($35 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$), loop, needle, pH-meter, petri dishes, pipette (1, 5 และ 10 มิลลิลิตร) stomacher, stomacher bag, test tube, vortex mixer, water bath ($41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$)

ตัวอย่างทดสอบ

อาหารพร้อมบริโภค เช่น อาหารจานเดียว (ข้าวมันไก่, ข้าวหมูแดง, ข้าวคลุกกะปิ) อาหารประเภทเส้น (ก๋วยเตี๋ยว, บะหมี่, สุกี้) กับข้าว (ผัดถั่วงอก, ผัดกระเพรา, ผัดผักคะน้า) อาหารประเภทยำ (ยำหัวหมู, ส้มตำ, ลาบ) ของทอด/ย่าง (ลูกชิ้นทอด, ไส้อั่ว, ไส้กรอก) ขนมหวาน และผลไม้ เก็บจากร้านอาหารและแผงลอยภายนอกสถานที่ และร้านอาหารภายในศูนย์อาหาร (Food court) ของสถานีส่งหมอชิต สายใต้ใหม่ เอกมัย และสถานีรถไฟหัวลำโพง ในช่วง 2 สัปดาห์ก่อนเทศกาลปีใหม่และเทศกาลสงกรานต์ โดยเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาเที่ยงวัน ระหว่างปี พ.ศ. 2553-2555 จำนวนทั้งหมด 459 ตัวอย่าง

การทดสอบ

อาหารพร้อมบริโภคแต่ละตัวอย่างที่เก็บโดยวิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic technique) จะถูกส่งตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาทันทีภายใน 2 ชั่วโมง เพื่อตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ตรวจปริมาณ (enumeration) เชื้อที่ใช้บ่งชี้สู่ลักษณะการผลิต ได้แก่ *E. coli* กลุ่มที่ 2 ตรวจหา (detection) จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ *S. aureus*, *Salmonella* spp., *V. cholerae* O1/O139 และ *V. parahaemolyticus* การตรวจวิเคราะห์ใช้วิธีต่าง ๆ ดังนี้

1. *E. coli* ใช้วิธี AOAC 2005.03⁽⁷⁾
2. *S. aureus* ใช้วิธี FDA.BAM 2001, chapter 12⁽⁸⁾
3. *Salmonella* spp. ใช้วิธี ISO 6579: 2002/ Cor.1: 2004⁽⁹⁾
4. *V. cholerae* O1/O139 และ *V. parahaemolyticus* ใช้วิธี ISO/TS 21872-1:2007⁽¹⁰⁾

เกณฑ์ที่ใช้ตัดสิน

การประเมินผลการตรวจวิเคราะห์ใช้ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค⁽¹¹⁾ และเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปี พ.ศ. 2553 ข้อ 2.1.1 (ผัก ผลไม้ สลัด สัมตำ) และข้อ 2.2.4 (อาหารปรุงสุกทั่วไป)⁽¹²⁾ ดังนี้

รายการ	เกณฑ์ฯ ข้อ 2.1.1	เกณฑ์ฯ ข้อ 2.2.4
<i>E. coli</i> /กรัม	น้อยกว่า 100	น้อยกว่า 3
<i>S. aureus</i> /กรัม	น้อยกว่า 100	น้อยกว่า 100
<i>Salmonella</i> spp./25 กรัม	ไม่พบ	ไม่พบ
<i>V. cholerae</i> O1/O139/25 กรัม	ไม่พบ	ไม่พบ
<i>V. parahaemolyticus</i> /25 กรัม	ไม่พบ	ไม่พบ

การคำนวณ หาความสัมพันธ์ (ความแตกต่าง) ทางสถิติของอาหารพร้อมบริโภคระหว่างช่วงเทศกาลปีใหม่และสงกรานต์กับการตรวจพบหรือไม่พบเชื้อโดยใช้ไคสแควร์ (χ^2 - test) สำหรับข้อมูลตารางขนาด 2×2 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังนี้⁽¹³⁾ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ (ความแตกต่าง) ทางสถิติของอาหารพร้อมบริโภคระหว่างช่วงเทศกาลปีใหม่และสงกรานต์กับการตรวจพบหรือไม่พบเชื้อ

ผลการตรวจ	ช่วงเทศกาล		รวม
	ปีใหม่	สงกรานต์	
พบ	a	b	g
ไม่พบ	c	d	h
รวม	e	f	k

$$\chi^2 = \frac{k (ad - bc)^2}{efgh}$$

- a = จำนวนตัวอย่างในช่วงเทศกาลปีใหม่ที่พบเชื้อหรือมีปริมาณเชื้อมากกว่าเกณฑ์กำหนด
- b = จำนวนตัวอย่างในช่วงเทศกาลสงกรานต์ที่พบเชื้อหรือมีปริมาณเชื้อมากกว่าเกณฑ์กำหนด
- c = จำนวนตัวอย่างในช่วงเทศกาลปีใหม่ที่ไม่พบเชื้อหรือมีปริมาณเชื้ออยู่ในเกณฑ์กำหนด
- d = จำนวนตัวอย่างในช่วงเทศกาลสงกรานต์ที่ไม่พบเชื้อหรือมีปริมาณเชื้ออยู่ในเกณฑ์กำหนด
- e = a + c
- f = b + d
- g = a + b
- h = c + d
- k = จำนวนตัวอย่างทั้งหมด
- df = ค่าชั้นแห่งความอิสระ = (r-1) (c-1)

$$r = \text{จำนวนแถว} = 2$$

$$c = \text{จำนวนสดมภ์} = 2$$

$$\therefore df = (2-1)(2-1) = 1$$

ค่าไคสแควร์ (χ^2) จากตารางที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 df = 1 มีค่า 3.84

ถ้า χ^2 ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่า 3.84 ($p < 0.05$) แสดงว่าตัวอย่างอาหารในช่วงเทศกาลปีใหม่และช่วงเทศกาลสงกรานต์พบจุลินทรีย์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ถ้าน้อยกว่า 3.84 ($p > 0.05$) แสดงว่าตัวอย่างจากทั้งสองช่วงเทศกาลไม่มีความแตกต่างกัน

ผล

อาหารพร้อมบริโภค 459 ตัวอย่าง ตรวจวิเคราะห์ช่วงเทศกาลปีใหม่ จำนวน 226 ตัวอย่าง พบปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้บ่งชี้สู่ลักษณะการผลิต *E. coli* มากกว่าเกณฑ์กำหนด 96 ตัวอย่าง (ร้อยละ 42.5) และพบจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค *S. aureus* มากกว่า 100 CFU ต่อกรัม 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.8) และ *Salmonella* spp. 19 ตัวอย่าง (ร้อยละ 8.4) ส่วนในช่วงเทศกาลสงกรานต์ 233 ตัวอย่าง พบ *E. coli* มากกว่าเกณฑ์กำหนด รวม 108 ตัวอย่าง (ร้อยละ 46.4) และพบจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค *S. aureus* มากกว่า 100 CFU ต่อกรัม 21 ตัวอย่าง (ร้อยละ 9.0) และ *Salmonella* spp. 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.3) โดยทั้งสองช่วงเทศกาลตรวจไม่พบ *V. cholerae* O1/O139 และ *V. parahaemolyticus* (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์อาหารพร้อมบริโภคในช่วงเทศกาลปีใหม่และเทศกาลสงกรานต์

ช่วง เทศกาล	ปี พ.ศ.	จำนวนตัวอย่าง (ร้อยละ)		จุลินทรีย์ที่บ่งชี้ สู่ลักษณะการผลิต	จุลินทรีย์ทำให้เกิดโรค		
		ตรวจ	ไม่ผ่าน เกณฑ์	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>V. cholerae</i> O1/O139 และ <i>V. parahaemolyticus</i>
ปีใหม่	2553	58	23 (39.7)	22 (37.9)	4 (6.9)	7 (12.1)	0
	2554	86	40 (46.5)	40 (46.5)	0	8 (9.3)	0
	2555	82	35 (42.7)	34 (42.7)	0	4 (4.9)	0
	รวม	226	98 (43.4)	96 (42.5)	4 (1.8)	19 (8.4)	0
สงกรานต์	2553	83	41 (49.4)	41 (49.4)	7 (8.4)	5 (6.0)	0
	2554	69	36 (52.2)	35 (50.7)	8 (11.6)	8 (11.6)	0
	2555	81	33 (40.7)	32 (39.5)	6 (7.4)	4 (4.9)	0
	รวม	233	110 (47.2)	108 (46.4)	21 (9.0)	17 (7.3)	0
รวม		459	208 (45.3)	204 (44.4)	25 (5.4)	36 (7.8)	0

เมื่อหาความสัมพันธ์ทางสถิติของการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (ตารางที่ 1) พบว่าตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภคทั้งสองช่วงเทศกาลที่ไม่ผ่านเกณฑ์โดยรวม มีค่าไคสแควร์ (χ^2) 0.69 แสดงว่าผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่เมื่อแยกหาความสัมพันธ์ของแต่ละเชื้อ พบว่าในช่วงเทศกาลสงกรานต์พบการปนเปื้อนเฉพาะ *S. aureus* ที่ไม่ผ่านเกณฑ์กำหนดในอาหารดังกล่าวมากกว่าช่วงปีใหม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มีค่าไคสแควร์ (χ^2) 11.71 โดยทั้งสองเทศกาลมีปริมาณ *S. aureus* มากกว่า 10^4 แต่น้อยกว่า 10^5 CFU

ต่อกรัม จำนวน 3 ตัวอย่าง (อาหารประเภทเส้น 1 ตัวอย่าง และอาหารจานเดียว 2 ตัวอย่าง) ส่วน *E. coli* และ *Salmonella* spp. ในช่วงเทศกาลทั้งสองพบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่าไคสแควร์ (χ^2) 0.70 และ 0.20 ตามลำดับ

เมื่อแยกตามประเภทอาหาร พบว่าอาหารจานเดียว (เช่น ข้าวมันไก่ ข้าวขาหมู ข้าวหมูแดง ฯลฯ) มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่บ่งชี้สู่ลักษณะการผลิตสูงสุด ร้อยละ 65.4 รองลงมา ได้แก่ อาหารประเภทเส้น อาหารประเภทยำ กับข้าว ผลไม้ ขนมหวานและของทอด มีความเสี่ยงคิดเป็นร้อยละ 52.2, 50.0, 32.5, 20.5, 10.7 และ 3.3 ตามลำดับ ส่วนการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค *S. aureus* และ *Salmonella* spp. พบอาหารประเภทยำ มีการปนเปื้อนมากที่สุด (*S. aureus* ร้อยละ 14.3 *Salmonella* spp. ร้อยละ 28.6) รองลงมา ได้แก่ อาหารจานเดียว และอาหารประเภทเส้น ที่พบ *S. aureus* ร้อยละ 7.8 และ 5.3 พบ *Salmonella* spp. ร้อยละ 12.4 และ 8.0 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการตรวจวิเคราะห์อาหารพร้อมบริโภคแยกตามประเภทอาหาร

ประเภทอาหาร	จำนวนตัวอย่าง	จุลินทรีย์ที่บ่งชี้	จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค	
		สู่ลักษณะการผลิต	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i> spp.
	ตรวจ	<i>E. coli</i> (ร้อยละ)	(ร้อยละ)	(ร้อยละ)
1. อาหารจานเดียว (เช่น ข้าวมันไก่, ข้าวหมูแดง, ข้าวขาหมู ข้าวคลุกกะปิ)	153	100 (65.4)	12 (7.8)	19 (12.4)
2. อาหารประเภทเส้น (เช่น ก๋วยเตี๋ยว, บะหมี่, กวยจั๊บ, เส้นหมี่กระเพาะปลา, สุกี้)	113	59 (52.2)	6 (5.3)	9 (8.0)
3. กับข้าว (เช่น กะเพราหมู, ผัดเครื่องในไก่, ผัดถั่วฝักยาว, ผัดคะน้า)	77	25 (32.5)	3 (3.9)	3 (3.9)
4. อาหารประเภทยำ (เช่น ยำหัวหมู, ส้มตำ, ลาบหมู)	14	7 (50.0)	2 (14.3)	4 (28.6)
5. ของทอด/ย่าง (เช่น ลูกชิ้นทอด, ใส่อั่ว, ใส้กรอก)	30	1 (3.3)	0	0
6. ขนมหวาน	28	3 (10.7)	1 (3.6)	0
7. ผลไม้	44	9 (20.5)	1 (2.3)	1 (2.3)
รวม	459	204 (44.4)	25 (5.4)	36 (7.8)

วิจารณ์

จากผลการตรวจวิเคราะห์อาหารพร้อมบริโภคซึ่งเก็บจากสถานที่จำหน่ายอาหารภายในสถานีนขนส่งผู้โดยสารขนาดใหญ่ 4 แห่ง ในเขตกรุงเทพมหานคร ระหว่างปี พ.ศ. 2533 ถึง พ.ศ. 2555 ในช่วงเทศกาลปีใหม่และสงกรานต์ พบ *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* spp. ร้อยละ 44.4, 5.4 และ 7.8 ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และ 3) การพบการปนเปื้อนของ *E. coli* เกือบร้อยละ 45 แสดงให้เห็นว่ากระบวนการผลิตและการเก็บรักษาอาหารเหล่านี้ยังไม่ถูกสุขลักษณะ เนื่องจาก *E. coli* เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ทนต่อความร้อนที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ซึ่งการพบ *E. coli* ในอาหารพร้อมบริโภค โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่ต้องผ่านความร้อนก่อนบริโภค (ทอด นึ่ง ย่างหรือผัด) แสดงให้เห็นว่าเกิดการปนเปื้อนซ้ำ (recontaminated) การปนเปื้อนซ้ำส่วนใหญ่เกิดจากการปนเปื้อนข้าม (cross contaminated) ของเชื้อจากอาหารดิบสู่ภาชนะ เครื่องมือ เครื่องใช้ เครื่องแต่งกาย มือ หรือการไอหรือจามของผู้ประกอบอาหารลงสู่อาหารสุก ดังนั้นการปนเปื้อนของ *S. aureus* และ *Salmonella* spp. จึงอาจปนเปื้อนซ้ำได้เช่นกัน เนื่องจาก *S. aureus* และ *Salmonella* spp. เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ทนต่อความร้อนโดย *S. aureus* เป็นจุลินทรีย์ซึ่งอยู่ตามผิวหนัง จมูกและลำคอของคน⁽¹⁴⁾ ส่วน *Salmonella* spp. เป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร เช่นเดียวกับ *E. coli* ผู้ประกอบการปรุง/จำหน่ายและบริการอาหาร สามารถควบคุมการปนเปื้อนซ้ำได้ เช่น เครื่องมือเครื่องใช้ในการตัดหรือปรุงอาหารต้องสะอาด แยกอุปกรณ์ที่หยิบจับวัตถุดิบและอาหารที่ปรุงแล้วออกจากกัน ไม่ควรหยิบจับอาหารด้วยมือ อาหารที่ปรุงเสร็จแล้วควรมีภาชนะปิดหรือป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์สู่อาหาร และควรอุ่นอาหารเป็นระยะ ๆ เพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ที่มีอยู่หรือทำลายจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนภายหลัง อาหารจานเดียว หรือขนมหวานที่ไม่สามารถอุ่นได้ ควรเก็บในตู้เย็นหรือภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิดส่วนวัตถุดิบประเภทเนื้อสัตว์ควรแช่เย็น เพื่อป้องกันการเจริญเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์

ส่วนการพบ *S. aureus* ในช่วงเทศกาลสงกรานต์มากกว่าปีใหม่มิอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (ร้อยละ 9.0 และ 1.8 ตามลำดับ) อาจเนื่องจากในช่วงเทศกาลสงกรานต์เป็นช่วงฤดูร้อน เชื้อจะเจริญแบ่งตัวได้อย่างรวดเร็วกว่าช่วงปีใหม่ซึ่งเป็นช่วงฤดูหนาว ดังนั้นช่วงสงกรานต์จึงมีโอกาสพบ *S. aureus* ในตัวอย่างมากกว่าและพบปริมาณ (CFU ต่อกรัม) สูงกว่าช่วงปีใหม่ ปริมาณที่พบในตัวอย่างทั้งสองช่วงเวลาน้อยกว่า 10^5 CFU ต่อกรัมจึงยังไม่สามารถสร้างสารพิษ (enterotoxin) ในปริมาณที่ก่อให้เกิดโรคได้ แต่ถ้าปล่อยอาหารเหล่านี้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ถึง 2 ชั่วโมง หรือเก็บรักษาไม่ถูกสุขลักษณะ จำนวน *S. aureus* ที่มีมากกว่า 10^4 CFU ต่อกรัมจะเพิ่มปริมาณมากขึ้นเป็น 10^5 ถึง 10^6 CFU ต่อกรัม และสร้างสารพิษทำให้เป็นสาเหตุการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ⁽¹⁵⁾ ดังนั้นอาหารพร้อมบริโภคที่จำหน่ายภายในสถานีนขนส่งผู้โดยสารจึงมีความเสี่ยงในการจะเกิดโรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* ได้ ทั้งนี้จะสอดคล้องกับรายงานประจำปีของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งเป็นข้อมูลการให้บริการตรวจวิเคราะห์อาหารที่จำหน่ายในประเทศพบว่าปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญ สาเหตุจากอาหารเป็นพิษนั้นพบ *S. aureus* เป็นเชื้อก่อโรคอันดับต้น ๆ ที่ปนเปื้อนในอาหารพร้อมบริโภค^(16, 17) อย่างไรก็ตามการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในอาหารพร้อมบริโภค สาเหตุส่วนใหญ่มาจากสุขลักษณะส่วนบุคคลไม่ดี โดยใช้มือที่มีบาดแผลหรือไม่ได้ล้างมือให้สะอาดหยิบจับอาหาร ไอหรือจามในขณะที่ปรุงหรือบริการอาหาร

ส่วนใหญ่ในช่วงปีใหม่พบการปนเปื้อนของเชื้อชนิดต่างๆ น้อยกว่าช่วงสงกรานต์ สาเหตุส่วนหนึ่งน่าจะเกิดจากช่วงสงกรานต์เป็นฤดูร้อน อุณหภูมิของอากาศสูง ซึ่งเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ ทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญได้รวดเร็วกว่าจึงมีโอกาสตรวจพบและก่อให้เกิดโรคได้มากกว่าช่วงปีใหม่ซึ่งเป็นฤดูหนาว แต่เมื่อทดสอบทางสถิติมีเพียง *S. aureus* เท่านั้นที่พบในช่วงสงกรานต์มากกว่าช่วงเทศกาลปีใหม่อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วน *E. coli* และ *Salmonella* spp. ในทั้งสองช่วงเทศกาลพบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) อาจเนื่องมาจากจำนวนและชนิดของตัวอย่างที่เก็บและจำหน่ายรายใหม่ที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละรอบที่มีการเก็บตัวอย่าง

การที่อาหารประเภทยำตรวจพบจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคมามากที่สุด พบ *S. aureus* และ *Salmonella* spp. ร้อยละ 14.3 และ 28.6 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ประกอบอาหารบางชนิดไม่ผ่านความร้อน (เช่น ผักและผลไม้) หรือผ่านความร้อนไม่เพียงพอ (เช่น การลวกเนื้อสัตว์ต่าง ๆ) และการปรุงอาหารประเภทนี้มักมีการหยิบหรือจับอาหารดิบสลับอาหารสุกโดยไม่ได้ล้างมือ ทำให้มีโอกาสที่เชื้อโรคจากวัตถุดิบปนเปื้อนข้ามสู่อาหารปรุงสุกได้มากกว่าอาหารประเภทอื่น ดังนั้นการปรุงอาหารประเภทนี้ ควรใช้วัตถุดิบที่สะอาด ทำให้สุกอย่างทั่วถึง และควรหลีกเลี่ยงการหยิบจับด้วยมือโดยตรง อุปกรณ์ที่ใช้หยิบจับ หั่นหรือสัมผัสวัตถุดิบและที่ปรุงสุกไม่ควรใช้ร่วมกัน อาหารประเภทกับข้าว ควรมีการอุ่นทุก 2 ถึง 3 ชั่วโมง ส่วนอาหารที่ปรุงเสร็จแล้วและขนมหวานที่ไม่สามารถอุ่นได้ ควรเก็บในตู้หรือภาชนะที่มีฝาปิด ควรหลีกเลี่ยงการหยิบจับด้วยมือโดยตรง ในกรณีที่ไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ ควรล้างมือให้สะอาดก่อนหยิบจับอาหาร

สรุป

การเฝ้าระวังความปลอดภัยอาหาร เพื่อคุ้มครองผู้บริโภคโดยสารที่เข้ามาใช้บริการในการเดินทางและบริโภคอาหารที่จำหน่ายภายในสถานขนส่งผู้โดยสารขนาดใหญ่ในเขตกรุงเทพมหานครในช่วงเทศกาลปีใหม่และสงกรานต์ ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ พบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ($p > 0.05$) แสดงว่าอาหารพร้อมบริโภค ทั้ง 2 ช่วงเทศกาล ยังไม่ถูกสุขลักษณะ ตรวจพบจุลินทรีย์บ่งชี้สุขลักษณะอาหารคือ *E. coli* ถึงแม้จะตรวจไม่พบ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* แต่ตรวจพบเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ *S. aureus* และ *Salmonella* spp. ซึ่งถ้าการเก็บรักษาไม่เหมาะสมเชื้อจะเจริญเพิ่มจำนวนและสร้างสารพิษในอาหารโดยเฉพาะ *S. aureus* และเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษได้ ผู้ควบคุมต้องควบคุมดูแลผู้จำหน่ายอาหารมีการตกแต่งและอบรมให้ความรู้แก่ผู้จำหน่ายและบริการอาหารให้ตระหนักถึงพิษภัยจากการบริโภคอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ และเก็บตัวอย่างอาหารตรวจวิเคราะห์เป็นระยะ ๆ เพื่อเฝ้าระวังความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคต่อไป ผู้บริโภคควรเลือกรับประทานอาหารที่ปรุงสุกใหม่ หรือมีการอุ่นเป็นระยะ ๆ และเลือกรับประทานอาหารจากร้านค้าที่สะอาด หลีกเลี่ยงอาหารที่ปรุงสุก ๆ ดิบ ๆ สำหรับผู้จำหน่ายอาหารควรเลือกวัตถุดิบที่นำมาประกอบอาหารที่สดและสะอาดควรล้างมือให้สะอาด สวมหมวกและสวมใส่ผ้ากันเปื้อนก่อนปรุงอาหาร แยกอุปกรณ์ที่ใช้สัมผัสวัตถุดิบและอาหารที่ปรุงสุกแล้ว อาหารที่ปรุงเสร็จใหม่ ๆ ควรอยู่ในภาชนะที่สะอาดมีที่ปิดป้องกันแมลงได้ อุ่นอาหารให้ร้อนอยู่เสมอ (ทุก 2-3 ชั่วโมง)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายปรีชา จิงสมานกุล นักวิทยาศาสตร์การแพทย์เชี่ยวชาญ นางลดาวัลย์ จิงสมานกุล นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้คำแนะนำและตรวจทานต้นฉบับและขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาทุกคนที่ช่วยงานวิจัยนี้ให้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. กรมการขนส่งทางบก. ข้าราชการขนส่งทางบก. [ออนไลน์]. 2554; [สืบค้น 18 เม.ย. 2557]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: http://www.dlt.go.th/th/attachments/plan48-51/2603_86-04-54.pdf.
2. สำนักข่าว กรมประชาสัมพันธ์. [ออนไลน์]. 2557; [สืบค้น 18 เม.ย. 2557]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: http://thainews.prd.go.th/centerweb/news/NewsDetail?NT01_NewsID=WNSOC5704110020013.

3. Jones TF, Chapter editor. Chapter 12, Investigation of foodborne and waterborne disease outbreaks. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of clinical microbiology, Vol 1. 9th ed. Washington, DC: ASM Press; 2007. p. 152-169.
4. Weitzman I, Cook OD, Massey JP, Chapter editors. Chapter 28, Investigation of foodborne illness outbreaks. In: Downes FP, Ito K, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. New York: American Public Health Association (APHA); 2001. p. 257-266.
5. โรคอาหารเป็นพิษ (Food poisoning). ใน : สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรคประจำปี 2552. นนทบุรี : กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2553. หน้า 117-124.
6. CAC/RCP 1-1969, Rev.4-2003. Recommended international code of practice general principles of food hygiene. [online]. 2003; [cited 2014 Apr 22]; [31 screens]. Available from: URL: <http://www.mhlw.go.jp/english/topics/importedfoods/guideline/dl/04.pdf>.
7. Andrews WH, Hammack TS, Chapter editors. Chapter 17, AOAC official method 2005.03. In: Latimer GW, editor. Official method of analysis of AOAC international. 19th ed. Gaithersburg: AOAC International; 2012. p. 36-39.
8. Bennett RW, Lancette GA. Chapter 12 “*Staphylococcus aureus*”. In: Bacteriological analytical manual. [online]. January 2001; [cited 2014 Apr 22]; [7 screens]. Available from: URL: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm>.
9. ISO 6579:2002/Cor.1:2004. Microbiological of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Geneva: International Organization for Standardization; 2004.
10. ISO/TS 21872-1:2007. Microbiological of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp.-Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. Geneva: International Organization for Standardization; 2007.
11. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 364 (พ.ศ. 2556) เรื่องมาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 130 ตอนพิเศษ 148 ง (วันที่ 31 ตุลาคม 2556).
12. ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 2. [ออนไลน์]. 28 กันยายน 2553; [6 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://dmisc2.dmisc.moph.go.th/webroot/BQSF/File/VAR-ITY/dmiscguideline.pdf>.
13. ทศนีย์ นุชประยูร, เดิมศรี ชำนิจารกิจ, บรรณาธิการ. สถิติในงานวิจัยทางการแพทย์. กรุงเทพฯ : โอ เอส พรินติ้ง เฮ้าส์; 2537. หน้า 85-86, 265.
14. Isenberg HD, D’Amato RF, Chapter editors. Chapter 4, Indigenous and pathogenic microorganisms of humans. In: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ, editors. Manual of clinical microbiology. 4th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1985. p. 24-35.
15. Chapter 23, Staphylococcus gastroenteritis. In: Jay JM, editor. Modern food microbiology. 6th ed. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers; 2000. p. 441-459.
16. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานประจำปี 2551. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2552.
17. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานประจำปี 2552. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2553.

