

วารสาร



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 57 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2558 Vol. 57 No. 2 April - June 2015

ISSN 0125-684X

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยและแลกเปลี่ยนความรู้ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ ที่ปรึกษาด้านบริหาร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นพ.อภิชัย มงคล พญ.วารุณี จินารัตน์	นางจุรีภรณ์ บุญวงศ์โรจน์ นพ.วันชัย สัตยาวิมลพงศ์
ที่ปรึกษาด้านวิชาการ	ภญ.อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์ ภญ.ดร.จตุร ว่องพินัยรัตน์ ภญ.สุภัทรา อิมเอิบ ดร.ปนัดดา ชิลวา	พญ.มยุรา กุสุมภ์ นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท ภญ.ดร.สุมล ปวีตรานนท์
บรรณาธิการ	สพญ. ดร.เยาวภา พงษ์สุวรรณ	
คณะบรรณาธิการ	ศ. ดร. นพ.สมชัย บวรกิตติ ศ. ดร.อรสา สุตเธียรกุล ดร.อารี ทัตติยพงศ์ นายศิริ ศรีมโนรณ นางกนกพร อธิสุข นายสุธน วงษ์ชีรี ดร.สุวรรณมา เจริญอักษร ดร.วิมล เพชรกาญจนางค์ ภญ.ดร.เจริญดี ปิงสุทธีวงศ์ ดร.อารีรัตน์ สง่าแสง	ศ. ดร. นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล ศ. ดร.ไพโรจน์ พุฒินันท์ นางสาวจุไร โชติธนาทวิวงศ์ ดร.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 2 เมษายน - มิถุนายน 2558

Vol. 57 No. 2 April - June 2015

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การพัฒนาระบบคุณภาพการทดสอบความชำนาญการวิเคราะห์อาหารและน้ำ พ.ศ. 2554-2556 79
กนกพร อธิสุข จิตผกา สันต์ตรบ และวิชาดา จงมีวาสนา
- การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ในอาหาร โดย LC-MS/MS 91
ทองสุข ปายะนันท์ และลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ
- การสร้างศักยภาพการเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงสากลผ่านการพัฒนาและการตรวจรับรอง ระบบคุณภาพ ISO guide 34 109
ธีระพล คชาชีวะ และสุภาพร ภูมิอมร
- การพัฒนาการเป็นผู้ดำเนินการแผนทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์อาหาร ทางจุลชีววิทยา 127
ลดาวลัย จิงสมานกุล กมลวรรณ กันแต่ และอัจฉรา อยู่คง
- การวิเคราะห์สารเร่งเนื้อแดงเคลือบเตอรอลในเนื้อหมู โดยใช้เทคนิค Exact-matching double IDMS: ผลการเข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัด APMP.QM-S6 Clenbuterol in Porcine Meat 142
กิตติยา เขียร์แมน พรหทัย กันแก้ว ปรียาภรณ์ พุกรอด ศรกฤษณ์ มาบำรุง และปณิดดา ชิลวา
- การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณเตตราไซคลิน และเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณ โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง 157
จิราณูช แจ่มทวีกุล สุเมธ เทียงธรรม วลัยลักษณ์ เมธาภัทร และจิตรา ชัยวัฒน์
- การพัฒนาแผ่นแปะผิวหนังจากสมุนไพรบวบก 174
พรศรี ประเสริฐวารี จิราณูช มิ่งเมือง เสาวณีย์ ทองดี ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง และณัจฉรา จันทร์สุวานิชย์
- ชีววิทยาของยุงพาหะโรคไข้เลือดออกและซีโรทัยป์ของเชื้อไวรัสเดงกีในวงจรการเกิดโรค ในประเทศไทย 186
อุษาวดี ถาวรระ พายุ ภักดีนวน อภิวัฏ ธวัชสิน จักรวาล ชมภูศรี ชญาดา ดีพลางม ยุทธนา ภูทร์พัย อัจฉรา ภูมิ ธีรภมร เพ็งสกุล เผด็จ ลิริยะเสถียร และสมชาย แสงกิจพร

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

- กรณีศึกษา : ความผิดพลาดในการคำนวณสถิติจากค่าลอการิทึม 197
สุนัน วงษ์ชีรี กิตติพงษ์ เกิดฤทธิ์ สุรศักดิ์ หมั่นพล มะลิวัลย์ หอมจัน และพรหมภัสสร ดิษสระ

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 57 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2558

Vol. 57 No. 2 April - June 2015

CONTENTS

Page

Original Articles

- Development of Proficiency Testing Quality System on Food and Water Analysis (2011-2013)** 79

Kanokporn Atisook Jitpaka Suntudrob and Wischada Jongmevasana

- Method development and Validation for Determination of Nitrofurantoin Metabolites in Food by LC-MS/MS** 91

Thongsuk Payanan and Ladda Kaewklapanyacharoen

- Capacity Building of International Reference Laboratory through Development and ISO guide 34:2009 Assessments** 109

Teerapon Kachacheewa and Supaporn Phumiamorn

- Development of Proficiency Testing Providing for Food Microbiological Testing Laboratory** 127

Ladawan Chungsamakool Kamonwan Kantaeng and Atchara Ukong

- Analysis of Clenbuterol in Porcine Meat Utilizing an** 142

- Exact-Matching Double IDMS: Interlaboratory Comparison**

- Result: APMP.QM-S6 Clenbuterol in Porcine Meat**

Kittiya Shearman Pornhatai Kankaew Preeyaporn Pookrod

Sornkrit Marbumrung and Panadda Silva

- Method Development for Determination of Dexamethasone and Prednisolone in Traditional Drug by High-Performance Liquid Chromatography** 157

Jiranuch Jamtaweekul Sumate Thiangthum Waliluk Matapatara and Chitra Chaiyawat

- The Development of Transdermal Patch From Centella Asiatica (L.) Urban** 174

Pornsri Prasertwaree Jiranuch Mingmuang Saowanee Thongdee

Sakwichai Onthong and Nuchattra Chansuwanich

- Biology of Dengue Vectors and Serotypes of Dengue Virus in infectious Cycle in Thailand** 186

Usavadee Thavara Payu Bhakdeenuan Apiwat Tawatsin

Jakkrawarn Chompoosri Chayada Khumsawads Yuttana Phusup

Atchara Phumee Theerakamol Pengsakul Padet Siriyasatien

and Somchai Sangkitporn

Laboratory Findings

- Failure in Calculating The Statistics from Logarithm Values: Case Study** 197

Suthon Vongsheree Kittipoong Keardrit Surasak Muenphon

Maliwan Homchan and Prompussorn Dissara



บทบรรณาธิการ



สวัสดีท่านผู้อ่านวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 57 ฉบับที่ 2 เมษายน – มิถุนายน 2558 ทุกท่าน ฉบับนี้เล่มวารสารเล่มหนาขึ้นกว่าเดิม สืบเนื่องจากการประชุมวิชาการครั้งที่ 23 เรื่อง National Laboratory System for Global Health Security ระหว่างวันที่ 25-25 มีนาคม 2558 ณ อิมแพ็คฟอรัม เมืองทองธานี จะเห็นได้ว่ากรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีนักวิจัยที่จะคิดค้นสิ่งต่าง ๆ ที่ให้ความรู้และเป็นประโยชน์มากมายซึ่งก็เป็นนโยบายของกรมฯ ที่จะส่งเสริมให้นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้มีผลงานตีพิมพ์เผยแพร่แก่ผู้สนใจได้นำไปใช้ประโยชน์

ในวารสารเล่มนี้ยังคงมีบทความวิชาการที่เต็มไปด้วยข้อมูลที่น่าสนใจรวม 9 เรื่อง แยกเป็น นิพนธ์ต้นฉบับ 8 เรื่อง และรายงานจากห้องปฏิบัติการ 1 เรื่อง ซึ่งทั้ง 9 เรื่องนี้เป็นผลงานวิชาการที่น่าสนใจต่อการติดตาม

ขอขอบพระคุณผู้ทบทวนบทความ (reviewer) ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่าตรวจแก้บทความเพื่อให้ได้ผลงานที่ดีลงตีพิมพ์ในวารสาร ขอขอบคุณผู้พิมพ์ทุกท่านที่ส่งบทความลงเผยแพร่ และขอบคุณผู้ติดตามอ่านวารสารฯ ซึ่งวารสารฯ ยินดีที่จะได้รับข้อเสนอแนะจากทุกท่านเพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ต่อไป

ปราณี ชาลิตธำรง

คำแนะนำในการเตรียมต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์ ในวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ประเภทของบทความ

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รับผิดชอบบทความ ประเภทนิพนธ์ต้นฉบับ รายงานจากห้องปฏิบัติการ กรณีศึกษา บทความปริทัศน์ บทความทั่วไป จดหมายถึงบรรณาธิการ บทบรรณาธิการ และสารคัดต่อสั้น บทความที่ส่งตีพิมพ์จะต้องไม่เคยตีพิมพ์ หรือกำลังตีพิมพ์ในวารสารฉบับอื่นมาก่อน ทั้งนี้บทความทุกเรื่องจะได้รับการพิจารณาตรวจแก้ไขจากผู้ทรงคุณวุฒิในสาขาที่เกี่ยวข้อง และกองบรรณาธิการขอสงวนสิทธิ์ในการตรวจแก้ไขต้นฉบับและพิจารณาตีพิมพ์ตามลำดับก่อนหลัง

ความรับผิดชอบ

บทความที่ตีพิมพ์ในวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถือเป็นผลงานทางวิชาการ และเป็นความเห็นส่วนตัวของผู้เขียน ไม่ใช่ความเห็นของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หรือกองบรรณาธิการ ผู้เขียนต้องรับผิดชอบต่อบทความของตน

การเตรียมต้นฉบับ

ภาษาที่ใช้คือ ภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ต้นฉบับภาษาไทย ควรใช้ภาษาไทยให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ คำศัพท์เฉพาะหรือคำศัพท์ภาษาอังกฤษที่บัญญัติเป็นภาษาไทยแล้ว แต่ยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างแพร่หลาย หรือแปลแล้วเข้าใจยาก ให้ใส่ภาษาอังกฤษกำกับไว้ในวงเล็บ หรืออนุโลมให้ใช้ภาษาอังกฤษได้

ต้นฉบับควรพิมพ์บนกระดาษขาวขนาด A4 ใช้ตัวอักษร (font) ชนิด Angsana New ขนาดตัวอักษร 16 พิมพ์บรรทัดคู่ (หรือแต่ละบรรทัดให้ห่างอย่างน้อย 6 มม.) พิมพ์หน้าเดียวและใส่เลขกำกับทุกหน้า โดยเว้นขอบด้านซ้ายและด้านบน 3.5 ซม. ด้านขวาและด้านล่าง 2.5 ซม.

หน้าแรกของต้นฉบับประกอบด้วยชื่อเรื่อง ชื่อผู้เขียน ชื่อผู้เขียนที่ทำหน้าที่ประสานงานกับคณะบรรณาธิการ และสถานที่ทำงานที่สามารถติดต่อได้ทางไปรษณีย์ และชื่อเรื่องโดยย่อ (running title) ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

หน้าที่สองเป็นบทคัดย่อ ต้องเขียนทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ความยาวไม่เกิน 250 คำ โดยครอบคลุมที่มาของหัวข้อวิจัย วัตถุประสงค์ ขอบเขตการวิจัย วิธีทำหรือวิธีการรวบรวมข้อมูล ผลใช้เฉพาะข้อมูลหลักที่สำคัญและสถิติที่ใช้ และสรุปโดยเน้นหลักการสำคัญที่พบใหม่ ทำบทคัดย่อภาษาอังกฤษให้มีคำสำคัญของบทความ (key word) ไม่เกิน 5 คำ เป็นภาษาอังกฤษ สำหรับผู้ที่ไม่สันทัดภาษาอังกฤษควรหาผู้ที่ชำนาญภาษาอังกฤษช่วยตรวจสอบ

ต้นฉบับหน้าที่สามเป็นต้นไปเป็นส่วนของเนื้อเรื่อง ควรใช้ภาษาที่ง่าย สั้น กระชับ และชัดเจน หากเป็นบทความประเภทนิพนธ์ต้นฉบับ และรายงานจากห้องปฏิบัติการให้เรียงลำดับดังนี้ : บทนำ วัสดุและวิธีการ ผล วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง

บทนำ ในบทนำนี้ควรกล่าวถึงสมมติฐานหรือหลักการ เหตุผลที่ศึกษา เมื่ออ้างอิงควรเลือกใช้เฉพาะเอกสารอ้างอิงที่สำคัญเท่านั้น

วัสดุและวิธีการ ในส่วนนี้ให้ข้อมูลทางวิชาการที่มากพอที่ผู้สนใจสามารถทำงานนี้ซ้ำได้ ทั้งนี้ให้ระบุแหล่งที่มาของน้ำยา สารเคมี อุปกรณ์ เครื่องมือ สายพันธุ์ของจุลชีพให้ละเอียด

ผล ให้นำเสนอผลงานตามลำดับ หลีกเลี่ยงการใช้กราฟหรือภาพที่ไม่จำเป็น ถ้ามีตารางข้อมูลให้เสนอพร้อมกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานหรือ Standard error of the mean ด้วย

วิจารณ์ วิจารณ์สิ่งที่ค้นพบเปรียบเทียบกับงานที่ผู้อื่นทำและเผยแพร่ไว้ก่อนหน้านี้แล้ว ทั้งนี้ควรระวังไม่นำส่วนของผลมากล่าวซ้ำในส่วนนี้

สรุป เน้นสิ่งที่พบใหม่ที่สำคัญจากการศึกษานี้ พยายามเชื่อมโยงการสรุปกับวัตถุประสงค์

ตารางและภาพ ให้แยกออกจากเนื้อเรื่อง หน้าละ 1 รายการ ภาพถ่ายควรเป็นภาพขาวดำที่มีความชัดเจน ขนาดไม่เล็กกว่าโปสการ์ด ส่วนภาพวาดควรวาดบนกระดาษขาวอย่างดีด้วยหมึกดำลายเส้นคมและชัดเจน ในส่วนของเนื้อเรื่องที่ต้องการแสดงตารางหรือภาพ ให้เว้นที่ว่างพอสมควรและให้เขียนในกรอบว่า

ใส่ตารางที่ 1

หรือ

ใส่ภาพที่ 1

เอกสารอ้างอิง การอ้างอิงเอกสารในเนื้อเรื่องให้ใช้ระบบของ the Uniform Requirements style (the Vancouver Citation style) ส่วนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่องให้อ้างเฉพาะบทความที่ตีพิมพ์แล้วในสิ่งตีพิมพ์ปฐมภูมิเท่านั้น การเรียงลำดับเอกสารอ้างอิงให้เรียงตามลำดับการอ้างอิง ผู้เขียนต้องรับผิดชอบในความถูกต้องของเอกสารอ้างอิง สามารถดูรายละเอียดเพิ่มเติมได้ที่

URL: <http://www2.dmsc.go.th/Web/DMSC.LIB/page5.html>

URL: <http://www2.dmsc.go.th/Web/DMSC.LIB/VANCOUV.PDF>

ผู้นิพนธ์ตั้งแต่ 1 ถึง 6 คน ใส่ชื่อผู้แต่งทุกคน ถ้ามีมากกว่าให้ใส่ชื่อ 6 คนแรกตามด้วยและคณะ หรือ et al กรณีบทความไม่มีชื่อผู้นิพนธ์ให้ใช้ชื่อเอกสารแทนชื่อผู้นิพนธ์

การเขียนเอกสารอ้างอิงให้ใช้รูปแบบดังตัวอย่าง

1. การอ้างบทความวารสาร (Article in Journal)

ตัวอย่าง: สุภาวรรณ จงธรรมวัฒน์, บำรุง คงดี, วิชัย ประสาททอง, มณี เขม้นเขตรการ, จิราภรณ์
อำพันธ์, กมล ฝอยหิรัญ และคณะ. การสำรวจคุณภาพของยางอนามัยทั่วประเทศ. ว กรมวิทย พ
2540;39(2): 67-74.

2. การอ้างหนังสือหรือตำรา (Text / Guideline)

ตัวอย่าง: ชีระพร วุฒยวนิช. บรรณาธิการ. เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์. เชียงใหม่ :
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2546.

3. การอ้างเฉพาะบทในตำรา (Chapter in the text)

ตัวอย่าง: ทวีศักดิ์ แทนวันดี. การวินิจฉัยโรคตับจากไวรัสทางคลินิก. ใน: สิริฤกษ์ ทรงศิริไธ.
บรรณาธิการ. ดับอักเสบบจากไวรัส. กรุงเทพฯ: บางกอกบลิ๊ก; 2543. เล่ม 1. หน้า 281-309.

4. การอ้างกฎหมาย (Legal material)

ตัวอย่าง: พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 61 (พ.ศ. 2524)
ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 98 ตอนที่ 157 (วันที่ 7 กันยายน 2524)

5. การอ้างสิ่งพิมพ์ขององค์กรหรือหน่วยงาน (Organization as author and publisher)

ตัวอย่าง: กรมสนับสนุนบริการสุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข. แผนยุทธศาสตร์การดำเนินงาน
สุขภาพภาคประชาชน. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย;
2546.

6. การอ้างรายงานการสัมมนา/ประชุมวิชาการ (Conference paper)

ตัวอย่าง: วิยะดา เจริญศิริวัฒน์. เอกสารการประชุมสัมมนาเฉลิมพระเกียรติเรื่อง การคัดกรองภาวะ
พร่องไทรอยด์ฮอร์โมนในทารกแรกเกิดเพื่อป้องกันปัญญาอ่อน. วันที่ 25 พฤศจิกายน 2542.
นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2542.

7. การอ้างวิทยานิพนธ์ (Dissertation)

ตัวอย่าง: มณี เขม้นเขตรการ. ผลของ N-acetylcysteine ต่อการป้องกันพิษของพาราควอตในหนูขาว
[วิทยานิพนธ์]. ภาควิชาพิษวิทยา, คณะวิทยาศาสตร์. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2547.

8. การอ้างสื่ออิเล็กทรอนิกส์ (Electronic material)

8.1 วารสารออนไลน์ (Journal on Internet)

ตัวอย่าง: ชวนพิศ ยิ้มสมบัติ. การประเมินคุณภาพการตรวจหาเชื้อมาลาเรียบนฟิล์มโลหิตบางด้วย
กล้องจุลทรรศน์. ว กรมวิทย พ [วารสารออนไลน์]. 2548; [สืบค้น 29 ก.ย. 2548]; 47(2):[8 หน้า].
เข้าถึงได้จาก: URL:<http://www.dmsc.moph.go.th/net/jms/>

8.2 เว็บไซต์ (WWW site)

ตัวอย่าง: กรมควบคุมโรค. การป้องกันควบคุมโรคไข้หวัดนก Avian Influenza (Bird Flu).

[ออนไลน์]. 2548; [สืบค้น 28 ก.ย. 2548];[1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL:http://www-ddc.moph.go.th/Bird_Flu_main.html.

การส่งต้นฉบับ

แนบจดหมายนำส่งที่ผู้พิมพ์และผู้ร่วมพิมพ์ลงชื่อไว้ทุกคน พร้อมระบุไว้ด้วยว่าทุกคนอ่านและยอมรับในบทความนั้น ให้ส่งต้นฉบับจริง 1 ชุด สำเนา 2 ชุด พร้อมแผ่นบันทึกข้อมูล ถึง บรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ ถนนบุรี 11000 โทร. 0-2589-0022 ต่อ 99662, บรรณาธิการ ต่อ 99701

การรับบทความ

บทความที่กองบรรณาธิการได้รับ จะแจ้งให้ผู้เขียนทราบทุกเรื่องและจะไม่คืนต้นฉบับยกเว้นบทความที่ไม่ได้รับการตีพิมพ์ จะแจ้งให้ทราบพร้อมส่งต้นฉบับส่งคืน บทความที่ได้รับการตีพิมพ์ กองบรรณาธิการจะมอบสำเนาพิมพ์ (reprint) 10 ชุด แก่ผู้เขียนชื่อแรก

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

The Bulletin of the Department of Medical Sciences welcomes different kinds of articles i.e. original articles, laboratory findings, review articles, general articles, letters to editor, editorials and short communications. Every article **must not be accepted or published elsewhere**.

Articles published in this bulletin represent the research activities or opinions of the authors. **Contributions in every article will be peer-reviewed**. The authors are responsible for its content. Authors who are not fluent in English should seek help from someone proficient in English.

Type or print out the manuscripts on A4 white paper using Angsana New font, size 16. Use double spacing throughout the paper, and on only one side of paper with left and top margins of 3.5 cm, and right and bottom margins of 2.5 cm.

The first page should carry the title of the article, the author's name, affiliation and a running title. The second page should carry an abstract of no more than 250 words and identify limited to 5 key words at the bottom of the abstract. The third page and next should carry the body of the article. The structure of original articles and laboratory findings should be in the order of: introduction, materials and methods, results, discussion, conclusion, acknowledgements and references.

Introduction: The introduction should provide the hypothesis or the rationale for the study. Give only pertinent references.

Materials and Methods: Give the full technical information so that the experiments can be repeated. The sources of all materials and apparatus must be provided.

Results: Present the results as concisely as possible in logical sequence. Avoid unnecessary graphs and figures. All tabular data, if needed, must be accompanied by either standard deviation or standard error.

Discussion: Provide an interpretation of the results in relation to other relevant studies. It must not contain extensive repetition of the results sections.

Conclusion: Emphasize the new and important aspect of the study. Link the conclusions with the goals of the study.

Each table or figure should be prepared on a separate sheet. Photographic prints must be in black and white, shape with high contrast and not smaller than the postcard size. Drawings are

clearly prepared with black drawing ink on white paper. In the text, an appropriate space should be provided for each table or figure as indicated below:

for Table 1.

 or

for Figure 1.

References appeared in the text, should be cited according to “the Uniform Requirements style” (the Vancouver Citation style). The references should be listed numerically and in the same order that they have been cited in the text. Only the original documents should be used as references.

List all authors up to six authors. If there are more than six authors, list the first six authors follow by *et al* (*et al* means “and others”). Use the title of the article or book as author when no author is given. Only the first word of journal articles or book titles (and words that normally begin with a capital letter) are capitalized, and do not use italics or underlining.

Each reference should be in the order according to the following samples:

1. Citing a Journal Article

Examples:

Hoorfar J, Cook N, Malorny B, Wagner M, Medici D, Abdulmawjood A, *et al*. Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41(12):5835-7.

Russell FD, Coppell AL, Davenport AP. In vitro enzymatic processing of radiolabelled big ET-1 in human kidney as a food ingredient. *Biochem Pharmacol* 1998;55:697-701.

Coffee drinking and cancer of the pancreas [editorial]. *BMJ* 1981;283:628.

2. Citing a Text/Guideline

Examples:

Greenberg AE, Clescri LS, Eaton AD, editors. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed. Washington DC: American Public Health Association; 1992. p. 9-94.

The United States Pharmacopoeia. The National Formulary. 23th ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, Inc.; 1995. p. 373-5.

Thai Pharmacopoeia. Vol. I (Pt 2). Appendix 1.1 Reagents. Bangkok: Department of Medical Sciences; 1993. p. 1472-5.

International Organization for Standardization. ISO/IEC Guide 25. General requirements for the competence of calibration and testing laboratories. 3rd ed. Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 1990.