Microbiological Safety of Ready to Eat Foods Sold at Bus Terminals and Railway Station in Bangkok

Kamonwan Kantaeng Atchara Ukhong and Ratchadaporn Suwannarat

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

ABSTRACT In order to evaluate the microbiological safety of ready to eat food, the project of Food Safety Monitoring from Bus Terminals and a Railway Station in Bangkok was carried on by the Bureau of Quality and Safety of Food (BQSF). Four hundred fifty nine samples of ready to eat food were collected from the food courts in the bus terminals (Mochit, Saitai, and Ekkamai) and Hualamphong Railway Station during 2010 to 2012. The samples were divided into two main groups: New Year group (226 samples taken during the New Year festivals) and Songkran group (233 samples taken during the Songkran festivals). The items of analysis were sanitary index microorganism; *Escherichia coli* (*E. coli*), and pathogenic bacteria; *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*) O1/O139 and *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*) were examined. The results showed that, for the New Year group, *E. coli* was detected in 96 samples (42.5%), *Salmonella* spp. in 19 samples (8.4%), and *S. aureus* in 4 samples (1.8%); and for the Songkran group, *E. coli* in 108 samples (46.4%), *S. aureus* in 21 samples (9.0%), and *Salmonella* spp. in 17 samples (7.3%). Both of festivals, *V. cholerae* O1/O139 and *V. parahaemolyticus* were not detected in any samples. The positive samples of *S. aureus* in Songkran group were more than that New Year group at statistical significance ($p < 0.05$). On the other hand, there was not significantly different ($p > 0.05$) between both groups of samples regarding *E. coli* and *Salmonella* spp. Therefore food safety monitoring and other measures such as law enforcement and knowledge giving of hygienic practices to food sellers and consumers are still needed in order to upgrade the quality and safety of ready to eat food.

Key words: ready to eat foods, microbiological safety, bus terminals

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์และ ผลการสำรวจปริมาณสารไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ ในเนื้อสัตว์ โดย LC-MS/MS

มาลี เจริญวิทย์วรกุล

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ กลุ่มยาไนโตรฟูแรนเดมิโนมใช้เป็นยารักษาโรคในสัตว์ ต่อมาพบว่ามีคุณสมบัติของการเป็นสารก่อมะเร็ง และสารก่อกลายพันธุ์ ประเทศไทยและอีกหลายประเทศได้ออกกฎหมายห้ามใช้เป็นยารักษาสัตว์ที่เสี่ยงเพื่อการบริโภคของมนุษย์ และสหภาพยุโรปได้ออกข้อกำหนดของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาในกลุ่มนี้ 4 ชนิด ในเนื้อสัตว์ โดยต้องหาในรูปของสารเมตาบอไลต์ ได้แก่ 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD) และ semicarbazide (SEM) และต้องวัดได้ต่ำถึงระดับที่ 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Minimum Required Performance Limits : MRPLs) จึงได้พัฒนาและทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์โดยเติม isotope-labelled analogues ของสารเมตาบอไลต์ 4 ชนิด เป็น internal standard ใช้กรดไฮโดรไลส์สารเมตาบอไลต์ ส่วนที่จับกับโปรตีนทำเป็นสารอนุพันธ์ นำมาปรับ pH 7.0 ± 0.5 สกัดแยกสารด้วย liquid-liquid extraction วิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วย LC-MS/MS ช่วงการวิเคราะห์ที่ 0.1-2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้เป็นเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ระหว่าง 0.9860 - 1.0000 ความแม่นยำของวิธีแสดงด้วย %recovery 88.9-112.0% ความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ประเมินโดย HORRAT ค่า <2 ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบ (LOD) 0.05 - 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบปริมาณได้ (LOQ) 0.1 - 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้ทำการสำรวจการตกค้างของกลุ่มยานี้ในเนื้อสัตว์ที่จำหน่ายในตลาดสด และซูเปอร์มาร์เก็ตของเขตกรุงเทพมหานคร ช่วงปี พ.ศ. 2551-2554 รวมทั้งสิ้น 402 ตัวอย่าง พบ AOZ ตกค้างในเนื้อหมูกับเครื่องในร้อยละ 12.2 ที่ระดับ <0.1-44.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และพบ SEM ตกค้างในกุ้งร้อยละ 4.2 ที่ระดับ <0.3-2.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณที่พบของ AOZ และ SEM ในแต่ละปี ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงถึงมีการใช้ยาทั้ง 2 ชนิดในช่วงปีที่สำรวจ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเฝ้าระวังและควบคุมการใช้ยาอย่างเข้มงวด

บทนำ

ไนโตรฟูแรน (nitrofurans) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วย วงแหวนฟูแรนและไนโตรกรุป เรียกว่า 5-nitrofuraldehyde มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ใช้ในการรักษาและป้องกันโรคติดเชื้อของระบบทางเดินอาหารและทางเดินปัสสาวะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและปศุสัตว์ที่นิยมใช้มี 4 ชนิด ได้แก่ furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin และ nitrofurazone ขบวนการเมตาบอลิซึมในสัตว์จะเปลี่ยนยาตั้งต้น (parent drugs) เป็นสารเมตาบอไลต์อย่างรวดเร็วและจับตามเนื้อเยื่อโปรตีนได้นานหลายสัปดาห์อย่างมีความเสถียร จึงตรวจพบยาในกลุ่มนี้ในรูปสารเมตาบอไลต์ได้แก่ 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD) และ semicarbazide (SEM) ตามลำดับ โดยเฉพาะ furazolidone ใช้มากในฟาร์มเลี้ยงหมู เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงและราคาถูก แต่สารกลุ่มนี้มีแนวโน้มเป็นสารก่อกลายพันธุ์และสารก่อมะเร็ง (Mutagen and carcinogen)⁽¹⁾ สหภาพยุโรป, ประเทศไทยและอีกหลายประเทศ จึงได้ออกกฎหมายบังคับห้ามใช้เป็นยารักษาสัตว์ที่เสี่ยงเพื่อการบริโภคของมนุษย์ โดยสหภาพยุโรปได้ออกข้อกำหนดเกี่ยวกับวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ตกค้างทั้ง 4 ชนิด ในเนื้อสัตว์ ของห้องปฏิบัติการต้องวัดค่าได้ต่ำถึงระดับที่กำหนด (Minimum Required Performance Limits; MRPLs) ที่ 1.0 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัม⁽²⁾ และกระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทย โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยากำหนดค่า MRPLs (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ที่ 0.3 สำหรับ AOZ และ AMOZ และ ที่ 1.0 สำหรับ AHD และ SEM เพื่อใช้เป็นค่าอ้างอิงดำเนินการเมื่อพบการตกค้าง^(3, 4)

การวิเคราะห์ไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ในเนื้อสัตว์ด้วย LC-MS/MS มีหลักการสกัดตัวอย่างที่เหมือนกัน อาจมีเพิ่ม solid-phase extraction (SPE) ในการทำให้บริสุทธิ์และใช้สภาวะของ LC แตกต่างกันไป^(5, 6, 7) หลักการสกัด คือ สลายพันธะของไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ที่จับกับโปรตีน (protein-bound metabolites) ให้อยู่ในรูปอิสระด้วยกรด (hydrolysis) เปลี่ยนไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ (total nitrofurans metabolites: free and protein-bound metabolites) เป็นสารอนุพันธ์ของ nitrophenyl (NP) โดยทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ (derivatisation) กับ 2-nitrobenzaldehyde (2-NBA) ปรับ pH ให้เป็นกลาง (neutralisation) สกัดแยกสาร (liquid-liquid extraction) ด้วย ethyl acetate ทำให้แห้งแล้วละลายในตัวทำละลายนำไปวิเคราะห์ปริมาณและยืนยันชนิดสารด้วย LC-MS/MS

ผู้วิจัยได้สกัดตัวอย่างตาม van Rhijn, J.A. และคณะ โดยปรับเปลี่ยนสภาวะของ LC ได้แก่ ชนิดของตัวทำละลายตัวอย่าง, ชนิดของคอลัมน์ที่แยกสาร, ชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลายตัวพา เพื่อให้การแยกของสารดีและเร็วขึ้น และตัวอย่างดับหมูได้เพิ่มขั้นตอนการสกัดด้วย n-hexane เพื่อลดสารรบกวนแล้วทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในกึ่ง ไข่ และดับหมู (ตัวแทนสัตว์น้ำ สัตว์บก และเครื่องในสัตว์ตามลำดับ) นำวิธีทดสอบที่ได้ตรวจหาปริมาณและชนิดของยาในกลุ่มไนโตรฟูแรนที่ตกค้างในเนื้อสัตว์ที่บริโภคระหว่างปี พ.ศ. 2551-2554 เพื่อเป็นข้อมูลการเฝ้าระวังความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อประเมินแนวโน้มของการใช้ยาโดยเปรียบเทียบปริมาณเฉลี่ยที่ตกค้าง

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี (AR grade) : hydrochloric acid, 2-nitrobenzaldehyde (2-NBA), trisodium phosphate, sodium hydroxide, ammonium acetate, ethyl acetate, methanol (HPLC grade)

สารมาตรฐาน : 3-amino-2-oxazolidinone, 5-methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinone, 1-aminohydantoin, semicarbazide hydrochloride, 3-amino-2-oxazolidinone-D₄(AOZ-D₄), 5-methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinone-D₅(AMOZ-D₅), 1-aminohydantoin -¹³C₃(AHD-¹³C₃), semicarbazide hydrochloride-¹³C¹⁵N₂(SEM-¹³C¹⁵N₂) สารมาตรฐานทุกตัวเป็นของ WITEGA Laboratory Berlin ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 99 ยกเว้น SEM ของ Sigma Aldrich ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 99

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐาน stock solution : เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งสารมาตรฐานน้ำหนักแน่นอน 5 มิลลิกรัม ละลายใน methanol ปรับปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร โดยแยกเตรียมแต่ละตัว และนำมาเตรียม working solution สารละลายผสม 4 ชนิด ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 100 และ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ใน methanol ตามลำดับ

สารละลาย internal standard stock solution : เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งสาร internal standard น้ำหนักแน่นอน 5 มิลลิกรัม ละลายใน methanol ปรับปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร โดยแยกเตรียมแต่ละตัว และนำมาเตรียม working solution สารละลายผสม 4 ชนิด ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ใน methanol ตามลำดับ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่ง 3 และ 5 ตำแหน่ง, เครื่องเขย่า, vortex mixer, turbovap LV: Zymark, ultra sonic bath, เครื่อง LC-MS/MS ประกอบด้วย HPLC: hewlett packard series 1100 และ mass spectrometer: AB applied biosystems MDS SCIEX API – 4000

สภาวะของ LC

- analytical column : Cliepus C18, 150 mm × 3 mm.id, 5 µm (Higgins Analytical)
- guard column : Symmetry Sentry C18, 3.9 mm × 20 mm.id, 5 µm (Waters)
- mobile phase A : 0.5 mM ammonium acetate in deionized water
- mobile phase B : methanol
- flow rate : 0.6 ml/min
- column oven : 30°C
- injection volume : 20 µl
- gradient LC condition

เวลา (นาที)	B (%)
0	24
5	52
10	52
10.1	96
13.4	96
13.5	24
15	24

สภาวะของ MS

- scan mode : MRM scan
- ionisation mode : ESI (positive mode)
- source temperature : 450°C
- ionspray voltage : 5200 (turbo spray)
- collision gas (CID) : nitrogen, pressure 1.2 torr

สภาวะของ MS-MS (DP = declustering potential, CE = collision energy, CXP = collision cell exit potential)

analyte	precursor ion (m/z)	quantitative product ion (m/z) confirmatory product ion (m/z)	dwel time (msec)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
NP-AOZ	236.37	103.89	150	76	33	10
		133.94	150	76	19	12
NP-AMAZ	335.13	262.05	150	56	15	10
		291.15	150	51	19	18
NP-AHD	249.20	103.90	150	61	31	8
		133.90	150	61	19	8
NP-SEM	209.46	191.90	150	56	17	12
		166.04	150	56	15	10
NP-AOZ-D ₄	240.37	133.94	150	76	19	12
NP-AMAZ-D ₅	340.13	296.15	150	51	19	18
NP-AHD- ¹³ C ₃	252.24	133.97	150	61	19	8
NP- SEM- ¹³ C ¹⁵ N ₂	212.21	168.0	150	56	15	10

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ทดสอบวิธี : กุ้ง ไข่ และตับหมู ที่ตรวจไม่พบสารตกค้าง ด้วย LC-MS/MS น้ำหนักประมาณ 300 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 °C (matrix blank)

ตัวอย่างที่สำรวจ : ตัวอย่างเนื้อสัตว์ ได้แก่ กุ้ง เนื้อไก่กับเครื่องในไก่ และเนื้อหมูกับเครื่องในหมู หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 °C รวมทั้งสิ้น 402 ตัวอย่างจากตลาดสด 22 แห่ง และซูเปอร์มาร์เก็ต 6 แห่ง ในเขตกรุงเทพมหานคร ระหว่างปี พ.ศ. 2551-2554 โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาเก็บตัวอย่างส่งวิเคราะห์

การสกัดและทำให้บริสุทธิ์

ซึ่งตัวอย่างที่บดละเอียด 1 กรัม ใน centrifuge tube ขนาด 35 มิลลิลิตร เติมน้ำละลายผสม internal standard 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร สกัดด้วย 0.2 M hydrochloric acid 5 มิลลิลิตร และ 100 mM 2-NBA 50 ไมโครลิตร เขย่าด้วย vortex mixer จนตัวอย่างกระจายตัว เขย่าต่อด้วย shaker นาน 10 นาที นำไปตั้งที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 16 ชั่วโมง นำมาเติม 0.3 M trisodium phosphate 250 ไมโครลิตร และปรับความเป็นกรดต่างให้ได้ 7.0 ± 0.5 ด้วย 2 N sodium hydroxide เติมน้ำ ethyl acetate 5 มิลลิลิตร เขย่า 10 นาที แยกชั้นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนสารละลายลงใน

test tube ขนาด 20 มิลลิลิตร สกัดตัวอย่างด้วย ethyl acetate 5 มิลลิลิตร ซ้ำอีกครั้ง นำชั้นสารละลาย ethyl acetate ที่แยกได้ทั้งหมดไประเหยแห้งด้วยเครื่อง turbo vap LV อุณหภูมิ 40 °C ละลายตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย 50% methanol in deionized water 0.5 มิลลิลิตร (กรณีตัวอย่างดับหมูล้างการระเหยแห้งให้ละลายตัวอย่างด้วย deionized water 0.25 มิลลิลิตร และเติม n-hexane 2 มิลลิลิตร ผสมด้วย vortex mixer นาน 1 นาที แยกชั้นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดชั้นของ n-hexane ทั้งสกัดตัวอย่างด้วย n-hexane 2 มิลลิลิตร ซ้ำอีกครั้ง ดูดชั้นของ n-hexane ทั้ง เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน ไล่ n-hexane ที่ค้างอยู่เติม methanol 0.25 มิลลิลิตร ผสมด้วย vortex mixer นาน 1 นาที) แล้วกรองสารละลายตัวอย่างผ่าน 0.2 μ m PVDF membrane ก่อนฉีดเข้า LC-MS/MS

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์⁽⁸⁾

การทำ method blank และ matrix blank

method blank : สกัดสารเคมีโดยไม่ใช้เนื้อตัวอย่าง เติมสารละลายผสม internal standard 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร สกัดและทำให้บริสุทธิ์ วัดด้วย LC-MS/MS

matrix blank : สกัดตัวอย่างที่ไม่พบสารตกค้าง จำนวน 2 ซ้ำ โดยเติมสารละลายผสม internal standard 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร สกัดและทำให้บริสุทธิ์ วัดด้วย LC-MS/MS

การทำการมาตรฐาน (Calibration curve)

เตรียมสารอนุพันธ์ nitrophenyl ของสารละลายมาตรฐานโดยปิเปต 0.01, 0.02, 0.06, 0.2 และ 0.4 มิลลิลิตร ของสารละลายมาตรฐานผสม 4 ชนิด เข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 35 มิลลิลิตร เติมสารละลายผสม internal standard 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร แล้วทำตามขั้นตอนการสกัดตัวอย่างโดยไม่มีเนื้อตัวอย่าง ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1, 0.2, 0.6, 2 และ 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กรองตัวอย่างผ่าน 0.2 μ m PVDF membrane ฉีดเข้า LC-MS/MS สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน และ internal standard (concentration ratio) กับค่าอัตราส่วนของ peak area ของสารมาตรฐาน และ internal standard (area ratio) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and working range)

เติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่าง (กุ้ง และไก่) ระดับละ 1 ซ้ำ เติมสารละลายผสม internal standard 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร สกัดตัวอย่างและทำให้บริสุทธิ์ วัดด้วย LC-MS/MS สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน และ internal standard (concentration ratio) ในตัวอย่างแต่ละชนิด กับค่าอัตราส่วนของ peak area ของสารมาตรฐาน และ internal standard (area ratio) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)

ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบ (Limit Of Detection, LOD)

ประมาณค่า LOD โดยฉีดสารอนุพันธ์ของสารมาตรฐาน ให้ peak ที่มีค่า signal to noise เท่ากับ 3 คำนวณเป็นความเข้มข้นต่อน้ำหนักตัวอย่าง ทำการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานที่คำนวณได้ใน blank sample จำนวน 10 ซ้ำ เติมสารละลายผสม internal standard 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร สกัดและทำให้บริสุทธิ์ วัดด้วย LC-MS/MS

ค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ (Limit Of Quantitation, LOQ)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานประมาณ 3 เท่าของ LOD ลงใน blank sample จำนวน 10 ซ้ำ เติมสารละลายผสม internal standard 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร สกัดและทำให้บริสุทธิ์ วัดด้วย LC-MS/MS คำนวณความแม่นยำ (% recovery) และความเที่ยง (% RSD)

การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง (Accuracy and precision)

ทดสอบที่ความเข้มข้น 0.3, 1.0 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (เนื้อไก่, กุ้ง) และที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ตับหมู) ระดับละ 10 ซ้ำ แล้วเติมสารละลายผสม internal standard 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร สกัดและทำให้บริสุทธิ์ วัดด้วย LC-MS/MS คำนวณค่าความแม่นยำ (% recovery) อยู่ในช่วงร้อยละ 60-120 ความเที่ยง (% RSD) และค่า HORRAT (Horwitz ratio) โดยมีเกณฑ์การยอมรับตาม Codex และ EU ≤ 2

การประเมินแหล่งและหาค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Uncertainty)⁽⁹⁾

วิเคราะห์ปริมาณสารเมตาบอไลต์ (AOZ) โดยชั่งเนื้อไก่ 1 กรัม เติม AOZ ที่ระดับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม คำนวณปริมาณสารในตัวอย่าง จาก

$$\begin{aligned}\text{สมการกราฟเส้นตรง} \quad Y &= mC + b \\ C &= (Y - b) / m \\ C &= C_0 / C_{ISTD}\end{aligned}$$

โดย Y = peak area ratio, m = slope, C = concentration ratio และ b = intercept

$$\text{ปริมาณสารที่พบ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)} = C \times C_{ISTD} \times V/W$$

โดย C_0 = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร), C_{ISTD} = ความเข้มข้นของ internal standard (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร), V = ปริมาตรสุดท้ายสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร) และ W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

จากสูตรคำนวณปริมาณสารที่พบ หาค่าแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนจากการชั่งน้ำหนักตัวอย่าง การเตรียมสารมาตรฐาน เครื่องแก้ววัดปริมาตรที่ใช้ และกราฟมาตรฐาน รวมทั้งความไม่แน่นอนจากการทำซ้ำ (precision) และความแม่นยำ (accuracy) จากการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ รวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมดแล้วคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ใช้ค่า $k = 2$ รายงานความไม่แน่นอนในรูปของความไม่แน่นอนขยาย

การควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์

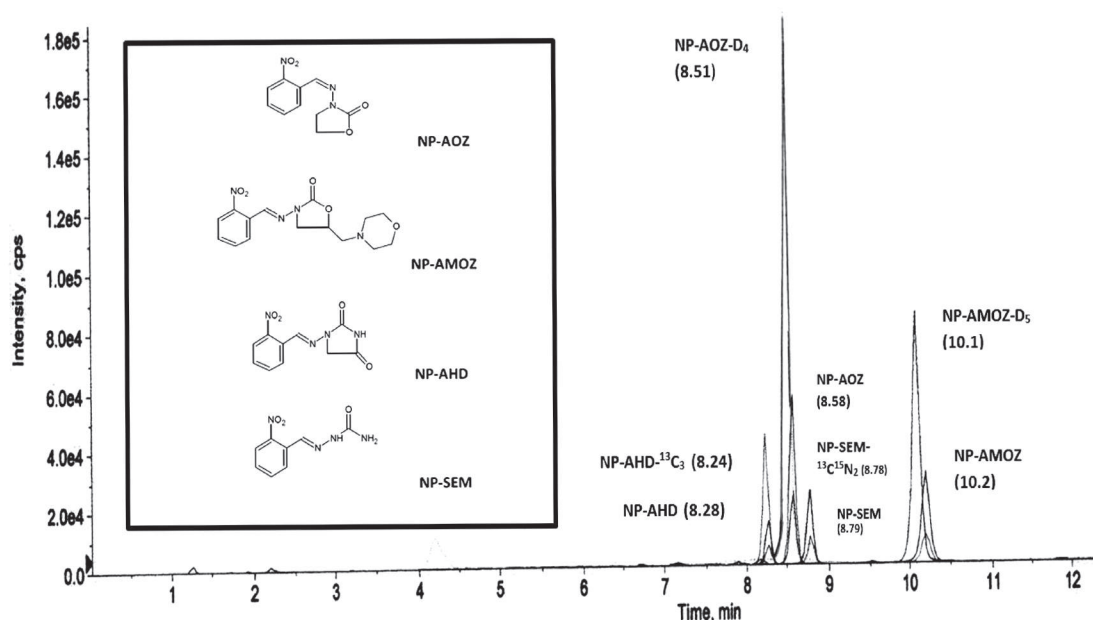
External quality control : เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญการวิเคราะห์ (Proficiency test) กับ FAPAS ประเทศอังกฤษ คือ ทดสอบ AMOZ และ AHD, AOZ และ SEM ในไตหมู, ทดสอบ AOZ และ AHD ในเนื้อหมู และทดสอบ total AMOZ และ bound AMOZ ในกุ้ง

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณสารที่พบโดยวิธีทางสถิติ

เปรียบเทียบปริมาณตกค้างที่พบของ AOZ ในเนื้อหมูกับเครื่องใน และ SEM ในเนื้อกุ้ง ในช่วงของปีที่สำรวจ ด้วยวิธีทางสถิติ โดยตรวจสอบการแจกแจงของข้อมูลว่ามีการแจกแจงเป็นแบบปกติหรือไม่ ถ้าเป็นใช้ one-way ANOVA หากไม่เป็นปกติใช้ Nonparametric statistics โดยใช้โปรแกรม SPSS⁽¹⁰⁾

ผล

ภายใต้สภาวะของ LC ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เลือกคอลัมน์ชนิด reverse phase ด้วยการใช้ CliepusC₁₈, 150 mm × 3 mm.id, particle size 5 µm (Higgins Analytical) แยก (elute) สารด้วยอัตราส่วนแบบผสม (linear gradient) ระหว่าง methanol และ 0.5 mM ammonium acetate เกิดการแยกของสารมีค่า retention time และลักษณะของพีคตาม chromatogram โดย AOZ มีความไวการวัดสูงสุด ตามด้วย AMOZ, AHD และ SEM ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน



ภาพที่ 1 Extracted Ion Chromatogram (XIC) ของสารอนุพันธ์โนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์

จากการทดสอบการวิเคราะห์ปริมาณโนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ 4 ชนิด ได้แก่ AOZ, AMOZ, AHD และ SEM ในเนื้อสัตว์ (กุ้ง เนื้อไก่ และตับหมู) ด้วย LC-MS/MS ตามสภาวะที่กำหนด เมื่อสร้างกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน และ internal standard (concentration ratio) กับค่าอัตราส่วนของ peak area ของสารมาตรฐาน และ internal standard (area ratio) ที่ความเข้มข้น 0.1–4.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ของ AOZ, AMOZ, AHD และ SEM ได้กราฟเป็นเส้นตรง มีค่า r 0.9954 – 0.9992 และเมื่อทำการวิเคราะห์ method blank และ matrix blank ไม่พบ peak ของสารรบกวน ยกเว้นสารรบกวนของ SEM ในกุ้ง ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 0.1–2.0 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัม ได้กราฟเป็นเส้นตรงมีค่า r ระหว่าง 0.9860 – 1.0000

ตัวอย่างเนื้อสัตว์ (กุ้ง ไก่) พบค่า LOD ของ AOZ และ AMOZ 0.05 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม AHD และ SEM 0.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่า LOQ ของ AOZ และ AMOZ 0.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม AHD และ SEM 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้ค่าเฉลี่ยความแม่นยำ (% recovery) ร้อยละ 82.5–111 และความเที่ยงประเมินด้วย