Stedman's medical dictionary. 26th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. Apraxia; p. 119.

3. Chapter in the Text

Examples:

Phillip SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In : Laragh JH, Brenner BM, editors.

Hypertension : pathophysiology, diagnosis and management. 2nd ed. New York (NY): Raven Press; 1995. p. 465-78.

Bennett GL, Horuk R. Iodination of chemokines for use in receptor binding analysis. In: Horuk R, editor. Chemokine receptors. New York (NY): Academic Press; 1997. p. 134-48. (Methods in enzymology; vol 288).

4. Legal Material

Examples:

Airlines Equipment Amendment Act 1981 (Cwlth), s. 19(1)(a)(ii)

Public Service Regulations (Cwlth), r.83(2)(a)(ii)

Preventive Health Amendments of 1993, Pub.L. No. 103-183, 107 Stat. 2226 (Dec. 14, 1993)

5. Organization as Author and Publisher (Including pamphlet & Package Insert)

Examples:

Department of Medical Sciences. Guideline of method validation used in pharmaceutical analysis. Nonthaburi: Department of Medical Sciences; 1995.

Pharmaceutical Society of Australia. Medicines and driving [pamphlet]. Pharmaceutical Society of Australia; 1998. DR-7.

Lamasil [package insert]. East Hanover (NJ): Sandoz Pharmaceuticals Corp; 1993.

6. Citing Conference Papers/Conference Proceedings

Examples:

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Reinhoff O, editors. MEDINFO 92.

Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

7. Citing a Newspaper Article

Examples:

Lee G. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 50,000 admissions annually.
The Washington Post 1996 Jun 21; Sect. A:3 (col. 5).

8. Dissertation

Example:

Kaplan SJ. Post-hospital home health care : the elderly's access and utilization [dissertation].
St. Louis, (MO) : Washington Univ.; 1995.

9. Citing Internet and Other Electronic Sources

9.1 Journal on Internet

Examples:

Morse SS. Factors in the emergence of infectious disease. Emerg Infect Dis [serial online] 1995

Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1(1):[24 screens]. Available from: URL:<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

Garfinkel PE, Lin E, Goering P. Should amenorrhoea be necessary for the diagnosis of anorexia nervosa ? Br J Psych [serial online] 1996 [cited 1999 Aug 17]; 168(4):500-6. Available from: URL:<http://biomed.niss.ac.uk>

9.2 Websites (WWW site)

Examples:

Hoffman DL. St John's Wort. [Online]. 1995 [cited 1998 Jul 16]; [4 screens]. Available from: URL:<http://www.healthy.net/library/books/hoffman/materiamedica/stjohns.htm>

9.3 Web Based/Online Databases

Example:

Kirkpatrick GL. Viral infections of the respiratory tract. In: Family Medicine. 5th ed. [Online]. 1998. Available from: Stat!Ref. Jackson (WY): Teton Data Systems; 2001. [cited 2001 Aug 31].

9.4 CD-ROM & Books on CD-ROM

Examples:

Clinical pharmacology 2000 [CD-ROM]. Version 2.01. [cited 2001 Aug 7]; Gainesville (FL): Gold Standard Multimedia; 2001.

The Oxford English dictionary [book on CD-ROM]. 2nd ed. New York (NY): Oxford University Press; 1992.

9.5 Journal on CD-Rom

Example:

Gershon ES. Antisocial behavior. Arch Gen Psychiatry [serial on CD-ROM]. 1995;52:900-901.

9.6 Other Software:

Example:

Epi Info [computer program]. Version 6. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention; 1994.

For further information see

URL: <http://www2.dmsc.go.th/Web/DMSC.LIB/page5.html>

URL: <http://www2.dmsc.go.th/Web/DMSC.LIB/VANCOUV.PDF>

Abbreviations should be based on the U.S. National Library of Medicine in Index Medicus. The body including tables and figures of original and review articles should not exceed 10-25 pages, and for other kinds of articles should not exceed 2-15 pages.

How to Submit Manuscripts

Two copies of the manuscript including the original one and a diskette should be sent to the editor at the below address. Papers which tend to have legal or ethical impact must be submitted accompanied by the guarantee letters from the authorized organizations.

All submissions will be acknowledged by the Editorial Board. Those unaccepted will also be notified. The Editorial Board reserves the right to edit any manuscripts for proper publication.

Following publication of an article, ten reprints will be supplied to the first author free of charge.

Editor, Bulletin of the Department of Medical Sciences

Department of Medical Sciences Library

88/7 Soi Bamrasnaradura Hospital, Tiwanond Rd.

Nonthaburi 11000, Thailand

Tel. 0-2589-0022 ext. 99701, 99662

การพัฒนาระบบคุณภาพการทดสอบความชำนาญการ วิเคราะห์อาหารและน้ำ พ.ศ. 2554-2556

กนกพร อธิสุข จิตผกา สันต์ตรบ และวิชาดา จงมีวาสนา

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การทดสอบความชำนาญการวิเคราะห์อาหารและน้ำเป็นองค์ประกอบสำคัญของการประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการทดสอบอาหาร เนื่องจากการประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการจากหน่วยงานภายนอก แสดงถึงความถูกต้องเชื่อถือได้ของผลการทดสอบ เพื่อให้ผู้ใช้บริการของห้องปฏิบัติการสามารถนำผลการทดสอบไปใช้ในการควบคุมคุณภาพอาหารในการผลิต นำเข้า ส่งออก หรือประกอบการขึ้นทะเบียนตำรับอาหาร ซึ่งในปัจจุบันประเทศไทยมีหน่วยงานให้บริการทดสอบความชำนาญ (proficiency testing provider) จำนวนไม่มาก และโปรแกรมที่ให้บริการยังไม่ครอบคลุมรายการทดสอบ ทำให้ห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องใช้บริการจากหน่วยงานต่างประเทศที่มีราคาสูง สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงได้พัฒนาและจัดการระบบงานการทดสอบความชำนาญให้สอดคล้องตามข้อกำหนดของ ISO/IEC 17043: 2010 จนได้รับการรับรองจาก สำนักบริหารและรับรองระบบงาน กรมวิทยาศาสตร์บริการตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน 2555 การพัฒนาระบบคุณภาพประกอบด้วย การวางแผนและกำหนดเป้าหมายความสำเร็จ การดำเนินการขอรับรอง การรักษาสถานภาพการได้รับการรับรอง และการปรับปรุงอย่างต่อเนื่อง การได้รับการรับรองแสดงถึงความสามารถในการเป็นผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญ ที่ให้บริการตามมาตรฐานสากล ห้องปฏิบัติการสมาชิกได้รับประโยชน์ คือ ได้รับบริการทดสอบความชำนาญที่ถูกต้องเชื่อถือได้ มีคุณภาพ โปร่งใส และประหยัดค่าใช้จ่าย สามารถนำผลการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญไปแสดงถึงความสามารถของการดำเนินการของห้องปฏิบัติการในการขอรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 ได้อย่างมั่นใจ ความสำเร็จในการพัฒนาระบบคุณภาพการทดสอบความชำนาญ ในช่วง พ.ศ. 2554 ถึง พ.ศ. 2556 นี้ สามารถใช้เป็นแนวทางให้หน่วยงานให้บริการทดสอบความชำนาญนำไปใช้ในการพัฒนาได้

บทนำ

กฎกระทรวงแบ่งส่วนราชการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2552⁽¹⁾ กำหนดให้ภารกิจเกี่ยวกับการวิจัยและตรวจชั้นสูตรด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยมีการศึกษา วิเคราะห์ วิจัย และพัฒนาองค์ความรู้และเทคโนโลยีด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อผลการสร้างเสริมสุขภาพที่ดีแก่ประชาชนและสนับสนุนการแก้ไขปัญหาสาธารณสุขของประเทศ รวมทั้งเพื่อสนับสนุนกระบวนการคุ้มครองผู้บริโภคของประชาชน โดยมีอำนาจหน้าที่ที่สำคัญ คือ เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านการทดสอบคุณภาพและมาตรฐานของผลิตภัณฑ์สุขภาพ สนับสนุนและพัฒนาระบบประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการ ซึ่งในปัจจุบันระบบคุณภาพ (quality system) ที่ใช้กันในห้องปฏิบัติการทดสอบ (testing laboratory) และห้องปฏิบัติการสอบเทียบ (calibration laboratory) ที่เป็นมาตรฐานสากลและยอมรับกันทั่วโลก คือ ISO/IEC 17025: 2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories ซึ่งมีข้อกำหนดด้านการบริหารและวิชาการที่ยืนยันได้ว่าห้องปฏิบัติการที่ใช้ระบบคุณภาพนี้สามารถแสดงความสามารถด้านวิชาการ (technical competent) สามารถสร้างผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือได้ (technically valid results)⁽²⁾ และถ้าห้องปฏิบัติการที่ใช้ระบบคุณภาพได้รับการรับรองจากหน่วยรับรอง (accreditation body) จะส่งผลไปถึงการยอมรับผลการทดสอบในการค้าระหว่างประเทศด้วย โดยมาตรฐานนี้มีข้อกำหนดที่สำคัญด้านบริหารจำนวน 15 ข้อ และด้านวิชาการจำนวน 10 ข้อ ข้อกำหนดวิชาการที่สำคัญข้อหนึ่งคือ ข้อที่ 5.9 ระบุเรื่อง การประกันคุณภาพผลการทดสอบและสอบเทียบ (assuring the quality of test and calibration results) โดยกำหนดให้ห้องปฏิบัติการต้องมีวิธีการหรือขั้นตอนการปฏิบัติในการเฝ้าระวังความน่าเชื่อถือของผลทดสอบและสอบเทียบ โดยใช้เครื่องมือ ได้แก่ วัสดุอ้างอิงรับรอง (certified reference materials) วัสดุรับรอง (secondary reference materials) การเข้าร่วมเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory comparison) หรือทดสอบความชำนาญ (proficiency testing; PT) การทดสอบซ้ำด้วยวิธีเดิมหรือวิธีอื่น การทดสอบตัวอย่างที่เก็บไว้ (retained items) หรือการหาความสัมพันธ์ของผลทดสอบสำหรับคุณลักษณะเฉพาะของตัวอย่างทดสอบ ในบรรดาเครื่องมือที่ใช้ในการประกันคุณภาพ การเข้าร่วมเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ และการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ เป็นกิจกรรมที่ต้องมีห้องปฏิบัติการอื่นมาเกี่ยวข้องอีกอย่างน้อย 1 ห้องปฏิบัติการ หรือต้องมีผู้จัดโปรแกรม (PT provider; PTP) กิจกรรมทั้งสองถือได้ว่าเป็นการควบคุมคุณภาพจากภายนอก (external quality control) เนื่องจากห้องปฏิบัติการต้องทดสอบหรือวิเคราะห์ตัวอย่างที่ไม่รู้ค่า (unknown sample) เช่นเดียวกับการให้บริการทดสอบแก่ลูกค้า โดยในต่างประเทศมี PTP ที่มีโปรแกรมด้านอาหาร ให้บริการในราคาสูง ซึ่งอาจเป็นเพราะมีคู่แข่งไม่มาก หรือเพราะค่าใช้จ่ายในการขนส่งตัวอย่างที่มักเป็นตัวอย่างที่เน่าเสียง่าย ต้องได้รับการดูแลควบคุมอุณหภูมิ แช่เย็น หรือแช่แข็ง ห้องปฏิบัติการไม่มีทางเลือกมากนักจำเป็นต้องใช้บริการด้วยการเล็งเห็นความสำคัญของการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการภายในประเทศ และความจำเป็นในการพึ่งพาตนเอง ในปี พ.ศ. 2541 กองอาหาร ปัจจุบัน คือ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร (ใช้ชื่อย่อว่า สคอ.) ได้จัดแผนทดสอบความชำนาญ “การสอบเทียบผลวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน ในตัวอย่างข้าวโพด ถั่วลิสง และนม”⁽³⁾ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโครงการแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารและอาหารสัตว์ครบวงจร ดำเนินการในช่วง พ.ศ. 2539 ถึง พ.ศ. 2543 โดยสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมในฐานะผู้ประสานงานโคเด็กซ์ ในขณะนั้นเป็นเจ้าของโครงการ ได้มอบให้กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เป็น PTP เตรียมตัวอย่าง (PT items) 3 ชนิด คือ ข้าวโพด ถั่วลิสง และนม โดยได้รับความรู้และฝึกปฏิบัติในเรื่องการเตรียมตัวอย่าง การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน และการทดสอบความคงตัว จาก U.S. Food and Drug Administration สหรัฐอเมริกา เพื่อดำเนินการในส่วนการประกันคุณภาพผลการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมโครงการ จำนวน 26 แห่ง และได้มีการจัดโปรแกรมอย่างต่อเนื่องในชื่อ “การทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินในข้าวโพดและถั่วลิสง” จนถึง พ.ศ. 2556 รวม 15 รอบ (rounds) จากต้นแบบการจัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญอะฟลาทอกซิน ต่อมาในปี

พ.ศ. 2549 ได้มีการขยายขอบข่ายการให้บริการทดสอบความชำนาญด้านเคมีอื่นๆ เรื่อยมา ได้แก่ น้ำทางเคมี โลหะหนักในอาหาร วัตถุเจือปนในอาหารและเครื่องดื่ม สารกาเฟอีนในเครื่องดื่ม สารอาหารในนมโค สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในไขมัน และในปี พ.ศ. 2556 เพิ่มขอบข่ายการทดสอบความชำนาญด้านจุลชีววิทยา

ในช่วงเริ่มต้นการดำเนินการจัดการตัวอย่าง ติดต่อสมาชิก พร้อมทั้งประเมินผลสมาชิก ตามวิธีที่กำหนดใน ISO/IUPAC/AOAC INTERNATIONAL Harmonized Protocol 1993 และ ISO/IEC Guide 43-1 ซึ่งเป็นแนวทางการพัฒนาและการทำงานทดสอบความชำนาญ และเพื่อให้ลูกค้าสมาชิกมีความมั่นใจในการดำเนินงาน และเป็นที่ยอมรับของหน่วยงานรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ซึ่งใช้ผลการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญในการประเมิน ในปี พ.ศ. 2554 ได้ปรับปรุงพัฒนาระบบการดำเนินงานให้สอดคล้องกับ ISO/IEC 17043: 2010 Conformity assessment-General requirements for proficiency testing ซึ่งประกาศใช้แทน ISO/IEC Guide 43-1 ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 เพื่อเป็นข้อกำหนดให้ PTP ใช้เป็นแนวปฏิบัติและให้หน่วยรับรอง PTP ใช้ในการให้การรับรอง จึงได้วางแผนและกำหนดเป้าหมายความสำเร็จในการขอรับรอง และดำเนินการจนได้รับการรับรองจากหน่วยรับรองในที่สุดเมื่อเดือนกันยายน 2555 การได้รับการรับรองแสดงถึงความสามารถในการเป็นผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญที่ให้บริการตามมาตรฐานสากล เพื่อให้ห้องปฏิบัติการสมาชิกได้รับประโยชน์ คือ ได้รับการทดสอบความชำนาญที่ถูกต้องเชื่อถือได้ มีคุณภาพ โปร่งใส เป็นกลาง ประหยัดค่าใช้จ่าย มุ่งมั่นที่จะดำรงไว้ซึ่งระบบคุณภาพ และพัฒนาปรับปรุงบริการอย่างต่อเนื่องเพื่อความยั่งยืน ความสำเร็จในการพัฒนาระบบคุณภาพการทดสอบความชำนาญของ ในช่วง พ.ศ. 2554 ถึง พ.ศ. 2556 นี้ จะเป็นประโยชน์ต่อหน่วยงานให้บริการทดสอบความชำนาญในด้านอื่นๆ โดยสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาระบบคุณภาพ รวมทั้งเป็นการเสริมสร้างความเข้มแข็งของห้องปฏิบัติการภายในประเทศได้ในขณะเดียวกัน

วิธีดำเนินการ

1. การวางแผนและกำหนดเป้าหมาย/ตัวชี้วัด

มีการวางแผนอย่างต่อเนื่อง 3 ปี คือ พ.ศ. 2554 ถึง พ.ศ. 2556 เพื่อให้การดำเนินการทดสอบความชำนาญของ สคอ. มีการใช้ระบบคุณภาพและได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043: 2010 ภายในปี 2555 จำนวนอย่างน้อย 1 แผน และขยายการขอรับรองในปีต่อมา 2556 เพิ่มอย่างน้อย 1 แผน

2. การบริหารจัดการเพื่อขอรับรอง

2.1 เตรียมความพร้อมของบุคลากรในระบบคุณภาพ

จัดอบรมให้บุคลากรทุกระดับ ตั้งแต่ผู้บริหารสูงสุดของระบบจนถึงผู้ปฏิบัติงาน ได้รับความรู้เกี่ยวกับมาตรฐาน ISO/IEC 17043: 2010 และเข้าใจบทบาทหน้าที่ในระบบคุณภาพ โดยผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมตัวอย่างและประเมินผล จะต้องได้รับการอบรมความรู้เกี่ยวกับสถิติที่ใช้ในการทดสอบความชำนาญ

2.2 การจัดทำเอกสารคุณภาพ

ศึกษามาตรฐาน ISO/IEC 17043: 2010 และจัดทำคู่มือคุณภาพ ขั้นตอนการปฏิบัติ แบบฟอร์มบันทึกทั้งด้านการบริหารระบบคุณภาพและด้านวิชาการ ครอบคลุมทุกกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินงาน

3. การดำเนินการตามระบบคุณภาพ

ได้แก่ การแต่งตั้งคณะกรรมการที่ปรึกษาวิชาการ (technical advisory committee) การวางแผนงาน (scheme design and planning) การดำเนินการแผนทดสอบความชำนาญ (scheme operation) การควบคุมบันทึกและข้อมูลสมาชิก (control of records) การตรวจติดตามคุณภาพภายใน (internal audit) และการประชุมทบทวนการบริหารงาน (management review)

4. การขอรับรองความสามารถเป็นผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญจากสำนักบริหารและรับรองห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์บริการ โดยมีขั้นตอนดังนี้

- 4.1 ติดต่อกับหน่วยรับรอง เพื่อขอทราบเงื่อนไขข้อกำหนดของการรับรอง
- 4.2 ส่งเอกสารขอการรับรอง
- 4.3 รับการตรวจเบื้องต้น (pre-visit) โดยหัวหน้าผู้ตรวจประเมินและผู้ประสานงาน เพื่อประเมินสภาพความพร้อมและความสอดคล้องกับมาตรฐาน ISO/IEC 17043: 2010
- 4.4 รับตรวจประเมินจริง (on-site assessment) โดยคณะผู้ตรวจประเมินและผู้ประสานงาน พิจารณาเอกสาร ชักถาม และเฝ้าดูการปฏิบัติ ใช้เวลา 2 วันทำการ คณะผู้ตรวจประเมินประชุมพิจารณาผลการตรวจประเมิน และแจ้งข้อบกพร่องและ/หรือข้อสังเกตที่พบในการประชุมปิดการตรวจประเมิน โดยให้โอกาสผู้จัดโปรแกรมชักถาม หรือชี้แจงเหตุผลเพิ่มเติมกรณีมีข้อสงสัยหรือมีความเห็นที่แตกต่างจนได้ข้อยุติร่วมกัน ผู้ตรวจประเมินและผู้จัดโปรแกรมลงนามรับทราบ โดยกำหนดระยะเวลาให้ส่งหลักฐานแก้ไขข้อบกพร่องและ/หรือข้อสังเกตที่พบให้แล้วเสร็จภายใน 3 เดือน นับจากวันที่ตรวจประเมิน
- 4.5 ประสานงานผู้รับผิดชอบส่งหลักฐานแก้ไขข้อบกพร่องหรือข้อสังเกต ภายในเวลาที่กำหนด

5. การรักษาสถานภาพและการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง

- 5.1 รับตรวจประเมินเฝ้าระวัง (surveillance) โดยคณะผู้ตรวจประเมินและผู้ประสานงาน ตามเวลาที่กำหนด คือ 1 ปีหลังจากการตรวจประเมินจริงครั้งแรก
- 5.2 พัฒนาและสนับสนุนผลักดันหน่วยงานภายใน สคอ. เพื่อขยายขอบข่ายขอรับรองเพิ่มขึ้น

ผล

จากการดำเนินการตามแผนเพื่อให้บรรลุเป้าหมายที่ได้วางไว้ต่อเนื่อง ในช่วง พ.ศ. 2554 ถึง 2556 มีผลการดำเนินการแยกเป็นรายปี ดังนี้

1. ผลการดำเนินการ ในช่วงตุลาคม 2553 ถึงกันยายน 2554:
 - 1.1 จากการสำรวจความพร้อม ประกอบด้วย บุคลากรที่มีความรู้ความสามารถและมีความมุ่งมั่น ความพร้อมของเครื่องมืออุปกรณ์ในการเตรียมตัวอย่าง ห้องปฏิบัติการที่มีความสามารถในการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ความคงตัว และให้ค่ากำหนด (assigned value) มีหลักฐานการได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ จึงกำหนดเป้าหมายและเลือกแผนทดสอบความชำนาญที่มีความพร้อมจำนวน 2 แผน ได้แก่ แผนการวิเคราะห์ห่อพลาสติกทอขึ้นในข้าวโพดและถั่วลิสง และแผนการวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในอาหาร
 - 1.2 สำรวจจำนวนบุคลากรที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมทดสอบความชำนาญเป้าหมาย และส่งเข้ารับการอบรมข้อกำหนดตามมาตรฐาน และความรู้สถิติที่ใช้ในการดำเนินงาน ซึ่งจัดโดย คณะอนุกรรมการสอบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 7 คน
 - 1.3 แต่งตั้งบุคลากรที่เหมาะสมเพื่อทำหน้าที่สำคัญในระบบ ได้แก่ ผู้จัดการคุณภาพ (PT-QM) ผู้จัดการวิชาการ (PT-TM) ผู้ประสานแผนฯ (scheme coordinator) ผู้ควบคุมเอกสาร (document control officer; DCO) รวมทั้งแต่งตั้งผู้ปฏิบัติหน้าที่แทนหรือผู้ช่วยในทุกตำแหน่ง ตาม ISO/IEC 17043: 2010 ข้อ 5.1.5

1.4 แต่งตั้งคณะกรรมการที่ปรึกษาวิชาการ (technical advisory committee) ประกอบด้วยบุคคลที่มีความรู้เชี่ยวชาญด้านเทคนิคในการเตรียมตัวอย่างและสถิติที่ใช้ มีหน้าที่ในการกำหนดรูปแบบและวางแผนการทดสอบความชำนาญ ชี้แจงและแก้ปัญหาที่อาจเกิดขึ้นจากการเตรียมตัวอย่าง ให้ความคิดเห็นและเสนอแนะเกี่ยวกับผลของสมาชิก และตอบสนองต่อผลสะท้อนกลับ (feedback) จากสมาชิก ตาม ISO/IEC 17043: 2010 ข้อ 4.4.1.5