HORRAT 0.4–1.9 ส่วนตับหมู มีค่า LOD ของ AOZ, AMOZ, AHD และ SEM 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.3 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และค่า LOQ ของ AOZ, AMOZ, AHD และ SEM 0.2, 0.3, 1.0 และ 1.0 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ได้ค่าเฉลี่ยความแม่นยำ (% recovery) ร้อยละ 92.6–97.7 และความเที่ยงประเมินด้วย HORRAT 0.3–1.4 ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธี (accuracy and precision) ที่ความเข้มข้น 0.3, 1.0 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ไก่ กุ้ง) และที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ตับหมู) มีความแม่นยำที่ประเมินจากค่าเฉลี่ย % recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 88.9–112 และความเที่ยงประเมินด้วย % RSD อยู่ในช่วงร้อยละ 1.5–6.6 และ HORRAT 0.3–1.2 รายละเอียดจำแนกตามชนิดตัวอย่างและชนิดของสาร ที่ทดสอบ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีวิเคราะห์

ชนิดตัวอย่าง	สาร	Spiked level (µg/kg)	% Recovery; Mean ± SD	% RSD	HORRAT
เนื้อไก่	AOZ	0.3	105 ± 3.0	2.9	0.5
		1	107 ± 2.8	2.6	0.5
		2	101 ± 3.7	3.7	0.7
	AMOZ	0.3	107 ± 4.3	4.0	0.8
		1	111 ± 4.5	4.1	0.8
		2	106 ± 5.6	5.3	1.0
	AHD	0.3	109 ± 4.3	4.0	0.8
		1	112 ± 3.0	2.7	0.5
		2	104 ± 3.2	3.1	0.6
	SEM	0.3	111 ± 3.5	3.2	0.6
		1	111 ± 5.7	5.1	1.0
		2	107 ± 4.1	3.9	0.7
กุ้ง	AOZ	0.3	97.9 ± 2.8	2.9	0.5
		1	111 ± 4.9	4.4	0.9
		2	106 ± 2.5	2.3	0.4
	AMOZ	0.3	104 ± 3.8	3.6	0.7
		1	112 ± 5.4	4.8	0.9
		2	105 ± 4.0	3.8	0.7
	AHD	0.3	99.7 ± 3.7	3.7	0.7
		1	105 ± 6.4	6.1	1.2
		2	95.2 ± 4.7	4.9	0.9
	SEM	0.3	102 ± 2.3	2.3	0.4
		1	106 ± 5.7	5.4	1.0
		2	100 ± 2.4	2.4	0.5
ตับหมู	AOZ	1	93.1 ± 1.8	2.0	0.4
		2	98.4 ± 4.6	4.7	0.9
	AMOZ	1	100 ± 4.1	4.1	0.8
		2	88.9 ± 5.3	6.0	1.1
	AHD	1	97.7 ± 1.4	1.5	0.3
		2	100 ± 4.0	4.0	0.8
	SEM	1	96.6 ± 6.4	6.6	1.2
		2	97.8 ± 4.2	4.4	0.8

ทำการประมาณค่าความไม่แน่นอนของผลการวัด พบแหล่งความไม่แน่นอนมาจากวิธีวิเคราะห์ ได้แก่ ขั้นตอนการชั่งน้ำหนักและปรับปริมาตรสุดท้ายในการสกัดตัวอย่าง ค่าความเข้มข้นสารที่ได้จากกราฟมาตรฐาน การชั่งน้ำหนักและเจือจางสารละลายมาตรฐาน รวมทั้งความบริสุทธิ์ที่ระบุ ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ เมื่อคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายของวิธีวิเคราะห์ AOZ มีค่าเท่ากับ ± 0.06 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับปริมาณ AOZ ที่เติมลงในตัวอย่าง 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม คำนวณจากกราฟมาตรฐานได้ 0.32 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม รายงานผลปริมาณสาร AOZ กับค่าความไม่แน่นอนขยาย คือ 0.32 ± 0.06 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าความไม่แน่นอนของผลการวัด

Component	Value, x	หน่วย	Standard uncertainty, u(x)	Relative standard uncertainty, u(x)	สัดส่วนความ ไม่แน่นอน (%)
1. Sample					
- Weight	1	g	0.00062	0.00062	
- Fianl vol.	0.5 (pipette)	ml	0.00088	0.00174	
				0.00187	1.31
2. C ₀ read from curve	0.560	ng/ml	0.03939	0.07090	49.63
3. Standard					
- Purity	100	%	0.28	0.00280	
- Weight	0.00500	g	0.00001	0.00200	
- Dilution	100 (vol.flask)	ml	0.18257	0.00182	
	1 (pipette)	ml	0.00174	0.00174	
	50 (vol.flask)	ml	0.09327	0.00186	
	1 (pipette)	ml	0.00174	0.00174	
	10 (vol.flask)	ml	0.02254	0.00225	
	1 (pipette)	ml	0.00174	0.00174	
	20 (vol.flask)	ml	0.04136	0.00208	
				0.00609	4.26
4. Precision (% RSD)	1	-	0.057	0.05700	39.90
5. Bias (Recovery)	1	-	0.007	0.00700	4.90
- Combined standard uncertainty	= U _c /r			0.09146	
- Standard uncertainty (U _c)	= 0.09146 × 0.32 µg/kg			0.029 µg/kg	
- Expanded uncertainty (U), k = 2	= 2 × 0.029 µg/kg			0.058 µg/kg	
ปริมาณ AOZ (µg/kg) = 0.32 ± 0.06					

ระหว่างปี พ.ศ. 2551-2554 สํารวจปริมาณไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ในเนื้อสัตว์ที่จำหน่ายในตลาดสด และซูเปอร์มาร์เก็ตของเขตกรุงเทพมหานคร รวมทั้งสิ้น 402 ตัวอย่าง ไม่พบการตกค้างของยาในกลุ่มนี้ในเนื้อไก่กับเครื่องใน พบอัตราการตกค้างของ AOZ ในเนื้อหมูร้อยละ 5.5 เครื่องในหมูร้อยละ 6.7 และ SEM ในกุ้งร้อยละ 4.2 แสดงรายละเอียดชนิดและร้อยละของตัวอย่างที่ตรวจพบ ($\geq$ ค่า LOD) และที่เกินมาตรฐาน ($\geq$ ค่า MRPLs ของ อย.) ชนิดและช่วงปริมาณของสารที่ตกค้างแยกตามปี (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การสำรวจปริมาณไนโตรฟูแรนในเนื้อสัตว์ระหว่างปี พ.ศ. 2551-2554

ปี พ.ศ.	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง (ร้อยละ)			ชนิดที่พบ	ปริมาณที่พบ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)		
		วิเคราะห์	ตรวจพบ	เกินมาตรฐาน		ช่วง	ค่าเฉลี่ย	ค่ามัธยฐาน
2551	กึ่ง	38 (100)	11 (28.9)	7 (18.4)	SEM	<0.3 – 2.3	1.2	1.2
	เนื้อหมู	42 (100)	8 (19)	6 (14.3)	AOZ	0.18–6.7	2.1	0.93
	เครื่องในหมู	25 (100)	10 (40)	9 (36)	AOZ	<0.2–10	4.4	3.6
	เนื้อไก่กับเครื่องใน	52 (100)	–	–	–	–	–	–
	รวม	157 (100)	29 (18.5)	22 (14.0)				
2552	กึ่ง	5 (100)	1 (20)	1 (20)	SEM	1.8	1.8	1.8
	เนื้อหมู	12 (100)	4 (25)	4 (25)	AOZ	0.41–32	13.4	10.6
	เครื่องในหมู	28 (100)	11 (39.3)	9 (32.1)	AOZ	<0.2–30	5.7	3.5
	เนื้อไก่กับเครื่องใน	24 (100)	–	–	–	–	–	–
	รวม	69 (100)	16 (23.2)	14 (20.3)				
2553	กึ่ง	40 (100)	5 (12.5)	4 (10)	SEM	<0.3–1.7	1.0	1.0
	เนื้อหมู	33 (100)	6 (18.2)	3 (9.1)	AOZ	<0.1–14	5.6	4.1
	เครื่องในหมู	1 (100)	–	–	–	–	–	–
	เนื้อไก่กับเครื่องใน	37 (100)	–	–	–	–	–	–
	รวม	111 (100)	11 (9.9)	7 (6.3)				
2554	กึ่ง	10 (100)	–	–	–	–	–	–
	เนื้อหมู	20 (100)	4 (15)	4 (15)	AOZ	0.72–44.5	14.4	2.4
	เครื่องในหมู	9 (100)	6 (66.7)	6 (66.7)	AOZ	0.47–13.5	4.9	2.6
	เนื้อไก่กับเครื่องใน	26 (100)	–	–	–	–	–	–
	รวม	65 (100)	10 (15.4)	10 (15.4)				
รวม	กึ่ง	93 (23.1)	17 (4.2)	12 (3.0)	–	–	–	–
	เนื้อหมู	107 (26.6)	22 (5.5)	17 (4.2)	–	–	–	–
	เครื่องในหมู	63 (15.7)	27 (6.7)	24 (6.0)	–	–	–	–
	เนื้อไก่กับเครื่องใน	139 (34.6)	–	–	–	–	–	–
	รวม	402 (100)	66 (16.4)	53 (13.2)				

วิจารณ์

ในการทดสอบมีการเติมสาร internal standard (ISTD) ซึ่งเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีจะใช้สารที่มีโครงสร้างสารเหมือนสารมาตรฐาน แต่มีมวลโมเลกุลมากกว่าจากการแทนที่บางอะตอมด้วยสารที่เป็นไอโซโทป ได้แก่ deuterium, carbon¹³ และ nitrogen¹⁵ ลงไปในตัวอย่างและสารมาตรฐานที่จะเตรียมกราฟมาตรฐานโดยเติมครบทั้ง 4 ชนิด เป็นการลดความผิดพลาดของการวิเคราะห์ เนื่องจากสารรบกวนในตัวอย่าง (matrix effect) และการสูญเสียสารที่เกิดขึ้นในขั้นตอนของการสกัดตัวอย่างเพิ่มความถูกต้องของผลที่ได้ร่วมกับการใช้เทคนิค MRM (Multiple Reaction Monitoring) ที่เลือกวัดเฉพาะไอออนของสารที่สนใจคือ ค่ามวลสารต่อประจุ (mass to charge ratio; m/z) ที่ตั้งค่าไว้โดย MS ตัวที่ 1 จะให้ selected precursor ion ผ่านเข้ามา ทำให้เกิดการแตกตัว (fragmentation) และ MS ตัวที่ 2 ให้ product ions (base peak and confirmative ions) ผ่านเข้าสู่

detector เท่านั้น ทำให้ background noise จากสารรบกวนลดลง เพิ่มค่า signal to noise ของสาร ส่งผลให้สัญญาณวัดที่ระดับต่ำมีความไวดีขึ้น

การคัดเลือกตัวแทนตัวอย่างเพื่อนำมาทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ พบว่าเนื้อกึ่งมีสารรบกวนที่ peak ของ SEM เมื่อเทียบสัญญาณ S/N กับ spiked sample ที่ระดับ LOD ที่ 0.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ระดับของสารรบกวนมีค่าต่ำซึ่งไม่มีผลกระทบต่อการใช้วิเคราะห์ ส่วนเนื้อไก่และตับหมูไม่พบสารรบกวนของสารที่สนใจ

การทดสอบความถูกต้องของวิธีได้ทดสอบค่า linearity and working range, LOD, LOQ, accuracy และ precision ตาม performance characteristics ที่กำหนด ค่าอยู่ในเกณฑ์สามารถนำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการได้ โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ 0.1–2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า LOD และ LOQ ของวิธี 0.05–0.3 และ 0.1–1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์ โดยมีค่า % recovery 60–120⁽¹¹⁾ และ HORRAT น้อยกว่า 2

กรณีตัวอย่างตับหมูและเครื่องในอื่นๆ พบว่าสารรบกวนในตัวอย่างทำให้ความไวการวัดลดลง จึงเพิ่มขั้นตอนสกัดด้วย n-hexane ในสารละลายตัวอย่าง พบว่าช่วยเพิ่มความไวการวัด AMOZ ซึ่งออกมาเป็น peak สุดท้ายแต่ไม่มีผลต่อสารตัวอื่นๆ ดังนั้นค่า LOD และ LOQ ของเครื่องในสัตว์จึงสูงกว่าตัวอย่างที่เป็นเนื้อสัตว์ แต่ยังสามารถวัดได้ต่ำถึงระดับที่กำหนด ดังนั้นถ้าต้องการลดสารรบกวนและเพิ่มความไวในการวัดของวิธีวิเคราะห์จำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ SPE (Solid-Phase Extraction)

ประเมินความไม่แน่นอนของการวัด พบค่าความไม่แน่นอนขยายเท่ากับ ± 0.06 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ($\pm 18.8\%$) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อพิจารณาความสมเหตุสมผลของค่าความไม่แน่นอนขยายอยู่ในเกณฑ์ของ codex⁽¹²⁾ (น้อยกว่าร้อยละ 44 ที่ระดับการวัด 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) สัดส่วนของความไม่แน่นอนที่มีมากที่สุด ได้แก่ ค่าความเข้มข้นสารที่ได้จากกราฟมาตรฐาน คิดเป็นร้อยละ 49.63 เนื่องจากกราฟมาตรฐานได้จากการเตรียมสารมาตรฐานที่ต้องแยกเตรียมแต่ละความเข้มข้นและไม่ได้มีเนื้อตัวอย่างอยู่ จึงอาจมีผลต่อค่าความเข้มข้นที่อ่านได้ ถ้าต้องการลดความไม่แน่นอนในส่วนนี้ควรเตรียมกราฟมาตรฐานแบบ matrix matched calibration curve คือ มีเนื้อตัวอย่างในการเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่าง เพิ่มจำนวนระดับความเข้มข้นและการทำซ้ำในแต่ละระดับของสารมาตรฐาน รองลงมาคือ ค่าความไม่แน่นอนจากการทำซ้ำร้อยละ 39.90 ซึ่งลดความไม่แน่นอนได้โดยการเพิ่มจำนวนวิเคราะห์ซ้ำของตัวอย่าง

ผู้วิจัยได้นำวิธีวิเคราะห์ที่ทำการทดสอบความถูกต้อง ตรวจสอบตัวอย่างในโครงการทดสอบความชำนาญการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ (proficiency testing) ของ FAPAS โดยผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์ มีค่า Z-score <2 ทำให้มั่นใจความถูกต้องของผลวิเคราะห์ และยืนยันชนิดของสารโดยพิจารณาค่า relative retention time อัตราส่วนระหว่าง retention time ของสารที่สนใจ กับสาร internal standard ในตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐาน ซึ่งผลทดสอบมีค่าอยู่ในเกณฑ์ร้อยละ ± 2.5 และคำนวณหาค่า % relative intensity ร้อยละของอัตราส่วนระหว่างสัญญาณที่วัดได้ของ confirmatory product ion กับสัญญาณที่วัดได้ของ quantitative product ion ในตัวอย่าง นำค่าที่ได้เทียบกับค่าที่ได้จากสารมาตรฐาน พบอยู่ในเกณฑ์ยอมรับที่ร้อยละ ± 20 (relative) และร้อยละ ± 25 (relative) เมื่อ % relative intensity ของ SEM ให้ค่ามากกว่า 50 และ AOZ, AMOZ และ AHD ให้ค่า % relative intensity มากกว่าร้อยละ 20–50 ตามลำดับ⁽¹³⁾ บ่งชี้ได้ว่าสารที่ตรวจพบในตัวอย่างมีโครงสร้างทางเคมีเหมือนสารมาตรฐาน

สำรวจหาปริมาณตกค้างของสารในโตรฟูแรนเมตาบอลิซึมในเนื้อกึ่ง เนื้อไก่ เครื่องในไก่ เนื้อหมู และเครื่องในหมูที่เก็บจากตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ต โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ระหว่าง พ.ศ. 2551–2554 รวม 402 ตัวอย่าง จากการสำรวจไม่พบยาชนิด AHD และ AMOZ ตกค้างในตัวอย่างทุกชนิด และไม่พบการตกค้างของกลุ่มยานี้ในเนื้อกับเครื่องในของไก่ แต่พบ SEM ตกค้างในกึ่ง ระหว่าง <0.3 – 2.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม คิดเป็นร้อยละ 4.2 พบ AOZ ตกค้างในเนื้อหมูและเครื่องในหมู ระหว่าง <0.1–44.5 และ <0.2–30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

คิดเป็นร้อยละ 5.5 และ 6.7 ตามลำดับ จากข้อมูลที่ได้รับแจ้งจากเจ้าของแผงค้าเนื้อไก่ส่วนใหญ่ระบุแหล่งที่ซื้อมาเป็นชื่อฟาร์มเลี้ยงที่ได้รับการรับรองมาตรฐานจากหน่วยงานรัฐ จึงเป็นไปได้ว่ามีความปลอดภัยจากการใช้ยาจริง ส่วนกรณีของ SEM เป็นสารที่พบได้ตามธรรมชาติในสัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็ง ได้แก่ ปู กุ้ง และกุ้ง ซึ่งไม่ได้มาจากการใช้ nitrofurazone⁽¹⁴⁾ จากการศึกษาของ van Poucke, C. และ คณะ⁽¹⁵⁾ โดยเลี้ยงกุ้งแบบควบคุม ไม่มีการใช้ยา ตรวจพบ total SEM และ bound SEM ในเนื้อกุ้ง 0.76 และ < 0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อพบการตกค้างและค่าเกินมาตรฐานอาจต้องยืนยันการตรวจซ้ำด้วยชนิด bound SEM ซึ่งตรวจหาโดยเพิ่มขั้นตอนการล้าง free metabolites ออกจากตัวอย่างด้วย methanol และน้ำ ก่อนการไฮโดรไลซ์ด้วยกรด⁽¹⁶⁾ ซึ่งค่าที่พบจะน้อยลงหรืออาจต้องตรวจสอบการใช้ยาที่ฟาร์มเลี้ยงโดยตรง ส่วนการตกค้างของ AOZ ซึ่งเป็นเมตาบอไลต์ของ furazolidone ในเนื้อหมูและเครื่องในหมู ตรวจพบระหว่างช่วงปีที่สำรวจทุกปี ทั้งตัวอย่างที่ไม่เกินเกณฑ์ที่มาตรฐานกำหนด และตัวอย่างที่สูงเกินมาตรฐานกำหนดของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเฉลี่ยที่พบด้วยวิธีทางสถิติในช่วงปีสำรวจ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงถึงยังมีการใช้ furazolidone ในสัตว์ จากข้อมูลการเก็บตัวอย่างแจ้งแหล่งที่ซื้อเป็นชื่อจังหวัด ชื่อโรงฆ่าสัตว์ หรือซื้อต่อจากแผงค้าอื่น โดยไม่ระบุชื่อของแหล่งเลี้ยง ทำให้ไม่ทราบว่าเป็นจากฟาร์มมาตรฐานหรือไม่ ซึ่งต่างจากกรณีของเนื้อไก่ ส่วนตัวอย่างเนื้อหมูอนามัยที่มีเครื่องหมายรับรองมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารจากหน่วยงานของรัฐ ไม่พบการตกค้าง อาจเนื่องจากเป็นหมูที่เลี้ยงจากฟาร์มระบบปิดที่เน้นป้องกันโรคโดยไม่ใช้ยาและสารเคมีต้องห้าม ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่ทำให้ผู้บริโภคปลอดภัย

สรุป

การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรฟูแรนเมตาบอไลต์ตกค้างในเนื้อสัตว์ด้วย LC-MS/MS มีความจำเพาะให้ผลการตรวจที่แม่นยำถูกต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ โดยมีความไวในการวัดที่ดี มีประสิทธิภาพ ตรวจหาสารที่ระดับต่ำกว่าหรือเท่ากับค่า MRPLs ของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และสหภาพยุโรป สามารถยืนยันชนิดของสารได้ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพและมาตรฐานอาหาร และการที่ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตสินค้าปศุสัตว์และสัตว์น้ำเพื่อบริโภคที่สำคัญ หน่วยงานต่างๆ ที่มีหน้าที่ในการกำกับดูแลควรกำหนดแผนการติดตามอย่างต่อเนื่อง และใช้มาตรการเด็ดขาดเพื่อควบคุมคุณภาพอาหารให้มีความปลอดภัยปราศจากสารตกค้างที่เป็นอันตราย เริ่มตั้งแต่การเลี้ยงสัตว์ไปจนถึงการแปรรูปสู่ผู้บริโภค เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าและสร้างภาพลักษณ์ที่ดีด้านอาหารทั้งบริโภคเองในประเทศและส่งออก ที่สำคัญคือ เกษตรกรผู้เลี้ยงควรมีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการใช้ยาและจัดระบบฟาร์มเลี้ยงที่ดีเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารต้องห้าม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณนิภาภรณ์ ลักษณะสมยา นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ให้คำแนะนำในด้านวิชาการ

เอกสารอ้างอิง

1. มาลินี ลิ้มโกคา. การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์ : สัตว์บกและสัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์จรัสสินทวงศ์; 2541. หน้า 256-268.
2. Commission Decision 2003/181/EC of 13 March 2003 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin. Off J Eur Commun 2003; L71: 17-18.

3. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 299 (พ.ศ. 2549) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีการปนเปื้อนสารเคมีบางชนิด (ฉบับที่ 2). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 123 ตอนพิเศษ 97 ง (วันที่ 18 กันยายน 2549) หน้า 6.
4. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 123 ตอนพิเศษ 97 ง (วันที่ 18 กันยายน 2549) หน้า 15.
5. van Rhijn JA, Mulder PPJ. Muscle of poultry, rabbit and aquaculture products-detection and identification of residues of metabolites of furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin, and nitrofurazone-LC-MS/MS confirmatory analysis. Wageningen, The Netherlands: State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT); 2002.
6. Leitner A, Zöllner P, Lindner W. Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr A 2001; 939(1-2): 49-58.
7. U.S. Food and Drug Administration. Detection of nitrofurantoin metabolites in shrimp. [online]. April 2004; [9 screens]. Available from: URL: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm239765.htm>.
8. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
9. EURACHEM/CITAC Guide CG4. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2nd ed. United Kingdom; 2000.
10. กัลยา วาณิชย์บัญชา. การใช้ SPSS for Windows ในการวิเคราะห์ข้อมูล. พิมพ์ครั้งที่ 9. กรุงเทพฯ: คณะพาณิชยศาสตร์และการบัญชี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2549.
11. CAC/GL 71-2009, Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals. [online]. 2009. Available from: URL: <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/>
12. CAC/GL 54-2004, Guidelines on measurement uncertainty. [online]. 2004. Available from: URL: <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/>.
13. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. Off J Eur Commun 2002; L221: 8-36.
14. Seafood Importers and Processors Alliance (SIPA ivzw), Press release. Illegal veterinary drug marker Semicarbazide occurs naturally in crustaceans. [online]. 2010; [2 screens]. Available from: URL: http://www.asemaquaculture.org/files/sipa/sipa_press_release.pdf.
15. van Poucke C, Detavernier C, Wille M, Kwakman J, Sorgeloos P, van Peteghem C. Natural presence of semicarbazide in laboratory grown Macrobrachium rosenbergii and other crustaceans. [online]. 2011; [22 screens]. Available from: URL: http://www.asemaquaculture.org/files/sipa/van_poucke.pdf.
16. Horne E, Cadogan A, O'Keeffe M, Hoogenboom LAP. Analysis of protein-bound metabolites of furazolidone and furaltadone in pig liver by high-performance liquid. Analyst 1996; 121(10): 1463-8.

Method Validation and a Survey for Total Nitrofuran Metabolites in Animal Tissues by LC-MS/MS

Malee Jaroenvitvorakul

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

ABSTRACT Nitrofurans were used effectively as medication of animals in the past. Due to the evidences of their properties as carcinogenicity and mutagenicity, Thailand and many countries revised the legislation and regulations to prohibit the drugs used in food producing animals. The European Union established the Minimum Required Performance Limits (MRPLs) of analytical method for nitrofuran metabolites namely 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD) and semicarbazide (SEM) in animal products at 1.0 µg/kg. The determination method has been developed and validated. The four isotope-labelled analogues were added in the sample as internal standard. Acid hydrolysis to release the side chains of metabolites from protein-bound residues was required and metabolites were derivatised. After pH adjustment to 7.0 ± 0.5 and liquid-liquid extraction, the residues were confirmatively determined by LC-MS/MS. The method validation showed the linearity of working range between 0.1–2.0 µg/kg with correlation coefficient valued 0.9860–1.0000. The accuracy (% recovery) ranged within 88.9–112.0% and the precision was evaluated by HORRAT method and given the values lower than 2. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were 0.05–0.3 µg/kg and 0.1–1.0 µg/kg, respectively.

The survey research on nitrofuran metabolites abuse from 402 samples of edible animal tissues, sold in the local markets and supermarkets in Bangkok was conducted during 2008–2011. The result showed that AOZ was found in pork and viscera 12.2 % and SEM in shrimp 4.2%. The amount range of AOZ and SEM were <0.1–44.5 µg/kg and <0.3–2.3 µg/kg, respectively. The detections of AOZ and SEM were not significantly different ($p > 0.05$) at the survey period, indicating both of drugs were still used in animal farms. Therefore, monitoring of drug residues and strictly law enforcement are further needed.