1.5 จัดทำเอกสารคุณภาพและอนุมัติใช้ ดังนี้

- คู่มือคุณภาพ รหัส QM PT 20 Revision No. 00 อนุมัติใช้เมื่อ 4 กรกฎาคม 2554
- ขั้นตอนการปฏิบัติงาน ข้อกำหนดด้านบริหาร จำนวน 11 เรื่อง ได้แก่ การรักษาความเป็นกลาง และป้องกันผลประโยชน์ทับซ้อน การควบคุมเอกสาร การทบทวนคำร้อง ข้อเสนอและข้อสัญญา การจัดการข้อร้องเรียน และข้ออุทธรณ์ การควบคุมงานที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนด การปฏิบัติการแก้ไข การปฏิบัติการป้องกัน การจัดการข้อมูล การทดสอบความชำนาญโดยระบบอิเล็กทรอนิกส์ การควบคุมบันทึก การตรวจติดตามคุณภาพภายใน และการทบทวนการบริหาร

- ขั้นตอนการปฏิบัติงาน ข้อกำหนดด้านวิชาการ จำนวน 12 เรื่อง ได้แก่ การวางแผน การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว สถิติที่ใช้ในการทดสอบความชำนาญ การแบ่งบรรจุและการแจกจ่ายตัวอย่าง การรายงานผลการทดสอบความชำนาญ และการรักษาความลับสมาชิก

- แบบบันทึกกิจกรรมตามข้อกำหนดด้านบริหาร ได้แก่ Master list เอกสารคุณภาพในระบบ การแจกจ่ายเอกสาร บันทึกทบทวนเอกสารคุณภาพประจำปี บันทึกการทบทวนคำร้อง ข้อเสนอและข้อสัญญา บันทึกการจัดการข้อร้องเรียน บันทึก Compliant log บันทึกการควบคุมงานที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนด บันทึก Nonconforming work log บันทึกการแก้ไขข้อบกพร่อง บันทึก Corrective action request log บันทึกการปฏิบัติการป้องกัน บันทึก Preventive action request log บันทึกการสำรองข้อมูลหรือไฟล์ที่จัดเก็บด้วยคอมพิวเตอร์ บันทึกแผนการตรวจติดตามคุณภาพภายใน บันทึก Audit checklist และบันทึกข้อบกพร่อง/ข้อสังเกตจาก internal audit

- แบบบันทึกกิจกรรมตามข้อกำหนดด้านวิชาการ ได้แก่ บันทึกการเตรียมตัวอย่าง บันทึกการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว บันทึกการทบทวนสอบโปรแกรมสำเร็จรูปในการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน แบบใบสมัครเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ แบบตอบรับตัวอย่าง บันทึกข้อมูลผลวิเคราะห์ของสมาชิก แบบเสนอความคิดเห็นของคณะกรรมการที่ปรึกษาวิชาการ และแบบรายงานผลการทดสอบความชำนาญ

1.6 สัมมนาสมาชิก จำนวน 100 คน ในวันที่ 26 กรกฎาคม 2554 โดยมีวิทยากรบรรยายความรู้เรื่อง การประกันคุณภาพผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการ และการรับฟังความคิดเห็นและผลสะท้อนกลับจากสมาชิก เพื่อนำข้อมูลเข้าประชุมทบทวนบริหารต่อไป

1.7 ได้รับการตรวจติดตามคุณภาพภายใน ดำเนินการโดยคณะกรรมการสอบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เมื่อวันที่ 8 กันยายน 2554 คณะผู้ตรวจติดตาม พบข้อบกพร่องด้านบริหาร 3 ข้อ ด้านวิชาการ พบข้อบกพร่อง 3 ข้อ และข้อสังเกต 1 ข้อ ดำเนินการแก้ไขแล้วเสร็จเมื่อ 10 ตุลาคม 2554

1.8 ประชุมทบทวนบริหารระบบคุณภาพ ในวันที่ 16 กันยายน 2554 โดยผู้จัดการคุณภาพเป็นผู้รับผิดชอบการจัดการประชุม ผู้บริหารสูงสุดของระบบคุณภาพเป็นประธานการประชุม มีวาระการประชุมครอบคลุมการพิจารณาความเหมาะสมของนโยบายและขั้นตอนการปฏิบัติงาน การทบทวนรายงานจากการบริหาร ผลของการตรวจติดตามคุณภาพภายในที่ผ่านมา การปฏิบัติการแก้ไขและป้องกัน ผลการตรวจประเมินจากหน่วยรับรอง (เนื่องจากยังไม่ได้รับการตรวจประเมิน จึงไม่มีผลการพิจารณาเรื่องนี้) การเปลี่ยนแปลงปริมาณงาน ผลสะท้อนกลับจากสมาชิก ข้อร้องเรียน หรืออุทธรณ์ ข้อเสนอแนะในการปรับปรุง และปัจจัยที่เกี่ยวข้องอื่นๆ

2. ผลการดำเนินการ ในช่วงตุลาคม 2554 ถึงกันยายน 2555:

2.1 วางแผนการขอรับรองความสามารถผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญ จากกรมวิทยาศาสตร์บริการ โดยกำหนดตัวชี้วัด คือ จำนวนแผนที่ได้รับการรับรองอย่างน้อย 1 แผน ภายในเดือนกันยายน 2555 กำหนดผู้รับผิดชอบและผู้กำกับติดตาม ดำเนินการตามแผนที่วางไว้และแก้ปัญหาที่อาจเกิดขึ้น โดยมีกิจกรรมสำคัญ ดังนี้

2.1.1 ประชุมวางแผนโดยคณะกรรมการที่ปรึกษาวิชาการ ตาม ISO/IEC 17043: 2010 ข้อ 4.4.1.3 และจัดทำเอกสารรายละเอียดแผนจากมติที่ประชุม ในวันที่ 11 ตุลาคม 2554

2.1.2 ฝึกอบรมบุคลากรที่เกี่ยวข้อง หลักสูตร ข้อกำหนด ISO/IEC 17043: 2010 และสถิติที่ใช้ ตามมาตรฐาน ISO 13528: 2005 ได้แก่ อบรมภายนอก จัดโดยกรมวิทยาศาสตร์บริการ 1 ครั้ง 2 วัน มีผู้เข้าอบรม จำนวน 2 คน และอบรมภายใน 1 ครั้ง 2 วัน มีผู้เข้าอบรม จำนวน 20 คน

2.2 ตรวจสอบติดตามคุณภาพภายใน ข้อกำหนดด้านวิชาการ รวมทั้งการเฝ้าดูการเตรียม แบ่งบรรจุและแจกจ่ายตัวอย่าง เมื่อวันที่ 12 เมษายน 2555 พบข้อบกพร่อง 4 ข้อ แก้ไขแล้วเสร็จเมื่อ 24 พฤษภาคม 2555 ข้อกำหนดด้านบริหาร ตรวจสอบติดตามเมื่อวันที่ 30 กรกฎาคม 2555 พบข้อบกพร่อง 2 ข้อ แก้ไขแล้วเสร็จเมื่อ 11 กันยายน 2555

2.3 ประชุมทบทวนบริหาร เมื่อวันที่ 20 มีนาคม 2555

2.4 ยื่นขอรับรอง มีกระบวนการ ดังนี้ ศึกษากฎระเบียบและเงื่อนไขการขอการรับรองผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการ (LA-R-06)⁽⁴⁾ กรอกเอกสารประกอบคำขอรับรองฯ (LA-F-202) และยื่นให้หน่วยรับรอง พร้อมทั้งจัดส่งเอกสาร ได้แก่ คู่มือคุณภาพ ขั้นตอนการดำเนินงาน และรายงานฉบับสมบูรณ์ฉบับล่าสุด ในเดือนมกราคม 2555 โดยหน่วยรับรองได้เข้ามาตรวจประเมินเบื้องต้น (pre-visit) ในวันที่ 20 กุมภาพันธ์ 2555 โดยพบระบบบริหารและเอกสารที่ยังไม่เป็นไปตามข้อกำหนดจำนวน 8 ข้อ และรายงานผลการตรวจเบื้องต้นว่าหน่วยงานมีความพร้อมที่จะได้รับการตรวจประเมิน หากปรับปรุงและแก้ไขข้อบกพร่องแล้วเสร็จภายในเวลา 30 วัน ซึ่งผู้จัดการคุณภาพและผู้ประสานแผนฯ ได้แก้ไขปรับปรุงตามที่ได้รับแจ้งและส่งเอกสารหลักฐานภายในเวลาที่กำหนด หลังจากนั้น วันที่ 13-14 และ 18 มิถุนายน 2555 หน่วยรับรองได้เข้าตรวจประเมินจริง (on-site) พบข้อบกพร่องจำนวน 7 ข้อ เป็นด้านบริหาร 1 ข้อ และด้านวิชาการ 6 ข้อ คือ ข้อบกพร่องที่ไม่เป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043: 2010 ข้อ 5.1 องค์กร ข้อ 4.4 การออกแบบ ข้อ 4.7 การวิเคราะห์ข้อมูลและการประเมินผล และข้อ 4.8 รายงาน และพบข้อสังเกตจำนวน 5 ข้อ ผู้จัดการคุณภาพและผู้ประสานแผนฯ แก้ไขข้อบกพร่องและส่งเอกสารหลักฐานเมื่อวันที่ 7 สิงหาคม 2555 และหน่วยรับรองพิจารณาให้การรับรอง ตามใบรับรองความสามารถผู้จัดโปรแกรมการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการ หมายเลขรับรองระบบงานที่ ทดสอบความชำนาญ-0004 วันที่ 18 กันยายน 2555 จำนวน 2 แผน คือ แผนฯ อะฟลาทอกซินในข้าวโพดและถั่วลิสง ดำเนินการ 1 รอบต่อปี และแผนฯ สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในไขมันสัตว์ ดำเนินการ 1 รอบต่อ 18 เดือน

3. ผลการดำเนินการ ในช่วงตุลาคม 2555 ถึงกันยายน 2556:

3.1 วางแผนการขอขยายการรับรองความสามารถผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญเพิ่มเติม โดยกำหนดตัวชี้วัด คือ จำนวนแผนที่ได้รับการรับรองเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 5 แผน ภายในเดือนกันยายน 2556 จากประสบการณ์การได้รับการรับรองในปี 2555 จึงกำหนดเป้าหมาย และเลือกแผนทดสอบความชำนาญที่มีความพร้อม ได้แก่ แผนฯ การวิเคราะห์น้ำทางเคมี แผนฯ การวิเคราะห์โลหะในน้ำ แผนฯ การวิเคราะห์วัตถุกันเสียในอาหาร แผนฯ การวิเคราะห์สีสังเคราะห์ในอาหาร และแผนฯ การวิเคราะห์กาเฟอีนในเครื่องดื่ม พร้อมนี้ต้องดำรงรักษาสถานภาพการได้รับการรับรองเดิม โดยมีกิจกรรมสำคัญ ดังนี้

3.1.1 ประชุมวางแผนโดยคณะกรรมการที่ปรึกษาวิชาการ ในวันที่ 9 ตุลาคม 2555 และจัดทำเอกสารรายละเอียดแผนจากมติที่ประชุม

3.1.2 ฝึกอบรมบุคลากรที่เกี่ยวข้อง หลักสูตร ข้อกำหนด ISO/IEC 17043: 2010 และสถิติที่ใช้ตามมาตรฐาน ISO 13528: 2005 โดยอบรมภายใน 2 ครั้ง 4 วัน มีผู้เข้าอบรม จำนวน 25 คน

3.2 สำรวจความพึงพอใจผู้ใช้บริการ โดยการส่งแบบสำรวจความพึงพอใจ จำนวน 90 ชุด ทางไปรษณีย์ ในช่วงเดือนธันวาคม 2555 ได้รับการตอบกลับมา 49 ชุดคิดเป็นร้อยละ 54 นำผลการสำรวจเข้าประชุมทบทวนบริหาร

3.3 ตรวจสอบติดตามคุณภาพภายในข้อกำหนดด้านวิชาการ รวมทั้งการเฝ้าดูการเตรียมแบ่งบรรจุและแจกจ่ายตัวอย่าง จำนวน 6 แผน ยกเว้น แผนฯ สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในไขมันสัตว์ ซึ่งไม่มีการเตรียมตัวอย่างในปีนี้ คือ

- แผนฯ วัตถุเจือปน (กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิก) ในอาหาร ตรวจวันที่ 28 มกราคม 2556
- แผนฯ กาแฟอินในเครื่องดื่ม ตรวจวันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2556
- แผนฯ อะฟลาทอกซินในข้าวโพดและถั่วลิสง ตรวจวันที่ 24 เมษายน 2556
- แผนฯ สีสังเคราะห์ในอาหาร ตรวจวันที่ 21 พฤษภาคม 2556
- แผนฯ น้ำเค็ม ตรวจวันที่ 6 มิถุนายน 2556
- แผนฯ โลหะในน้ำ ตรวจวันที่ 26 กรกฎาคม 2556

พบข้อบกพร่อง 2 ข้อ แก้ไขแล้วเสร็จภายในเวลาที่กำหนด (30 วัน)

ส่วนข้อกำหนดด้านบริหาร ตรวจสอบติดตามเมื่อวันที่ 21 มิถุนายน 2556 พบข้อบกพร่อง 3 ข้อ แก้ไขแล้วเสร็จภายในเวลาที่กำหนด

3.4 ประชุมทบทวนบริหาร เมื่อวันที่ 18 มีนาคม 2556

3.5 ยื่นขอรับรอง กรอกเอกสารประกอบคำขอรับรองฯ และจัดส่งเอกสารที่กำหนด ในช่วงเดือนมีนาคม 2556 ทั้งนี้เพื่อเฝ้าระวังข้อบกพร่องที่ได้รับการรับรองแล้วจำนวน 2 แผน และเพื่อขยายขอบข่าย จำนวน 5 แผนหน่วยรับรอง ตรวจประเมินวันที่ 2-3 กรกฎาคม 2556 พบข้อบกพร่องด้านบริหาร 4 ข้อ และด้านวิชาการ 5 ข้อ คือ ข้อบกพร่องที่ไม่เป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043: 2010 คือ ข้อ 5.1 องค์การ (2 ข้อ) ข้อ 5.3 การควบคุมเอกสาร ข้อ 5.14 การตรวจสอบติดตามคุณภาพภายใน ข้อ 4.4 การออกแบบ ข้อ 4.6 การดำเนินการ (2 ข้อ) และ ข้อ 4.8 รายงาน พบข้อสังเกต 4 ข้อ ผู้จัดการคุณภาพและผู้ประสานแผนฯ แก้ไขข้อบกพร่องและส่งเอกสารหลักฐานวันที่ 5 สิงหาคม 2556 และหน่วยรับรองพิจารณาให้การรับรองวันที่ 19 กันยายน 2556 เพิ่มขึ้นอีก 5 แผน รวมได้รับรอง 7 แผน ในการให้บริการ รวมมีห้องปฏิบัติการสมาชิกทั้งภาครัฐและเอกชน รวมมากกว่า 100 แห่ง โดยจำนวนสมาชิกของแต่ละแผนฯ แตกต่างกัน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ชื่อแผนทดสอบความชำนาญ วันที่ได้รับการรับรอง และจำนวนห้องปฏิบัติการสมาชิก

วันที่ได้รับรอง	แผนทดสอบความชำนาญ	จำนวนสมาชิก (ห้องปฏิบัติการ)		
		2554	2555	2556
18 กันยายน 2555	1. การวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืชออร์กาโนคลอรีนในไขมันสัตว์	16	17	-*
	2. การวิเคราะห์อะฟลาทอกซินในข้าวโพดและถั่วลิสง	41	43	40
19 กันยายน 2556	3. การวิเคราะห์น้ำทางเคมี (สารทั้งหมด ความกระด้างทั้งหมด คลอไรด์ ฟลูออไรด์ไนเตรท และซัลเฟต)	78	80	83
	4. การวิเคราะห์โลหะในน้ำ (สารหนู แคดเมียม เหล็ก แมงกานีส ตะกั่ว และทองแดง)	44	49	45
	5. การวิเคราะห์กาเฟอีนในเครื่องดื่ม	19	21	28
	6. การวิเคราะห์วัตถุเจือปนในเครื่องดื่ม (สีอินทรีย์สังเคราะห์)	25	24	25
	7. การวิเคราะห์วัตถุเจือปนในอาหารเหลวและกึ่งเหลว (กรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิก)	28	33	33

* ไม่มีการดำเนินการในปี 2556

วิจารณ์

บทบาทหน้าที่ของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในฐานะห้องปฏิบัติการวิเคราะห์หัตถ์เพื่อใช้ข้อมูลในการควบคุมคุณภาพอาหารตามพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 มีบุคลากรที่มีความรู้ความสามารถ มีการสั่งสมประสบการณ์ในการวิเคราะห์อาหาร ได้รับการยอมรับจากต่างประเทศ เช่น ได้รับมอบหมายจากสถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติให้ทำหน้าที่การวัดแทนหรือที่เรียกว่า Designated Institute ด้านการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในอาหาร ในปี พ.ศ. 2553 และได้รับแต่งตั้งเป็น ASEAN Food Reference Laboratory (AFRL) ด้านโลหะหนักในอาหาร และได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 มาตั้งแต่ปี 2550 จนถึงปี 2556 ได้รับการรับรองแล้วถึงจำนวน 224 รายการ⁽⁶⁾ ซึ่งความสามารถที่ได้มีการนำมาใช้ในการให้บริการทดสอบความชำนาญฯ อาหารและน้ำทั้งด้านเคมีและด้านจุลชีววิทยา โดยในปี พ.ศ. 2556 มีการให้บริการจำนวน 10 แผน มีห้องปฏิบัติการที่เป็นสมาชิกจำนวนมากกว่า 200 แห่งทั้งในประเทศและประเทศเพื่อนบ้านในภูมิภาคอาเซียน ห้องปฏิบัติการสมาชิกจะได้ประโยชน์จากการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญอย่างสม่ำเสมอ คือ มีหลักฐานการควบคุมคุณภาพจากภายนอก (independent evidence) แสดงความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการใช้เป็นประจำ และเป็นเครื่องมือ (tool) ในการพัฒนาความสามารถห้องปฏิบัติการหากพบว่าผลการประเมินไม่น่าพอใจ และในบางโปรแกรมที่ค่า assigned value เป็นค่าอ้างอิงรับรอง ยังสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการพัฒนาความถูกต้อง (accuracy) และความสอบกลับได้ของการวัด (traceability of measurement) อีกด้วย ในด้านเศรษฐกิจ การเข้าร่วมทดสอบความชำนาญกับกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เอื้อประโยชน์ในการลดค่าใช้จ่ายจากการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญกับต่างประเทศ ดังจะเห็นได้จากการเข้าร่วมแผนฯ อะพลาทอกซินกับโปรแกรม FAPAS® ราคามากกว่า 20,000 บาท ในขณะที่ค่าใช้จ่ายในการเข้าร่วมทดสอบกับกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ราคา 2,000 บาท สามารถประหยัดได้ถึง 1 ใน 10 โดยได้รับการที่เท่าเทียมกันในด้านคุณภาพของการดำเนินการและคำแนะนำทางวิชาการ ดังนั้น สมาชิกที่มีมากกว่า 200 ห้องปฏิบัติการจึงสามารถประหยัดเงินตราที่เป็นค่าใช้จ่ายในการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญกับต่างประเทศได้อย่างมาก

มาตรฐาน ISO/IEC 17043: 2010 เป็นมาตรฐานนานาชาติที่มีข้อกำหนดทั่วไปเพื่อแสดงความสามารถของผู้ดำเนินการทดสอบความชำนาญและสำหรับการรับรอง เนื่องจากข้อกำหนดด้านบริหารสอดคล้องกับ ISO/IEC 17025: 2005 เมื่อ สคอ. ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการที่มีการให้บริการทดสอบที่ใช้ระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025 และได้รับการรับรอง ตั้งแต่ พ.ศ. 2550 มีความมุ่งหมายในการขอการรับรองระบบคุณภาพทดสอบความชำนาญ จึงมีปัจจัยสนับสนุนให้สามารถวางแผนและกำหนดเป้าหมายการพัฒนาได้ โดย สคอ. มี เอกสารคุณภาพและขั้นตอนการปฏิบัติงานของระบบ ISO/IEC 17025 เมื่อนำมาศึกษา พบว่า ในบางข้อกำหนดสามารถใช้เอกสารขั้นตอนการปฏิบัติงานร่วมกันได้ เช่น การพัฒนาบุคลากร การจัดซื้อวัสดุและบริการ ส่วนข้อกำหนดอื่นที่ไม่ครอบคลุมการดำเนินการทดสอบความชำนาญ ต้องจัดทำเพิ่มเติมให้สอดคล้องกับมาตรฐานและเงื่อนไขของหน่วยรับรอง เนื่องจาก สคอ. เป็นหน่วยงานขนาดใหญ่ มีข้าราชการและพนักงานรวมประมาณ 200 คน มีห้องปฏิบัติการถึง 11 ห้อง เพื่อให้บรรลุเป้าหมายการบริหารและนาระบบคุณภาพ ISO/IEC 17043 มาใช้ จึงจำเป็นต้องแต่งตั้งผู้จัดการคุณภาพ และทีมงานผู้จัดการวิชาการ ของกิจกรรมทดสอบความชำนาญขึ้นแยกจากระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025 ผู้จัดการคุณภาพมีหน้าที่ในการผลักดันให้มีการใช้ระบบคุณภาพและติดตามเฝ้าระวัง ตรวจสอบตลอดเวลาและรับผิดชอบในการจัดทำทบทวน แก้ไข เอกสารคุณภาพ ดำเนินการตรวจติดตามคุณภาพภายในอย่างมีประสิทธิภาพ จัดให้มีการประชุมทบทวนบริหาร และประสานงานกับหน่วยรับรอง รวมทั้งการแก้ไขข้อบกพร่องที่ได้รับ ในส่วนการให้บริการผู้จัดการคุณภาพรับผิดชอบในการรับข้อร้องเรียนเพื่อปรับปรุงบริการ ดำเนินการสำรวจความพึงพอใจหรือประชุมร่วมกับสมาชิก นอกจากนั้น ยังเป็นผู้ทบทวนและอนุมัติรายงานการประเมินผลสมาชิก ผู้จัดการคุณภาพและทีมงานวิชาการจึงจำเป็นต้องเป็นผู้มีความรู้ในข้อกำหนดสามารถตีความข้อกำหนดมาสู่การปฏิบัติและประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมกับหน่วยงาน และมีความรู้และประสบการณ์ด้านเทคนิคการวิเคราะห์และสถิติ

นอกเหนือจากการดำเนินงานด้านบริหารจัดการตามข้อกำหนดแล้ว ข้อกำหนดด้านวิชาการ ข้อ 4.1 ได้ให้ความสำคัญกับความสามารถ (competence) ของ PTP และมี Note ว่า ISO/IEC 17025 สามารถใช้แสดงถึงความสามารถของห้องปฏิบัติการที่ทำหน้าที่ทดสอบ PT items ได้ เนื่องจากหน่วยงานมีนโยบายไม่จ้างเหมาช่วงแก่ Sub-contractor ในกิจกรรมใดๆ ซึ่งใน ISO/IEC 17043: 2010 ข้อ 5.5.1 กำหนดว่าต้องไม่จ้างเหมาช่วง 3 กิจกรรม คือ การวางแผน การประเมินผล และการอนุมัติรายงาน จึงดำเนินการทุกกิจกรรม ในการกำหนดเป้าหมายการขอรับรองในแต่ละปี จึงเลือก scheme ที่รายการทดสอบที่ใช้ในการประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวได้รับการรับรอง ISO/IEC 17025 แล้ว