Key words : Nitrofuran metabolites, animal tissues, LC-MS/MS

ปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันจากสารที่บ่งสี ชนิดไม่แตกตัวเป็นประจุในผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจ เอกซเรย์คอมพิวเตอร์

ธีรพันธ์ บุตรแก้ว

โรงพยาบาลกระบี่ ถนนอู่ตรกิจ อำเภอเมือง กระบี่ 81000

บทคัดย่อ การศึกษาปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันจากสารที่บ่งสีชนิดไม่แตกตัวเป็นประจุในผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ ผู้ศึกษาได้ทำการศึกษาค้นคว้าอัตราการเกิดและความรุนแรงของปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันจากสารที่บ่งสี ที่เกิดกับผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ในโรงพยาบาลกระบี่ ในช่วง เดือน มกราคม 2553 ถึง กันยายน 2557 โดยแบ่งผู้ป่วยเป็นสามกลุ่มตามช่วงอายุ พบว่าผู้ป่วยเข้ารับการตรวจทั้งหมด 5,904 ราย เป็นเพศชาย 3,425 ราย เพศหญิง 2,479 ราย มีผู้ป่วยเกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลัน จำนวน 24 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.4 เป็นเพศชาย 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 33.3 เพศหญิง 16 ราย คิดเป็นร้อยละ 66.7 ปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันส่วนใหญ่จะเป็นชนิดเล็กน้อย จำนวน 22 ราย คิดเป็นร้อยละ 91.7 ไม่ปรากฏปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันระดับรุนแรงหรือเสียชีวิต พบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันในวัยผู้ใหญ่ สูงกว่าวัยเด็กและวัยสูงอายุอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เพศหญิงมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันสูงกว่าเพศชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสรุปการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ร่วมกับการฉีดสารที่บ่งสีชนิดไม่แตกตัวเป็นประจุเข้าหลอดเลือดดำพบปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลัน ในอัตราที่น้อยมาก ส่วนใหญ่อาการอยู่ในระดับเล็กน้อย และค่อนข้างมีความปลอดภัย

บทนำ

การตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ ร่วมกับการฉีดสารทึบรังสีที่มีไอโอดีนเป็นส่วนประกอบ (Iodinated contrast material) เข้าหลอดเลือดดำ เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรค มีบทบาทมากอย่างมากในวงการแพทย์ในปัจจุบัน สารทึบรังสีเปรียบเสมือนยาตัวหนึ่ง ซึ่งสามารถก่อให้เกิดอาการข้างเคียงและภาวะไม่พึงประสงค์ต่อผู้ป่วยได้ โดยสาเหตุของภาวะไม่พึงประสงค์อาจเป็นผลรวมกันของ ปฏิกริยาภูมิแพ้ ปฏิกริยาเสมือนภูมิแพ้ (Allergic-like reaction) และความเป็นพิษของสารทึบรังสีเอง^(1, 2)

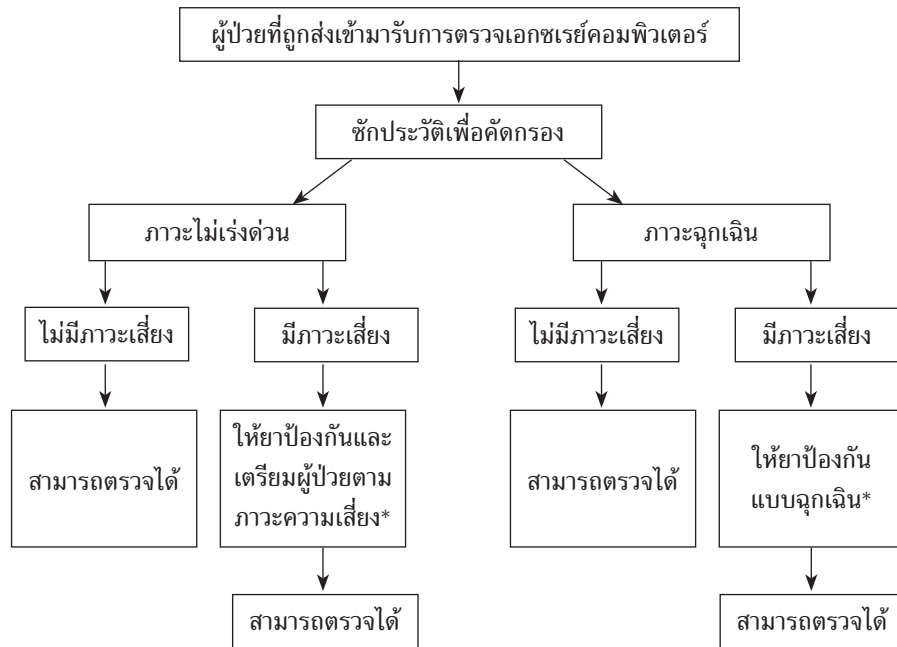
เป็นที่ทราบกันดีว่า โอกาสเกิดปฏิกริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันกับผู้ป่วยนั้นมีโอกาสเกิดน้อยมาก โดยเฉพาะเมื่อใช้สารทึบรังสีชนิดไม่แตกตัวเป็นประจุ (Non-ionic contrast material) จะพบเพียงประมาณร้อยละ 0.07–3.14 เท่านั้น^(3, 4) ซึ่งส่วนใหญ่พบว่า มีอาการเล็กน้อย^(3, 4, 5) ผู้ที่มีความเสี่ยงต่อปฏิกริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันจากสารทึบรังสี ได้แก่ คนที่เคยมีประวัติแพ้สารทึบรังสี อาหาร ยา หรือมีโรคประจำตัวเป็นหอบหืด ภูมิแพ้ ถ้าผู้ป่วยเคยแพ้สารทึบรังสีก็มีความเสี่ยงที่จะเกิดปฏิกริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันสูงเป็น 3.3–6.9 เท่าของคนทั่วไป ในผู้ป่วยโรคหอบหืดจะมีความเสี่ยงสูงเป็น 1.2–2.5 เท่าของคนทั่วไป และถ้ามีการแพ้เกิดขึ้นก็จะเป็นแบบรุนแรงสูงเป็น 5–9 เท่าของคนทั่วไป ในผู้ป่วยภูมิแพ้จะมีความเสี่ยงสูงเป็น 1.5–3 เท่าของคนทั่วไป ในผู้ป่วยที่มีประวัติแพ้อาหารทะเลนั้นปัจจุบันยังมีความเห็นที่แย้งกันว่าไม่ผลต่อการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดปฏิกริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันหรือไม่^(6, 7)

ในช่วงระหว่าง เดือนมกราคม ปี พ.ศ. 2553 ถึง เดือนกันยายน ปี พ.ศ. 2557 มีผู้ป่วยเข้ามารับการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ที่กลุ่มงานรังสีวิทยา โรงพยาบาลกระบี่ จำนวน 17,319 ราย มีผู้ป่วยได้รับการฉีดสารทึบรังสีชนิดไม่แตกตัวเป็นประจุเข้าหลอดเลือดดำ จำนวน 5,904 ราย ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาอัตราการเกิดและความรุนแรงของปฏิกริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลัน จากการฉีดสารทึบรังสีที่มีไอโอดีนเป็นส่วนประกอบเข้าหลอดเลือดดำ ระหว่างการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ในโรงพยาบาลกระบี่ในช่วงเวลาดังกล่าว เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงและพัฒนาแนวปฏิบัติทางคลินิก (Clinical Practice Guideline) สำหรับการป้องกันและดูแลรักษาภาวะไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากการใช้สารทึบรังสี ของกลุ่มงานรังสีวิทยา โรงพยาบาลกระบี่ ให้สามารถดูแลผู้ป่วยที่เข้ามารับบริการในกลุ่มงานรังสีวินิจฉัยได้อย่างปลอดภัยต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การศึกษานี้ เป็นการศึกษาเชิงบรรยายโดยได้รวบรวมข้อมูลย้อนหลังในผู้ป่วยที่ตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ และมีการฉีดสารทึบรังสีชนิดไม่แตกตัวเข้าหลอดเลือดดำที่กลุ่มงานรังสีวิทยาโรงพยาบาลกระบี่ ในช่วงระหว่างเดือน มกราคม พ.ศ. 2553 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2557 ซึ่งแบ่งผู้ป่วยเป็น 3 กลุ่มตามช่วงอายุ คือ กลุ่มวัยเด็กที่อายุน้อยกว่า 15 ปี กลุ่มวัยผู้ใหญ่ที่อายุ 15 ถึง 70 ปี และกลุ่มวัยสูงอายุที่อายุมากกว่า 70 ปี โดยจะได้รับการปฏิบัติตามแนวปฏิบัติทางคลินิก (Clinical Practice Guideline) สำหรับการป้องกันและดูแลรักษาภาวะไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากการใช้สารทึบรังสี ของกลุ่มงานรังสีวิทยา โรงพยาบาลกระบี่ (ภาพที่ 1)

สารทึบรังสีที่ใช้ในผู้ป่วย ได้แก่ Ultravist (Iopromide) ความเข้มข้นของไอโอดีน 300 มก./ซีซี ซึ่งเป็นสารทึบรังสีชนิดไม่แตกตัวเป็นประจุ ปริมาณสารทึบรังสีที่ใช้ขึ้นอยู่กับน้ำหนักของผู้ป่วยและส่วนของร่างกายที่ตรวจตามมาตรฐานของทางกลุ่มงานรังสีวิทยา ได้แก่ ในการตรวจสมองใช้ 1 ซีซี/กก. ในการตรวจบริเวณโพรงจมูก ลำคอ และทรวงอกใช้ 1.5 ซีซี/กก. ในการตรวจบริเวณช่องท้องและการเอกซเรย์คอมพิวเตอร์เส้นเลือดแดงใช้ 2.0–3.0 ซีซี/กก. โดยปริมาณสารทึบรังสีที่ใช้สูงสุด คือ 100 ซีซี หากใช้สารทึบรังสี เกิน 20 ซีซี จะใช้เครื่องฉีดยาอัตโนมัติ (Contrast media injector) ยกเว้นในกรณีที่มีข้อห้าม ความเร็วของการฉีดขึ้นอยู่กับชนิดและส่วนของร่างกายที่ตรวจ หากปริมาณสารทึบรังสีน้อยกว่า 20 ซีซี จะฉีดด้วยมือ (Hand injection)



ภาพที่ 1 การเตรียมผู้ป่วยตามแนวปฏิบัติทางคลินิก (Clinical Practice Guideline) สำหรับการป้องกันและดูแลรักษาภาวะไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากการใช้สารทึบรังสี ของกลุ่มงานรังสีวิทยา โรงพยาบาลกระบี่

* วิธีการเตรียมผู้ป่วย ชนิดและปริมาณของยาที่ใช้จะขึ้นอยู่กับอายุ น้ำหนัก และภาวะความเสี่ยงของผู้ป่วยในแต่ละราย ตามแนวปฏิบัติทางคลินิก (Clinical Practice Guideline) สำหรับการป้องกันและดูแลรักษาภาวะไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากการใช้สารทึบรังสี ของกลุ่มงานรังสีวิทยา โรงพยาบาลกระบี่

การศึกษานี้จะศึกษาเฉพาะการเกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลัน ที่เกิดขึ้นภายใน 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง^(2, 7-10) ซึ่งผู้ป่วยอยู่ในช่วงสังเกตอาการในห้องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ โดยไม่รวมอาการจากผลข้างเคียง (side effect) ภาวะไม่พึงประสงค์ชนิดล่าช้า และการเกิดภาวะไม่พึงประสงค์แบบไม่จำเพาะ เช่น ภาวะไม่พึงประสงค์ต่อไต เนื่องจากไม่สามารถติดตามอาการและไม่สามารถนำผู้ป่วยกลับมาเจาะเลือดซ้ำเพื่อหาระดับครีเอตินินในเลือดได้

ภาวะไม่พึงประสงค์จากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ จะถูกแบ่งเป็น 3 ระดับ คือ ระดับเล็กน้อย ปานกลาง และรุนแรง⁽¹¹⁾ (ตารางที่ 1) โดยมีรังสีแพทย์ประจำห้องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์เป็นผู้ประเมินและรักษาเบื้องต้น สำหรับผู้ป่วยที่เกิดอาการจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันทุกราย ผู้วิจัยจะสืบค้นประวัติทางการแพทย์ ได้แก่ โรคประจำตัว โรคหอบหืด ประวัติการแพ้สารทึบรังสีหรือยาอื่น ๆ การให้ยาป้องกันการแพ้ก่อนตรวจ รายละเอียดการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ การใช้สารทึบรังสี อาการและเวลาที่เกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลัน การรักษา รวมทั้งผลการรักษา โดยมีรังสีแพทย์ พยาบาล นักรังสีการแพทย์และเจ้าหน้าที่ประจำห้องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ เป็นผู้เก็บรวบรวมข้อมูล

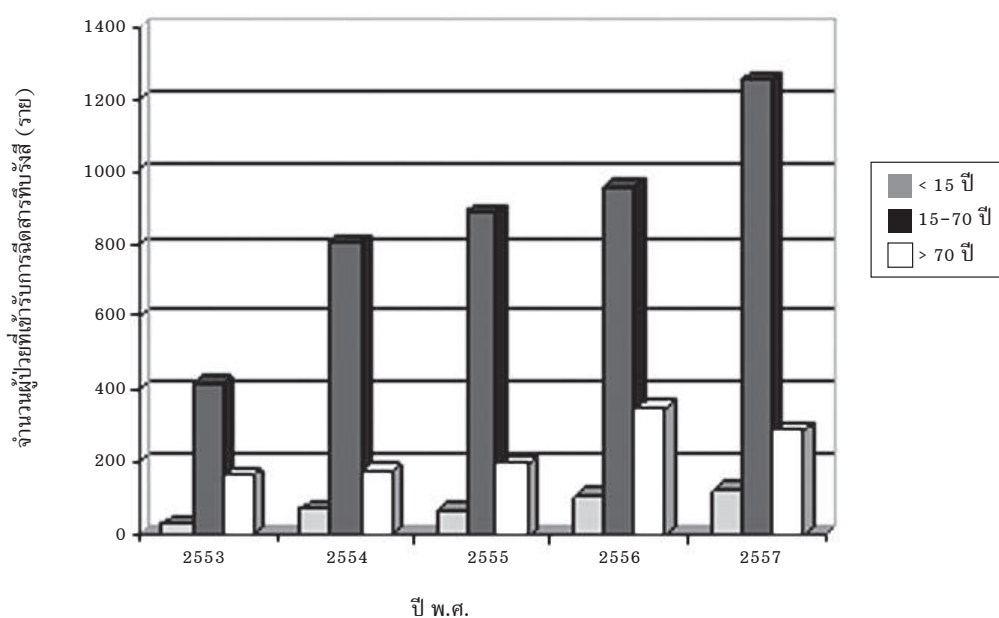
ตารางที่ 1 ผลข้างเคียง (side effect) และปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ (allergic-like reaction) ชนิดเฉียบพลันแบบจำเพาะต่อสารทึบรังสีแบ่งตามระดับความรุนแรง⁽¹¹⁾

ผลข้างเคียง	ระดับเล็กน้อย	ระดับปานกลาง	ระดับรุนแรง
คลื่นไส้	คัน	เหนื่อย	เหนื่อยอย่างรุนแรง
อาเจียน	ผื่นคัน	หลอดลมตีบ	ช็อค
รับรสชาติเพี้ยน	ผื่นลมพิษ	กล่องเสียงบวมเล็กน้อย	ช็อค
เหงื่อออก	ไอ	ตาและหน้าบวมมาก	หัวใจเต้นผิดจังหวะ
รู้สึกอุ่น ร้อน	แน่นจมูก	หัวใจเต้นเร็วจนมีอาการ	หัวใจหยุดเต้นเฉียบพลัน
วิตกกังวล	จาม	หัวใจเต้นเร็วซ้ำจนมีอาการ	
	ตาบวมเล็กน้อย	ความดันโลหิตต่ำ	
	หน้าบวมเล็กน้อย	ความดันโลหิตสูง	

ผล

จากการรวบรวมข้อมูลจากแบบบันทึกข้อมูลของกลุ่มงานรังสีวิทยา และเวชระเบียนของโรงพยาบาลกระบี่ มีผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์และมีการฉีดสารทึบรังสีชนิดไม่แตกตัวเข้าหลอดเลือดดำทั้งหมด 5,904 ราย (ภาพที่ 2) ผู้ป่วยทุกรายได้รับการคัดกรองความเสี่ยงเพื่อเตรียมผู้ป่วยตามแนวปฏิบัติทางคลินิก (Clinical Practice Guideline) สำหรับการป้องกันและดูแลรักษาภาวะไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากการใช้สารทึบรังสีของกลุ่มงานรังสีวิทยา โรงพยาบาลกระบี่

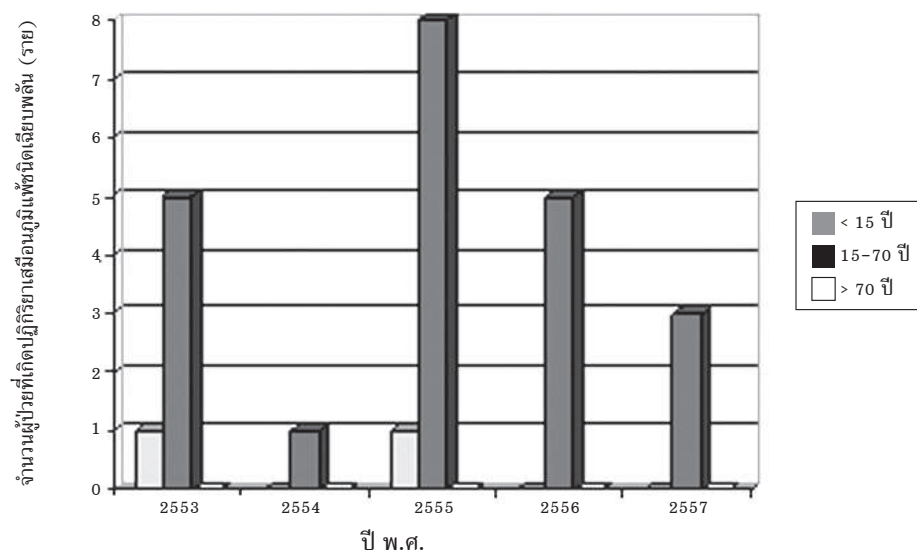
การวิเคราะห์ข้อมูลใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 17.0 ข้อมูลเชิงปริมาณรายงานเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ข้อมูลเชิงคุณภาพรายงานเป็นร้อยละ ใช้ chi-square เปรียบเทียบความแตกต่างของอัตราการเกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันในแต่ละช่วงอายุ และใช้ Fisher's exact test เปรียบเทียบความแตกต่างกันของอัตราการเกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันในเพศชายและหญิง โดยกำหนดค่า p-value < 0.05 ว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 2 จำนวนผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ร่วมกับการฉีดสารทึบรังสี

อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยเท่ากับ 49.0 ปี (ระหว่าง 1 ปี ถึง 101 ปี) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 22.1 ปี แบ่งเป็นเพศชาย 3,425 ราย คิดเป็นร้อยละ 58.0 เพศหญิง 2,479 ราย คิดเป็นร้อยละ 42.0 แบ่งตามการตรวจได้เป็นการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์สมอง จำนวน 1,059 ราย คิดเป็นร้อยละ 17.9 การตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์บริเวณโพรงจมูกและลำคอ จำนวน 1,195 ราย คิดเป็นร้อยละ 20.2 การตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์บริเวณทรวงอก จำนวน 1,030 ราย คิดเป็นร้อยละ 17.4 การตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์บริเวณช่องท้อง จำนวน 2,457 ราย คิดเป็นร้อยละ 41.6 พบว่ามีอาการที่เกิดจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลัน เกิดขึ้นกับผู้ป่วยทั้งสิ้น 24 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.4 (ภาพที่ 3) เป็นเพศชาย 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 33.3 เพศหญิง 16 ราย คิดเป็นร้อยละ 66.7 (ตารางที่ 2) ผู้ป่วยทุกรายมีอาการที่เกิดจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลัน เกิดขึ้นเพียงครั้งเดียวต่อผู้ป่วยแต่ละราย โดยเป็นผู้ป่วยนอก 17 ราย คิดเป็นร้อยละ 70.8 และเป็นผู้ป่วยใน 7 ราย คิดเป็นร้อยละ 29.2 ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่มีอาการที่เกิดจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลัน จำนวน 22 ราย คิดเป็นร้อยละ 91.7 อยู่ในกลุ่มช่วงอายุ 15-70 ปี ผู้ป่วยอีก 2 ราย อยู่ในกลุ่มช่วงอายุน้อยกว่า 15 ปี โดยไม่พบอาการที่เกิดจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันในกลุ่มผู้ป่วยช่วงอายุมากกว่า 70 ปี (ตารางที่ 2 และ 3) ไม่มีผู้ป่วยรายใดที่เกิดอาการจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลัน เคยมีประวัติแพ้สารที่บ่งชี้อาหาร ยา หรือ มีโรคประจำตัว เป็นหอบหืด ภูมิแพ้มาก่อน ไม่มีผู้ป่วยรายใดที่เกิดอาการจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลัน เคยได้รับยาป้องกันการแพ้ (Premedication) มาก่อนการตรวจ

อาการที่เกิดจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้น เป็นระดับเล็กน้อย จำนวน 22 ราย คิดเป็นร้อยละ 91.7 ได้แก่ ภาวะผื่นคัน ผื่นลมพิษ หน้าและตาบวมเล็กน้อย เป็นระดับปานกลาง จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 8.3 ซึ่งผู้ป่วยทั้ง 2 ราย มีอาการเหนื่อยร่วมกับหลอดลมตีบ โดยที่ผู้ป่วย 1 ราย มีอาการหน้าและตาบวมมากร่วมด้วย (ตารางที่ 4) ไม่พบอาการที่เกิดจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันระดับรุนแรง ไม่มีผู้ป่วยที่จำเป็นต้องนอนโรงพยาบาลเพื่อรักษาอาการที่เกิดจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลัน และไม่มีผู้ป่วยเสียชีวิตจากอาการที่เกิดจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลัน ผู้ป่วยทุกรายได้รับการรักษาตามแนวปฏิบัติทางคลินิก (Clinical Practice Guideline) สำหรับการป้องกันและดูแลรักษาภาวะไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากการใช้สารที่บ่งชี้ ของกลุ่มงานรังสีวิทยา โรงพยาบาลกระบี่ จนอาการปลอดภัย (ตารางที่ 5)



ภาพที่ 3 แสดงจำนวนผู้ป่วยที่เกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันที่เข้ารับการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ร่วมกับการฉีดสารที่บ่งชี้

ผู้ป่วยจำนวน 1 ราย ที่เคยมีประวัติเกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลัน หลังการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์บริเวณทรวงอก โดยมีอาการระดับเล็กน้อย ซึ่งกลับมาตรวจซ้ำ ภายใน เวลา 1 ปี เพื่อติดตามการรักษา ครั้งนี้ได้รับยาป้องกัน (Premedication) มาก่อนการตรวจ และปรากฏว่าไม่พบอาการที่เกิดจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันเกิดขึ้นซ้ำ

ตารางที่ 2 จำนวนผู้ป่วยที่เกิดอาการจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันจำแนกตามเพศและกลุ่มวัย

กลุ่มวัย	จำนวน (5,904 ราย)			
	ชาย (3,425 ราย)		หญิง (2,479 ราย)	
	ไม่เกิดอาการ	เกิดอาการ	ไม่เกิดอาการ	เกิดอาการ
วัยเด็ก (<15 ปี)	243	1	162	1
วัยผู้ใหญ่ (15-70 ปี)	2,497	7	1,806	15
วัยสูงอายุ (>70 ปี)	677	0	495	0
รวม	3,417	8	2,463	16

ตารางที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเพศและกลุ่มวัยกับจำนวนผู้ป่วยที่เกิดอาการจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลัน

ปัจจัย	จำนวน (5,904 ราย)		p-value
	ไม่เกิดอาการ	เกิดอาการ	
เพศ			
- ชาย	3,417	8	0.021*
- หญิง	2,463	16	
กลุ่มวัย			
- วัยเด็ก (< 15 ปี)	405	2	0.036**
- วัยผู้ใหญ่ (15-70 ปี)	4,303	22	
- วัยสูงอายุ (> 70 ปี)	1,172	0	

* พบว่าเพศหญิงมีอัตราการเกิดอาการจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันสูงกว่าเพศชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

** พบว่าวัยผู้ใหญ่มีอัตราการเกิดอาการจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันสูงกว่าวัยเด็กและวัยสูงอายุอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4 จำนวนผู้ป่วยที่เกิดอาการจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันจำแนกตามอาการที่พบและเพศ

ระดับความรุนแรงและอาการ	จำนวนผู้ป่วยที่เกิดอาการ (24 ราย)	
	ชาย (8 ราย)	หญิง (16 ราย)
ระดับเล็กน้อย*		
- ผื่นคัน ลมพิษ	8	12
- ใบหน้าบวมเล็กน้อย	0	2
ระดับปานกลาง**		
- หลอดลมตีบ เหนื่อย	0	1
- ใบหน้าและคอบวมมาก	0	1
หลอดลมตีบ เหนื่อย		

*ผู้ป่วยทุกรายได้รับการรักษาด้วยการให้ยาคอร์ติโคสเตียรอยด์และยาต้านฮีสตามีนเข้าหลอดเลือดดำ สังเกตอาการจนดีขึ้นที่แผนกรังสีวิทยา ก่อนจะได้รับยาคอร์ติโคสเตียรอยด์และยาต้านฮีสตามีนไปใช้ที่บ้าน

**ผู้ป่วยทั้งสองรายได้รับการรักษาด้วยการให้ยาคอร์ติโคสเตียรอยด์ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ให้ยาอะดรีนาลีนฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ร่วมกับการพ่นยาขยายหลอดลมและให้ออกซิเจน สังเกตอาการจนดีขึ้นที่แผนกรังสีวิทยา ก่อนจะได้รับยาคอร์ติโคสเตียรอยด์และยาต้านฮีสตามีนไปใช้ที่บ้าน

ตารางที่ 5 แนวปฏิบัติทางคลินิก (Clinical Practice Guideline) สำหรับการให้ยาป้องกันภาวะไม่พึงประสงค์จากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันที่เกิดการฉีดสารที่บ่งชี้เข้าหลอดเลือดดำ (Premedication Regimens) ของกลุ่มงานรังสีวิทยา โรงพยาบาลกระบี่ *

ยา	เวลาการบริหารยา	วิธีการบริหารยาและขนาดยาในเด็ก/dose	วิธีการบริหารยาและขนาดยาในผู้ใหญ่/dose
Prednisolone	13, 7 และ 1 ชั่วโมง ก่อนฉีดสารที่บ่งชี้	รับประทาน 0.5-0.7 มก./กก. (สูงสุดไม่เกิน 50 มก.)	รับประทาน 50 มก.
Ranitidine	13 และ 1 ชั่วโมง ก่อนฉีดสารที่บ่งชี้	-	รับประทาน 150 มก.
Cetirizine	13 และ 1 ชั่วโมง ก่อนฉีดสารที่บ่งชี้	-	รับประทาน 10 มก.