ข้อกำหนดด้านวิชาการ ข้อ 4.4 การออกแบบ PT scheme ระบุถึงการจัดทำเอกสารการวางแผนดำเนินงาน PT scheme (ข้อ 4.4.1) โดยใช้หลักฐานรายการการประชุมคณะกรรมการที่ปรึกษาวิชาการ ซึ่งระบุรายละเอียดหัวข้อการประชุมครบถ้วนตามที่กำหนดไว้ภายใต้ข้อ 4.4.1.3 a) ถึง u) ในส่วนข้อกำหนดที่ระบุถึงการเตรียม PT items ในแต่ละ PT scheme ได้จัดทำเอกสารขั้นตอนการเตรียม การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว และวิธีการสถิติที่เหมาะสมมาประเมิน โดยใช้วิธีและเกณฑ์ที่กำหนดใน ISO 13528: 2005 หรือ IUPAC 2006⁽¹¹⁾ ความเป็นเนื้อเดียวกันจะถูกทดสอบและประเมินผลหลังจากแบ่งบรรจุและก่อนส่งให้สมาชิกทุกโปรแกรม ซึ่งผลต้องผ่านเกณฑ์ยอมรับ จึงจะจัดส่งให้สมาชิก และความคงตัวจะถูกทดสอบในสถานะต่างๆ ตามความเหมาะสม เช่น ทดสอบสถานะส่ง โดยทดสอบหลังนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิภายนอกห้องปฏิบัติการ 3 วัน หรือทดสอบตัวอย่าง หลังจากเก็บในอุณหภูมิต่ำกว่า -15°C จนถึงสัปดาห์สุดท้ายของเวลาที่กำหนด เป็นต้น ดังนั้นจึงยืนยันความมั่นใจกับสมาชิกว่า PT items ที่ได้รับมีคุณสมบัติเหมาะสมมีความเป็นเนื้อเดียวกันและคงตัวเพียงพอในช่วงเวลาที่กำหนดให้สมาชิกส่งผล หากมีผลของการประเมินไม่เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด ก็จะมีขั้นตอนการปฏิบัติโดยต้องให้ข้อมูลแก่สมาชิกในรายงานฉบับสมบูรณ์ และต้องนำความไม่คงตัวมาประมาณค่า Measurement uncertainty ของค่า assigned value

ค่า assigned value เป็นค่าที่ถูกนำมาใช้ในการเปรียบเทียบกับผลของสมาชิก เพื่อประเมินสมาชิกนั้น ในโปรแกรมที่ได้รับการรับรอง ส่วนใหญ่ใช้ค่า Robust average โดยใช้สถิติ Algorithm A ตาม ISO 13528: 2005 ซึ่งมีความเหมาะสมเนื่องจากจำนวนสมาชิกค่อนข้างมาก คือ มากกว่า 30 แห่ง ยกเว้นโปรแกรมทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืชออร์กาโนคลอรีนในไขมัน⁽¹²⁾ ใช้ค่าอ้างอิงรับรอง (Certified reference value) จากการวิเคราะห์โดยวิธี Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS) ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ขั้นสูงทางมาตรวิทยา ค่า assigned value ถือเป็นค่าจริง (true value) มีความไม่แน่นอนน้อยซึ่งหมายถึงมีสายโซ่ของการสอบกลับได้ที่สั้นเข้าใกล้ SI Unit และในโปรแกรมนี้อย่างยิ่งขอให้สมาชิกรายงานค่าความไม่แน่นอนของค่าที่รายงานมาด้วย เพื่อเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงโดยใช้ E_n -score ซึ่งสามารถชี้บ่งความสมเหตุสมผลของแหล่งความไม่แน่นอนที่สมาชิกลำมาประเมินได้

การเฝ้าระวัง (monitor) ระบบคุณภาพที่ใช้ โดยการตรวจติดตามภายในอย่างมีประสิทธิภาพ ดำเนินการโดยบุคลากรที่เป็นอิสระจากกิจกรรมนั้นๆ และได้รับการฝึกอบรม ในข้อกำหนดข้อ 5.14.1 กำหนดว่าต้องตรวจติดตามครอบคลุมทุกข้อกำหนด รวมทั้งการเตรียม การจัดเก็บและการแจกจ่ายตัวอย่าง PT items รวมทั้งกระบวนการรายงาน ดังนั้นการวางแผนตรวจติดตามจึงต้องสอดคล้องกับช่วงเวลาการเตรียมตัวอย่างของแต่ละแผน จากการตรวจติดตามภายในช่วงปี 2554 ถึง 2556 ผลพบข้อบกพร่องด้านบริหารรวม 9 ข้อ และด้านวิชาการรวม 9 ข้อ สิ่งที่เป็นปัญหาคือความไม่เป็นปัจจุบันของคำสั่งต่างๆ โครงสร้างองค์กร ขั้นตอนการปฏิบัติงาน หรือ Standard Operation Procedure (SOP) ไม่ครบถ้วนไม่เป็นปัจจุบัน จึงหาสาเหตุที่แท้จริงและป้องกันการเกิดซ้ำ โดยกำหนดแผนการทบทวนปรับปรุงคำสั่งต่างๆ ในเดือนตุลาคม เพื่อให้สอดคล้องกับวาระการเปลี่ยนแปลงบุคลากรของราชการ และกำหนดแผนทบทวนเอกสารคู่มือ/ขั้นตอนในเดือนกรกฎาคมของทุกปี การตรวจติดตามคุณภาพภายในกำหนดให้ดำเนินการอย่างน้อย 1 ครั้งต่อปี แต่หากมีปัญหาหรือข้อร้องเรียน จำเป็นต้องมีการตรวจติดตามเพิ่มเติม

การรับรองความสามารถ (accredit) การทดสอบความชำนาญ ดำเนินการโดยหน่วยรับรอง (accreditation body) ในประเทศไทยหน่วยรับรองผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญคือ กรมวิทยาศาสตร์บริการ ซึ่งได้ลงนามข้อตกลงว่าด้วยการยอมรับร่วม (Mutual Recognition Arrangement, MRA) กับ Asia Pacific Laboratory Accreditation Cooperation, (APLAC) และ International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) เมื่อ พ.ศ. 2549⁽¹²⁾ มีข้อกำหนดเพิ่มเติมจากมาตรฐาน ISO/IEC 17043 คือ กำหนดให้มีการตรวจติดตามคุณภาพภายในทุกกิจกรรมให้ครบถ้วนภายใน 1 ปี มีการทบทวนระบบบริหารงานคุณภาพอย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง และมีการเก็บรักษาระบบที่ระบบคุณภาพไม่น้อยกว่า 3 ปี 6 เดือน⁽⁷⁾ ในการรับรองคณะผู้ตรวจประเมิน ประกอบด้วยผู้ตรวจประเมินระบบ และผู้ตรวจประเมินวิชาการที่มีความรู้ด้านสถิติ ตรวจประเมินห้องปฏิบัติการ ในปี พ.ศ. 2555 และ 2556 โดยได้พบข้อบกพร่อง และข้อสังเกต ทำให้มีโอกาสในการปรับปรุงระบบการดำเนินการที่สำคัญ คือ สถิติใช้ในการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของตัวอย่าง PT items ทำให้บุคลากรได้นำมาตรฐาน ISO 13528: 2005 และ IUPAC 2006 มาศึกษาและปรับใช้ให้เหมาะสมกับสภาพตัวอย่างอาหารที่มีสารปนเปื้อนปริมาณน้อย เช่น อะฟลาทอกซินในข้าวโพดและถั่วลิสงที่ใช้ตัวอย่างที่ปนเปื้อนตามธรรมชาตินำมาผสมกับตัวอย่างที่ไม่มีการปนเปื้อนให้ได้ปริมาณระดับที่ต้องการ และได้จัดทำเอกสาร SOP สถิติที่ใช้ในการทดสอบความชำนาญ ระเบียบวิธีการทางสถิติอย่างละเอียดพร้อมตัวอย่างการคำนวณในทุกขั้นตอน ได้แก่ การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน โดยทดสอบความแตกต่างภายในตัวอย่าง (within sample variation) ทดสอบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง (between sample variation) การทดสอบความคงตัว การหาค่ากำหนด การคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบความชำนาญ (σ_{PT}) และการคำนวณ performance statistics และได้จัดการฝึกอบรมภายในให้ผู้ประสานแผนฯ ได้เข้าใจ และสามารถปฏิบัติได้อย่างถูกต้อง

ปัจจัยที่เอื้อต่อการพัฒนาระบบคุณภาพการทดสอบความชำนาญจนประสบผลสำเร็จ คือ วิสัยทัศน์ของผู้บริหารและนักวิชาการระดับสูงของกรมฯ ในการนำระบบคุณภาพมาใช้ตั้งแต่มกราคม พ.ศ. 2540 พร้อมทั้งส่งเสริมสนับสนุนการพัฒนาศูนย์กลาง ในส่วนของสำนักฯ บุคลากรที่เกี่ยวข้องทุกระดับ มีส่วนสำคัญต่อความสำเร็จ โดยเฉพาะผู้อำนวยการ ทั้งในอดีตและปัจจุบัน ซึ่งเป็นผู้บริหารสูงสุดของระบบ ทุกคนล้วนได้ให้ความสำคัญ ตระหนักถึงบทบาทหน้าที่ของตนในระบบคุณภาพ มีการวางแผนอย่างชัดเจน และมุ่งมั่นในการดำเนินการสู่เป้าหมายที่ตั้งไว้ การใช้กระบวนการสื่อสารอย่างเหมาะสมภายในทีมงาน การพูดคุยปรึกษาหารืออย่างไม่เป็นทางการ และการประชุมตามวาระที่กำหนด ความสามัคคีร่วมแรงร่วมใจ เป็นส่วนสำคัญอีกส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิดการพัฒนาปรับปรุงอย่างต่อเนื่องและยั่งยืน ในปีงบประมาณ 2557 จึงวางแผนขยายขอบข่ายการให้บริการการทดสอบความชำนาญการวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาและขอรับรองเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่ายังมีปัญหาและอุปสรรคบ้าง ได้แก่ ภาระและปริมาณงานที่เพิ่มขึ้นจากแผนงานที่วางไว้ ในกรณีการเกิดเหตุภัยพิบัติธรรมชาติ น้ำท่วม การเกิดปัญหาสารพิษสารปนเปื้อนในอาหารฉับพลันซึ่งมีผลกระทบต่อผู้บริโภคในประเทศ ซึ่ง สคอ.ต้องมีส่วนในการแก้ไขและบรรเทาปัญหาอย่างเร่งด่วน นอกจากนั้นงบประมาณของหน่วยงานที่มีจำกัดเป็นอุปสรรคสำคัญในการพัฒนาระบบสารสนเทศที่ทันสมัย

สรุป

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ได้ดำเนินการพัฒนาระบบคุณภาพการทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์อาหารเพื่อให้สอดคล้องกับมาตรฐานสากล ISO/IEC 17034: 2010 ในช่วง พ.ศ. 2554 ถึง 2556 โดยการวางแผน กำหนดเป้าหมาย ดำเนินการใช้ระบบคุณภาพ ตรวจติดตามคุณภาพภายใน ขอรับรองความสามารถผู้จัดโปรแกรมกับกรมวิทยาศาสตร์บริการ และได้รับการรับรองใน พ.ศ. 2555 จำนวน 2 แผน และมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องจนได้รับการรับรองใน พ.ศ. 2556 เพิ่มขึ้นจำนวน 5 แผน รวม 7 แผน ทำให้มีหลักประกันได้ว่าสมาชิก

จะได้รับบริการที่มีคุณภาพจากผู้จัดที่มีความรู้และประสบการณ์ในการวิเคราะห์อาหารและน้ำ ได้รับตัวอย่างที่มีความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวที่ยอมรับได้ มีการรักษาความลับสมาชิก ได้รับรายงานที่ประเมินผลโดยวิธีทางสถิติที่เหมาะสมและมีคำแนะนำทางวิชาการที่ดี ซึ่งเป็นการเสริมสร้างคุณภาพของห้องปฏิบัติการด้านอาหารและแสดงถึงการพึ่งพาตนเองได้อย่างยั่งยืน

เอกสารอ้างอิง

1. กฎกระทรวงแบ่งส่วนราชการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2552 ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 126 ตอนที่ 98 ก (ลงวันที่ 28 ธันวาคม 2552).
2. ISO/IEC 17025: 2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 2nd ed. Geneva, Switzerland: ISO; 2005.
3. กนกพร อธิสุข, อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์. การสอบเทียบผลวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน ในตัวอย่างข้าวโพด ถั่วลิสง และ นม. ว กรมวิทย์ พ 2543; 42(1): 10-9.
4. Thompson M, Wood R. The international harmonized protocol for the proficiency testing of (chemical) analytical laboratories. J AOAC Int 1993; 76(4): 926-940.
5. ISO/IEC Guide 43-1: 1997. Proficiency testing by interlaboratory comparisons --Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes. Geneva, Switzerland: ISO; 1997.
6. ISO/IEC Guide 43-2: 1997. Proficiency testing by interlaboratory comparisons -- Part 2: Selection and use of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies. Geneva, Switzerland: ISO; 1997.
7. ISO/IEC 17043: 2010. Conformity assessment -- General requirements for proficiency testing. Geneva, Switzerland: ISO; 2010.
8. สำนักบริหารและรับรองห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ. ข้อกำหนด กฎระเบียบ และเงื่อนไขการรับรองความสามารถ ผู้จัดโปรแกรมการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการ (LA-R-06). กรุงเทพฯ : กรมวิทยาศาสตร์บริการ; 2555.
9. สันตกิจ นิลอุตมศักดิ์, ปราณี นาคประสิทธิ์, มงคล เจริญจิตกุล. การพัฒนาระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 ของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร. ว กรมวิทย์ พ 2556; 55(2): 63-77.
10. ISO 13528: 2005. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. Geneva, Switzerland: ISO; 2005.
11. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC technical report). Pure Appl Chem 2006; 78(1): 145-96.
12. วิชาดา จงมีวาสนา, รัตยากร ศรีโคตร, กนกพร อธิสุข. การประเมินความสามารถห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในไขมัน. ว กรมวิทย์ พ 2554; 53(2): 113-30.
13. สำนักบริหารและรับรองห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ. [ออนไลน์]. 2558; [สืบค้น 1 มกราคม 2558]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://www.dss.go.th/index.php/2012-06-24-18-31-45/2012-06-25-07-43-32.html>

Development of Proficiency Testing Quality System on Food and Water Analysis (2011–2013)

Kanokporn Atisook Jitpaka Suntudrob and Wischada Jongmevasana

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

ABSTRACT Proficiency testing (PT) on food and water analysis is a major component in quality assurance of food testing laboratories. It provides external independent evidence of the validity and comparability of measurement result based on the interlaboratory comparison approach. It can ensure that laboratory's customer can use the analysis results for control, improvement, importing or exporting their food products. There is not many domestic proficiency testing providers in Thailand at present and their services are in limited test. Testing laboratories are necessary to participate in PT programs from foreign countries and their costs are high. Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences has developed and managed its quality system to comply with ISO/IEC 17043: 2010 requirements and has been accredited by Department of Sciences Services since September 2012. The process of quality system development concludes planning and setup target achievement, preparing and request for accreditation, maintaining accreditation status and continuous improvement. ISO/IEC 17043 accreditation can show that accredited PT provider is competence to operate PT schemes on a consistent basis. The advantages of PT provider accreditation also include confidentiality of laboratory participants to get accurate and qualified services and reduction of cost compare to foreign PT. Result of PT participation from accredited PT provider therefore can be objective evidence of competent laboratory for ISO/IEC 17025: 2005 accreditation. The achievement of quality system development from 2011 to 2013 can be used as guidance for other PT providers.

Key words: Proficiency testing, Food and water analysis, ISO/IEC 17043: 2010, accreditation

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ในอาหาร โดย LC-MS/MS

ทองสุข ปายะนันท์ และลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ได้พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ในอาหาร จำนวน 4 ชนิด ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่มีการใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์ คือ furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin และ nitrofurazone โดยสารกลุ่มนี้จะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็ว และตกค้างในเนื้อสัตว์ในรูปอนุพันธ์ (metabolites) ได้แก่ 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD) และ semicarbazide (SEM) ซึ่งกลุ่มสหภาพยุโรป (EU) ประกาศห้ามใช้สารกลุ่มนี้ เนื่องจากแนวโน้มเป็นสารก่อมะเร็ง การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างได้ถูกพัฒนาโดยวิธี LC-MS/MS โดยการย่อยตัวอย่างด้วยกรด hydrochloric เจือจาง เพื่อให้สารตกค้างหลุดออกจากส่วนที่จับอยู่กับโปรตีนในตัวอย่าง พร้อมทั้งทำปฏิกิริยา derivatization แล้วทำการสกัดด้วย ethyl acetate หลังจากนั้นดึงไขมันออกด้วย hexane ตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง LC-MS/MS วิธีดังกล่าวมีขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ของ AOZ และ AMOZ เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม AHD และ SEM เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อกรัม ค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ของ AOZ และ AMOZ เท่ากับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกรัม AHD และ SEM เท่ากับ 1.0 ไมโครกรัมต่อกรัม ช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (linear working range) เท่ากับ 0.3-5.0 ไมโครกรัมต่อกรัม โดยมีค่า correlation coefficient ในช่วง 0.9978-0.9999 โดยมีความแม่นยำ (accuracy) แสดงด้วยค่าเฉลี่ย % recovery อยู่ในช่วง 65-120% และความเที่ยง (precision) แสดงด้วย %RSD อยู่ในช่วง 0.1-15.2 จากการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีพบว่าเป็นไปตามหลักเกณฑ์และเงื่อนไขที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กำหนด และเกณฑ์การควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์ที่ European Communities กำหนด ได้ดำเนินการสำรวจปริมาณการตกค้างของสารไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ในเนื้อสัตว์ เครื่องใน สัตว์น้ำ น้ำผึ้ง นมผง ไข่ผง และแป้ง ในช่วงปี พ.ศ. 2554-2556 รวมทั้งสิ้น 579 ตัวอย่าง ตรวจพบ 13 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.2 ตรวจพบ AOZ และ SEM ในสัตว์น้ำ 8 ตัวอย่าง ปริมาณที่ตรวจพบ น้อยกว่า 1.0 - 2.4 และ 2.2 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และพบ SEM ในนมผง ไข่ผง และแป้ง 5 ตัวอย่าง ปริมาณที่ตรวจพบ น้อยกว่า 1.0 - 3.5 ไมโครกรัมต่อกรัม

บทนำ

สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ ประกอบด้วย ฟุราโซลิโดน (furazolidone) ฟุรัลทาโดน (furaltadone) ไนโตรฟูราโซน (nitrofurazone) และไนโตรฟูรานโทอิน (nitrofurantoin) ซึ่งเป็นยาเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial agent) ที่สังเคราะห์ขึ้นนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการรักษาโรคติดเชื้อภายในลำไส้ โรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และโรคผิวหนังติดเชื้อในสัตว์ เช่น วัว ควาย สุกร เป็ด ไก่ ปลา และกุ้ง⁽¹⁾ ตลอดจนใช้เป็นยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียในการเลี้ยงผึ้ง สูตรโครงสร้างของสารกลุ่มนี้ประกอบไปด้วยวงแหวนฟูแรนส์เกาะด้วยไนโตรกรุป เรียกว่า 5-nitro-furaldehyde มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส ละลายน้ำได้เล็กน้อย และจะถูกละลายอย่างรวดเร็วในสัตว์ กลายเป็น metabolites ซึ่งจะจับตัวตามเนื้อเยื่อต่างๆ เรียกว่า tissue-bound metabolites หรือ protein-bound metabolites ซึ่งมีความคงตัวกว่า parent drugs และจะตกค้างในเนื้อเยื่อของสัตว์ ซึ่ง metabolites ของฟุราโซลิโดน ฟุรัลทาโดน ไนโตรฟูรานโทอิน และไนโตรฟูราโซน คือ 3-amino-2-oxazolididone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD) และ semicarbazide (SEM) ตามลำดับ ซึ่งสารกลุ่มนี้มีแนวโน้มเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogenic) และทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสัตว์ (genotoxic) ถ้าได้รับการบริโภคในระยะเวลาอันยาวนาน เป็นผลทำให้ในหลายประเทศ เช่น อเมริกา ออสเตรเลีย แคนาดา ญี่ปุ่น สิงคโปร์ และประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป (EU) ประกาศห้ามใช้สารกลุ่มนี้กับสัตว์ที่ใช้เป็นอาหาร⁽²⁾ ประเทศไทยได้มีการประกาศห้ามใช้สารกลุ่มนี้ผสมในอาหารเพื่อการเลี้ยงสัตว์เช่นกัน ปี พ.ศ. 2541 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้ออกประกาศห้ามใช้สารเคมีภัณฑ์ชนิดฟุราโซลิโดนและไนโตรฟูราโซนผสมในอาหารและห้ามนำเข้าอาหารสัตว์ที่มีส่วนผสมของสารนี้ ต่อมาในปี พ.ศ. 2542 ประกาศดังกล่าวได้รับการปรับให้ครอบคลุมสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ทั้งหมด⁽³⁾ ปี พ.ศ. 2536 กระทรวงสาธารณสุขได้ออกประกาศฉบับที่ 151 เรื่อง กำหนดวัตถุที่ห้ามใช้ในอาหาร โดยกำหนดให้อาหารทุกชนิดต้องตรวจไม่พบการปนเปื้อนของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์⁽⁴⁾ พร้อมกันนี้สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้ออกประกาศ เรื่อง หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร กำหนดว่าจะต้องใช้วิธีตรวจ และห้องปฏิบัติการที่มีความสามารถในการตรวจพบปริมาณสารปนเปื้อนสาร AOZ และ AMOZ ได้อย่างน้อยต่ำกว่า 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม AHD และ SEM ได้อย่างน้อยต่ำกว่า 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม⁽⁵⁾

ในช่วงปี พ.ศ. 2545-2546 สหภาพยุโรปได้แจ้งผ่านระบบการเตือนภัยสำหรับอาหารและผลิตภัณฑ์อาหาร (Rapid Alert System for Food and Food Product, RASFF) ว่าตรวจพบยาปฏิชีวนะกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ตกค้างในกุ้งกุลาดำแช่แข็งและเนื้อไก่แช่แข็งจากประเทศไทย จีน ไต้หวัน อินเดีย เวียดนาม เอกวาดอร์ และบราซิล และในปี พ.ศ. 2547 ถึง 2550 ยังคงตรวจพบการตกค้างของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ โดยเฉพาะ AOZ และ SEM ในอาหารประเภท กุ้ง น้ำผึ้ง ไข่ไก่ แป้ง เนื้อสัตว์บรรจุกระป๋อง และอาหารสำหรับทารก จากกลุ่มประเทศแถบเอเชีย เช่น ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย เวียดนาม จีน อินเดีย บังคลาเทศ ดังนั้นทางกลุ่มสหภาพยุโรปจึงได้ออกมาตรการควบคุมสินค้าจากประเทศดังกล่าวอย่างเข้มงวดตาม Commission Decision 2002 และ Council Directive 96/23/EC^{(6), (7), (8), (9)} โดยให้มีการตรวจสอบสารตกค้างในสินค้าดังกล่าวทุก shipment จากปัญหาดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่าคุณภาพของอาหารที่ประชาชนบริโภคภายในประเทศอาจมีการตกค้างของสารกลุ่มนี้อยู่เช่นกัน

การวิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ตกค้างในอาหาร โดยทั่วไปจะตรวจวัดในรูปของสารอนุพันธ์ที่จับอยู่กับเนื้อเยื่อต่าง ๆ ดังนั้นจึงต้องทำการแยกสารเหล่านี้ออก โดยการย่อยสลายพันธะด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ได้สาร metabolites ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กมากยากต่อการตรวจสอบ ดังนั้นจึงต้องทำให้สารเหล่านี้อยู่ในรูปสารอนุพันธ์ที่มีขนาดของโมเลกุลใหญ่ขึ้นโดยผ่านขบวนการ derivatization โดยสารที่นิยมใช้เป็นตัวทำให้เกิดอนุพันธ์คือ 2-NBA (2-nitrobenzaldehyde) แล้วทำให้สารบริสุทธิ์ (clean up) ซึ่งมีเทคนิคหลายรูปแบบแล้วแต่ความซับซ้อน

ของ matrix นั้นๆ เช่น การใช้ SPE cartridge, liquid-liquid partition เป็นต้น ทำให้เสียเวลาในการเตรียมตัวอย่าง และค่าใช้จ่ายสูง แล้วทำการตรวจวัดชนิดและปริมาณโดยเครื่อง UV photodiode array, ELISA, LC-MS หรือ LC-MS/MS^{(10), (11), (12), (13)} สำหรับงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างจาก McCracken RJ และ Kennedy DG⁽¹⁾ โดยทำการสกัดด้วยวิธี total residue และปรับปริมาณสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอน derivatization ให้เหมาะสม เพียงพอกับสารเป้าหมายที่ต้องการเปลี่ยนเป็นสารอนุพันธ์ (derivative) เท่านั้น และทำให้สารบริสุทธิ์ด้วย hexane ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้สามารถวิเคราะห์ชนิดตัวอย่างได้หลากหลาย เช่น เนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์ แป้ง นมผง ไข่ผง น้ำผึ้ง เตรียมตัวอย่างได้รวดเร็ว ใช้ปริมาณสารเคมีน้อย ประหยัดค่าใช้จ่าย ตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจสอบสารที่มีปริมาณน้อยได้อย่างแม่นยำ

ได้ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธี (method validation) โดยใช้เนื้อกุ้ง เนื้อไก่ น้ำผึ้ง นมผง และไข่ผง เป็นตัวแทน (representative matrix) ทำการวิเคราะห์ method blank, matrix blank, limit of detection, limit of quantitation, linearity and working range, accuracy และ precision ตาม EURACHEM Guide 1998⁽¹⁴⁾ และได้เข้าร่วมการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการในการทดสอบความชำนาญ (Proficiency testing) กับหน่วยงานที่เชื่อถือได้ เพื่อยืนยันว่าวิธีที่ได้มีความถูกต้อง เหมาะสม สามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมาย และเพื่อทราบสถานการณ์การตกค้าง เป็นการเฝ้าระวังความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค นอกจากนี้ยังใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เพื่อป้องกันและเฝ้าระวังการใช้สารเหล่านี้ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

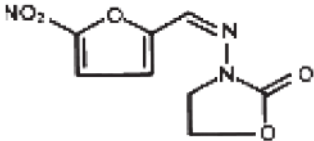
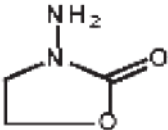
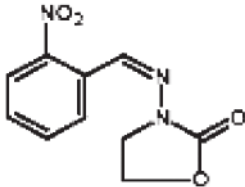
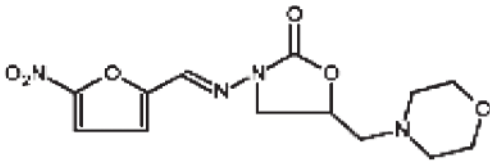
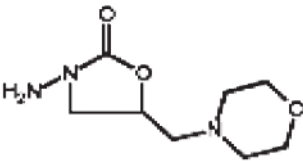
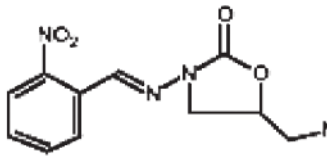
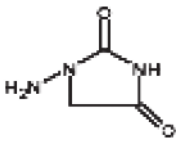
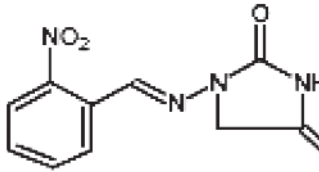
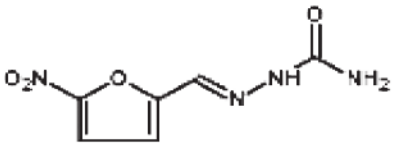
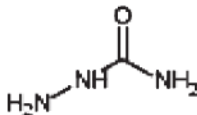
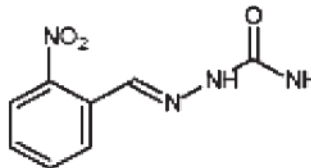
สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน : 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD) (ผลิตภัณฑ์ของ Witega Laboratorien Berlin, purity > 99%), semicarbazide (SEM) (ผลิตภัณฑ์ของ CHEM SERVICE, purity 99%) และ internal standard AOZ-d4 (purity > 98%), AMOZ-d5 และ SEM-¹³C (purity > 99%) ทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์ของ Witega Laboratorien Berlin

สารเคมี : methanol (MeOH), ethylacetate (C₄H₈O₂) และ hexane (C₆H₁₄) เป็น HPLC grade, 2-nitrobenzaldehyde (C₇H₅NO₃), trisodium phosphate dodecahydrate (Na₃PO₄·12H₂O), hydrochloric acid (HCl), sodium hydroxide pellets (NaOH) และ ammonium acetate (CH₃COONH₄) เป็น AR grade (ภาพที่ 1)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง และ 5 ตำแหน่ง, refrigerated centrifuge, vortex mixer, turbo nitrogen evaporator temperature controlled, เครื่องบดเนื้อ, micro pipette ขนาด 10-200, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร, screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร, test tube ขนาด 10 มิลลิลิตร, micro-spin filter tube 0.45 µm PVDF, เครื่อง LC-MS/MS ประกอบด้วย binary pump, autosampler, micro vacuum degasser, thermostated column compartment: Agilent 1100 series, detector ชนิด triple quadrupole mass spectrometer: API 4000 และคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสารคือ zorbax SB C-18 150 mm x 3 mm, 5 µm สำหรับ mobile phase ที่ใช้เป็นระบบตัวทำละลาย 2 ชนิด ซึ่งตัวทำละลาย A คือ 0.5 mM CH₃COONH₄ และตัวทำละลาย B คือ methanol โปรแกรมที่ใช้ในการแยกสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ คือ gradient

Parent compound	Metabolite	Derivative
(a) furazolidone	(b) AOZ	(c) NPAOZ
		
(d) furaltadone	(e) AMOZ	(f) NPAMOZ
		
(g) nitrofurantoin	(h) AHD	(i) NPAHD
		
(j) nitrofurazone	(k) SEM	(l) NPSEM
		

ภาพที่ 1 โครงสร้างของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ และอนุพันธ์ของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์

โดยใช้ flow rate 0.6 ml/min เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 15 นาที โดยมีสภาวะของ mass spectrometer ดังนี้

- ion spray voltage: 5200 Volts
- temperature (TEM): 450 องศาเซลเซียส
- collision gas (CAD): nitrogen: 5 psig
- curtain gas (CUR): 13 psig
- ion spray nebulizer gas (GAS-1): 52 psig
- TIS heater gas (GAS-2): 58 psig
- entrance potential (EP): 10 Volts

สำหรับการวิเคราะห์โดย MS/MS นั้นสารจะถูกทำให้เป็นไอออนบวกโดย electrospray ionization (ESI) ไอออนที่ได้จะถูกวิเคราะห์ด้วย Selective Reaction Monitoring (SRM) mode โดยศึกษา mass ที่ m/z (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 MS/MS fragmentation condition

component	precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	Dwell time (ms)	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
NP-AOZ	236.3 ± 0.5	104.0 ± 0.5 (secondary)	150	40	39	20
NP-AMOX	335.2 ± 0.5	134.1 ± 0.5 (primary)	150	40	24	20
NP-AHD	249.3 ± 0.5	262.0 ± 0.5 (secondary)	150	46	45	5
NP-SEM	209.3 ± 0.5	291.3 ± 0.5 (primary)	150	46	23	8
NP-AOZ-d ₄	240.3 ± 0.5	104.0 ± 0.5 (secondary)	150	58	40	11
NP-AMOX-d ₅	340.2 ± 0.5	134.1 ± 0.5 (primary)	150	58	26	7
NP-SEM- ¹³ C	212.2 ± 0.5	166.2 ± 0.5 (secondary)	150	32	15	24
		192.2 ± 0.5 (primary)	150	32	26	24
		134.1 ± 0.5	150	32	26	24
		296.3 ± 0.5	150	32	26	24
		168.0 ± 0.5	150	32	26	24

ตัวอย่าง

1. การทดสอบความใช้ได้ของวิธี ใช้เนื้อกึ่ง เนื้อไก่ น้ำผึ้ง นมผง และไข่ผง เป็นตัวแทนของกลุ่มเนื้อสัตว์และเครื่องใน เนื้อสัตว์น้ำ น้ำผึ้ง นม ไข่ และแป้งในการทดสอบวิธี
2. การสำรวจปริมาณตกค้างในอาหาร พ.ศ. 2554 - 2556 โดยวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารรวม 579 ตัวอย่าง ได้แก่ เนื้อสัตว์และเครื่องใน 190 ตัวอย่าง เนื้อสัตว์น้ำ 201 ตัวอย่าง น้ำผึ้ง 9 ตัวอย่าง นมผง 83 ตัวอย่าง ไข่ผง 36 ตัวอย่าง และแป้ง 60 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างอาหารตรวจวิเคราะห์ในปี 2554 - 2556

ปี พ.ศ.	ชนิดตัวอย่าง/จำนวนตัวอย่าง					
	เนื้อสัตว์และเครื่องใน	เนื้อสัตว์น้ำ	น้ำผึ้ง	นมผง	ไข่ผง	แป้ง
2554	16	7	5	38	8	4
2555	92	129	2	30	21	26
2556	82	65	2	15	7	30
รวม	190	201	9	83	36	60

วิธีวิเคราะห์

การสกัด (extraction)

ตัวอย่างเนื้อสัตว์ เครื่องในที่บดละเอียด น้ำผึ้ง ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ตัวอย่างนมผง แป้ง และไข่ผง ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม ใส่ในหลอด screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม internal standard, AOZ- d₄, AMOX-d₅ และ SEM-¹³C ที่ระดับ 2.0 ไมโครกรัมต่อกลิลกรัม เติม 0.2 M HCl 5 มิลลิลิตร เขย่าให้พอเข้ากัน

เติม 100 mM 2-NBA 50 ไมโครลิตร ปั่นด้วย vortex mixer ประมาณ 1 นาที และ incubate ที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง นำตัวอย่างตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม 0.3 M $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 ± 0.5 ด้วย 2 M NaOH ปั่นด้วย vortex mixer ประมาณ 1 นาที สกัดด้วย ethyl acetate 10 มิลลิตร และ 5 มิลลิตร ตามลำดับ โดยเขย่าด้วย shaker เบาๆ centrifuge ที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดชั้น organic solvent รวมใส่ในหลอด centrifuge tube ระเหยชั้น organic solvent จนแห้ง

การทำให้สารบริสุทธิ์ (clean - up)

ละลาย residue ด้วย hexane 2 มิลลิตร และสารละลายผสมของ MeOH: 0.5 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (1:1) 1 มิลลิตร สำหรับตัวอย่างเนื้อสัตว์ น้ำผึ้ง และ 500 ไมโครลิตร สำหรับตัวอย่างนมผง แบ่ง ไซ่ง จากนั้นนำไปปั่นด้วย vortex mixer วางทิ้งให้แยกชั้น ดูดชั้น hexane ที่เติม hexane 2 มิลลิตร สกัดซ้ำ เพื่อกำจัดไขมันอีกครั้ง ถ่ายสารละลายตัวอย่างใส่ micro-spin filters นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 5,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลายที่กรองได้ใส่ใน HPLC vials สีขาว นำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณโดยเครื่อง LC-MS/MS

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

เตรียม matrix - matched calibration curve โดยชั่ง matrix blank จำนวน 6 หลอด แล้วเติมสารมาตรฐาน AOZ, AMOZ, AHD และ SEM 6 ระดับความเข้มข้น 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 5.0 ไมโครกรัม ต่อกลิลกรัม เติม internal standard ความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อกลิลกรัม ในทุกหลอด จากนั้นทำการสกัด และทำให้บริสุทธิ์เหมือนการสกัดตัวอย่าง สร้างกราฟมาตรฐาน ระหว่าง (แกน x) อัตราส่วนความเข้มข้นของสารมาตรฐาน และความเข้มข้นของ internal standard (concentration ratio) กับ (แกน y) อัตราส่วนของ peak area ของสารมาตรฐาน และ peak area ของ internal standard (peak area ratio) คำนวณหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson correlation coefficient, r)

วิเคราะห์ method blank และ matrix blank

method blank: สกัดตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาโดยใช้สารเคมีทั้งหมด แต่ไม่มีตัวอย่าง เติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อกลิลกรัม

matrix blank: สกัดเนื้อไก่ เนื้อหมู น้ำผึ้ง นมผง และไซ่ง ตามวิธีวิเคราะห์ เติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อกลิลกรัม

ฉีดสารสกัด method blank และ matrix blank เข้าเครื่อง LC-MS/MS เพื่อดูว่ามี mass หรือ peak รบกวนตรงสารมาตรฐานหรือไม่

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD)

ทดสอบค่า LOD โดยเติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank ปริมาณใกล้เคียงกับระดับที่ต่ำสุดของ matrix matching calibration curve เติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อกลิลกรัม จากนั้นยืนยันค่า LOD โดยทำการทดสอบ 10 ซ้ำ ผลต้องไม่พบ false negative และต้องให้สัญญาณค่า signal/noise >3

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐาน ประมาณ 2 เท่าของ LOD และเติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank วิเคราะห์ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณ % recovery, % RSD และ HORRAT

การทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงการวิเคราะห์ (linearity and working range)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้น 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และเติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง concentration ratio กับ peak area ratio ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด คำนวณหาค่า r

การทดสอบความแม่นยำ และความเที่ยง (accuracy and precision)

ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของการวิเคราะห์ในช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรงโดยเติมสารมาตรฐาน 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.3, 2.0 และ 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมสำหรับ AOZ และ AMOZ ที่ระดับความเข้มข้น 1.0, 2.0 และ 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมสำหรับ AHD และ SEM ในช่วง linear working range และเติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank วิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณค่าเฉลี่ย % recovery, % RSD และ HORRAT โดยประเมินผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีตามเกณฑ์กำหนดดังนี้

ความแม่นยำ (accuracy) กำหนดเกณฑ์ยอมรับโดยค่าเฉลี่ย % recovery อยู่ในช่วง 60 - 120⁽¹⁵⁾ ความเที่ยง (precision) เกณฑ์ยอมรับโดยใช้ HORRAT (Horwitz ratio) ที่ Codex และ EU กำหนดไว้ที่ ≤ 2 โดย HORRAT (Horwitz ratio) คำนวณจาก

$$\text{HORRAT} = \frac{\text{Experimental RSD}_r}{\text{Predicted RSD}_r}$$

การเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ (proficiency testing)

เข้าร่วมการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการในการทดสอบความชำนาญ (proficiency testing) เกณฑ์ยอมรับ $|Z| \leq 2$

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (uncertainty)

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด⁽¹⁶⁾ โดยคำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนทุกแหล่ง รวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด แล้วคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($k = 2$) ในการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตามวิธีที่ได้ทดสอบ

ปริมาณสารที่พบ หน่วยเป็นไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ($\mu\text{g/kg}$) โดยคำนวณความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบจาก standard curve

$$\text{โดยใช้สมการเส้นตรง} \quad Y = aX + b$$

$$\text{ปริมาณของสารที่ตรวจพบ, } C_A (\mu\text{g/kg}) = (Y - b) \times C_{IS} (\mu\text{g/kg}) / a$$

$$\text{โดย } X = \text{concentration ratio, } C_A (\mu\text{g/kg}) / C_{IS} (\mu\text{g/kg})$$

$$Y = \text{peak area ratio}$$

C_A	=	conc. of analyte ($\mu\text{g/kg}$)
C_{IS}	=	conc. of internal standard ($\mu\text{g/kg}$)
a	=	slope ของ calibration curve
b	=	intercept ของ calibration curve

ผล

จากการศึกษาการวิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ AOZ, AMOZ, AHD และ SEM ภายใต้สภาวะที่กำหนด พบว่าสามารถสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง concentration ratio กับ peak area ratio ของสารมาตรฐานดังกล่าวได้ในช่วงความเข้มข้น 0.3–5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้กราฟที่เป็นเส้นตรงมีค่า r ในช่วง 0.9978–0.9999 และเมื่อวิเคราะห์ method blank ของสารเคมีที่ใช้ทั้งหมด และ matrix blank ของตัวอย่างเนื้อกุ้ง เนื้อไก่ น้ำผึ้ง นมผง และไข่ผง ไม่พบ peak ครอบคลุมในช่วงของการตรวจวัดสารเป้าหมาย

ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ AOZ และ AMOZ และ 0.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ AHD และ SEM โดยให้สัญญาณพีคมีค่าสูงกว่า 3 เท่าของ signal to noise ในทุกตัวอย่าง ส่วนค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ AOZ และ AMOZ และ 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ AHD และ SEM ผลการพิสูจน์ค่า LOQ โดยการเติมสารมาตรฐาน วิเคราะห์ 10 ซ้ำ โดยมีค่าความแม่นยำจาก % recovery เฉลี่ยในช่วง 65–117 %, % RSD ในช่วง 0.3–10.9 และความเที่ยงจาก HORRAT ในช่วง 0.01–0.4 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับ LOQ ของ AOZ, AMOZ, AHD และ SEM

ชนิด ตัวอย่าง	Nitrofuran metabolites											
	AOZ (0.3 $\mu\text{g/kg}$)			AMOZ (0.3 $\mu\text{g/kg}$)			AHD (1.0 $\mu\text{g/kg}$)			SEM (1.0 $\mu\text{g/kg}$)		
	%Rec.	%RSD	HORRAT	%Rec.	%RSD	HORRAT	%Rec.	%RSD	HORRAT	%Rec.	%RSD	HORRAT
เนื้อกุ้ง	81.2	5.4	0.2	99.2	2.7	0.1	101.1	4.1	0.1	100.3	1.1	0.04
เนื้อไก่	96.7	4.4	0.1	100.3	0.3	0.01	99.9	4.8	0.1	80.6	5.8	0.2
น้ำผึ้ง	101.7	7.4	0.2	109.4	3.7	0.1	117.3	3.7	0.1	85.5	6.7	0.2
นมผง	93.4	3.7	0.1	99.1	3.8	0.1	65.1	4.7	0.2	86.0	4.5	0.2
ไข่ผง	87.8	9.8	0.1	91.3	10.7	0.2	112.4	3.8	0.1	88.3	10.9	0.4

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and working range) ที่ช่วงความเข้มข้น 0.3–5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้กราฟเส้นตรง มีค่า r ในช่วง 0.9825–0.9999 (ตารางที่ 4) การทดสอบค่าความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 0.3, 2.0 และ 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ AOZ และ AMOZ ที่ระดับความเข้มข้น 1.0, 2.0 และ 5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ AHD และ SEM วิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ พบว่าความแม่นยำที่ประเมินจาก % recovery เฉลี่ยทั้ง 4 ระดับอยู่ในช่วง 61–120% และความเที่ยง (precision) ที่ประเมินด้วย %RSD และ HORRAT อยู่ในช่วง 0.1–15.2 และ 0.0–0.7 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 แสดงความเป็นเส้นตรง ที่ช่วงความเข้มข้น 0.3-5.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ชนิดตัวอย่าง	r			
	AOZ	AMOX	AHD	SEM
กุ้ง	0.9999	0.9976	0.9998	0.9978
ไก่	0.9957	0.9956	0.9985	0.9841
น้ำผึ้ง	0.9978	0.9996	0.9951	0.9998
นมผง	0.9950	0.9973	0.9930	0.9848
ไข่ผง	0.9965	0.9995	0.9957	0.9825

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำ และความเที่ยง ในการวิเคราะห์ AOZ, AMOX, AHD และ SEM

ชนิดตัวอย่าง	สารมาตรฐาน	Spiked level ($\mu\text{g/kg}$)	% Recovery (n=10) Min-Max	Min $\pm$ SD	%RSD	HORRAT
เนื้อกุ้ง	AOZ	0.3	72.3 - 87.0	81.2 $\pm$ 4.4	5.4	0.2
		2.0	88.5 - 100.5	97.0 $\pm$ 5.4	5.6	0.2
		5.0	84.0 - 95.6	90.4 $\pm$ 3.9	4.3	0.2
	AMOX	0.3	95.0 - 120.0	99.2 $\pm$ 2.7	2.7	0.1
		2.0	99.0 - 120.0	102.6 $\pm$ 6.2	6.1	0.2
		5.0	84.4 - 112.6	94.7 $\pm$ 8.7	9.2	0.4
	AHD	1.0	100.0 - 106.0	101.1 $\pm$ 4.1	1.8	0.1
		2.0	119.5 - 120.0	120.0 $\pm$ 0.2	0.1	0.01
		5.0	119.6 - 120.0	120.0 $\pm$ 0.1	0.1	0.0
	SEM	1.0	97.5 - 101.0	100.3 $\pm$ 1.1	1.1	0.04
		2.0	73.0 - 115.0	96.1 $\pm$ 12.7	13.2	0.5
		5.0	70.4 - 74.6	72.8 $\pm$ 1.5	2.1	0.1
เนื้อไก่	AOZ	0.3	86.7 - 100.3	96.7 $\pm$ 4.4	4.5	0.1
		2.0	71.0 - 100.0	91.3 $\pm$ 8.4	9.2	0.5
		5.0	92.8 - 112.0	100.2 $\pm$ 5.9	5.9	0.3
	AMOX	0.3	100.0 - 101.0	100.3 $\pm$ 0.3	0.3	0.01
		2.0	82.0 - 97.5	89.9 $\pm$ 5.1	5.7	0.2
		5.0	88.4 - 98.4	93.5 $\pm$ 3.2	3.4	0.10
	AHD	1.0	89.6 - 110.1	99.9 $\pm$ 4.8	4.8	0.1
		2.0	90.0 - 100.5	98.5 $\pm$ 3.7	3.7	0.1
		5.0	98.2 - 100.2	99.4 $\pm$ 0.7	0.7	0.03
	SEM	1.0	72.2 - 86.1	80.6 $\pm$ 4.7	5.8	0.2
		2.0	85.0 - 100.0	95.5 $\pm$ 6.3	6.6	0.3
		5.0	97.8 - 118.4	100.9 $\pm$ 6.2	6.2	0.04
น้ำผึ้ง	AOZ	0.3	88.3 - 109.7	101.7 $\pm$ 7.5	7.4	0.2
		2.0	88.0 - 109.0	99.8 $\pm$ 7.7	7.7	0.3
		5.0	94.6 - 108.2	101.0 $\pm$ 4.0	3.9	0.2
	AMOX	0.3	98.3 - 111.7	109.4 $\pm$ 4.1	3.7	0.1
		2.0	100.0 - 101.5	100.5 $\pm$ 0.5	0.5	0.02
		5.0	99.8 - 101.5	100.3 $\pm$ 0.5	0.3	0.02
	AHD	1.0	110.0 - 120.0	117.3 $\pm$ 4.4	3.7	0.1