*ในภาวะฉุกเฉินจะใช้ยา Chlorpheniramine และ Dexamethasone ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ โดยปริมาณและเวลาในการบริหารยาขึ้นอยู่กับชนิดของโรค ระดับความรุนแรงต่อนัย และน้ำหนัก ตามความเหมาะสมในผู้ป่วยแต่ละราย

วิจารณ์

ปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันจากสารทึบรังสี เป็นภาวะไม่พึงประสงค์ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับภาวะภูมิแพ้ (Anaphylactic reaction) พยาธิกำเนิดยังไม่สามารถอธิบายได้ชัดเจน อาจเกิดจากการที่สารทึบรังสีมีผลโดยตรงต่อระดับโครงสร้างเซลล์ กระบวนการทำงานของเอนไซม์ ทำให้มีการปล่อยสารออกฤทธิ์ออกมา เช่น ฮีสตามีน ซีโรโทนิน และมีปฏิกิริยาตามมาอีก จนสุดท้ายมีการปลดปล่อยคอมพลีเมนต์ออกมา⁽¹²⁾ และแสดงเป็นอาการและอาการแสดงทางคลินิกในที่สุด ปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ มีความสำคัญ เพราะแม้ว่าส่วนมากผู้ป่วยมักมีอาการเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย แต่อาจมีอาการรุนแรงจนกระทั่งเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิต

จากการรวบรวมข้อมูลย้อนหลังของกลุ่มงานรังสีวิทยา โรงพยาบาลกระบี่ พบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันจากสารทึบรังสีชนิดไม่แตกตัวเป็นประจุ ระหว่างการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์เท่ากับร้อยละ 0.4 ซึ่งเท่ากับผลการศึกษาของ Gooding และคณะ⁽¹³⁾ โดยมีอัตราสูงกว่าการศึกษาของ Dillman⁽¹¹⁾ ที่พบเพียงร้อยละ 0.18 แต่เมื่อเปรียบเทียบการศึกษาของ Morteale และคณะ ที่ศึกษาการใช้ Iopromide ในการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ในผู้ป่วย 29,508 ราย พบว่ามีอัตราสูงกว่าที่พบในการศึกษานี้เล็กน้อยคือร้อยละ 0.7⁽¹⁴⁾ อย่างไรก็ตามมีรายงานไว้ในการศึกษาของ Katayama และคณะ ที่ศึกษาการเกิดภาวะไม่พึงประสงค์ในการใช้สารทึบรังสีชนิดเข้าหลอดเลือดดำมากกว่า 337,000 ครั้ง พบอัตราการเกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันสูงถึงร้อยละ 3.14⁽⁴⁾ สาเหตุสำคัญที่การศึกษาของ Katayama มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันสูงกว่าการศึกษาอื่น ๆ อาจเกิดจากความแตกต่างกันในการนิยามความหมายและแยกแยะระหว่างอาการจากผลข้างเคียงต่าง ๆ เช่น อาการคลื่นไส้ อาเจียน ความรู้สึกร้อนวูบวาบ และอาการที่เกิดจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลัน เช่น ผื่นคัน ลมพิษ เป็นต้น

การศึกษานี้พบว่า อาการที่เกิดจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันส่วนใหญ่ที่พบอยู่ในระดับเล็กน้อย ส่วนระดับปานกลางพบได้บ้าง แต่ไม่ปรากฏอาการที่เกิดจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันระดับรุนแรง (ตารางที่ 3) พบว่ามีความแตกต่างกันของอัตราการเกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลัน เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างแต่ละช่วงอายุอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4) สอดคล้องกับการศึกษาของ Katayama และคณะ ที่รายงานว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันในวัยเด็กและวัยสูงอายุมีอัตราต่ำกว่าช่วงอายุวัยผู้ใหญ่⁽⁴⁾ อย่างไรก็ตามในการศึกษาของ Cochran และคณะ รายงานว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันในวัยเด็กและผู้ใหญ่ไม่แตกต่างกัน⁽⁹⁾ ในส่วนของปัจจัยเรื่องเพศ จากการศึกษาก่อนหน้านี้หลายแห่งพบว่าเพศหญิงมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันสูงกว่าเพศชาย⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ แต่ในการศึกษาของ Katayama และคณะ พบว่าปัจจัยเรื่องเพศไม่มีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลัน⁽⁴⁾ ในการศึกษาพบว่าเพศหญิงมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันสูงกว่าเพศชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4)

ในการศึกษานี้ ผู้ป่วยที่มีปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ ได้แก่ ประวัติแพ้สารทึบรังสี อาหาร ยา หรือมีโรคประจำตัวเป็น หอบหืด ภูมิแพ้ ได้ถูกคัดกรองและเตรียมตัวผู้ป่วยเพื่อป้องกันการเกิดภาวะไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลัน ตามแนวปฏิบัติทางคลินิก (Clinical Practice Guideline) สำหรับการป้องกันและดูแลรักษาภาวะไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากการใช้สารทึบรังสี ของกลุ่มงานรังสีวิทยา โรงพยาบาลกระบี่ (ตารางที่ 5) จึงอาจเป็นสาเหตุให้พบอัตราการเกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันค่อนข้างต่ำดังที่กล่าวมาข้างต้น ในส่วนของกลุ่มผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะไม่พึงประสงค์ต่อไต จะมีการเตรียมผู้ป่วยโดยการให้สารน้ำ ให้ยาป้องกันชนิด เอ็น-อะเซทิลซิสเทอีน (N-acetylcysteine) และให้หยุดยาบางชนิด เช่น เมตฟอร์มิน (Metformin) ก่อนการตรวจ ตามความเหมาะสมในผู้แต่ละราย

ข้อจำกัดของการวิจัยนี้ คือ เป็นการศึกษาแบบย้อนหลัง สันนิษฐานว่าสามารถรวบรวมอัตราและรายละเอียดการเกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันมาศึกษาได้ทั้งหมด ซึ่งก็อาจเป็นไปได้ว่าถ้าปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิด

เฉียบพลันที่เกิดขึ้นอยู่ในระดับเล็กน้อย ผู้ป่วยไม่ได้แจ้งให้เจ้าหน้าที่ทราบหรือเจ้าหน้าที่ไม่ได้สังเกตเห็น อาจทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีโอกาสคลาดเคลื่อนได้บ้าง แต่ก็คงเป็นเพียงส่วนน้อยเท่านั้น

สรุป

การตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ร่วมกับการฉีดสารทึบรังสีชนิดไม่แตกตัวเป็นประจุเข้าหลอดเลือดดำพบปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลัน ในอัตราที่น้อยมาก และถ้าเกิดขึ้นส่วนใหญ่อยู่ในระดับเล็กน้อย หากรังสีแพทย์พยาบาล นักรังสีการแพทย์และทีมงานทางรังสีวิทยา ได้เตรียมความพร้อมตั้งแต่การคัดกรองความเสี่ยง การเตรียมตัวผู้ป่วย การเฝ้าสังเกตอาการและอาการแสดงทางคลินิก ทั้งขณะทำและหลังทำการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ตามแนวปฏิบัติทางคลินิก (Clinical Practice Guideline) สำหรับการป้องกันและดูแลรักษาภาวะไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากการใช้สารทึบรังสี ของกลุ่มงานรังสีวิทยา โรงพยาบาลกระบี่ ที่กำหนดไว้ จะช่วยลดโอกาสที่ผู้ป่วยจะเกิดปฏิกิริยาเสมือนภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันได้ และช่วยให้สามารถดูแลผู้ป่วยขณะเข้ามารับการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ได้อย่างปลอดภัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้ทำการศึกษาขอขอบคุณ รังสีแพทย์ พยาบาล นักรังสีการแพทย์และทีมเจ้าหน้าที่ประจำกลุ่มงานรังสีวิทยา โรงพยาบาลกระบี่ทุกท่าน สำหรับการช่วยดูแลผู้ป่วย และเก็บรวบรวมข้อมูล รวมทั้งนักสถิติประจำโรงพยาบาลกระบี่ สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ จนทำให้การศึกษานี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Brasch RC. Allergic reactions to contrast media: accumulated evidence. *AJR* 1980; 134(4): 797-801
2. Bush WH, Swanson DP. Acute reactions to intravascular contrast media: types, risk factors, recognition, and specific treatment. *AJR* 1991; 157(6): 1153-61.
3. แสงงาม วงษ์อนุชิตเมธา, รุ่งนภา ทรงสิริพันธ์, สิริวรรณ หวังโรตม, สุริรัตน์ ตั้งสง่าศักดิ์ศรี. Intensive ADR monitoring of radio-contrast medium in Hatyai Hospital. ใน : การประชุมวิชาการงานเฝ้าระวังความปลอดภัยจากการใช้ยา เรื่อง Pharmacovigilance: for Patient Safety. วันที่ 2-3 กรกฎาคม 2551. ณ ห้องแกรนด์ บอลรูม โรงแรม ดิ เอ็มเมอร์อัลด์ ถนนรัชดาภิเษก กรุงเทพมหานคร. 2551.
4. Katayama H, Yamaguchi K, Kozuka T, Takashima T, Seez P, Matsuura K. Adverse reactions to ionic and nonionic contrast media. A report from the Japanese Committee on the Safety of Contrast Media. *Radiology* 1990; 175(3): 621-8.
5. Lasser EC, Berry CC, Talner LB, Santini LC, Lang EK, Gerber FH, et al. Pretreatment with corticosteroids to alleviate reactions to intravenous contrast material. *N Engl J Med* 1987; 317(14): 845-9.
6. Cutroneo P, Polimeni G, Curcuruto R, Calapai G, Caputi AP. Adverse reactions to contrast media: an analysis from spontaneous reporting data. *Pharmacol Res* 2007; 56: 35-41.
7. Namasivayam S, Kalra MK, Torres WE, Small WC. Adverse reactions to intravenous iodinated contrast media: an update. *Curr Probl Diagn Radiol* 2006; 35(4): 164-9.
8. Bettmann MA, Morris TW. Recent advances in contrast agents. *Radiol Clin North Am* 1986; 24(3): 347-57.

9. Cochran ST, Bomyea K, Sayre JW. Trends in adverse events after IV administration of contrast media. *AJR* 2001; 176(6): 1385-8.
 10. Bettmann MA, Holzer JF, Trombly ST. Risk management issues related to the use of contrast agents. *Radiology* 1990; 175(3): 629-31.
 11. Dillman JR, Strouse PJ, Ellis JH, Cohan RH, Jan SC. Incidence and severity of acute allergic-like reaction of IV nonionic iodinated contrast material in children. *AJR* 2007; 188(6): 1643-7.
 12. Almen T. The etiology of contrast medium reactions. *Invest Radiol* 1994; 29(suppl 1): S37-45.
 13. Gooding CA, Berdon WE, Brodeur AE, Rowen M. Adverse reactions to intravenous pyelography in children. *AJR* 1975; 123(3): 802-4.
 14. Mortelé KJ, Olivia MR, Ondategui S, Ros PR, Silverman SG. Universal use of nonionic iodinated contrast medium for CT: evaluation of safety in a large urban teaching hospital. *AJR* 2005; 184: 31-4.
 15. Lang DM, Alpern MD, Visintainer PF, Smith ST. Gender risk for anaphylactoid reaction to radiographic contrast media. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95(4): 813-7.
 16. Yocum MW, Khan DA. Assessment of patients who have experienced anaphylaxis: a 3-year survey. *Mayo Clin Proc* 1994; 69: 16-23.
 17. Stark BJ, Sullivan TJ. Biphasic and protracted anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78: 76-83.
 18. Wong S, Dykewicz MS, Patterson R. Idiopathic anaphylaxis: a clinical summary of 175 patients. *Arch Intern Med* 1990; 150(6): 1323-8.
-

Acute Allergic-Like Reaction To Intravenous Non-ionic Iodinated Contrast Material In Patients Who Underwent Computed Tomography

Teeraphan Bootphaew

Krabi Hospital, Amphoe Muang, Krabi 81000, Thailand.

ABSTRACT The author retrospectively reviewed incidence and severity of acute allergic-like reaction related to intravenous administration of non-ionic iodinated contrast material in patients who underwent computed tomography in Krabi General Hospital during January 2010 to September 2014. Type of acute allergic-like reaction, severity of reaction and patient outcome were reviewed. The medical records were reviewed for pertinent medical history related to each reaction, including previous contrast material reaction, premedication before administration of intravenous iodinated contrast material, previous allergic-like reaction to drugs or substances other than contrast material and history of asthma. Five thousand nine hundred and four intravenous administrations of low-osmolality non-ionic iodinated contrast material were performed during the time period specified. Acute allergic-like reactions to contrast material were documented in 24 (0.4%) of patients. Twenty-two (91.7%) of acute allergic-like reaction were categorized as mild and two (8.3%) as moderate. No deaths were attributed to intravenous non-ionic iodinated contrast material. The most of acute allergic-like reactions (91.7%) occurred in adult age group. The difference of reaction rates in adult, pediatric and elderly patients was statistically significant ($p < 0.05$). Greater risk of allergic-like reaction exists in association with female gender ($p < 0.05$). In conclusion, the incidence of acute allergic-like reactions to intravenous administration of low-osmolality non-ionic iodinated contrast material is very low and most reactions are mild degree. The use of intravenous administration of low-osmolality non-ionic iodinated contrast material during computed tomography is quite safe.

Key words: Acute allergic-like reaction, Non-ionic iodinated contrast material, Computed tomography

สรุปและวิเคราะห์สาเหตุที่แรงงานไทยถูกส่งกลับ จากการตรวจโรคไม่ผ่านในต่างประเทศ ระหว่าง พ.ศ. 2554-2557

สุธน วงษ์ชีรี* สุรศักดิ์ หมั่นพล* อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์** พินิจ งามประสิทธิ์* มะลิวัลย์ หอมจัน*
พรหมภัสสร ดิษสระ* เอกรินทร์ ทรัพย์มาก* และชมโฉลโล สีนธสาร*

*สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี

**สถาบันวิจัยชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ ตั้งแต่ พ.ศ. 2540 เป็นต้นมา แรงงานไทยที่จะไปทำงานในต่างประเทศ ต้องได้รับการตรวจสุขภาพ ตามกฎหมายหรือข้อกำหนดของประเทศนั้นๆ โดยจะต้องตรวจกับสถานพยาบาลเอกชน ที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในขณะที่สถานพยาบาลภาครัฐ ไม่ต้องขอการรับรองมาตรฐานใดๆ แต่ก็ยังปรากฏรายงานสถิติแรงงานไทยที่ถูกส่งกลับจากตรวจโรคไม่ผ่านในต่างประเทศ จึงได้ศึกษาข้อมูลย้อนหลัง เพื่อวิเคราะห์สาเหตุการส่งกลับดังกล่าว โดยมีรูปแบบเป็นการศึกษาย้อนหลังจากข้อมูล จากกรมการจัดหางาน กระทรวงแรงงานและสวัสดิการสังคม ที่รายงานให้กับสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่าง พ.ศ. 2554-2557 พบว่าแรงงานถูกส่งกลับจำนวน 242 คน (0.11%) จากที่เดินทางไปทำงานต่างประเทศ 217,963 คน อัตราการส่งกลับมีแนวโน้มลดลงตาม ปี พ.ศ. ที่ผ่านมา สาเหตุของโรคที่พบบ่อย 3 อันดับแรก ได้แก่ โรคปอดและวัณโรค ไวรัสตับอักเสบบี และโรคจิตเภท ตามลำดับ สำหรับโรคปอดและวัณโรคที่ตรวจไม่ผ่านในต่างประเทศมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจาก 55.77% ในปี พ.ศ. 2554 เป็น 76.19% ในปี พ.ศ. 2557 และได้ติดตาม ผลตรวจยืนยันแรงงานที่ถูกส่งกลับ 139 คน ที่ถูกส่งกลับเพราะตรวจโรคปอดและวัณโรค ไม่ผ่านในต่างประเทศ 99 คน (71.22%) โดยถูกส่งกลับจากการตรวจของห้องปฏิบัติการภาครัฐเพียงแห่งเดียว 52 คน (52.53%) เฉพาะแรงงานที่ถูกส่งกลับและติดตามบุคคลให้รับการตรวจยืนยันในประเทศไทยได้ 19 คน มี 11 คน (57.90%) ที่ผลการตรวจยืนยันในประเทศไทยเป็นลบหรือปกติ ทั้งนี้มี 6 คน (31.58%) ที่ใช้เอกสารปลอม หรือปลอมแปลงผลตรวจ เนื่องจากผลตรวจเอกซเรย์ไม่ผ่านตั้งแต่ก่อนเดินทางหรือใช้ใบรายงานผลจากห้องปฏิบัติการที่ถูกยกเลิก หรือไม่ปรากฏรายนามเป็นผู้มารับบริการตรวจ มีเพียง 2 คน (10.53%) ที่อาจมีผลลบปลอมตั้งแต่ก่อนเดินทาง ปัญหาการใช้เอกสารปลอมหรือปลอมแปลงผลตรวจก่อนเดินทาง ยังพบได้ในกรณีแรงงานถูกส่งกลับ จากตรวจไวรัสตับอักเสบบี และ ซี และตรวจสารเสพติดไม่ผ่านในต่างประเทศ ซึ่งตรงกับผลตรวจก่อนเดินทาง

บทนำ

แรงงานไทยจำนวนหนึ่ง ถูกส่งกลับเนื่องจากผลตรวจโรคไม่ผ่านในต่างประเทศทั้ง ๆ ที่ก่อนเดินทางไปทำงานต่างประเทศ ได้ผ่านการตรวจโรค ตามประกาศของกรมจัดหางาน พ.ศ. 2546⁽¹⁾ ที่ระบุชนิดการตรวจโรคและกำหนดรายชื่อสถานพยาบาล ตามที่ประเทศปลายทางต้องการ⁽²⁾ ทำให้แรงงานสูญเสียเงินที่ได้จ่ายไปแล้วให้กับบริษัทจัดหางาน กรมจัดหางานต้องชดเชยในกรณีที่แรงงานถูกส่งกลับ เพราะไม่ผ่านการตรวจโรคในต่างประเทศและยังเสื่อมเสียภาพลักษณ์ของประเทศไทยในด้านสุขภาพของคนไทย และคุณภาพผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ บทความนี้จะทบทวนสถิติที่เกี่ยวข้องกับแรงงานไทยที่ถูกส่งกลับ จากกรณีผลตรวจโรคไม่ผ่านในต่างประเทศ วิเคราะห์แนวโน้มนำเสนอการติดตามผลตรวจที่ขัดแย้งกัน เพื่อสรุปสาเหตุที่แท้จริงต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. ข้อมูลสถิติแรงงานไทยถูกส่งกลับ จากกรณีผลตรวจโรคไม่ผ่านในต่างประเทศ เป็นข้อมูลจากรายงานรอบ 6 เดือน (ต.ค.-มี.ค. และ เม.ย.-ก.ย.) ที่กรมจัดหางานรายงานมาที่ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำแนกตามปีงบประมาณ ระหว่าง ตุลาคม 2554-สิงหาคม 2557
2. ข้อมูลห้องปฏิบัติการที่แรงงานไทยตรวจก่อนเดินทางไปต่างประเทศ จำแนกตามประเภทสถานพยาบาลตามประเทศของกรมจัดหางาน พ.ศ. 2546 โดยจำแนกเป็นห้องปฏิบัติการภาครัฐ และภาคเอกชน ซึ่งจะได้ข้อมูลสถานที่ตั้ง โรคที่ผลตรวจขัดแย้งระหว่างก่อนเดินทางไปต่างประเทศ ผลการตรวจในต่างประเทศ ข้อมูลแรงงานไทยที่ถูกส่งกลับ ในส่วนของภาคเอกชนต้องสอบสวนชี้แจง ภายใน 15 วัน หลังจากได้รับหนังสือราชการ จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ตามข้อกำหนด ร่วมด้วยนโยบายการรับรองความสามารถ ห้องปฏิบัติการตรวจสุขภาพคนงานที่จะไปทำงานต่างประเทศ ของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ข้อ 12.1.1⁽³⁾
3. การวิเคราะห์ข้อมูลการศึกษานี้ เป็นการศึกษาแผนย้อนหลัง (Retrospective Study) เก็บรวบรวมข้อมูลเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับแรงงานไทยที่ถูกส่งกลับ มีข้อจำกัดที่ขาดข้อมูลแรงงานไทยที่ไม่ถูกส่งกลับเพื่อใช้เป็นตัวควบคุม จึงวิเคราะห์ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการถูกส่งกลับเชิงเปรียบเทียบไม่ได้ บทความนี้จะแสดงสถิติเชิงพรรณนา วิเคราะห์แนวโน้มตามปี พ.ศ. ที่ศึกษาเพื่อแสดงความเปลี่ยนแปลงด้วยสถิติ Chi square for trend ของ Epitool ซึ่งเป็นเครื่องมือวิเคราะห์ทางสถิติแบบออนไลน์ ทางเว็บไซต์ [epitools.ausvet.com.au /content.php?page=trend](http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=trend)⁽⁴⁾

ผล

1. สถิติแรงงานไทยที่ถูกส่งกลับจากการตรวจโรคไม่ผ่านในต่างประเทศ จำแนกตามปีงบประมาณ พ.ศ. 2554-2557 (ตารางที่ 1) มีจำนวนแรงงานไทยที่ถูกส่งกลับรวม 242 คน จากที่ไปทำงานต่างประเทศจำนวน 217,963 คน คิดเป็น 0.11% แนวโน้มร้อยละของแรงงานไทยที่ถูกส่งกลับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Chi square for trend = 12.48, $p = 0.006$)
2. ข้อมูลที่อาจสัมพันธ์กับจำนวนแรงงานไทยที่ถูกส่งกลับ จำแนกตามปีงบประมาณ 2554-2557 ไม่พบแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในอัตราการถูกส่งกลับในด้านประเภทของสถานพยาบาลภาครัฐหรือภาคเอกชน สถานที่ตั้งของสถานพยาบาลในกรุงเทพมหานครและต่างจังหวัด ประเทศปลายทาง คือ ไต้หวัน และประเทศอื่นๆ (Chi square for trend $p > 0.05$) ยกเว้นพบว่าแนวโน้มอัตราการถูกส่งกลับจากโรคปอดและวัณโรค จาก 55.77% ในปี พ.ศ. 2554 เพิ่มขึ้นเป็น 76.19% ในปี พ.ศ. 2557 (Chi square for trend = 16.94, $p = 0.0007$) รายละเอียดแสดงในตารางที่ 2

3. สรุปผลตรวจโรคที่ขัดแย้งระหว่างตรวจในประเทศไทยก่อนเดินทางตรวจในต่างประเทศ และตรวจในประเทศไทย หลังจากถูกส่งกลับจากต่างประเทศแล้วเฉพาะแรงงานที่ติดตามข้อมูลได้ 139 คน จาก 242 คน ที่ถูกส่งกลับ โดยมีสาเหตุที่ถูกส่งกลับเป็นอันดับหนึ่ง คือ โรคปอดและวัณโรค 99 คน (71.22%) ไวรัสตับอักเสบบี 16 คน (11.51%) โรคอื่นๆ 24 คน (17.27%) ผลตรวจขัดแย้งกรณีโรคปอดและวัณโรค จำแนกเป็นสองประเภทหลัก คือ ประเภทแรก ผลตรวจลบปลอมในประเทศไทยก่อนเดินทางแต่ได้ผลบวกในต่างประเทศ และยืนยันผลบวกในประเทศไทยหลังจากถูกส่งกลับ 59 ราย (59.60%) ประเภทที่สอง ผลตรวจเป็นลบในประเทศไทยบวกในต่างประเทศ แต่ยืนยันผลตรวจเป็นลบในประเทศ ภายหลังถูกส่งกลับหรือสงสัยจะเป็นผลบวกปลอมในต่างประเทศ สูงถึง 40 ราย (40.40%) โรคอื่นๆ พบผลลบปลอมในประเทศไทย 35 ราย (87.50%) ผลบวกปลอมในต่างประเทศ 5 ราย (12.50%) (ตารางที่ 3)

4. ผลการสอบสวนสาเหตุที่ผลตรวจขัดแย้งกันระหว่างในประเทศไทย และต่างประเทศ เฉพาะรายที่ห้องปฏิบัติการติดตาม ให้มารับผลตรวจยืนยันจำนวน 28 ราย (ตารางที่ 4) จำแนกตามสภาพปัญหาจากแรงงานถูกส่งกลับจนได้ผลการตรวจวินิจฉัยสุดท้ายเฉพาะตรวจโรคปอดและโรควัณโรคไม่ผ่านในต่างประเทศที่ติดตามบุคคลได้ 19 ราย มี 7 ราย ที่ตรวจยืนยันในประเทศไทยหลังจากถูกส่งกลับว่า ไม่ใช่โรคปอดและวัณโรค มี 4 ราย ที่ยืนยันว่าเป็นเพียงร่องรอยโรคที่รักษาหายขาดแล้ว แต่มี 4 ราย ที่ผลตรวจเอกซเรย์ปอดไม่ผ่านตั้งแต่ก่อนเดินทางไปต่างประเทศ 1 ราย ไม่ปรากฏรายนามเป็นผู้รับการตรวจจากสถานพยาบาลที่กล่าวอ้างแต่ประการใด และพบ 1 ราย ใบรายงานผลตรวจเอกซเรย์ปอดจากสถานพยาบาลที่ถูกยกเลิกไปแล้วมีเพียง 2 ราย ที่ผลตรวจยืนยันโรคปอดและวัณโรคตรงกันระหว่างต่างประเทศและในประเทศภายหลังถูกส่งกลับ จากข้อมูลข้างต้นสรุปได้ว่า มีการใช้เอกสารปลอม หรือปลอมผลตรวจถึง 6 ราย ผลตรวจบวกปลอมในต่างประเทศ 11 ราย มีเพียง 4 ราย ที่ผลตรวจก่อนเดินทางอาจผิดพลาด

ปัญหาการใช้เอกสารปลอมหรือใช้ผลตรวจปลอมยังคงพบได้ในกรณีผลตรวจขัดแย้งของการตรวจสารเสพติดในปัสสาวะ 1 ราย การตรวจแอนติเจนของไวรัสตับอักเสบบี 3 ราย

ปัญหาผลลบปลอมในประเทศไทย ก่อนเดินทางเป็นไปได้ในกรณีแรงงานถูกส่งกลับจากตรวจผลบวกในต่างประเทศ ได้แก่ การตรวจซีฟิลิส และไวรัสตับอักเสบบี เป็นบวกอย่างละเอียด 1 ราย อย่างไรก็ตามอาจเป็นผู้ติดเชื้อรายใหม่ก็เป็นได้ ทั้งนี้ในกรณีตับอักเสบบีและซี มีข้อมูลการติดเชื้อแต่ไม่มีแอนติเจนในเลือดผู้ติดเชื้อเป็นระยะเวลาหลายเดือนได้⁽¹⁰⁾ (Window period) นอกจากนี้ยังพบ 1 ราย มีผลตรวจ HBsAg เป็นลบอย่างต่อเนื่องเมื่อตรวจในประเทศไทยหลังถูกส่งกลับ ซึ่งบ่งชี้ว่าผลตรวจในต่างประเทศเป็นผลบวกปลอม

ตารางที่ 1 สถิติแรงงานไทยที่ถูกส่งกลับกรณีตรวจโรคไม่ผ่านในต่างประเทศจำแนกตาม ปีงบประมาณ 2554-2557

ปีงบประมาณ (ต.ค.-ก.ย.)	2554	2555	2556	2557*	รวม
จำนวนแรงงานที่ไป (คน)	60,190	53,831	53,166	50,776	217,963
จำนวนแรงงานที่ถูกส่งกลับ (คน)	54	82	49	57	242
อัตราร้อยละที่ถูกส่งกลับ** (%)	0.09	0.15	0.09	0.11	0.11

* ต.ค. 2556- ส.ค. 2557

** Chi square for trend = 12.46, p = 0.006

ตารางที่ 2 ข้อมูลความสัมพันธ์ของจำนวนแรงงานไทย (คน) และอัตราร้อยละ (%) ที่ถูกส่งกลับกรณีตรวจโรคไม่ผ่านในต่างประเทศ จำแนกตามปีงบประมาณ 2554 - 2557

	จำนวนแรงงาน (%)				
	พ.ศ. 2554	พ.ศ. 2555	พ.ศ. 2556	พ.ศ. 2557*	รวม (%)
ประเภทสถานพยาบาล					
รพ. รัฐบาล	10(34.48)	38(49.35)	8(40.00)	28(53.85)	84(47.19)
รพ. เอกชน	19(65.52)	39(50.65)	12(60.00)	24(46.15)	94(52.81)
สถานที่ตั้ง					
กรุงเทพฯ และปริมณฑล	15(51.72)	49(63.64)	13(65.00)	39(72.22)	116(64.44)
ต่างจังหวัด	14(48.28)	28(36.36)	7(35.00)	15(27.78)	64(35.56)
โรคที่ตรวจพบในต่างประเทศ					
โรคปอด/วัณโรค**	29(55.77)	51(62.20)	15(65.22)	48(76.19)	143(65.00)
ไวรัสตับอักเสบบี	7(13.46)	10(12.20)	3(13.04)	3(4.76)	23(10.46)
โรคอื่นๆ	16(30.77)	21(25.60)	5(21.74)	12(19.05)	54(24.54)
ประเทศที่ส่งกลับ					
ไต้หวัน	19(35.19)	26(31.71)	8(34.78)	23(42.59)	76(55.47)
ประเทศอื่นๆ	35(64.81)	56(68.29)	15(65.22)	31(57.41)	61(44.53)

* ต.ค. 2556 - ส.ค. 2557

** Chi square for trend = 16.94, p = 0.0007

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบผลตรวจวินิจฉัยก่อนเดินทางในต่างประเทศ และหลังจากแรงงานถูกส่งกลับ

โรค	ผลตรวจ -/+ (+) (%)	ผลตรวจ -/+/- (%)	รวม (คน)
1. โรคปอดและวัณโรค	59(59.60)	40(40.40)	99(71.22)
2. ไวรัสตับอักเสบบี	14(87.50)	2(12.50)	16(11.51)
3. โรคอื่นๆ*	21(22.34)	3(6.67)	24(17.27)
รวม	94(67.63)	45(32.37)	139(100.00)

ผลตรวจ -/+ (+) หมายถึง ผลวินิจฉัยก่อนเดินทางเป็น ลบ ในต่างประเทศเป็น บวก และหลังจาก แรงงานถูกส่งกลับเป็นผล บวก

ผลตรวจ -/+/- หมายถึง ผลวินิจฉัย ก่อนเดินทางเป็น ลบ ในต่างประเทศเป็น บวก และหลังจาก แรงงานถูกส่งกลับเป็นผล ลบ

*โรคอื่นๆ อาทิ ซิฟิลิส โรคไต ไวรัสตับอักเสบบี เอ โรคติดเชื้อเอชไอวี ภาวะธัยรอยด์ และตรวจพบยาเสพติด

ตารางที่ 4 การสอบสวนปัญหาและสาเหตุที่แรงงานไทยถูกส่งกลับจากตรวจโรค ไม่ผ่านในต่างประเทศ

ปัญหา	การสอบสวน	สรุปสาเหตุหรือข้อเสนอ
1. ผลตรวจเอกซเรย์ปอด ไม่ผ่านในต่างประเทศ	- แรงงาน 12 คน ตรวจสุขภาพ เป็นปกติ ผลเอกซเรย์ปอดปกติ ในประเทศไทยหลังถูกส่งกลับ	- มาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยวัณโรคในประเทศไทย สูงกว่าในประเทศปลายทาง
1.1 ตรวจยืนยันในประเทศ เป็นลบ หรือยืนยันไม่ใช่ วัณโรค ในประเทศไทย หลังจากถูกส่งตัวกลับ	- แรงงาน 4 คน ผลตรวจเอกซเรย์ปอด ยืนยันเป็นร่องรอยการติดเชื้อ ที่รักษาหายแล้ว	
1.2 ตรวจยืนยันในประเทศไทย ไม่ผ่านตรงกับตรวจ ในต่างประเทศ	- แรงงาน 4 คน มีผลตรวจเอกซเรย์ปอดไม่ผ่านในต่างประเทศ ตรงกับที่ตรวจในประเทศหลังถูกส่งกลับโดย - 2 คน ผลตรวจเอกซเรย์ปอดไม่ผ่าน ก่อนเดินทางไปทำงานต่างประเทศ - 2 คน มีผลตรวจเอกซเรย์ปอดผ่าน จากสถานพยาบาลที่ถูกยกเลิก ใบอนุญาตแล้ว	- ใช้เอกสารปลอม หรือปลอมแปลง ผลตรวจก่อนเดินทางไปต่างประเทศมีการฝ่าฝืนประกอบ การตรวจสุขภาพแรงงานที่จะไปทำงานต่างประเทศ โดยไม่ได้ รับอนุญาต
2. ตรวจพบยาเสพติดใน ต่างประเทศ 1 คน	ไม่ปรากฏรายชื่อแรงงานคนนี้เข้ารับการ ตรวจสารเสพติดในสถานพยาบาลที่อ้างถึง ก่อนเดินทาง	- ใช้เอกสารปลอม หรือปลอมแปลง ผลตรวจก่อนเดินทางไป ต่างประเทศ
3. ผลตรวจการติดเชื้อไวรัสตับ อักเสบ บี (HBsAg) เป็นบวก ในต่างประเทศ	- แรงงาน 2 คน มีผลบวกในประเทศไทย ตั้งแต่ก่อนเดินทาง - มี 1 คนที่ผลตรวจยืนยันเป็นลบ อย่างต่อเนื่องหลังจากถูกส่งกลับ	- ใช้เอกสารปลอม หรือปลอมแปลง ผลตรวจก่อนเดินทางไป ต่างประเทศ - ผลตรวจในต่างประเทศ เป็นบวกปลอม
4. ผลตรวจการติดเชื้อไวรัสตับ อักเสบ ซี (Anti HCV) เป็นบวกในต่างประเทศ	- แรงงาน 1 คนมีผลบวกหลังจาก เดินทางไปทำงาน 5 เดือน - อีก 2 คนมีผลบวกตั้งแต่ก่อน เดินทางไปทำงาน	- อาจเป็นผู้ติดเชื้อรายใหม่หรือ เพิ่งติดเชื้อระหว่างทำงาน ในต่างประเทศ - ใช้เอกสารปลอม หรือปลอมแปลง ผลตรวจก่อนเดินทางไป ต่างประเทศ
5. ผลตรวจซีฟิลิสบวกในต่างประเทศ	แรงงาน 1 คน ตรวจยืนยันได้ผลบวก ในต่างประเทศและหลังจากถูกส่งกลับ อย่างต่อเนื่อง	- อาจเป็นผู้ติดเชื้อรายใหม่หรือ เพิ่งติดเชื้อระหว่างทำงานใน ต่างประเทศและเป็นไปได้ที่ ผลตรวจก่อนเดินทางเป็นผลลบ ปลอม

วิจารณ์

การตรวจสุขภาพแรงงานไทยไปทำงานต่างประเทศ เป็นไปตามความต้องการของประเทศปลายทาง ที่ต้องการแรงงานที่มีสุขภาพดีปราศจากโรคต้องห้าม ดังระบุรายละเอียดรายการตรวจสอบตามประกาศปลายทางในประเทศของกรมจัดหางาน อย่างไรก็ตาม แม้จะมีการตรวจสุขภาพแรงงานโดยก่อนเดินทางประเทศปลายทางยังคงตรวจสุขภาพแรงงานไทยซ้ำ และมีการส่งแรงงานกลับจากผลตรวจโรคไม่ผ่าน 242 คน ระหว่างปี พ.ศ. 2554-2557 โดยประเทศไต้หวันส่งกลับแรงงานไทยมากที่สุด 76 คน (55.47% จาก 137 คนที่แจ้งประเทศส่งกลับ) ใน พ.ศ.2555 มีการตรวจสุขภาพแรงงานไทยก่อนเดินทาง 39,916 คน ไม่ผ่านการตรวจสุขภาพ 2,157 คน (5.40%) และในปีเดียวกัน มีแรงงานไทยถูกส่งกลับจากการตรวจโรคไม่ผ่านในต่างประเทศถึง 82 คน จากจำนวนแรงงานไทยทั้งหมด 53,831 คน (0.15%)⁽⁵⁾ แม้หน่วยงานกำกับควบคุมได้ระบุให้เข้มงวดด้านคุณภาพห้องปฏิบัติการตรวจสุขภาพแรงงาน⁽⁶⁾ แล้วก็ตาม ยังคงมีแรงงานไทยถูกส่งกลับในปีต่อมา แม้จะมีแนวโน้มลดลงแต่น่าจะเป็นการสรุปปัญหาที่มองข้ามสาเหตุสำคัญอื่น ๆ นอกจากระบุปัญหาคุณภาพการตรวจก่อนเดินทาง การศึกษารุ่นนี้ได้แสดงหลักฐานเชิงประจักษ์ที่อธิบายปรากฏการณ์ส่งแรงงานกลับ ดังนี้

ประการที่หนึ่ง มาตรฐานทางการแพทย์ที่แตกต่างกันระหว่างประเทศไทยกับประเทศปลายทาง จากแรงงานไทยที่ถูกส่งกลับจากผลเอกซเรย์ปอดไม่ผ่านในต่างประเทศ 99 คน ที่ติดตามการตรวจสุขภาพ ตรวจเอกซเรย์ปอดซ้ำ และตรวจหาเชื้อวัณโรค ด้วยการย้อม Acid Fast Staining พบว่า 40 คน คิดเป็นร้อยละ 40.40 ยืนยันว่าไม่ใช่วัณโรคปอด มาตรฐานการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคในประเทศไทยข้างต้นทำตามแนวทางการวินิจฉัย และรักษาวัณโรคในประเทศไทย ของสมาคมปราชญ์วัณโรคแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ พ.ศ. 2539⁽⁷⁾ ซึ่งมีแนวทางการตรวจวินิจฉัยตรงกับ WHO Treatment of Tuberculosis Guideline 4th edition⁽⁸⁾ ขณะที่ประเทศปลายทางใช้เพียงผลตรวจเอกซเรย์ปอด ซึ่งเป็นแค่การตรวจคัดกรองที่ไม่จำเพาะกับวัณโรค โรคหรือภาวะอื่นๆ อาจให้ผลบวกในการตรวจเอกซเรย์ปอด ได้แก่ ปอดบวมจากเชื้ออื่นๆ⁽⁹⁾ ทั้งแบคทีเรีย ไวรัส หรือ เชื้อปรสิต ภาวะซิลิโคซิส ถุงลมโป่งพอง โรคกระดูกทรวงอกต่างๆ หรือแม้แต่องค์การเกิดการติดเชื้อวัณโรคในปอด ที่รักษาหายขาดแล้ว (Calcified lung) การใช้ผลเอกซเรย์ปอดเพียงการทดสอบเดียวในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรค จึงเป็นการปฏิบัติต่อแรงงานไทยที่อาจจะละเมิดจริยธรรมทางการแพทย์ เพราะใช้การทดสอบผิดหรือเกินจากวัตถุประสงค์ของการทดสอบเพื่อประโยชน์อื่นๆ นอกจากเพื่อประโยชน์ในการรักษาพยาบาล ตัวแทนกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้เรียกร้องให้มีการพบปะเจรจาระหว่างแพทย์ไทยกับแพทย์ต่างประเทศ เพื่อทำความเข้าใจในมาตรฐานการตรวจวัณโรคปอด จนถึงปัจจุบัน ยังคงไม่มีการเจรจาดังกล่าว

ประการที่สอง มีปัญหาการใช้เอกสารปลอมแปลง หรือปลอมแปลงผลการตรวจสุขภาพแรงงานก่อนเดินทางไปต่างประเทศ 6 คน โดย 4 ราย มีผลตรวจเอกซเรย์ปอดไม่ผ่าน และอีก 2 ราย ไม่ปรากฏเป็นผู้มาตรวจ ณ สถานพยาบาลที่กล่าวอ้าง และยังพบการใช้เอกสารปลอมแปลง กรณีแรงงานถูกส่งกลับ คือ HBsAg 2 คน Anti-HCV 1 คน และสารเสพติด 1 คน จนถึงปัจจุบัน ยังไม่มีมาตรการใดๆ กับผู้ใช้เอกสารปลอมแปลง ทั้ง 10 คนนี้

ประการที่สาม ห้องปฏิบัติการที่ได้รับอนุญาตให้ตรวจสุขภาพแรงงานไทย ที่จะไปทำงานต่างประเทศ ถูกจำแนกเป็น 2 ประเภท ตามประกาศของกรมจัดหางาน พ.ศ. 2546 ข้อ 4 ยกเว้นสถานพยาบาลภาครัฐไม่ต้องขอรับรองคุณภาพเป็นห้องปฏิบัติการตรวจสุขภาพคนงานที่จะเดินทางไปต่างประเทศ ข้อมูลแรงงานไทยที่ถูกส่งกลับจากไม่ผ่านตรวจโรคในต่างประเทศ เฉพาะที่ได้ตรวจกับห้องปฏิบัติการสังกัดภาครัฐ 84 คน พบว่าถูกส่งกลับจากโรงพยาบาลภาครัฐที่ตั้งในเขตกรุงเทพมหานคร แห่งหนึ่งทีเดียว จำนวน 52 คน (61.90%) ของแรงงานที่ถูกส่งกลับ และผ่านการตรวจจากห้องปฏิบัติการภาครัฐ ความแตกต่างในมาตรฐานระหว่างห้องปฏิบัติการภาครัฐและภาคเอกชน อาทิ

มาตรการบังคับบุคคล มาตรการจัดเก็บตัวอย่างที่ควบคุมการปลอมปนตัวอย่าง มาตรฐานการป้องกันการรับผลรายงานที่ต้องแสดงตน รวมถึงมาตรการควบคุมให้มีการตรวจสอบคุณภาพเครื่องเอกซเรย์ทรวงอกก่อน และทุกการต่ออายุการรับรอง ผู้ประพันธ์เสนอให้กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ทบทวนบทบาทและส่งคืนภารกิจการรับรอง มาตรฐานห้องปฏิบัติการ คนงานที่จะไปทำงานต่างประเทศ ให้กับกรมจัดหางาน ทั้งนี้คำนึงถึงการแก้ไขปัญหาโดยหน่วยงานที่มีอำนาจบังคับควบคุมโดยตรงและในปัจจุบันนี้มีมาตรการทางการแพทย์มากเพียงพอต่อการรับรองคุณภาพห้องปฏิบัติการเหล่านี้แล้ว

บทสรุป

การศึกษาครั้งนี้ได้แสดงหลักฐานเชิงประจักษ์ที่อธิบายปรากฏการณ์ส่งแรงงานกลับ ดังนี้

ประการที่หนึ่ง มาตรฐานทางการแพทย์ที่แตกต่างกันระหว่างประเทศไทยกับประเทศปลายทาง จากแรงงานไทยที่ถูกส่งกลับจากผลเอกซเรย์ปอดไม่ผ่านในต่างประเทศ 99 คน ที่ติดตามการตรวจสุขภาพ ตรวจเอกซเรย์ปอดซ้ำ และตรวจหาเชื้อวัณโรค ด้วยการย้อม Acid Fast Staining พบว่า 40 คน (40.40%) ยืนยันว่าไม่ใช่วัณโรคปอด

ประการที่สอง มีปัญหาการใช้เอกสารปลอมแปลง หรือปลอมแปลงผลการตรวจสุขภาพแรงงานก่อนเดินทางไปต่างประเทศ 6 คน โดย 4 รายมีผลตรวจเอกซเรย์ปอดไม่ผ่าน และอีก 2 ราย ไม่ปรากฏนาม ณ สถานพยาบาลที่กล่าวอ้าง

ประการที่สาม ข้อมูลแรงงานไทยที่ถูกส่งกลับจากไม่ผ่านตรวจโรคในต่างประเทศ เฉพาะที่ได้ตรวจกับห้องปฏิบัติการสังกัดภาครัฐ 84 คน พบว่าถูกส่งกลับจากโรงพยาบาลภาครัฐที่ตั้งในเขตกรุงเทพมหานคร แห่งหนึ่ง ที่เดียว จำนวน 52 คน (61.90%) ของแรงงานที่ถูกส่งกลับ และผ่านการตรวจจากห้องปฏิบัติการภาครัฐ

เอกสารอ้างอิง

1. กรมการจัดหางาน กระทรวงแรงงานและสวัสดิการสังคม. ระเบียบกรมการจัดหางานว่าด้วยการพิจารณาให้ความเห็นชอบเป็นสถานตรวจสุขภาพคนหางานที่จะไปทำงานต่างประเทศ พ.ศ. 2546. กรุงเทพฯ : สำนักบริหารแรงงานไทยไปต่างประเทศ; 2547.
2. สำนักงานบริหารแรงงานไทยไปต่างประเทศ. สถานพยาบาลที่ได้รับการเห็นชอบให้ตรวจสุขภาพคนหางานที่จะไปทำงานต่างประเทศ. [ออนไลน์]. 16 ก.ค. 2557; [สืบค้น 30 ต.ค. 2557]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: http://www.overseas.doe.go.th/health/20140716_hospital.pdf.
3. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. ข้อกำหนดและเงื่อนไขการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตรวจสุขภาพคนหางานที่จะไปทำงานต่างประเทศ. [ออนไลน์]. สิงหาคม 2555; [สืบค้น 30 ต.ค. 2557]; [19 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_qa/DBQA/ifc_qa/userfiles/oversee_requirement55.pdf.
4. AusVet Animal Health Service. Chi-squared test for trend. [online]. 2014; [cited 2014 Oct 30]; [1 screen]. Available from: URL: <http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=trend>.
5. กรมการจัดหางาน กระทรวงแรงงานและสวัสดิการสังคม. สถิติจำนวนคนหางานที่ถูกส่งกลับประเทศไทยกรณีตรวจโรคไม่ผ่านในต่างประเทศ พ.ศ. 2555-2557. กรุงเทพฯ : สำนักบริหารแรงงานไทยไปต่างประเทศ; 2558.
6. วินัย ลูวิโรจน์. ประสาน สธ. เข้มมาตรฐานโรงพยาบาล หลังแรงงานไทยถูกส่งกลับ. แนวหน้า[หนังสือพิมพ์ออนไลน์]. 24 ธ.ค. 2555; [สืบค้น 30 ต.ค. 2557]; เข้าถึงได้จาก : URL: <http://www.naewna.com/local/35043>.
7. แนวทางการวินิจฉัยและรักษาวัณโรคในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2 (ฉบับปรับปรุง). กรุงเทพฯ : สมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์; 2543.
8. WHO/HTM/TB/2009.420, Guidelines treatment of tuberculosis. 4th ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010.

9. Chest x-ray related diseases & conditions. [online]. 2014; [cited 2014 Oct 30]; Available from:
URL: http://www.medicinenet.com/chest_x-ray/related-conditions/index.htm
 10. Whyte GS, Savoia HF. The risk of transmitting HCV, HBV or HIV by blood transfusion in Victoria.
Med J Aust 1997; 166(11): 584-6.
-

Thailand Oversea Labors Returned From Disease Detected Abroad Between 2554–2557: Summarized and Analyzed for The Root Causes

Suthon Vongsheree* Surasak Muenphon* Archawin Rojanawiwat**
and Pinit Ngamprasit* Maliwan Homchan* Prompuassorn Dissara*
Aekkarin Submark* and Chomchalai Sinthusarn*

* Bureau of Laboratory Quality Standards ** Medical Life Science Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road Nonthaburi 11000 Thailand.

ABSTRACT Since 1997, Thailand labors wishing to work abroad must receive a medical examination under the laws or regulations of the destination countries. The labors have to get health check with private hospitals received accreditation from Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences, while the governmental ones need no any accreditation. We have studied the retrospective data using the report data from Thailand Oversea Employment Administration, Ministry of Labor and Social Welfares, during 2011–2014. This paper has summarized statistics of Thailand overseas labors who are returned from disease detected abroad between 2011–2014. There are 242 labors (0.11%) who were sent back among 217,963 ones. The rate of return is likely to decrease, by year, statistically. However, the returned rate from the lung disease and tuberculosis [tend to increase statistically significant] 55.77% in 2011 to 76.19 % in the 2014. There are 99 out of 139 (71.22%) returned labors with lung diseases/tuberculosis and 52 such labors (52.53%) are examined from a governmental laboratory. Among such 19 returned labors who are eligible to be followed up for confirmation of the lung disease and tuberculosis, 11 labors (57.90%) confirmed normal testing results in Thailand. While another 6 labors (31.58%) use fake reports or fabricated testing results since the chest x-ray does not pass before travelling abroad or uses the report from withdrawn laboratories or it is not the one who get testing services from the claimed laboratories. There are only two labors (10.53%) who might have false negative results before traveling. The use of fake reports or fabricated testing results are also observed in the case of the returned labors getting positive testing results of Hepatitis B and Hepatitis C and the abused drug.