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำ และความเที่ยง ในการวิเคราะห์ AOZ, AMOZ, AHD และ SEM (ต่อ)

ชนิดตัวอย่าง	สารมาตรฐาน	Spiked level ($\mu\text{g/kg}$)	% Recovery (n=10) Min-Max	Min $\pm$ SD	%RSD	HORRAT
นมผง	SEM	2.0	100.0 – 101.0	100.5 $\pm$ 0.4	0.4	0.02
		5.0	89.9 – 98.8	93.9 $\pm$ 3.2	3.4	0.1
		1.0	80.9 – 88.3	85.5 $\pm$ 5.7	6.7	0.2
		2.0	89.9 – 101.0	98.3 $\pm$ 4.4	4.4	0.2
		5.0	94.6 – 101.0	99.6 $\pm$ 2.2	2.2	0.1
	AOZ	0.3	85.7 – 98.3	93.4 $\pm$ 3.5	3.7	0.1
		2.0	77.5 – 100.0	91.0 $\pm$ 7.0	7.7	0.3
		5.0	85.4 – 100.4	95.6 $\pm$ 4.6	4.8	0.2
		0.3	96.7 – 104.7	99.1 $\pm$ 3.9	3.8	0.1
		2.0	97.5 – 110.0	102.0 $\pm$ 4.3	4.2	0.2
	AMOZ	5.0	80.0 – 97.4	89.1 $\pm$ 5.7	6.4	0.3
		1.0	60.8 – 69.6	65.1 $\pm$ 3.0	4.7	0.2
		2.0	89.0 – 100.5	96.8 $\pm$ 4.1	4.2	0.2
		5.0	100.0 – 120.0	112.0 $\pm$ 7.7	6.9	0.3
		1.0	81.8 – 93.6	86.0 $\pm$ 3.8	4.5	0.2
ไข่ผง	SEM	2.0	89.0 – 101.0	97.5 $\pm$ 4.0	4.1	0.2
		5.0	88.6 – 99.2	96.1 $\pm$ 3.6	3.7	0.2
	AOZ	0.3	80.0 – 103.3	87.8 $\pm$ 8.6	9.8	0.1
		2.0	100.0 – 101.0	100.3 $\pm$ 0.4	0.4	0.02
		5.0	79.0 – 100.4	95.4 $\pm$ 7.1	7.5	0.3
	AMOZ	0.3	75.3 – 111.3	91.3 $\pm$ 9.8	10.7	0.2
		2.0	98.1 – 120.0	107.2 $\pm$ 7.1	6.6	0.3
		5.0	75.8 – 102.8	94.5 $\pm$ 8.1	8.6	0.4
	AHD	1.0	103.6 – 118.6	112.4 $\pm$ 4.3	3.8	0.1
		2.0	88.5 – 99.5	94.9 $\pm$ 3.9	4.2	0.2
		5.0	76.8 – 99.4	91.0 $\pm$ 7.7	8.5	0.4
	SEM	1.0	72.7 – 108.0	88.3 $\pm$ 9.6	10.9	0.4
		2.0	70.5 – 120.0	104.4 $\pm$ 15.8	15.2	0.7
		5.0	70.4 – 90.6	77.4 $\pm$ 6.8	8.8	0.4

ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีจากการเข้าร่วมการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการ ในการทดสอบความชำนาญ ในตัวอย่างไข่ไก่ และเนื้อไก่ (FAPAS proficiency test No. 02198 และ No. 02201) พบว่าผลการประเมินอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ โดยในตัวอย่างไข่ไก่พบสาร AMOZ ค่า assigned value เท่ากับ 2.39 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผลการทดสอบ เท่ากับ 2.36 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าการประเมิน Z-Score เท่ากับ -0.1 และ ตัวอย่างเนื้อไก่พบสาร SEM ค่า assigned value เท่ากับ 1.72 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผลการทดสอบ เท่ากับ 1.01 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าการประเมิน Z-Score เท่ากับ -1.9 นอกจากนี้ยังได้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญระหว่าง ห้องปฏิบัติการกับหน่วยงานภายในประเทศ ผลการประเมินอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ โดยได้ทำการทดสอบในตัวอย่าง เนื้อไก่ พบสาร AOZ, AHD และ SEM ค่า assigned value เท่ากับ 2.44, 2.19, 1.81 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผลการทดสอบ เท่ากับ 2.86, 2.66, 2.09 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าการประเมิน Z-Score เท่ากับ 0.78, 0.98 และ 0.70 ตามลำดับ

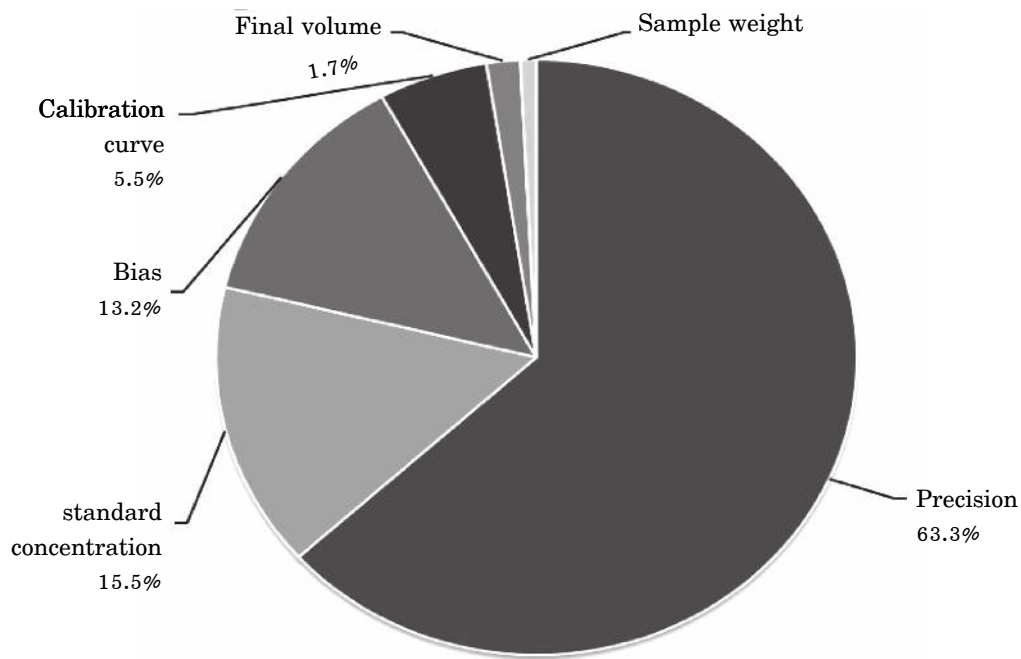
การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตามวิธีที่ได้ทดสอบ โดยนำการวิเคราะห์สารฟูราโซลิโดน (AOZ) ในเนื้อกุ้งเป็นตัวอย่าง พบแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน ได้แก่ การชั่งน้ำหนักของตัวอย่าง ค่า concentration ratio, C ที่อ่านได้จาก calibration curve สารมาตรฐาน เครื่องแก้ววัดปริมาตรที่ใช้ bias และ precision เมื่อได้คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย มีค่าเท่ากับ $\pm 17.8\%$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 6 และภาพที่ 2) และเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งความไม่แน่นอนที่ส่งผลต่อปริมาณสารจากมากไปหาน้อย ได้แก่ ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (method precision, 63.3%) สารมาตรฐาน (15.5%), ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (bias, 13.2%) calibration curve (5.5%) final volume (1.7%) การชั่งน้ำหนักของตัวอย่าง (sample weight, 0.8%)

ตารางที่ 6 แหล่งที่มาและการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ ไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์

component	value, x	standard uncertainty, u	relative standard uncertainty $u(x)/x$
1. sample weight	1 g	0.00113 g	0.00113
2. final volume			
- calibration	1 ml	0.00028 ml	0.00028
- temperature	1 ml	0.00231 ml	0.00231
3. calibration curve	1.0 $\mu\text{g/kg}$	0.00737 $\mu\text{g/kg}$	0.00737
4. standard dilution			
purity	99%	0.25%	0.00252
stock std			
- calibration (balance)	0.01001 g	0.00019 g	0.01898
- calibration (vol. flask)	10 ml	0.00095 ml	0.00010
- temperature (vol. flask)	10 ml	0.02309 ml	0.00231
working std			
- calibration (micro pipette)	0.1 ml	0.00052 ml	0.0052
- calibration (vol. flask)	10 ml	0.001640 ml	0.00016
- temperature (micropipette)	0.1 ml	0.00040 ml	0.0040
- temperature (vol. flask)	10 ml	0.03999 ml	0.0040
5. precision (repeatability)	1.89 $\mu\text{g/kg}$	0.16 $\mu\text{g/kg}$	0.08466
6. bias (recovery)	96.9%	1.7%	0.01754
Combine standard uncertainty			0.08927
Standard uncertainty (u_c)	$= 0.08927 \times 1 \mu\text{g/kg}$		0.089 $\mu\text{g/kg}$
Expanded uncertainty (U), k	$= 2, 2 \times 0.08927$		0.178 $\mu\text{g/kg}$

ตารางที่ 7 การสำรวจการปนเปื้อนของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ในอาหาร

ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง		ชนิดและปริมาณที่พบ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)			
	วิเคราะห์	ตรวจพบ	AOZ	AMAZ	AHD	SEM
เนื้อสัตว์และเครื่องใน	190	0	–	–	–	–
เนื้อสัตว์น้ำ	201	8	0.4 – 2.4	–	–	2.2
น้ำผึ้ง	9	0	–	–	–	–
นมผง	83	1	–	–	–	น้อยกว่า 1.0
ไข่ผง	36	1	–	–	–	1.5
แป้ง	60	3	–	–	–	น้อยกว่า 1.0 – 3.5
รวม	579	13	0.4 – 2.4	–	–	น้อยกว่า 1.0 – 3.5



ภาพที่ 2 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ในเนื้อกุ้ง

ได้นำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีนี้ มาตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในการสำรวจปริมาณการปนเปื้อนของสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ในช่วงปี พ.ศ. 2554-2556 โดยวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อสัตว์และเครื่องใน และสัตว์น้ำที่จำหน่ายในเขตจังหวัดต่างๆ ทั่วทุกภาคในประเทศไทย รวม 96 ตัวอย่าง และตัวอย่างอาหารที่ส่งตรวจที่สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และภาคเอกชน รวม 483 ตัวอย่าง ซึ่งในจำนวนนี้มีตัวอย่างอาหารสินค้าถูกอายัดที่ด่านอาหารและยาเนื่องจากคุณภาพไม่ได้มาตรฐานหรือเป็นสินค้าส่งออกที่ถูกส่งกลับ จำนวน 70 ตัวอย่าง

ผลการตรวจวิเคราะห์ ตรวจพบไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ในกึ่งสด 8 ตัวอย่าง แป้ง 3 ตัวอย่าง และนมผงไข่ผง อย่างละ 1 ตัวอย่าง ชนิดสารที่พบคือ AOZ และ SEM โดยในตัวอย่างกึ่งสดตรวจพบการตกค้างทั้ง AOZ และ SEM ปริมาณที่ตรวจพบ 0.4-2.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 2.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนแป้ง นมผง และไข่ผง ตรวจพบเฉพาะ SEM ปริมาณที่ตรวจพบน้อยกว่า 1.0-3.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 7)

วิจารณ์

การหาปริมาณสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ตกค้างในอาหารสามารถแสดงได้ใน 2 ลักษณะ คือ การตกค้างแบบ bound residue และ total residue โดย bound residue นั้น จะมีเทคนิคในการวิเคราะห์โดยตัวอย่างจะถูกนำมาล้างไขมันและสิ่งรบกวนออกก่อน ด้วย methanol, ethanol และ diethyl ether ตามลำดับ จากนั้น hydrolysed ด้วยกรด hydrochloric เจือจาง เพื่อให้ส่วนของ metabolite หลุดออกจากส่วนที่ bound อยู่กับโปรตีนในตัวอย่างแล้วทำการ derivatized ให้เกิดเป็นสารอนุพันธ์ของ nitrophenyl (NP) derivative ด้วย 2-nitrobenzaldehyde (2-NBA) และแยกออกด้วย ethyl acetate จากนั้นทำให้สารบริสุทธิ์ด้วย hexane ซึ่งการสกัดด้วยวิธีนี้จะมีขั้นตอนในการสกัดที่ค่อนข้างยุ่งยากและซับซ้อน ใช้ชนิดและปริมาณสารเคมีจำนวนมาก จำกัดเฉพาะตัวอย่างที่เป็นเนื้อสัตว์เท่านั้น

สำหรับวิธี total residue นั้น ตัวอย่างจะไม่มีกระบวนการล้างไขมันและสิ่งรบกวนออกจากตัวอย่างก่อน แต่จะนำตัวอย่างนั้นมา hydrolysed ด้วยกรด hydrochloric เจือจาง แล้วจึงทำการ derivatized ด้วย 2-nitrobenzaldehyde (2-NBA) ซึ่งวิธีนี้เหมาะสำหรับตัวอย่างอาหารที่มีไขมันต่ำ

วิธีที่พัฒนานี้ใช้เทคนิคการวิเคราะห์แบบ total residue โดยตัวอย่างจะถูก hydrolysed ด้วยกรด hydrochloric เจือจาง จากนั้นทำการ derivatized ด้วย 2-nitrobenzaldehyde (2-NBA) ซึ่งในขั้นตอนนี้ได้มีการปรับปริมาณของ 2-NBA ที่ใช้ให้เหมาะสม เพียงพอกับสารเป้าหมายที่ต้องการเปลี่ยนเป็นสารอนุพันธ์ (derivative) เท่านั้น เพื่อลดสิ่งรบกวนอื่น ทำให้ง่ายต่อการทำให้สารบริสุทธิ์ และทำการสกัดด้วย ethyl acetate หลังจากนั้นทำให้สารบริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วย hexane ซึ่งขั้นตอนการสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ระยะเวลาสั้น ไม่ยุ่งยาก สามารถตรวจวัดสารได้อย่างจำเพาะ วิเคราะห์หาสารตกค้างได้ครั้งละหลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน และครอบคลุมชนิดตัวอย่างได้หลากหลาย เช่น เนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์ แป้ง ไข่ผง นมผง เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาวิธีวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่าง bound และ total residue จะพบว่าวิธี bound residue จะมีการลดการรบกวนจาก matrix ก่อนการสกัดได้เล็กน้อย และเพื่อให้แน่ใจว่าเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี total residue พบสารไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ มาจากตัวอย่างจริงหรือมาจากการรบกวนของ matrix ศึกษาพบว่าเมื่อนำไปใช้การสกัดแบบ bound residue ผลการทดสอบไม่มีความแตกต่าง

วิธีที่ศึกษานี้สามารถทดสอบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ได้ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD) และ semicarbazide (SEM) สารทั้ง 4 ชนิดนี้มีค่า molecular masses อยู่ระหว่าง 209.3 และ 335.2 g mol⁻¹ โดยใช้เครื่อง liquid chromatograph (LC) ซึ่งมี tandem mass spectrometer

(MS/MS) เป็นตัวตรวจวัด และมีการนำสาร stable isotope, AOZ-d₄, AMOZ-d₅, SEM-¹³C เป็น internal standard ในการตรวจวิเคราะห์ สามารถชดเชยการสูญเสียหรือสลายตัวของสารที่สนใจที่อาจเกิดขึ้นในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง และหลักการคำนวณผลจะใช้สัดส่วน (ratio) ระหว่างปริมาณสารที่สนใจกับสาร internal standard ทำให้ไม่ต้องคำนึงถึง total recovery ของวิธี ซึ่งเป็นข้อดีเหนือกว่าการคำนวณโดยใช้ external standard จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ LC-MS/MS ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (selectivity) สูง ใช้หลักการ mass spectrometry ตรวจวัด ion ของสารที่แยกกันด้วยค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio, m/z) ที่แตกต่างกันจึงมีความจำเพาะสูง และเลือกใช้เทคนิค electrospray ionization (ESI) เพื่อให้เกิดการไอออไนเซชันดียิ่งขึ้นโดยการเติมสาร ammonium acetate buffer ซึ่งเป็นสาร additives ทำให้การแยกของสารที่ต้องการออกจาก matrix ได้ดียิ่งขึ้น ป้องกันการเกิด co-elute และด้วย detector ชนิด tandem mass spectrometer ตรวจวัดโดยเลือก mass ถึง 2 ครั้ง ครั้งแรกเลือก precursor ion หรือ parent ion จากนั้นใช้ก๊าซเฉื่อย รุ่งชนทำให้เกิดการ fragmentation ได้ product ion หรือ daughter ion เลือก product ion 2 ion ที่มีค่า response สูง และไม่มีสารอื่นรบกวน การตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์นั้น สาร AOZ เลือก m/z 236.3 เป็น precursor ion และเลือก product ion ที่ m/z 104.0 กับ 134.1 AMOZ เลือก m/z 335.2 เป็น precursor ion และเลือก product ion ที่ m/z 262.0 กับ 291.3 AHD เลือก m/z 249.3 เป็น precursor ion และเลือก product ion ที่ m/z 104.0 กับ 134.1 ส่วน SEM ใช้ m/z 209.3 เป็น precursor ion และเลือก product ion ที่ m/z 166.2 กับ 192.2 ในการคำนวณปริมาณสารทั้ง 4 ชนิดตามลำดับ

เนื่องจากสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ถูกกำหนดให้เป็นสารที่ห้ามใช้ในกลุ่มสหภาพยุโรปกับสัตว์ที่นำมาบริโภคโดยเด็ดขาด และประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้ กำหนดให้ใช้วิธีตรวจวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์โดย AOZ และ AMOZ ต่ำกว่า 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม AHD และ SEM ต่ำกว่า 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งวิธีที่ได้ทดสอบนี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์ตามข้อกำหนดของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้ในการวิเคราะห์ยังได้กำหนดการควบคุมคุณภาพเพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้อง ได้แก่ การเลือก identification point ซึ่งเป็นระบบการคิดคะแนนเพื่อการยืนยันชนิดสารในการแปลผลข้อมูลโดยใช้จำนวน parent ion เริ่มต้น และ daughter ion และกำหนดความแตกต่างสูงสุดที่ยอมรับได้ (maximum permitted tolerance) ของ relative ion intensities ตามที่ European Communities, EC กำหนด⁽⁶⁾ นอกจากนี้ค่า precision ที่ได้มีค่า HORRAT น้อยกว่า 2 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ของ Codex และ EU กำหนดไว้ นอกจากนี้ยังได้มีการวางแผนการควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control) เพื่อความมั่นใจในผลการวิเคราะห์ตัวอย่างทุก batch โดยกำหนดไว้ไม่เกิน 10 ตัวอย่าง โดยจะทำการทดสอบ method blank, matrix blank, duplicate analysis และ spiked sample ที่ระดับ 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่า% recovery ควรอยู่ในช่วง 60-120% และในปี 2556 วิธีตรวจวิเคราะห์นี้ได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการแสดงให้เห็นว่าวิธีที่ได้ทดสอบนี้จึงมีความเหมาะสมในการใช้วิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์

เมื่อพิจารณาความสมเหตุสมผลของค่าความไม่แน่นอน โดยใช้เกณฑ์การคำนวณจากค่า standard deviation ค่าความไม่แน่นอนที่ควรจะเป็นควรน้อยกว่า 2 เท่าของ predicted Horwitz's RSD_r⁽¹⁷⁾ เมื่อดำเนินการคำนวณค่าความไม่แน่นอนที่ควรจะเป็น เท่ากับ 59.7% แต่จากวิธีนี้ค่าความไม่แน่นอนที่พิจารณาจากแหล่งความไม่แน่นอนที่มีผลกระทบต่อปริมาณสารมีค่า 17.8% ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าที่ควรจะเป็นประมาณ 3.4 เท่า หรือมีค่าเป็น 30% ของค่าที่ควรจะเป็น ทั้งนี้เนื่องมาจากเป็นเทคนิคการวิเคราะห์แบบ internal standard calibration โดยใช้ internal standard ใส่ลงในตัวอย่างและในสารมาตรฐานคำนวณโดยใช้สัดส่วน (ratio) ระหว่างปริมาณสารที่สนใจกับ

internal standard สามารถชดเชยการสูญเสียของสารที่สนใจที่อาจเกิดขึ้นในขั้นตอนการสกัด ทำให้สามารถลดค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งความไม่แน่นอนที่เกิดจาก total recovery ลงได้ เช่น ค่าความไม่แน่นอนจากความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (bias) เป็นต้น นอกจากนี้การเลือกใช้สารมาตรฐานที่มีค่าความไม่แน่นอนของความบริสุทธิ์น้อย มีผลทำให้ค่าความไม่แน่นอนของวิธีลดลงได้เช่นกัน

ได้นำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ได้นี้ วิเคราะห์ตัวอย่าง proficiency test เพื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการ ในการทดสอบความชำนาญกับหน่วยงานทั้งภายในและภายนอกประเทศ ซึ่งพบว่าผลการประเมินอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ ($IZI < 2$) ซึ่งการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญหรือเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการเป็นการบ่งชี้ประสิทธิภาพวิธีว่าเป็นวิธีที่ยอมรับได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ที่เข้าร่วมการทดสอบในรอบเดียวกัน ทำให้ยอมรับได้ว่าวิธีที่ได้พัฒนามีความแม่นยำเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์

สำหรับผลการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ในตัวอย่าง จำนวนทั้งหมด 579 ตัวอย่าง พบการตกค้าง 13 ตัวอย่าง โดยพบในกุ้ง นมผง ไข่ผง และแป้ง คิดเป็นร้อยละ 2.2 โดยพบปริมาณมากกว่า 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 9 ตัวอย่าง เกินค่ามาตรฐาน สำหรับผลการตรวจพบสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ในกุ้ง จากการศึกษาวิธีการเลี้ยงกุ้งพบว่า จะใช้ระบบการเลี้ยงแบบพัฒนาหนาแน่น (intensive culture) มีการใช้ยาฟูราโซลิโดน และสารเคมีในระหว่างขบวนการเลี้ยง ทั้งวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันโรค รักษาโรค และการจัดการคุณภาพดินและน้ำปัญหาที่เกิดขึ้นกับการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลแบบพัฒนาหนาแน่น คือ การเกิดโรคระบาด ทำให้เกษตรกรใช้ยาและ/หรือสารเคมีเพื่อป้องกันและรักษาโรค^{(19), (20), (21)} ส่วนตัวอย่าง นมผง ไข่ผง และแป้ง พบสาร SEM ที่ไม่ได้เกิดจากการใช้สารนี้โดยตรง แต่อาจเป็นไปได้ว่าความร้อนจากกระบวนการผลิตเป็นสาเหตุทำให้เกิดสาร SEM ซึ่งเป็นผลพลอยได้ (by-product) จากสาร azodicarbonamide ซึ่งเป็นสารที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิห้อง แต่จะสลายตัวที่อุณหภูมิสูง และสารนี้ยังใช้เป็นสารที่ใส่ในขบวนการผลิตแป้ง (food additive)⁽²²⁾ อีกด้วย