Key words: Thailand overseas labors, returned labor from disease detected abroad, fake Reports, fabricated testing results

การพัฒนาเทคนิคปฏิบัติในการวิเคราะห์หา Light Filth ในอาหาร

ทงนงพันธ์ สัจจาปะละ

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทนำ

สหรัฐอเมริกาซึ่งเป็นตลาดหลักแห่งหนึ่งของอาหารส่งออกจากหลายประเทศทั่วโลก มีกฎหมายอาหารยาและเครื่องสำอาง มาตรา 402 (a) (3) และ (4)⁽¹⁾ กำหนดว่าอาหารที่ตรวจพบสิ่งปนปลอมที่น่ารังเกียจ (Filth) ซึ่งเป็นดัชนีทางกายภาพของสุขลักษณะการผลิต องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration หรือ US.FDA.) จะพิจารณาตามเกณฑ์ Defect Action Levels (DAL) โดยมีเกณฑ์กำหนดไว้สำหรับ light filth ในอาหารบางประเภท ถ้าตรวจพบว่าตกเกณฑ์ ให้สรุปว่ารุ่นของอาหารนำเข้านั้น ๆ เป็นอาหารที่มีกระบวนการผลิตและ/หรือบรรจุอย่างไม่ถูกต้องตามหลักสุขลักษณะ ถือว่าละเมิดต่อกฎหมาย ซึ่งจะทำให้เกิดสภาพบังคับตามมา คือ การยึด (seizure) การเรียกคืน (recall) การดำเนินคดีต่อผู้ผลิต (prosecution) กรณีอาหารนำเข้าจะถูกกักกันที่ด่าน (detention) ในช่วงเมษายน 2557 ถึงมีนาคม 2558 ที่ผ่านมานี้ ปรากฏว่ามีอาหารกักกันสินค้าอาหารหลายประเภทจากไทย สาเหตุจาก light filth ได้แก่ แป้งข้าว⁽²⁾ ลูกอมเคลือบช็อกโกแลต⁽³⁾ เส้นก๋วยเตี๋ยว⁽⁴⁾ แยมและเจลลี่⁽⁵⁾ ข้าวเกรียบ⁽⁶⁾ ทุ่นากระป๋อง⁽⁷⁾ น้ำปลา⁽⁸⁾ มะขามเปียก⁽⁹⁾ ข้าวสารบรรจุถุง⁽¹⁰⁾ ปูกระป๋อง⁽¹¹⁾ ผลิตภัณฑ์ประมง⁽¹²⁾ ทำให้เสียชื่อเสียงของประเทศ และเกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ

การปนปลอมของสิ่งที่น่ารังเกียจ (Filth) ในอาหาร แบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม คือ⁽¹³⁾

1. สิ่งปนปลอมที่น่ารังเกียจซึ่งมาจากสัตว์พาหะนำโรคที่มากับอาหาร (Filth from Vectors of Food-borne Disease) ประกอบด้วย ชิ้นส่วนของสัตว์พาหะนำโรคชนิดที่มีกระดูกสันหลัง เช่น นก หนู และสัตว์พาหะนำโรคชนิดไม่มีกระดูกสันหลัง/ชิ้นส่วนของสัตว์ดังกล่าว เช่น แมลงวัน แมลงสาบ มด มอด
2. สิ่งปนปลอมที่น่ารังเกียจซึ่งมาจากสัตว์ที่ไม่เป็นพาหะนำโรคที่มากับอาหาร (Filth that poses a nonpathogenic health hazard) เช่น แมลงปีกแข็ง ไรฝุ่น ชิ้นส่วนที่แข็ง/คมของแมลงอื่น ๆ
3. สิ่งปนปลอมที่น่ารังเกียจซึ่งมาจากสัตว์อื่น ๆ เช่น แมงมุม แมลงอื่น ๆ
4. สิ่งปนปลอมที่น่ารังเกียจซึ่งมาจากแมลง/สัตว์อื่นจากการเก็บรักษาอาหาร (Stored-product pest) เช่น มอด ตัวไร
5. สิ่งปนปลอมที่น่ารังเกียจซึ่งไม่อยู่ในกลุ่ม 1- 4 (Incidental filth) ไม่มีอันตรายต่อผู้บริโภค

โรงงานผลิตอาหารสามารถใช้ชนิดและปริมาณสิ่งปนปลอมที่น่ารังเกียจ เป็นดัชนีบ่งชี้สัญลักษณ์ วัตถุติดและกระบวนการผลิต เพื่อการปรับปรุงให้เป็นไปตามมาตรฐานสากลได้ ซึ่งจะสามารถส่งออกผลิตภัณฑ์ไปยังประเทศสหรัฐอเมริกาได้โดยไม่ถูกกักกัน

US.FDA. ให้ความหมายของ light filth^(1, 14) ว่าหมายถึง สิ่งปนปลอมที่น่ารังเกียจ ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค มีลักษณะเป็นชิ้นเล็ก ๆ (particles) ลอยในชั้นน้ำมัน แยกจากผลิตภัณฑ์อาหารได้โดยใช้ส่วนผสมที่เป็นของเหลวที่มีชั้นน้ำมัน ตัวอย่าง light filth เช่น แผลงทั้งตัว ชิ้นส่วนของแผลง ขนสัตว์ฟันแทะ เส้นขนมนุษย์ ขนนก (feather barbules)

การวิเคราะห์ light filth ในอาหารมักจะอ้างอิงวิธีการวิเคราะห์ที่กำหนดไว้ใน Official Methods of Analysis of AOAC International (AOAC)⁽¹⁴⁾ เป็นหลัก เนื่องจาก US.FDA. เป็นผู้นำในการควบคุมผลิตภัณฑ์อาหาร ทั้งที่ผลิตภายในและที่นำเข้าของประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้เกณฑ์จำนวน light filth ที่ตรวจพบ อย่างไรก็ตาม วิธีการวิเคราะห์ light filth ตาม AOAC เป็นวิธีการวิเคราะห์หาสิ่งบ่งชี้เบื้องต้นทางสุขาภิบาลอาหาร ใช้หลักการทางกายภาพ ซึ่งให้ผลรวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างต่ำ มีสิ่งเหลือทิ้งที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อย ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้วิเคราะห์ แต่ก็มีข้อจำกัดบางประการ เช่น ไม่ระบุรายละเอียดของเทคนิคปฏิบัติที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ อุปกรณ์เครื่องมือต่าง ๆ ที่ระบุไว้อาจไม่เป็นที่คุ้นเคยของผู้วิเคราะห์ทั่วไป percolator ซึ่งเป็นเครื่องแก้วที่ใช้แยกชั้นน้ำกับน้ำมันอาจไม่สามารถหาซื้อได้ในท้องตลาดปัจจุบัน เนื่องจากผู้ผลิตได้เลิกผลิตแล้ว และที่สำคัญที่สุดคือ ผู้วิเคราะห์ที่ต้องมีประสบการณ์สูงในการวินิจฉัยสิ่งที่พบจากการส่องกล้องจุลทรรศน์ว่าเป็น light filth หรือไม่ และถ้าเป็นจัดอยู่ในประเภทใด

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยหน่วยงานเดิมคือ กองวิเคราะห์อาหารส่งออก เป็นหน่วยงานที่ได้เริ่มการตรวจวิเคราะห์ light filth ในอาหารส่งออกมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2524 เห็นความสำคัญและตระหนักถึงสิ่งที่ควรเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์หา light filth เพื่อเผยแพร่ให้เป็นประโยชน์ต่อผู้วิเคราะห์ที่จะเริ่มงานตรวจวิเคราะห์ light filth ได้ศึกษาและใช้เป็นแนวทางปฏิบัติให้เกิดประสิทธิภาพสูงต่อไป จึงได้มอบหมายให้ห้องปฏิบัติการทางกายภาพ ซึ่งมีนักวิเคราะห์ที่มีความรู้ ความชำนาญได้ผ่านการอบรมจากผู้เชี่ยวชาญของ US.FDA. ดำเนินการพัฒนาเทคนิคปฏิบัติที่เหมาะสมเพิ่มเติมเพื่อเสริมวิธีการวิเคราะห์ตาม AOAC ให้มีความชัดเจนและมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

กระบวนการดำเนินงานพัฒนาเทคนิคปฏิบัติในการวิเคราะห์หา light filth ในอาหาร

ห้องปฏิบัติการทางกายภาพซึ่งเป็นกลุ่มผู้พัฒนาเทคนิคปฏิบัติ ได้พิจารณาเนื้อหาของวิธีการวิเคราะห์ light filth ของ AOAC แล้วเห็นควรเพิ่มเติมเนื้อหาใน 3 ประเด็น ได้แก่

1. การเลือกใช้อุปกรณ์ที่เหมาะสม
2. การเสริมเทคนิคที่จำเป็น
3. การจัดทำ คัดกรอง รวบรวมภาพถ่ายมาตรฐานของ light filth ที่พบมากในผลิตภัณฑ์อาหารของไทยไว้เป็นสื่ออ้างอิง

ผลการดำเนินงานพัฒนาเทคนิคปฏิบัติ

1. การเลือกใช้อุปกรณ์ที่เหมาะสม

1.1 ตะแกรง (sieve)

ชนิดของตะแกรงที่ใช้ต้องเป็นชนิด plain weave (woven with one wire alternately over and under next) (ภาพที่ 1) คือชนิดที่เส้นลวดสานขึ้น 1 ลง 1 เท่านั้น ห้ามใช้ตะแกรงชนิด twill weave (เส้นลวดขึ้น 2 ลง 2) เนื่องจากจะเกิดสูญเสีย light filth (loose material) กล่าวคือ light filth จะลอดรูตะแกรงไปบางส่วน ทำให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้ต่ำกว่าความเป็นจริง สำหรับวิธีการตรวจคุณสมบัติของตะแกรงข้างต้น ถ้าเป็นตะแกรงเบอร์ 8

จะสามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า แต่ถ้าเป็นตะแกรงที่รูขนาดเล็กมาก ให้ตรวจโดยใช้ wide field zoom stereoscopic microscope

ขนาดของตะแกรงควรมีเส้นผ่านศูนย์กลางอย่างน้อยประมาณ 20 เซนติเมตร (8 นิ้ว) ซึ่งอาจใช้ตะแกรงที่มีขนาดใหญ่กว่า เพื่อให้เหมาะสมกับขนาดของผลิตภัณฑ์อาหารที่ตรวจ เช่น block ของอาหารแช่แข็ง แต่ก็ทำให้ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์มากขึ้น วัสดุที่ใช้ทำตะแกรง ถ้าทำจาก stainless steel ซึ่งถึงแม้ราคาจะแพงกว่า sieve ที่ทำจากทองเหลืองเล็กน้อย แต่ในระยะยาวจะดีกว่าเนื่องจากไม่เป็นสนิม

การดูแลทำความสะอาดตะแกรงทันทีที่ใช้งานเสร็จ ควรใช้น้ำฉีดที่มีแรงดันพอสมควรฉีดล้างจากทางด้านหลัง เพื่อป้องกันการอุดตัน หรือใช้เครื่องอัลตราโซนิกในการทำความสะอาด และไม่ควรใช้แปรงขัดเพราะจะทำให้ขนาดของรู (aperture) เปลี่ยนแปลงไม่ได้มาตรฐานตามที่ระบุ

1.2 percolator ขนาด 2,000 มิลลิลิตร (ภาพที่ 2) ปัจจุบัน Pyrex เลิกผลิต จึงไม่สามารถหาซื้อจากผู้แทนจำหน่าย (supplier) ทั่วไป ต้องสั่งทำพิเศษ ส่วน stand ที่ใช้ตั้ง percolator ควรสั่งทำให้เหมาะสมกับขนาดของ percolator ที่ใช้ โดยอาจทำเป็นชั้นไม้ที่วาง percolator ได้ 6 อัน หรืออาจทำเป็นขาตั้ง stainless steel ที่วาง percolator ได้ 1 อัน สำหรับระดับความสูงของการตั้ง percolator พบว่าการตั้งบนอุปกรณ์บนพื้นที่ต่ำกว่าจะทำงานได้สะดวกกว่าการตั้งบนโต๊ะปฏิบัติการ โดยเฉพาะเมื่อผู้วิเคราะห์เป็นสุภาพสตรีที่มีส่วนสูงไม่เกิน 160 เซนติเมตร

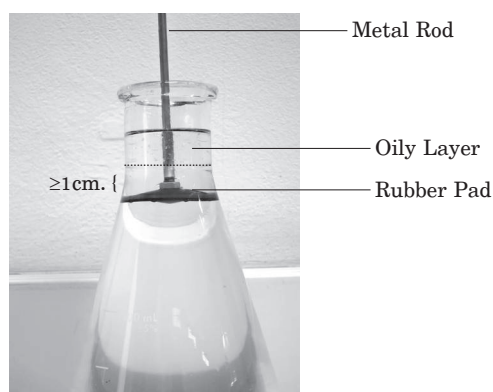


ภาพที่ 1 ตะแกรงทำจาก stainless steel



ภาพที่ 2 percolator

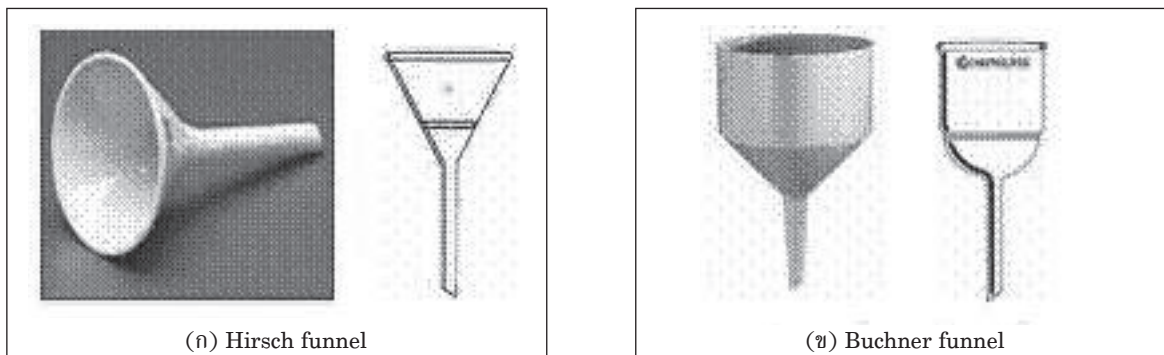
1.3 Wildman trap flask ประกอบด้วย erlenmeyer flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร และภายใน flask มี metal rod ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร (3/16 นิ้ว) มีความยาวมากกว่าความสูงของ flask ประมาณ 10 เซนติเมตร ส่วนปลายของ metal rod มีแผ่นยาง (rubber pad) รูปวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ติดอยู่ (ภาพที่ 3) และแผ่นยางต้องเป็นชนิดที่ไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำมันที่ใช้ ไม่ควรใช้ที่เป็นผิวเรียบ เพราะอาจดูดติดผิว flask ส่วน metal rod ไม่มีจำหน่ายต้องสั่งทำ ตามคุณลักษณะข้างต้น



ภาพที่ 3 Wildman trap flask



1.4 porcelain funnel ที่ใช้ในการกรองน้ำมันที่ดักจับ light filth ควรเป็น Hirsch funnel (ภาพที่ 4 ก) ซึ่งขนาดที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ เส้นผ่านศูนย์กลางด้านบนประมาณ 9.5 เซนติเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางที่ฐานซึ่งมีลักษณะเป็นรู (perforate base plate) ประมาณ 5.5 เซนติเมตร แต่ถ้าไม่สามารถหา Hirsch funnel ได้ อาจใช้ Buchner funnel (ภาพที่ 4 ข) แทนได้ ทั้งนี้ไม่ควรใช้ Buchner funnel ที่มีรูที่ฐานกรวยมีขนาดใหญ่เกินไป เพราะจะทำให้กระดาษกรองขาดได้ง่ายเมื่อทำการกรอง



ภาพที่ 4 Hirsch funnel (ก) และ Buchner funnel (ข)

1.5 กระดาษกรอง ตามวิธี AOAC แนะนำให้ใช้กระดาษกรอง S & S (Schlicher & Schuell) No. 8 Liniert/Ruled เส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร แต่ปัจจุบันที่หาซื้อได้จะเป็นผลิตภัณฑ์ Whatman No. 8 Liniert/Ruled คำว่า Ruled หมายถึง การตีเส้นที่มีระยะห่าง 5 มิลลิเมตร เพื่อใช้เส้นเป็นเครื่องหมายในการตรวจนับจำนวน ชั้นของ light filth ให้ทั่วทั้งพื้นที่ของกระดาษกรอง

2. การเสริมเทคนิคที่จำเป็น

วิธีวิเคราะห์ตาม AOAC จะไม่ได้รับรายละเอียดเทคนิคการวิเคราะห์ไว้ทั้งหมด ผู้วิเคราะห์จะต้องสังเกตจากประสบการณ์การลงมือวิเคราะห์ พร้อมทั้งศึกษาจากเอกสารอ้างอิงอื่น ๆ ห้องปฏิบัติการทางกายภาพจึงได้รวบรวมข้อมูลดังกล่าวไว้ดังต่อไปนี้

2.1 ขั้นตอนการทำ Wet Sieving เป็นการใช้ตะแกรง (sieve) mesh number ตามที่วิธีวิเคราะห์กำหนด เช่น No. 8, No. 140, No. 230 นำตะแกรงมาอยู่ใต้ฝักบัว (aerator) แล้วจึงฉีดน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิตามที่กำหนด ให้ทำมุม 30 องศา โดยจับตะแกรงให้เอียงพอเหมาะ (ภาพที่ 5) ขั้นตอนนี้มีความสำคัญ เพราะถ้าน้ำที่ฉีดทำมุม 90 องศา จะทำให้ชั้นของ filth หลุดลอดช่องตะแกรงออกไปได้ แรงดันน้ำที่ฉีดเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อผลวิเคราะห์ ต้องค่อย ๆ เพิ่มแรงดันน้ำจนได้แรงดันที่เหมาะสม ต้องระวังไม่ฉีดน้ำจนล้นตะแกรง จากนั้นฉีดล้างจนน้ำใสและรวมสิ่งที่ตกค้างไว้ที่ด้านหนึ่งของตะแกรง ถ่ายสิ่งที่ตกค้างลงใน beaker โดยใช้ขวดฉีดน้ำ (wash bottle) แล้วตรวจวิเคราะห์ตามขั้นตอนต่อไป

2.2 เทคนิคการทำให้เย็น (Cooling) การวิเคราะห์ light filth จากตัวอย่างที่เป็นพืช วิธีวิเคราะห์ตาม AOAC บางวิธีจะระบุให้ ทำให้อย่างในภาชนะที่วิเคราะห์ให้เย็น โดยใช้คำว่า Cooling แต่ไม่ระบุรายละเอียด จุดนี้สำคัญมาก กล่าวคือ การ Cooling เช่น ที่ระบุไว้ใน Light Filth (External) in Grains and Seeds, AOAC 950.86 จะต้องทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วและโดยทันที คือ นำไปแช่ไว้ในอ่างน้ำเย็นเพื่อป้องกันไม่ให้ฟองอากาศเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช ซึ่งจะทำให้ชั้นส่วนพืชลอยขึ้นมาในชั้นน้ำมันปะปนกับชั้นของ filth มีผลให้ในขั้นตอนการ drained off ของ percolator หรือการ trapped off ของ trapped flask จะทำให้กระดาษกรองตันไม่สามารถกรองตัวอย่างได้ นอกจากนั้นการลดอุณหภูมิต้องไม่ลดให้อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่กำหนด เช่น การวิเคราะห์ Light Filth in Whole



ภาพที่ 5 Wet Sieving

Wheat Flour, AOAC 971.32 กำหนดอุณหภูมิ Cooling $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, Light Filth in Bean Paste, AOAC 993.28 กำหนดอุณหภูมิ Cooling $28-30^{\circ}\text{C}$ เพราะจะทำให้เนื้อตัวอย่างจับตัวกันเป็นก้อน ไม่สามารถวิเคราะห์ต่อได้

2.3 ขั้นตอนการใช้ Wildman trap flask (ภาพที่ 6) เมื่อคนตัวอย่างโดยใช้ metal rod ใน trapped flask จะต้องคนขึ้นน้ำมันให้แตกกระจายไปทั่ว flask เพื่อให้ไขมันจับ light filth ได้ทั้งหมด โดยที่ขณะคนต้องระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ เพื่อไม่ให้ชิ้นส่วนพืชหรืออาหารที่ตรวจลอยขึ้นมาในชั้นน้ำมัน

การ trapped off พิจารณาจากภาพที่ 3 ระยะระหว่าง oily layer และ rubber pad จะต้องเท่ากับหรือมากกว่า 1 เซนติเมตร เพื่อให้เก็บ light filth ได้หมดนั่นเอง กล่าวคือ light filth ไม่ได้อยู่เฉพาะใน oily layer และตรงรอยต่อระหว่างชั้นน้ำมันกับน้ำเท่านั้น

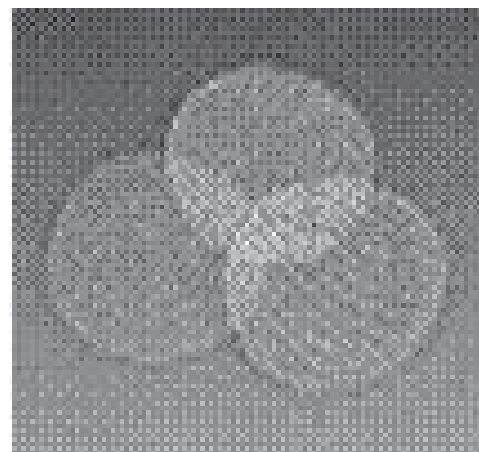
2.4 ในขั้นตอนการกรองตัวอย่าง ให้ใช้ตะแกรงลวด (มุ้งลวด) ที่ตัดได้ขนาดพอดีกับกรวยกรองรองรับแผ่นกระดาษกรอง (ภาพที่ 7) เพื่อให้มีช่องว่างระหว่างกรวยกับกระดาษกรอง จะทำให้การกรองตัวอย่างสะดวกมากขึ้น

กระดาษกรองจะต้องมีเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่า funnel ที่ใช้กรอง โดยพับกระดาษกรองให้เป็นขอบป้องกัน light filth หลุดลอดออกไปจากกระดาษกรอง

2.5 ขั้นตอนการตรวจ light filth ภายใต้ widefield zoom stereoscopic microscope เป็นขั้นตอนที่สำคัญไม่ยิ่งหย่อนไปกว่าขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและการตรวจวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอม ผู้วิเคราะห์ต้องมีเก้าอี้ที่นั่งที่มีระดับเหมาะสม เนื่องจากถ้าตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์สกปรก มี light filth จำนวนมาก ต้องใช้เวลาในการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นอกจากนั้นการปรับแสงและปรับ focus ให้เหมาะสม (ใช้ opaque white background) โดยใช้เข็มช่วยก็เป็นปัจจัยสำคัญ หากปรับไม่เหมาะสมอาจทำให้มองไม่เห็น light filth



ภาพที่ 6 แสดงการใช้ Wildman trap flask

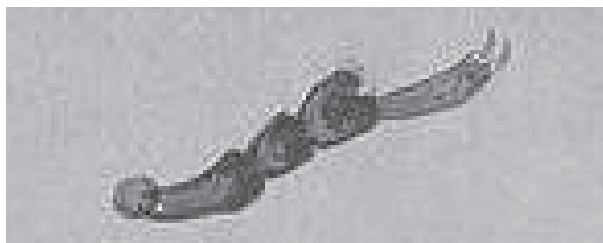


ภาพที่ 7 ตะแกรงลวด

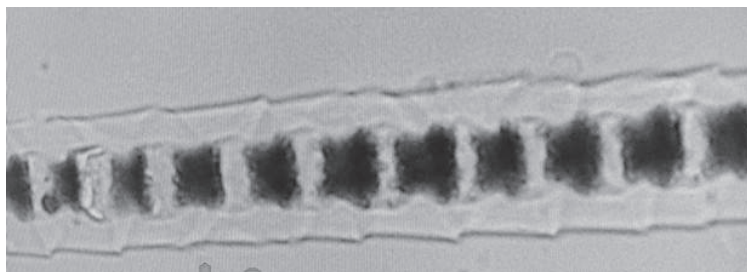
การตรวจให้เริ่มที่กำลัษขยาย 30 เท่า เมื่อพบวัตถุสงสัยให้ใช้กำลัษขยายสูงขึ้นที่ 60 เท่าขึ้นไป ซึ่งจะทำให้เห็นรายละเอียดได้มากขึ้น และเลื่อนกระดาษกรองที่ตรวจไปตามเส้นสีเขียวที่อยู่บนกระดาษกรอง (Whatman No. 8 Liniert/Ruled) ผู้วิเคราะห์ต้องมีความชำนาญในการจำแนกความแตกต่างระหว่าง light filth กับตัวอย่างอาหารที่อยู่บนกระดาษกรอง หากสงสัยต้องตรวจภายใต้ compound microscope โดยใช้กำลัษขยายที่สูงขึ้น กล่าวโดยทั่วไป การตรวจจำแนก light filth จะใช้กำลัษขยายที่ 100, 200 และ 400 เท่า ตามลำดับ

3. การจัดทำ คัดกรอง รวบรวมภาพถ่ายมาตรฐานของ light filth ที่พบมากในผลิตภัณฑ์อาหารของไทย ไว้เป็นหลักฐานอ้างอิง

ถึงแม้ว่าแมลงเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายมากที่สุดในโลก แต่ก็ยังมีวิธีที่สามารถตรวจจำแนกชนิดของแมลงได้ ซึ่งมีเนื้อหาที่น่าสนใจ ชวนให้ศึกษาค้นคว้า และใช้การสังเกตจากประสบการณ์การวิเคราะห์ ซึ่งห้องปฏิบัติการทางกายภาพได้ทำการรวบรวมภาพถ่ายพร้อมทั้งระบุลักษณะเด่นของ light filth ประเภทเส้นขนของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ได้แก่ เส้นขนมนุษย์ ขนสุนัข ขนแมว ขนหนู ขนกระต่าย ขนค่างควา ขนจากส่วนต่าง ๆ ของนก ชิ้นส่วนแมลงต่าง ๆ ได้แก่ ขน (setae) บริเวณปีกของผีเสื้อกลางคืน รูขุมที่ผิวของแมลง ชิ้นส่วนกราม ส่วนหัว ปล้องสุดท้ายของตัว ส่วนขา ส่วนปีก ชิ้นส่วนหนวด (antenna) ของแมลงชนิดต่าง ๆ รวม 38 ภาพ ไว้เป็นหลักฐานเพื่อการศึกษาเปรียบเทียบและอ้างอิง ตัวอย่างภาพชิ้นส่วนแมลงและเส้นขน แสดงตามภาพที่ 9 ถึงภาพที่ 12



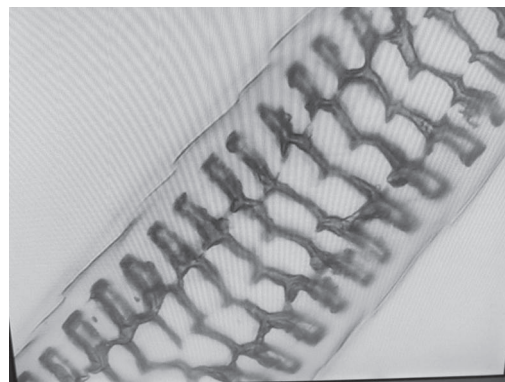
ภาพที่ 9 ขาแมลง (Tarsus) กำลัษขยาย 300X



ภาพที่ 11 ขนหนู (RAT/MOUSE hair) ชนิด fur hair
กำลัษขยาย 200X



ภาพที่ 10 หนวดแมลง (Antenna)
กำลัษขยาย 150X



ภาพที่ 12 ขนหนู (RAT/MOUSE hair) ชนิด guard hair กำลัษขยาย 200X

บทสรุป

การพัฒนาเทคนิคปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ light filth ในอาหารครั้งนี้ เป็นการรวบรวมองค์ความรู้จากเอกสารวิชาการต่าง ๆ เสริมด้วยเทคนิคปฏิบัติจากผู้เชี่ยวชาญจากต่างประเทศ รวมทั้งประสบการณ์จากการลงมือปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ของบุคลากรของห้องปฏิบัติการทางกายภาพ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร มีการจัดทำเป็นเอกสารเผยแพร่โดยประสงค์ให้เกิดประโยชน์ต่อผู้วิเคราะห์ที่เริ่มปฏิบัติงานด้านนี้เป็นแนวทางปฏิบัติที่มีรายละเอียดครบถ้วน ผู้เริ่มปฏิบัติงานสามารถศึกษาได้ด้วยตนเอง ช่วยในการดำเนินงานวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง ช่วยเพิ่ม % recovery ของผลการตรวจวิเคราะห์ ทำให้ผลการวิเคราะห์ใกล้เคียงจริงมากขึ้น เป็นการสร้างความเชื่อมั่นในผลงาน

การตรวจวิเคราะห์ light filth ในอาหารเป็นที่สนใจของผู้ผลิตอาหารในภาคอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เพื่อใช้ในการควบคุมสุขลักษณะการผลิตในขั้นตอนต่าง ๆ ของกระบวนการผลิตอาหารประเภทต่าง ๆ ช่วยพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้สะอาดถูกสุขลักษณะเหมาะสมแก่การบริโภค และเพื่อลดปัญหการกักกันผลิตภัณฑ์อาหารส่งออกในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งเป็นตลาดหลักของการส่งออกที่มีกำลังซื้อสูง ส่วนหน่วยงานภาครัฐตรวจวิเคราะห์เพื่อวัตถุประสงค์ในการคุ้มครองผู้บริโภค สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารจึงได้นำผลของการพัฒนาเทคนิคปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ light filth ในอาหาร จัดทำเป็นรูปเล่มเอกสารเผยแพร่ คือ คู่มือการวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมในอาหาร (light filth) จัดพิมพ์ครั้งที่ 1 โดยสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เมื่อพฤษภาคม 2557 และปัจจุบันได้เพิ่มการเผยแพร่ทาง website ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์อีกช่องทางหนึ่ง คือ http://dmisc2.dmisc.moph.go.th/webroot/BQSF/File/file_pdf/หนังสือ/light%20filth.pdf เพื่อให้ผู้สนใจสามารถเข้าถึงข้อมูลได้สะดวกยิ่งขึ้น กลุ่มผู้พัฒนาเทคนิคปฏิบัติมุ่งหวังว่าผลการพัฒนาเทคนิคปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ light filth ในอาหารครั้งนี้ จะช่วยให้ผู้วิเคราะห์ซึ่งเริ่มงานใหม่จะสามารถทำความเข้าใจได้ด้วยตนเอง สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาบุคลากรของห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องทั้งภาครัฐและเอกชน เพื่อการสร้างผลงานที่มีคุณภาพสูงเป็นที่น่าเชื่อถือ นำไปใช้ในการพัฒนาคุณภาพผลิตภัณฑ์สินค้าอาหารของไทยให้สะอาดถูกสุขลักษณะ เพื่อคุ้มครองผู้บริโภค และสร้างความมั่นใจในการตรวจปล่อยสินค้าอาหารส่งออกได้เป็นอย่างดี

กิตติกรรมประกาศ

ผู้พัฒนาเทคนิคปฏิบัติฯ ขอขอบคุณ นางสาวจรรวณ ลัมสังจะสกุล ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ได้สนับสนุนให้มีการดำเนินงานพัฒนาเทคนิคปฏิบัติในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Gorham JR, editor. Ecology and Management of Food - Industry Pests. Virginia: Association of Official Analytical Chemists, 1991. p. 491-494.
2. Import Refusal Report. [Online] 2015. [Cited] 2015 May 15]; [2 screens]. Available from: URL: www.accessdata.fda.gov/scripts/importrefusals/ir_detail.cfm?EntryId=BDI-1804
3. Import Refusal Report. [Online] 2015. [Cited] 2015 May 15]; [2 screens]. Available from: URL: www.accessdata.fda.gov/scripts/importrefusals/ir_detail.cfm?EntryId=UPS-4842
4. Import Refusal Report. [Online] 2015. [Cited] 2015 May 15]; [2 screens]. Available from: URL: www.accessdata.fda.gov/scripts/importrefusals/ir_detail.cfm?EntryId=U79-1688
5. Import Refusal Report. [Online] 2015. [Cited] 2015 May 15]; [2 screens]. Available from: URL: www.accessdata.fda.gov/scripts/importrefusals/ir_detail.cfm?EntryId=EJ2-01183

6. Import Refusal Report. [Online] 2015. [Cited] 2015 May 15]; [2 screens]. Available from: URL: www.accessdata.fda.gov/scripts/importrefusals/ir_detail.cfm?EntryId=906-22809
 7. Import Refusal Report. [Online] 2015. [Cited] 2015 May 15]; [2 screens]. Available from: URL: www.accessdata.fda.gov/scripts/importrefusals/ir_detail.cfm?EntryId=791-0075
 8. Import Refusal Report. [Online] 2015. [Cited] 2015 May 15]; [2 screens]. Available from: URL: www.accessdata.fda.gov/scripts/importrefusals/ir_detail.cfm?EntryId=277-01459
 9. Import Refusal Report. [Online] 2015. [Cited] 2015 May 15]; [2 screens]. Available from: URL: www.accessdata.fda.gov/scripts/importrefusals/ir_detail.cfm?EntryId=EJ4-00108
 10. Import Refusal Report. [Online] 2015. [Cited] 2015 May 15]; [2 screens]. Available from: URL: www.accessdata.fda.gov/scripts/importrefusals/ir_detail.cfm?EntryId=ETS-0004
 11. Import Refusal Report. [Online] 2015. [Cited] 2015 May 15]; [2 screens]. Available from: URL: www.accessdata.fda.gov/scripts/importrefusals/ir_detail.cfm?EntryId=316-19342
 12. Import Refusal Report. [Online] 2015. [Cited] 2015 May 15]; [2 screens]. Available from: URL: www.accessdata.fda.gov/scripts/importrefusals/ir_detail.cfm?EntryId=442-09651
 13. Gorham JR, editor. Principle of Food Analysis for Filth, Decomposition and Foreign Matter, FDA Technical Bulletin No. 1. Washington D.C. p. 83-94.
 14. Whitlock LL, Chapter editor. Chapter 16, Extraneous materials: Isolation, In: Dr. Latimer, Jr. GW, Editor. Official Method of Analysis of AOAC International. 19th ed. Maryland: AOAC International, 2012. p. 4.
-

แนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพการทดสอบหา Light Filth

ทงนพันธ์ สัจจาปะละ

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทนำ

Light filth⁽¹⁾ หมายถึง สิ่งปนปลอมที่น่ารังเกียจ ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค มีลักษณะเป็นชิ้นเล็ก ๆ (particles) ลอยในชั้นน้ำมัน แยกจากผลิตภัณฑ์อาหารได้โดยใช้ส่วนผสมที่เป็นของเหลวที่มีชั้นน้ำมัน ตัวอย่าง light filth เช่น แผลงทั้งตัว ชิ้นส่วนของแผลง ขนสัตว์ฟุ้งปะทะ เส้นขนของคน ขนนก (feather barbules)

Light filth ที่พบในอาหารเป็นสิ่งบ่งชี้ว่าลักษณะของการผลิตอาหารเป็นอย่างไร มีกระบวนการผลิตที่ถูกต้องตามหลักสุขาภิบาลในการผลิตอาหารหรือไม่⁽²⁾ light filth จึงเป็นสิ่งที่ปนปลอมที่น่ารังเกียจที่อาจพบได้ในผลิตภัณฑ์อาหาร วัตถุดิบหรือส่วนประกอบอื่นของอาหารทั่วไป ซึ่งอาจจะเกิดจากภาวะหรือวิธีปฏิบัติที่ไม่พึงประสงค์ในกระบวนการผลิต การเก็บ และการกระจายผลิตภัณฑ์ โดยมาจากการปนเปื้อนด้วยชิ้นส่วนหรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์นำโรค หรือแผลงที่ไม่พึงประสงค์ลงไปผลิตภัณฑ์ ชิ้นส่วนของสัตว์หรือแผลงที่ไม่พึงประสงค์เหล่านี้จะเป็นอันตรายต่อสุขภาพ สิ่งปนปลอมเหล่านี้เป็นสิ่งที่น่ารังเกียจสำหรับผู้บริโภค เนื่องจากอาจเป็นพาหะของเชื้อโรคหรือก่อให้เกิดอาการภูมิแพ้ในผู้บริโภคได้

องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration หรือ US.FDA.) จะพิจารณาตามเกณฑ์ Defect Action Levels (DAL) โดยมีเกณฑ์กำหนดไว้สำหรับ light filth ในอาหารบางประเภท (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เกณฑ์ Defect Action Levels (DAL)⁽³⁾

ประเภทอาหาร	รายการที่ตรวจพบ	เกณฑ์ที่กำหนด
Curry Powder	Insect filth (AOAC 975.48)	Average of 100 or more insect fragments per 25 grams
	Rodent filth (AOAC 975.48)	Average of 4 or more rodent hairs per 25 grams
Macaroni and Noodle	Insect filth (AOAC 969.41)	Average of 225 insect fragments or more per 25 grams in 6 or more subsamples
	Rodent filth (AOAC 969.41)	Average of 4.5 rodent hairs or more per 25 grams in 6 or more subsamples
Peanut Butter	Insect filth (AOAC 968.35)	Average of 30 or more insect fragments per 100 grams
	Rodent filth (AOAC 968.35)	Average of 1 or more rodent hairs per 100 grams
Pepper, Ground	Insect filth (AOAC 972.40)	Average of 475 or more insect fragments per 50 grams
	Rodent filth (AOAC 972.40)	Average of 2 or more rodent hairs per 50 grams

การพัฒนาแนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ light filth ในอาหารของโรงงานผลิตอาหารจึงมีความจำเป็นที่จะต้องดำเนินการเพื่อเสริมสร้างขีดความสามารถในการพึ่งตนเองด้านการควบคุมสุขาภิบาลอาหารของโรงงาน วิธีการเพิ่มประสิทธิภาพห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ light filth ในอาหารสำหรับภาคอุตสาหกรรมทำได้โดยการฝึกอบรมบุคลากรผู้วิเคราะห์ให้มีความรู้ ความเข้าใจในการตรวจหาสิ่งปนปลอมเหล่านี้ เพื่อควบคุมดูแลผลิตภัณฑ์ที่ผลิตให้ได้ตามมาตรฐานที่กำหนด ซึ่งจะเป็นการเพิ่มโอกาสในการแข่งขันสู่ตลาดการค้าอาหารระหว่างประเทศ โดยเฉพาะประเทศสหรัฐอเมริกาซึ่งมีความเข้มงวดเรื่อง light filth ในอาหาร การพัฒนาหลักสูตรและให้การฝึกอบรมจะช่วยให้ผู้เข้ารับการอบรมได้เข้าใจและตระหนักถึงความสำคัญของสิ่งปนปลอม และนำไปสู่ความระมัดระวังในกระบวนการผลิตมากขึ้น ส่งเสริมให้ได้ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีคุณภาพตามมาตรฐานสากลเป็นที่ต้องการของประเทศ คู่ค้า ลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ และเป็นแนวทางหนึ่งที่จะทำให้อุตสาหกรรมการผลิตอาหารของประเทศมีความยั่งยืน สำนึกคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เล็งเห็นความสำคัญของเรื่องดังกล่าว จึงดำเนินการพัฒนาหลักสูตรและจัดฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเพื่อพัฒนาศักยภาพบุคลากรห้องปฏิบัติการทั้งจากภาครัฐและเอกชน ในการตรวจวิเคราะห์ light filth ในอาหารชนิดต่าง ๆ

การดำเนินงาน

I. พัฒนาหลักสูตรฝึกอบรมสำหรับผู้ตรวจวิเคราะห์ เพื่อเพิ่มศักยภาพและความชำนาญในการตรวจวิเคราะห์ light filth ในอาหารชนิดต่าง ๆ เน้นการให้ความรู้เกี่ยวกับการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ รวมทั้งเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้อง

II. จัดฝึกอบรมตามหลักสูตรที่พัฒนาขึ้นโดยวิทยากรผู้ให้การอบรม คือ บุคลากรระดับชำนาญการของห้องปฏิบัติการทางกายภาพ

I. การพัฒนาหลักสูตรการฝึกอบรมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ light filth ในอาหาร

1. ผู้พัฒนาหลักสูตรได้กำหนดวัตถุประสงค์เพื่อให้ผู้เข้ารับการอบรมได้รับความรู้เบื้องต้นในการตรวจวิเคราะห์ light filth ที่เกี่ยวกับการเลือกวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมกับชนิดอาหาร ได้เรียนรู้เทคนิคปฏิบัติที่ไม่มีระบุไว้ในวิธีวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐาน มีความเข้าใจวิธีการจัดหา การใช้อุปกรณ์เครื่องมือ อุปกรณ์ประกอบการวิเคราะห์ ซึ่งค่อนข้างเฉพาะเจาะจง เช่น ตะแกรง (sieve), trap flask, percolator, widefield zoom stereoscopic microscope ให้ทำความเข้าใจกับภาพขยายของ light filth ประเภทชนิดสัตว์ต่างๆ ชิ้นส่วนของแมลงและตัวไร เป็นต้น เพื่อให้สามารถวินิจฉัยสิ่งที่ตรวจพบได้ถูกต้อง

2. การกำหนดหัวข้อเนื้อหาของหลักสูตรได้คำนึงถึงผลที่จะเกิดขึ้นตามวัตถุประสงค์ที่ได้กำหนดไว้ และให้เหมาะสมกับระยะเวลาฝึกอบรม 2 วัน ดังนี้

วันที่ 1

ภาคบรรยาย

- ความสำคัญของ light filth ในอาหาร
- เกณฑ์กำหนดมาตรฐาน US.FDA Food Defect Action Levels
- การเลือกวิธีวิเคราะห์ light filth ในอาหารชนิดต่าง ๆ
- ความรู้พื้นฐานด้านอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์
- ลักษณะทั่วไปของ insect cuticle และโครงสร้างของขน
- การควบคุมคุณภาพผลการตรวจวิเคราะห์

วันที่ 2

ภาคปฏิบัติ

- ฝึกเทคนิคปฏิบัติสำหรับการตรวจวิเคราะห์ light filth ในอาหารชนิดต่างๆ โดยใช้วิธีมาตรฐานที่กำหนดไว้ใน Official Methods of Analysis of AOAC International (AOAC) 19th ed., 2012. เป็นหลัก สำหรับตัวอย่างกุ้งแช่แข็ง ใช้วิธี Laboratory Information Bulletin No. 3172. Rapid Procedure for the Examination of Shrimp for Filth.
- ฝึกการจำแนกชิ้นส่วนแมลง เส้นขนมนุษย์ ขนหนู ขนแมว/ขนสุนัข ที่มักตรวจพบได้จากอาหารของประเทศไทย
- ประเมินผล ซักถามปัญหา และมอบประกาศนียบัตร

3. การกำหนดวิธีการวัดและประเมินผลการฝึกอบรม

การวัดผลทำโดยให้ผู้เข้ารับการฝึกอบรมระบุชนิด light filth จาก authentic slide จำนวน 10 slides เกณฑ์การประเมิน ผู้ผ่านการอบรมต้องระบุสิ่งปนปลอมได้ถูกต้อง จำนวน 8 slides ขึ้นไป

II. ผลการจัดฝึกอบรมตามหลักสูตรที่พัฒนาขึ้น

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร โดยห้องปฏิบัติการทางกายภาพ ได้จัดฝึกอบรมหลักสูตรที่พัฒนาขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 ถึงปัจจุบัน ให้แก่ห้องปฏิบัติการของโรงงานผลิตอาหาร 17 แห่ง บุคลากรจากภาคเอกชน จำนวน 34 คน และฝึกอบรมให้ผู้วิเคราะห์ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 10 แห่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 10 คน โดยทำให้สามารถใช้วิธีวิเคราะห์ 11 วิธี (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การดำเนินงานฝีกอบรมตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 ถึงปัจจุบัน

เดือนปี	จำนวน ห้องปฏิบัติการ (แห่ง)	จำนวนผู้ผ่าน การอบรม (คน)	ชนิดตัวอย่าง ที่ใช้ฝีกอบรม	วิธีวิเคราะห์ที่ใช้
ส.ค. 2542	7	12	กุ้งแช่แข็ง	Laboratory Information Bulletin No. 3172 ⁽⁴⁾
ก.พ. 2549	5	6	มักกะโรนีและ สปาเก็ตตี้	AOAC (2012) 969.41 ⁽¹⁾
มี.ค. 2549	1	3	อาหารเช้าธัญพืช Cereal breakfast (Corn and Rice)	AOAC (2012) 970.71 ⁽¹⁾
ส.ค. 2551	10*	10	เส้นก๋วยเตี๋ยว แป้งข้าวเจ้า	AOAC (2012) 982.32 B. (b) ⁽¹⁾ AOAC (2012) 982.32 A. (a) ⁽¹⁾
พ.ย. 2551	1	4	นมผง ผง spinach และผง apple	AOAC (2012) 960.49 A. ⁽¹⁾ AOAC (2012) 974.33 ⁽¹⁾ AOAC (2012) 977.24 ⁽¹⁾
ก.ย. 2553	1	4	แป้งข้าวโพด ใบชา ผงโกโก้ อาหารเช้าธัญพืช Cereal breakfast (Corn and Rice)	AOAC (2012) 965.39 ⁽¹⁾ AOAC (2012) 981.18 ⁽¹⁾ AOAC (2012) 965.38 ⁽¹⁾ AOAC (2012) 970.71 ⁽¹⁾
มิ.ย. 2556	1	2	เส้นก๋วยเตี๋ยว	AOAC (2012) 969.41 ⁽¹⁾
พ.ย. 2556	1	3	ครีมเทียมผง แป้งรำข้าว	AOAC (2012) 960.49A. ⁽¹⁾ AOAC (2012) 982.32A. ⁽¹⁾

หมายเหตุ *เป็นศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 10 แห่ง

จากการประเมินผลการฝีกอบรมจากการสังเกต พบว่าผู้ฝีกอบรมมีความเข้าใจในหลักการพื้นฐาน และ การเลือกใช้วัสดุ อุปกรณ์ได้อย่างเหมาะสมและถูกต้อง ส่วนการประเมินความสามารถในการตรวจจำแนกชนิด สิ่งปนปลอมที่น่ารังเกียจจาก authentic slide ผู้เข้ารับการฝีกอบรมสามารถระบุชนิดสิ่งปนปลอมได้ถูกต้องจำนวน 8 ถึง 10 slides ผู้เข้ารับการฝีกอบรมจึงผ่านการประเมินทุกคน

สรุป

จากการจัดฝีกอบรมตามหลักสูตรที่พัฒนาขึ้นจนถึงปัจจุบัน มีองค์กรภาคเอกชน จำนวน 17 องค์กร และศูนย์ วิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 10 แห่ง ที่สนใจส่งบุคลากรเข้ารับการอบรมทั้งสิ้นรวม 44 คน ในภาพรวม การที่ผู้เข้ารับการ อบรมได้ลงมือวิเคราะห์ตัวอย่างที่ตนเองรับผิดชอบการตรวจวิเคราะห์ light filth นอกจากจะวิเคราะห์ได้อย่าง ถูกต้องตามขั้นตอนที่วิธีมาตรฐานกำหนดแล้ว ยังได้รับความรู้ ความเข้าใจซึ่งเป็นเทคนิคพิเศษ เช่น การทำ wet sieve, การ drained off โดยใช้ percolator, การ trapped off โดยใช้ Wildman trapped flask, การกรอง นอกจากนี้ยัง สามารถตรวจจำแนกชนิดสิ่งปนปลอม เช่น เส้นผม ขนแมว/ขนสุนัข ขนหนู ชิ้นส่วนแมลง ได้อย่างถูกต้อง การดำเนิน งานพัฒนาหลักสูตรและจัดฝีกอบรมโดยห้องปฏิบัติการทางกายภาพ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร จึงเป็น การเพิ่มจำนวนบุคลากรผู้มีขีดความสามารถในการทดสอบหา light filth ซึ่งเป็นตัวชี้วัดสุขลักษณะอาหารได้ใน ระดับหนึ่งทั้งในภาครัฐและเอกชนได้อย่างเป็นรูปธรรม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางสาวจันทร์ฉาย แจ้สว่าง และนางลัดดาวัลย์ โจนพรรณทิพย์ อดีตผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร รวมทั้งนางสาวจรรุวรรณ ลิ้มสัจจะสกุล ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ได้สนับสนุนให้มีการดำเนินงานเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทดสอบหา light filth ในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Whitlock LL, Chapter editor. Chapter 16, Extraneous materials: Isolation, In: Dr. Latimer, Jr. GW, Editor. Official Method of Analysis of AOAC International. 19th ed. Maryland: AOAC International, 2012. p. 4, 11-13, 16, 24-25, 27-28, 48.
2. Gorham JR, Editor. Ecology and Management of Food - Industry Pests. Virginia: Association of Official Analytical Chemists, 1991. p. 491-492.
3. Department of Health and Human Services. The Food Defect Action Levels. [Online]. 2005 [Cited 2014 May 28]; [4 screens]. Available from: URL: www.fda.gov/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/UCMO56174-hm
4. Olsen AR, The Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration, USA. Laboratory Information Bulletin No. 3172. Rapid Procedure for the Examination of Shrimp for Filth. 1988. p. 1.



ใบสมัครเป็นสมาชิก วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ชื่อ.....

ที่อยู่.....

อาชีพ.....

โทรศัพท์.....

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

ตั้งแต่ปี.....

พร้อมนี้ได้ส่ง

☐ ธนาณัติ

☐ ตัวแลกเงินไปรษณีย์

☐ เงินสด

ส่งจ่าย

นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ

ห้องสมุดกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ซอยโรงพยาบาลบำราศนราดูร ถนนติวานนท์

นนทบุรี 11000 โทร. 0-2589-9850-8 ต่อ 99339

ส่งจ่าย ปณณ. กระทรวงสาธารณสุข รหัสไปรษณีย์ 11000

THE BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

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

Owner	Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health	
Administrative Advisor	Apichai Mongkol	Jureporn Boonyawongvirot
	Varunee Jinaratana	Wanchai Sattayawuthipong
Technical Advisor	Amara Vongbuddhapitak	Mayura Kusum
	Jongdee Wongpinairat	Pimjai Naigowit
	Supatra Im-Erb	Sumol Pavittranon
	Panadda Silva	
Editor	Yaowapa Pongsuwanna	
Editorial Board	Somchai Bovornkitti	Prasert Auewarakul
	Orasa Suthienkul	Pilaipan puthavathana
	Aree Thattiyaphong	Jurai Chotichanathawewong
	Siri Srimanoroth	Usavadee Thavara
	Kanokporn Atisook	Wichuda Jariyapan
	Suthon Vongsheree	Malinee Chittaganpitch
	Suwanna Tienungoon	Siripakorn Sangkitporn
	Wimol Petkanchanapong	Prapai Wongsinkongman
	Charoendee Pingsuthiwong	Walailuk Matapatara
	Areerat Sa-ngasang	
Secretary	Paiwan Boonwong	
Administration	Namfon Noiprasert	
	Prasan Julwong	
Subscription Rate	The Bulletin of the Department of Medical Sciences is published quarterly. Annual subscription rate is ฿ 200.00 for domestic and US.\$ 50.00 for all other countries.	
Office	Department of Medical Sciences 88/7 Soi Tiwanond 14, Tiwanond Rd., Nonthaburi 11000, Thailand. Tel. 0-2951-0000 Fax: 0-2951-1297	
Printed by	Aroonkarnphim Ltd., Part. 457/6-7 Phra Sumen Road, Bangkok 10200 Tel. 0-2282-6033-4	



มุ่งมั่นพัฒนา คำนึงวิจัย ฉบับบริการ มาตรฐานสากล

www.dmsc.moph.go.th