สรุป

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการตรวจสารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ เมตาโบไลต์ ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ AOZ, AMOZ, AHD และ SEM มีคุณลักษณะเฉพาะ แสดงสมรรถนะที่ผ่านเกณฑ์การยอมรับและเหมาะสม มีความถูกต้องแม่นยำ มีความไว และความจำเพาะต่อสารที่ต้องการทดสอบ เหมาะกับการใช้งาน (fitness for intended use) และให้ผลทุกพารามิเตอร์ผ่านเกณฑ์ยอมรับของสากล ทำให้ผลการทดสอบถูกต้อง เชื่อถือได้โดยการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation) ซึ่งใช้เนื้อไก่ เนื้อกุ้ง น้ำผึ้ง นมผง และไข่ผง เป็นตัวแทนของกลุ่มเนื้อสัตว์และเครื่องใน เนื้อสัตว์น้ำ น้ำผึ้ง นม ไข่ และแป้ง ซึ่งเป็นตามระบบคุณภาพของ ISO/IEC 17025: 2005 และเป็นไปตามหลักเกณฑ์และเงื่อนไขของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา สามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อดำเนินคดีความ หรือเพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมาย เพื่อความยุติธรรมทั้งแก่ผู้ประกอบการและคุ้มครองผู้บริโภคต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางกนกพร อธิสุข นักวิทยาศาสตร์การแพทย์เชี่ยวชาญด้านมาตรฐานของอาหาร ที่ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ และตรวจทานต้นฉบับ ตลอดจนสนับสนุนการศึกษาวิจัยจนบรรลุผลสำเร็จในครั้งนี้ ขอขอบคุณนางสาวกรพรรณ ส่งศรี และนางสาวสิริลักษณ์ ชัยรินทร์ ที่ช่วยเตรียมและสกัดตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

1. McCracken RJ, Kennedy DG. Determination of the furazolidone metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone, in porcine tissues using liquid chromatography-thermospray mass spectrometry and the occurrence of residues in pigs produced in Northern Ireland. *J Chromatogr B* 1997; 691: 87-94.
2. Valera-Tarifa NM, Plaza-Bolanos P, Romero-Gonzalez R, Martinez-Vidal JL, Garrido-Frenich A. Determination of nitrofurans metabolites in seafood by ultra high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. *J Food Comp Anal* 2013; 30(2): 86-93.
3. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. ปัญหาตกค้างในเนื้อสัตว์และแนวทางแก้ไข. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2545. หน้า 145-146.
4. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 151 (พ.ศ. 2536) เรื่อง กำหนดวัตถุที่ห้ามใช้ในอาหาร ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 111 ตอนพิเศษ 9ง. (ลงวันที่ 4 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2537) หน้า 107.
5. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหารราชกิจจานุเบกษา เล่ม 120 ตอนพิเศษ 50ง (ลงวันที่ 24 เมษายน 2546) หน้า 28.
6. Commission Decision 2002/657/EC of implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities L* 221/8. August 2002.
7. Council Directive 96/23/EC of on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decision 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Official Journal of the European Communities L* 125/10. April 1996.
8. Regulation (EC) 178/2002 of the European Parliament and of the Council of laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Official Journal of the European Communities L* 31/1. January 2002
9. The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual report 2008. Luxembourg: European Commission; 2009.
10. Verdon E, Couedor P, Sanders P. Multi-residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, nitrofurantoin, nifursol) in poultry muscle tissue through the detection of their five major metabolites (AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DNSAH) by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry-in-house validation in line with Commission Decision 657/2002/EC. *Anal Chim Acta* 2007; 586(1-2): 336-47.
11. Szilagyi S, de la Calle B. Development and validation of an analytical method for the determination of semicarbazide in fresh egg and in egg powder based on the use of liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2006; 572: 113-20.
12. Chu PS, Lopez MI. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of protein-bound residues in shrimp dosed with nitrofurans. *J Agric Food Chem* 2005; 53(23): 8934-9.
13. Cooper KM, Elliott CT, Kennedy DG. Detection of 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), a tissue-bound metabolite of the nitrofurans furazolidone, in prawn tissue by enzyme immunoassay. *Food Addit Contam* 2004; 21(9): 841-8.
14. EURACHEM. The fitness for purpose of analytical method: a laboratory guide to method validation and related topics. United Kingdom: LGC (Teddington) Ltd; 1998. p. 5-24.

15. Fajgelj A, Ambrus A. Principles and practices of method validation. Budapest, Hungary; 1999.
16. Ellison SLR, Rosslein M, Williams A, editors. EURACHEM/CITAC Guide: quantifying uncertainty in analytical measurement. 2nd ed. United Kingdom: EURACHEM; 2000.
17. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2549.
18. Vass M, Hruska K, Franek M. Nitrofurantoin antibiotics: a review on the application, prohibition and residual analysis. Vet Med 2008; 53(9): 469-500.
19. ธงชัย นิตริฐสุวรรณ, วีระพร ศรีอรุณพรหม. การใช้ยาและสารเคมีในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอำเภอลิเกา จังหวัดตรัง ปี 2542. ตัง : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล; 2543. หน้า 45.
20. ลีลา เรืองแป้น, สถาพร ดิเรกบุษราคัม, เยาวนิตย์ ดนยดล, ยุบลรัตน์ ศรีแก้ว. ประสิทธิภาพของยารักษาโรคกุ้งกุลาดำในท้องตลาดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเรืองแสงและไวรัสโอ. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 19/2540. สงขลา : สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง; 2540. หน้า 10.
21. Gräslund S, Karlsson K, Wongtavatchai J. Responsible use of antibiotics in shrimp farming. Aquaculture Asia Magazine 2002; 7(3): 17.
22. McCracken R, Hanna B, Ennis D, Cantley L, Faulkner D, Kennedy D. The occurrence of semicarbazide in the meat and shell of Bangladeshi fresh-water shrimp. Food Chem 2013; 136(3-4): 1562-7.

Method Development and Validation for Determination of Nitrofurantoin Metabolites in Food by LC-MS/MS

Thongsuk Payanan and Ladda Kaewklapanyacharoen

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

ABSTRACT Method for analysis of metabolites from nitrofurantoin drugs (furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin and nitrofurazone) in food which are mainly employed for the treatment of bacterial diseases in livestock was studied and developed. Nitrofurantoin drugs are rapidly metabolized to form 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-aminohydantoin (AHD) and semicarbazide (SEM) and also strongly bound to proteins in target animals. Due to their carcinogenicity, nitrofurantoin drugs were prohibited to use as veterinary drugs in the EU. The development of an analytical method for the simultaneous determination of four nitrofurantoin metabolites was developed by LC-MS/MS. Sample was digested by diluted hydrochloric acid to release the metabolites from the protein in sample and then a derivatization step was performed. Next, the nitrofurantoin derivatives have been extracted with ethyl acetate and then defatted with hexane. Afterwards, LC-MS/MS was employed for qualitative and quantitative analysis of these compounds. Limits of detection (LOD) were 0.1 µg/kg for AOZ and AMOZ and 0.5 µg/kg for AHD and SEM. Limit of quantitation (LOQ) were 0.3 µg/kg for AOZ and AMOZ and 1.0 µg/kg for AHD and SEM. Method linear working range was 0.3–5.0 µg/kg with the correlation coefficient ranged from 0.9978–0.9999. The accuracy of method was presented in form of % mean recovery which equals to 65–120% while method precision (0.1–15.2%) was represented with % RSD value. From the validation results, this method was fit for intended use with for the regulations legislated by the Thai Food and Drug Administration and the EU commission. In 2011–2013, the proposed method was performed in meat, offal, aquatic animals, honey, milk powder, egg powder, and flour to inspect the nitrofurantoin metabolites residue. From 579 samples, the residues were found in 13 samples (2.2%). In 8 aquatic animal samples, AOZ was found in range of less than 1.0 to 2.4 and SEM was found at 2.2 µg/kg. Moreover, SEM was also found in range of less than 1.0 to 3.5 µg/kg in 5 samples of milk powder, egg powder, and flour.

Key words: Nitrofurantoin metabolites, LC-MS/MS, food

การสร้างศักยภาพการเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงสากล ผ่านการพัฒนาและการตรวจรับรองระบบคุณภาพ ISO guide 34: 2009

ธีระพล คชาชีวะ และสุภาพร ภูมิอมร

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการอ้างอิงในระดับสากล จำเป็นต้องมีระบบคุณภาพ สถาบันชีววัตถุ เป็นหน่วยงานควบคุมกำกับของรัฐในการประกันคุณภาพวัคซีนและชีววัตถุในห้องปฏิบัติการ เริ่มจากการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ มีระบบคุณภาพว่าด้วยการทดสอบและการสอบเทียบเครื่องมือ ISO/IEC 17025: 2005 ซึ่งได้พัฒนาระบบคุณภาพนี้มาอย่างต่อเนื่อง แต่ในการควบคุมคุณภาพวัคซีนนั้น จำเป็นต้องใช้วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานเพื่อควบคุมคุณภาพผลการทดสอบควบคุมไปกับตัวอย่างวัคซีน จึงได้สร้างศักยภาพการเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับสากลผ่านการพัฒนาระบบคุณภาพว่าด้วยการผลิตวัสดุอ้างอิงตามมาตรฐาน ISO guide 34: 2009 โดยมีการจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานหลายชนิดในรูปแบบแห้ง เพื่อง่ายต่อการจัดเก็บ ได้นานเนื่องจากความคงตัวสูงและที่สำคัญง่ายต่อการขนส่ง มีระบบการบริหารจัดการวัคซีนโดยการสร้างคลังเก็บวัคซีนมาตรฐานของภูมิภาค มีกระบวนการพัฒนาห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านวัคซีนโดยการพัฒนาบุคลากร เพื่อให้มีความรู้ ความเข้าใจในระบบคุณภาพใหม่ จัดทำเอกสารเพิ่มเติมรวมถึงคู่มือคุณภาพ ก่อนขอรับการตรวจรับรองระบบคุณภาพ ISO guide 34: 2009 เป็นหน่วยงานแรกของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในปี 2557

บทนำ

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นหน่วยงานเดียวในประเทศที่ทำหน้าที่ควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์วัคซีนและชีววัตถุอื่น ๆ โดยเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านยาชีววัตถุของประเทศ⁽¹⁾ มีบทบาทที่สำคัญคือการควบคุมการผลิตโดยเฉพาะวัคซีนและการตรวจสอบคุณภาพทางห้องปฏิบัติการ เพื่อยืนยันว่าวัคซีนมีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันได้ดีในคนปกติ และเนื่องจากวัคซีนมีลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลที่ซับซ้อน มีความเปราะบางในตัวสูง และวิธีการผลิตหรือการควบคุมคุณภาพต้องอาศัยวิธีทางชีววิธี⁽²⁻⁴⁾ ที่มีความเปราะบางสูงเช่นกัน แม้จะปฏิบัติด้วยนักวิเคราะห์ ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือเดียวกัน ผลการวิเคราะห์ก็ยังคงมีความเปราะบางค่อนข้างมาก ต้องมีการควบคุมกำกับที่ค่อนข้างเข้มงวด จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมการผลิตก่อนจำหน่าย⁽⁵⁾ เพื่อตรวจสอบว่าทุกกระบวนการผลิตมีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพเหมือนกับที่ได้รับอนุมัติเมื่อขึ้นทะเบียน โดยเฉพาะการทดสอบทางชีววิธีเพื่อตรวจสอบค่าความแรง (potency) พบว่าวัคซีนแต่ละชนิดมีวิธีที่จำเพาะในการทดสอบแตกต่างกัน แต่ทุกการทดสอบต้องอาศัยวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานในการทดสอบควบคู่ไปกับตัวอย่างวัคซีนทุกครั้ง เพื่อควบคุมคุณภาพชีววัตถุทั้งในขั้นตอนของการขึ้นทะเบียน การควบคุมการผลิตตลอดจนการเฝ้าระวังชีววัตถุหลังจำหน่าย ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการประกันและควบคุมคุณภาพชีววัตถุให้เป็นไปตามข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก จะเห็นได้ว่าวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานมีความสำคัญเพื่อยืนยันว่าผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการมีความน่าเชื่อถือและสามารถสลับได้ในระดับสากล⁽⁶⁾ ซึ่งเดิมสถาบันชีววัตถุ ได้จัดหา จัดเตรียมและสอบเทียบค่าวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานเพื่อใช้ในประเทศ นั้นหมายถึงผู้ผลิตในประเทศใช้วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานเดียวกันในการควบคุมคุณภาพวัคซีนตัวอย่างที่ผลิตในประเทศ แต่เนื่องจากผู้ผลิตวัคซีนในประเทศมีน้อย และผลิตภัณฑ์มีจำนวนไม่มาก สถาบันชีววัตถุจึงมีแนวคิดในการจัดเตรียมชีววัตถุมาตรฐานในระดับภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ขึ้นตั้งแต่ปี 2547 โดยได้รับเงินสนับสนุนจากองค์การอนามัยโลกประจำประเทศไทย โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างศักยภาพในการช่วยเหลือตนเองในระดับภูมิภาคของห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพวัคซีน (National Control Laboratory, NCL) ปัจจุบันชีววัตถุมาตรฐานที่เป็นวัคซีนมาตรฐานสากล ต้องมีการสั่งซื้อทุกปี เพื่อนำมาใช้ในการสอบเทียบค่ามาตรฐานสากล ซึ่งมีราคาแพงและบางชนิดไม่มีการจัดเตรียมขึ้นโดยห้องปฏิบัติการขององค์การอนามัยโลก เนื่องจากเป็นวัคซีนป้องกันโรคเฉพาะภูมิภาค เช่น วัคซีนป้องกันโรคไข้มองอักเสบ เจอี (JE vaccine) เป็นต้น สถาบันชีววัตถุ จึงได้พัฒนาการจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานขึ้นและพยายามผลักดันให้สามารถนำไปใช้ได้ในระดับภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เนื่องจากการจัดเตรียมวัคซีนมาตรฐานในระดับภูมิภาค จะเป็นแนวทางหนึ่งของการขยายขีดความสามารถของการเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงในระดับสากลรวมถึงการพัฒนากระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการผลิตวัสดุอ้างอิง⁽⁷⁾ ซึ่งจะเป็นการเพิ่มศักยภาพของการเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงเช่นเดียวกัน ดังนั้นสถาบันชีววัตถุ จึงพัฒนาศักยภาพการเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิง โดยการพัฒนาการจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน กระบวนการพัฒนาห้องปฏิบัติการด้านวัคซีนโดยการพัฒนาบุคลากร จัดทำเอกสารคุณภาพและอื่น ๆ เพื่อเตรียมพร้อมขอการรับรองระบบคุณภาพว่าด้วยการผลิตวัสดุอ้างอิงตามข้อกำหนด ISO guide 34: 2009

การดำเนินการ

1. พัฒนาการจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน

ได้พัฒนาการจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานหลายชนิด โดยการพัฒนาการจัดเตรียมจากเดิมในรูปของเหลวเป็นรูปผงแห้ง เช่น วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสำหรับวัคซีนคางทูม⁽⁹⁾ บีซีจี⁽¹⁰⁾ หัด หัดเยอรมัน และไวรัสโรตาโดยปรับส่วนประกอบให้ได้อย่างครอบคลุมที่เหมาะสมต่อการจัดเก็บในระยะยาว โดยการควบคุมคุณภาพก่อนและหลังการทำแห้งได้แก่ การศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพของผงแห้งที่ได้ การชั่งน้ำหนักก่อนและหลังการบรรจุ การตรวจหาปริมาณความชื้นที่หลงเหลือหลังการทำแห้ง การตรวจสอบความสามารถในการละลาย การวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ก่อนและหลังการบรรจุ รวมถึงการศึกษาค่าความแรง และความคงตัวของวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน

2. กระบวนการพัฒนาห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านวัดชิ้นและการพัฒนาเพื่อรองรับระบบคุณภาพว่าด้วยการเป็นผู้ผลิตวัสดุอ้างอิง

ดำเนินการพัฒนาห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านวัดชิ้นหลายด้านพร้อมด้วยการพัฒนาศักยภาพของหน่วยงาน โดยมีจุดประสงค์เพื่อรองรับระบบคุณภาพใหม่ที่ว่าด้วยการผลิตวัสดุอ้างอิงตามข้อกำหนด ISO guide 34: 2009 ดังนี้

2.1 การพัฒนาบุคลากร โดยส่งเสริมให้บุคลากรได้ศึกษาทบทวนระบบคุณภาพในหลายด้าน เช่น ระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025: 2005⁽⁸⁾ ระบบคุณภาพว่าด้วยการบริหารจัดการ ISO 9001: 2008/2015 หลักปฏิบัติที่ดีในการผลิตยาชีววัตถุ (Good Manufacturer Practice) และการศึกษากระบวนการว่าด้วยการผลิตวัสดุอ้างอิงตามข้อกำหนด ISO guide 34: 2009 ได้เชิญผู้เชี่ยวชาญภายนอกที่มีประสบการณ์มาบรรยาย เพื่อให้บุคลากรได้เรียนรู้ระบบคุณภาพจากผู้มีประสบการณ์จริง รวมถึงได้เข้าร่วมการสัมมนาทั้งภาคบรรยายและการอบรมเชิงปฏิบัติการ นอกจากนี้บุคลากรที่เกี่ยวข้องยังได้เรียนรู้ตามข้อกำหนดมาตรฐาน ISO guide 35: 2006 และผ่านการอบรมเชิงปฏิบัติการ “เรื่องมาตรฐาน ISO guide 34, ISO guide 35 และ ISO 13528” ความรู้ที่ได้จากระบบคุณภาพ ISO guide 34: 2009 ได้นำมาศึกษาเปรียบเทียบข้อกำหนด ISO/IEC 17025: 2005 กับ ISO guide 34: 2009 เพื่อดูความแตกต่างของข้อกำหนดก่อนดำเนินการจัดทำเอกสารคุณภาพเพิ่มเติมเพื่อให้สอดคล้องกับระบบ ISO guide 34: 2009

2.2 ดำเนินการสร้างอาคารคลังเก็บวัดชิ้นของภูมิภาค ได้เสนอโครงการจัดเตรียมคลังเก็บวัดชิ้นของภูมิภาคต่อสถาบันวัดชิ้นแห่งชาติ (มหาชน) โดยได้รับเงินสนับสนุนงบประมาณจำนวน 7.8 ล้านบาท ในปี 2556 ซึ่งโครงการนี้ได้ถูกบรรจุไว้ในวาระแห่งชาติด้านวัดชิ้นโดยได้รับความเห็นชอบจากคณะรัฐมนตรี เมื่อวันที่ 18 มกราคม 2554 ซึ่งมีสถาบันวัดชิ้นแห่งชาติทำหน้าที่ประสานและติดตามความก้าวหน้าของโครงการอย่างต่อเนื่อง การก่อสร้างได้ดำเนินการแล้วเสร็จในเดือนกรกฎาคมปี 2557 เป็นอาคาร 2 ชั้น ประกอบด้วยพื้นที่สำหรับก่อสร้าง (วัดตามแนวหลังคา) วัดตามส่วนที่ยาวที่สุด 26.88 เมตร × ส่วนที่กว้างที่สุด 9.35 เมตร รวม 251.328 ตารางเมตร พื้นที่ใช้สอย (วัดพื้นที่ภายในรวมห้องแช่แข็ง) กว้าง 5 เมตร × ยาว 20 เมตร อาคาร 2 ชั้น รวม 200 ตารางเมตร ส่วนปริมาตรห้องแช่แข็ง (วัดปริมาตรภายใน) กว้าง 5 เมตร × ยาว 10 เมตร สูง 2.5 เมตร รวมพื้นที่ใช้สอย 125 ตารางเมตร (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 อาคารคลังวัดชิ้นมาตรฐานของภูมิภาค

2.3 จัดทำคู่มือควบคุมคุณภาพการผลิตชีววัตถุอ้างอิงมาตรฐาน ฉบับภาษาไทยครั้งแรกเมื่อวันที่ 23 กรกฎาคม 2555 และมีการปรับปรุง ทบทวนและเพิ่มเติมหลังจากได้รับการตรวจติดตามทั้งภายในและภายนอก โดยแก้ไขเพิ่มเติม ครั้งที่ 1 เมื่อวันที่ 20 พฤศจิกายน 2555 แก้ไขครั้งที่ 2 เมื่อวันที่ 20 สิงหาคม 2556 แก้ไขครั้งที่ 3 เมื่อวันที่ 15 ตุลาคม 2556 และแก้ไขครั้งสุดท้าย เมื่อวันที่ 8 กันยายน 2557 หลังได้รับการตรวจประเมินจริง เพื่อให้เนื้อหามีความสอดคล้องกับระบบข้อกำหนด ISO guide 34 มากยิ่งขึ้น

2.4 จัดทำเอกสารคุณภาพด้วยวิธีมาตรฐานการปฏิบัติงาน (Standard Operating Procedure, SOP) และแบบฟอร์มการบันทึกผลการปฏิบัติงาน (Worksheet, WS) เพิ่มเติมในหลายฉบับให้สอดคล้องกับข้อกำหนดของ ISO guide 34: 2009 มากยิ่งขึ้นรวมทั้งสิ้น 13 ฉบับ

2.5 การจัดทำฐานข้อมูลระบบคุณภาพในห้องปฏิบัติการ

ดำเนินการจัดทำฐานข้อมูลการสอบเทียบเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ฐานข้อมูลการประชุมฝึกอบรม สัมมนาฐานและฐานข้อมูลเอกสารมาตรฐานการปฏิบัติงาน เพื่อให้สามารถตรวจสอบและติดตามข้อมูลที่เป็นปัจจุบัน ในระบบคุณภาพ

3. การขอการรับรองระบบคุณภาพด้วยการผลิตชีววัตถุอ้างอิงตามข้อกำหนด ISO guide 34: 2009

ได้ดำเนินการขอรับรองระบบคุณภาพตามมาตรฐาน ISO guide 34: 2009 ในปี 2557 โดยขอ การรับรองวัดชิ้นอ้างอิงมาตรฐานสำหรับตรวจสอบคุณภาพวัดชิ้นคางทูม ต่อสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งเป็นองค์กรที่ทำหน้าที่ให้การรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการด้านการแพทย์ และสาธารณสุข และลงนามในข้อตกลงว่าด้วยการยอมรับร่วมด้านการรับรองกับองค์กรภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ว่าด้วยการรับรองห้องปฏิบัติการ (Asia Pacific Laboratory Accreditation Cooperation, APLAC) และในระดับสากล กับองค์กรระหว่างประเทศว่าด้วยการรับรองห้องปฏิบัติการ (International Laboratory Accreditation Cooperation, ILAC) สถาบันชีววัตถุ ถือเป็นห้องปฏิบัติการแรกของกรมฯ ที่ยื่นขอการรับรองตามมาตรฐาน ISO guide 34: 2009 โดยได้รับการตรวจประเมินในวันที่ 10 และ 12 มิถุนายน 2557 รวม 2 วัน โดยผู้ตรวจ ประเมินเป็นบุคลากรภายนอกกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งข้อบกพร่องและข้อสังเกตที่ได้รับจะนำมาปรับปรุงแก้ไข เพื่อให้ระบบมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ผลการดำเนินการ

1. พัฒนาการจัดเตรียมวัดชิ้นอ้างอิงมาตรฐาน

การจัดเตรียมวัดชิ้นอ้างอิงมาตรฐานในรูปผงแห้ง เป็นการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง เพื่อให้วัดชิ้นอ้างอิงมาตรฐาน นั้นสามารถเก็บได้นาน มีปริมาณมากเพียงพอต่อการใช้งานในระยะยาว โดยวัดชิ้นที่จัดเตรียมขึ้นนั้นมาจากวัดชิ้น อ้างอิงมาตรฐานสากลจากห้องปฏิบัติการขององค์การอนามัยโลก ซึ่งนำมาพัฒนาการผลิตและจัดเตรียมวัดชิ้นมาตรฐาน ในรูปผงแห้งตั้งแต่ปี 2553 (ตารางที่ 2) โดยจัดเตรียมวัดชิ้นอ้างอิงมาตรฐานสำหรับวัดชิ้นป้องกันโรคคางทูมและ ตีพิมพ์ในวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในปี 2554⁽⁹⁾ จากนั้นในปี 2555-2557 ได้พัฒนาการจัดเตรียมวัดชิ้น อ้างอิงมาตรฐานสำหรับตรวจสอบคุณภาพวัดชิ้นปัสสาวะ หัด หัดเยอรมันและไวรัสโรตา ตามลำดับ ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ระหว่างการ ศึกษาความคงตัวในระยะยาว เช่น วัดชิ้นอ้างอิงมาตรฐานสำหรับตรวจสอบคุณภาพวัดชิ้นป้องกันโรคหัด และ ระยะสั้น เช่น วัดชิ้นอ้างอิงมาตรฐานสำหรับตรวจสอบคุณภาพวัดชิ้นป้องกันโรคหัดเยอรมันและไวรัสโรตา ยกเว้นวัดชิ้น อ้างอิงมาตรฐานสำหรับตรวจสอบคุณภาพวัดชิ้นป้องกันโรคคางทูมและปัสสาวะได้ผ่านการศึกษาคงตัวระยะยาวแล้ว และตีพิมพ์ในวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และวารสารวิชาการสาธารณสุข^(9, 10) ซึ่งสำหรับวัดชิ้นอ้างอิงมาตรฐาน

สำหรับตรวจสอบคุณภาพวัคซีนป้องกันโรคปอดอักเสบที่ได้รับรางวัลผลงานดีเด่นจากการประชุมวิชาการประจำปีของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาในปี 2556 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การพัฒนาศักยภาพของการจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน

วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานใช้ สำหรับการควบคุมคุณภาพ ของวัคซีน	ปีที่ผลิต	อยู่ระหว่างการศึกษา	ตีพิมพ์ในวารสาร
ป้องกันโรคคางทูม	2553	ตรวจติดตามเป็นระยะ ๆ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ปี 2554
ป้องกันโรคหัด	2554	ตรวจติดตามเป็นระยะ ๆ	วิชาการสาธารณสุขปี 2557*
ป้องกันโรคหัดเยอรมัน	2556	ความคงตัว ระยะยาว	อยู่ระหว่างการพิจารณาตีพิมพ์
ป้องกันโรคหัดเยอรมัน	2557	ความคงตัว ระยะสั้น	-
ป้องกันโรคคางทูมและโรคหัดเยอรมัน	2557	ความคงตัว ระยะสั้น	-

เด็กแรกเกิดจากไวรัสโรตา

* ได้นำเสนอผลงานวิชาการที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาในปี 2556 และได้รับรางวัลผลงานดีเด่น

2. กระบวนการพัฒนาห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านวัคซีนและการพัฒนาเพื่อรองรับระบบคุณภาพว่าด้วยการเป็นผู้ผลิตวัสดุอ้างอิง

จากการพัฒนาบุคลากรให้มีความรู้ระบบคุณภาพ ISO guide 34: 2009 เพื่อรองรับการตรวจประเมินในปี 2557 นั้น ได้มีการจัดเตรียมเอกสารเพิ่มเติมให้สอดคล้องกับระบบคุณภาพ ISO guide 34: 2009 โดยการทบทวนเปรียบเทียบกับระบบ ISO/IEC 17025: 2005 ที่ดำเนินการอยู่ในห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 3) พบว่ามีเอกสารที่ต้องดำเนินการเพิ่มเติมที่แตกต่างจากระบบ ISO/IEC 17025: 2005 อยู่ 3 ข้อหลักคือ 1) เรื่องของคำศัพท์และคำจำกัดความที่เป็นไปตามระบบคุณภาพที่เกี่ยวข้องกับ ISO guide 34: 2009 (ISO/IEC 17000, ISO/IEC 17025, ISO guide 30, ISO guide 9000 และ ISO/IEC guide 99) ได้แก่ผู้ผลิตวัสดุอ้างอิง ผู้รับเหมาช่วง การผลิตวัสดุอ้างอิงวัสดุอ้างอิงรับรอง ความสัมพันธ์ของวัสดุอ้างอิง การสอบกลับได้ทางมาตรวิทยาและความไม่แน่นอนของการวัด 2) การควบคุมงานและหรือวัสดุอ้างอิงที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนด 3) ข้อกำหนดด้านการผลิตและวิชาการ ได้แก่ข้อกำหนดทั่วไปที่ครอบคลุมถึงการผลิตวัสดุอ้างอิงที่ได้รับการรับรองและที่ไม่ได้รับการรับรอง ผู้รับเหมาช่วง การวางแผนการผลิต การจัดการวัสดุและการจัดเก็บ กระบวนการผลิตวัสดุ การประเมินผลข้อมูล การประเมินความเป็นเนื้อเดียวกัน การประเมินความคงตัว คุณลักษณะ การกำหนดค่าคุณสมบัติและความไม่แน่นอน เอกสารและใบรับรองสำหรับผู้ใช้ และการบริการจัดส่ง

3. การขอการรับรองระบบคุณภาพว่าด้วยการผลิตวัสดุอ้างอิงตามข้อกำหนด ISO guide 34: 2009

สถาบันชีววัตถุ ได้รับการตรวจประเมินระบบคุณภาพตามมาตรฐาน ISO guide 34: 2009 ในปี พ.ศ. 2557 โดยมีผู้เชี่ยวชาญจากภายนอกกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มาเป็นผู้ตรวจประเมิน ในระยะเวลา 2 วัน พบว่ามีข้อบกพร่องจำนวน 6 ข้อ (ตารางที่ 4) และข้อสังเกตจำนวน 6 ข้อ (ตารางที่ 5) ข้อบกพร่องและข้อสังเกตที่ได้รับการแก้ไขและส่งให้กับสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เรียบร้อยแล้วในเดือนกันยายน 2557 รายละเอียดการแก้ไขตามตารางที่ 6 สำหรับการแก้ไขข้อบกพร่องและตารางที่ 7 สำหรับการแก้ไขข้อสังเกต

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบข้อกำหนดระหว่างระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025: 2005 กับ ISO guide 34: 2009

หัวข้อ	ข้อกำหนด ISO/IEC 17025: 2005	หัวข้อ	ข้อกำหนด ISO guide 34: 2009
1.	ขอบข่าย : ข้อกำหนดครอบคลุมการทดสอบและการสอบเทียบเครื่องมือ	1.	ขอบข่าย : ข้อกำหนดครอบคลุมถึงการผลิตวัสดุอ้างอิง
2.	เอกสารอ้างอิง : ISO/IEC 17000 และ VIM	2.	เอกสารอ้างอิง : ครอบคลุมข้อกำหนด ISO/IEC 17025, ISO guide 30, 31 และ 35 รวมถึง ISO guide 98-3, 99, ISO 9000, 10012, 15189 และ 17000
3.	คำศัพท์และคำจำกัดความ : ISO/IEC 17000 และ VIM	3.	คำศัพท์และคำจำกัดความ: เป็นไปตาม ISO/IEC 17000, ISO/IEC 17025, ISO guide 30 และ 35, ISO 9000 และ ISO/IEC guide 99
		3.1	ผู้ผลิตวัสดุอ้างอิง (Reference material producer)
		3.2	ผู้รับเหมาช่วง (Subcontractors)
		3.3	การผลิตวัสดุอ้างอิง (Production of a reference material)
		3.4	วัสดุอ้างอิง (Reference material)
		3.5	วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference material)
		3.6	ความสัมพันธ์ของวัสดุอ้างอิง (Commutability of a reference material)
		3.7	การสอบย้อนกลับทางมาตรวิทยา (Metrological traceability)
		3.8	ความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)
4.9	การควบคุมงานทดสอบและหรือสอบเทียบที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนด	4.9	การควบคุมงานและหรือวัสดุอ้างอิงที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนด
5.	ข้อกำหนดด้านวิชาการ	5.	ข้อกำหนดด้านการผลิตและวิชาการ
5.1	ทั่วไป: ข้อกำหนดว่าด้วยการวัดความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์และหรือการสอบเทียบเครื่องมือ รวมถึงการฝึกอบรมบุคลากรและการกำหนดคุณลักษณะบุคลากร	5.1	ทั่วไป: ข้อกำหนดจะครอบคลุมถึงการผลิตวัสดุอ้างอิงที่ได้รับการรับรองและที่ไม่ได้รับการรับรอง
		5.3	ผู้รับเหมาช่วง
		5.4	การวางแผนการผลิต
		5.7	การจัดการวัสดุและการจัดเก็บ
		5.8	กระบวนการผลิตวัสดุ
		5.11	การประเมินผลข้อมูล
		5.13	การประเมินความเป็นเนื้อเดียวกัน
		5.14	การประเมินความคงตัว
		5.15	คุณลักษณะ
		5.16	การกำหนดค่าคุณสมบัติและความไม่แน่นอน
		5.17	เอกสารและใบรับรองสำหรับผู้ใช้
		5.18	การบริการจัดส่ง

ตารางที่ 4 ข้อบกพร่องที่ได้รับจากการตรวจประเมิน ISO guide 34: 2009

ลำดับที่	รายละเอียดข้อบกพร่องที่พบ	จำนวน (เรื่อง)
1.	ข้อมูลผลการฝึกอบรมบุคลากรใหม่ สำหรับการผลิตสารชีววัตถุมาตรฐานอ้างอิงตามหนังสือที่ สธ 0603/- ลงวันที่ 1 สิงหาคม 2554 มีเกณฑ์การประเมินผลและการอบรม เรื่องความรู้ ความเข้าใจทางสถิติไม่เหมาะสม	1
2.	เอกสาร SOP 03 04 017 มีรายละเอียดไม่ครอบคลุมตามข้อกำหนด ISO/IEC 17025: 2005 ดังนี้ - หน้า 1/7 ไม่ได้ระบุวิธีการตรวจว่าเป็น Membrane filtration หรือ Direct inoculation อย่างชัดเจนในหัวข้อใหญ่ - หน้า 2/7 ข้อ 5. หลักการ บรรทัดที่ 3 “...ชีววัตถุอ้างอิงมาตรฐานนั้น ปลอดภัยจะไม่พบตะกอนของอาหารเลี้ยงเชื้อ” คำว่า “ตะกอน” ไม่สื่อถึงการเจริญเติบโตของเชื้อทั่วไป ซึ่งอาจจะขึ้นแต่ไม่มีตะกอน - หน้า 4/7 ข้อ 10.6 Negative control มีรายละเอียดไม่เหมาะสม ได้แก่ - ตารางที่ 1 ไม่พบการระบุจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบและ - ไม่พบการทดสอบ Presence of antimicrobial activity	1
3.	การควบคุมเอกสารและข้อมูล ไม่ถูกต้อง ดังนี้ - เอกสาร SOP 03 04 014 เรื่อง Preparation and calibration of working reference standard preparation for mumps vaccine มีรายละเอียดที่จำเป็นและสำคัญไม่ครบถ้วนตามการปฏิบัติงานจริง - WS 03 04 029 เรื่อง Stability study of working reference standard preparation มีเนื้อหาในแต่ละช่วงไม่สอดคล้องกัน เช่น การกำหนดช่วงเวลากับการศึกษา Stability เป็นต้น - ไม่พบวิธี/ขั้นตอนการวัด pH ของ working reference standard preparation ที่ผลิตขึ้น	1
4.	ไม่พบ Technical record ที่เป็นข้อมูลดิบ (First primary data) ในการตรวจวัดค่า pH	1
5.	การทำ Homogeneity ในขั้นตอนการสุ่มตัวอย่าง ไม่เป็นไปตามเอกสาร SOP 03 04 031 และไม่พบ Technical record ในการสุ่มตัวอย่าง	1
6.	ไม่พบเกณฑ์การกำหนดค่า pH (Assignment of property value)	1

ตารางที่ 5 ข้อสังเกตที่พบจากการตรวจประเมิน ISO guide 34: 2009

ลำดับที่	รายละเอียดข้อข้อสังเกตที่พบ	จำนวน (เรื่อง)
1.	ไม่พบ Validation data ที่สนับสนุนการดำเนินการ การขนส่งชีววัตถุมาตรฐานอ้างอิง ตามเอกสาร SOP 03 04 032	1
2.	การทบทวนคำขอ ข้อเสนอ และข้อสัญญา ในเอกสาร QCM บทที่ 5 และ SOP 03 00 027 ไม่มีการระบุ	1
3.	การประชุม Management review ตามข้อกำหนด ISO guide 34: 2009 ไม่ครอบคลุมภาวะ Management system และ Production process มีแต่การพิจารณาเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับข้อบกพร่องจากการทำ Internal audit	1
4.	สถานที่และสภาวะแวดล้อมควรปรับปรุง พบห้องปลอดเชื้อ (Cleanroom) หมายเลข 214/1 และ 214/2 ที่ใช้สำหรับการเตรียมวัสดุอ้างอิง WRP (Working reference preparation) สำหรับ Mumps vaccine เป็นห้องที่ใช้ในการวิเคราะห์หาความแรง พิสูจน์เอกลักษณ์ ความเป็นเนื้อเดียวกัน ความคงตัว การสอบเทียบ งานวิจัยและพัฒนาวัคซีนชนิดอื่น และผู้ปฏิบัติงานคนหนึ่ง ทำงานกับไวรัสหลายชนิด หลายผลิตภัณฑ์ จึงควรต้องแสดงให้เห็นระบบประกันคุณภาพ ที่มีมาตรการควบคุมไม่ให้เกิดข้อผิดพลาดจากบุคลากรจากการปนเปื้อน และจากการใช้ห้อง Cleanroom ที่มากเกินไป	1
5.	Material processing (การดำเนินการงานการผลิตวัสดุอ้างอิง) ควรแก้ไขดังนี้ - คู่มือคุณภาพ QCM บทที่ 23 เรื่อง กระบวนการตรวจรับวัสดุ หัวข้อและเนื้อหา ไม่ครอบคลุมตามข้อกำหนด - SOP 03 04 014 เรื่อง การเตรียมและการสอบเทียบ WRP ฉบับแก้ไขครั้งที่ 7 - หน้า 1/9 ข้อ 4 นิยามและคำย่อ ข้อ 4.4 CCID₅₀ (Cell culture infective dose) ไม่มีคำว่า “50%” ในคำอธิบาย - หน้า 2/9 บรรทัดแรก “และคำนวณค่าเฉลี่ย (Geometric mean; G.M.)...” ไม่มีคำว่า “เรขาคณิต” หลังคำว่าค่าเฉลี่ย - หน้า 4/9 ข้อ 10 วิธีดำเนินการ ไม่พบ - ข้อ 10.1 การประมาณจำนวนเซลล์และการระบุขนาดของ Tissue culture flasks ที่ใช้กับการผลิต WRP และใช้กับ Control ซึ่งแตกต่างกัน - ข้อ 10.4 Multiplicity of infection (MOI) (จำนวนไวรัส/ จำนวนเซลล์) โดยประมาณ - หน้า 5/9 ข้อ 10.9.3 ถึง 10.9.4 ไม่พบขั้นตอนการทำให้เกิด Homogeneity - หน้า 6/9 ข้อ 10.10.1 “เติม Maintenance medium... ทุกหลุม” ไม่ได้ระบุว่าจะให้เติมในภาชนะอะไร	1
6.	เอกสาร SOP 03 04 018 หน้า 3/6 ข้อ 10.1.1 กล่าวว่า Homogeneity ของงานด้าน Cell culture ต้องมีค่า %CV < 25% แต่ในทางปฏิบัติการตรวจ Homogeneity ตามเอกสาร SOP 03 04 031 ใช้การเปรียบเทียบตามตาราง One-way ANOVA	1

ตารางที่ 6 การแก้ไขข้อบกพร่องจากการตรวจประเมิน ISO guide 34: 2009

ลำดับที่	รายละเอียดข้อบกพร่อง	การดำเนินการแก้ไข
1.	ข้อมูลผลการฝึกอบรมบุคลากรใหม่ สำหรับการผลิตสารชีววัตถุมาตรฐานอ้างอิง ตามหนังสือที่ สธ 0603/- ลงวันที่ 1 สิงหาคม 2554 มีเกณฑ์การประเมินผล และการอบรมเรื่องความรู้ ความเข้าใจทางสถิติไม่เหมาะสม	1. การขยายผล : ไม่มี 2. ผลการวิเคราะห์หาสาเหตุ : ไม่มี 3. การแก้ไข : ทางกลุ่มชีววัตถุมาตรฐานได้ทำการแก้ไข SOP การฝึกอบรมบุคลากรใหม่สำหรับการผลิตสารชีววัตถุมาตรฐานอ้างอิง โดยได้เพิ่มรายละเอียดในการฝึกอบรมการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเฉพาะด้าน โดยมีการกำหนดจำนวนครั้งการทดสอบให้ชัดเจนขึ้น 4. การป้องกัน: ให้ความรู้ความเข้าใจกับเจ้าหน้าที่ในการใช้สถิติเพื่อวิเคราะห์ข้อมูลหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ต้องมีผลการทดสอบอย่างน้อย 3 ค่าและให้ปฏิบัติตาม SOP 5. การประเมินผลกระทบ : ไม่มี
2.	Sterility test for mumps vaccine ตามเอกสาร SOP 03 04 017 มีรายละเอียดไม่ครอบคลุมตามข้อกำหนด ISO/ IEC 17025: 2005 ดังนี้ 1. หน้า 1/7 ไม่ได้ระบุวิธีการตรวจว่าเป็น Membrane filtration หรือ Direct inoculation อย่างชัดเจนในหัวข้อใหญ่ 2. หน้า 2/7 ข้อ 5. หลักการ บรรทัดที่ 3 “...ชีววัตถุมาตรฐานอ้างอิงนั้น ปลอดเชื้อจะไม่พบตะกอนขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ” คำว่า “ตะกอน” ไม่สื่อถึงการเจริญเติบโตของเชื้อทั่วไป ซึ่งอาจจะขุ่นแต่ไม่มีตะกอน 3. หน้า 4/7 ข้อ 10.6 Negative control มีรายละเอียดไม่เหมาะสม ได้แก่ 3.1 ตารางที่ 1 ไม่พบการระบุจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบและ 3.2 ไม่พบการทดสอบ Presence of antimicrobial activity	1. การขยายผล : ไม่มี 2. ผลการวิเคราะห์หาสาเหตุ : ไม่มี 3. การแก้ไข : ทำการทบทวน แก้ไข SOP 03 04 017 ฉบับแก้ไขครั้งที่ 5 โดยได้แก้ไขดังนี้ 1. เปลี่ยนชื่อเอกสารโดยได้ระบุวิธีการตรวจสอบความปราศจากเชื้อว่าใช้วิธี direct inoculation หน้า 1 of 7 2. แก้ไขตัดคำว่า “ตะกอน” ออก ใช้เป็น “ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ” ข้อ 5.0 หลักการ และข้อ 14 การรายงานผล 3. negative control ได้เพิ่มรายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับตัวอย่างที่จะตรวจสอบเป็น negative control คือใช้ diluents หรืออาหารเลี้ยงเซลล์ และ cell fluid ที่ได้จาก flask cell control ในขั้นตอนการจัดเตรียมชีววัตถุมาตรฐานมาเป็นตัวอย่าง negative control ข้อ 10.7 - ได้เพิ่มตารางแสดงจำนวนตัวอย่างที่สุ่มมาเพื่อตรวจสอบความปราศจากเชื้อตารางที่ 1 - ได้ทำการทดสอบ Growth inhibitory effect ของ WRP. Of Mumps vaccine ที่ปริมาตรส่งตรวจ 0.5 ml/cryotube ว่าเมื่อทดสอบด้วย

ตารางที่ 6 การแก้ไขข้อบกพร่องจากการตรวจประเมิน ISO guide 34: 2009 (ต่อ)

ลำดับที่	รายละเอียดข้อบกพร่อง	การดำเนินการแก้ไข
		อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบความปราศจากเชื้อ ปริมาตร 25 ml พบว่าปริมาณของ antibiotic ในตัวอย่างมีน้อยจนไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง การเจริญเติบโตของเชื้อได้ (เอกสารแนบ 6) 4. การป้องกัน : ไม่มี 5. การประเมินผลกระทบ : ไม่มี
3.	การควบคุมเอกสารและข้อมูล ไม่ถูกต้อง ดังนี้	
1.	เอกสาร SOP 03 04 014 เรื่อง Preparation and calibration of working reference standard preparation for mumps vaccine มีรายละเอียดที่จำเป็นและสำคัญไม่ครบถ้วน ตามการปฏิบัติงานจริง	1. การขยายผล : ไม่มี
2.	WS 03 04 029 เรื่อง Stability study of working reference standard preparation มีเนื้อหาในแต่ละช่วง ไม่สอดคล้องกัน เช่น การกำหนดช่วงเวลากับ การศึกษา Stability เป็นต้น	2. ผลการวิเคราะห์หาสาเหตุ : มีการใช้เอกสารเป็น คู่มือหลายฉบับ
3.	ไม่พบวิธี/ขั้นตอนการวัด pH ของ working reference standard preparation ที่ผลิตขึ้น	3. การแก้ไข : รวบรวมเนื้อหาในคู่มือฉบับต่าง ๆ ไว้ ใน SOP ฉบับเดียวและทบทวนแก้ไข ดังนี้
		1. ได้มีการทบทวนและแก้ไข SOP 03 04 014 ฉบับแก้ไขครั้งที่ 8 โดยมีการเพิ่มรายละเอียด วิธีดำเนินการดังนี้ - เพิ่มรายละเอียดการวางแผนการผลิต ชีววัตถุมาตรฐานอ้างอิงข้อ 10.1 - เพิ่มรายละเอียดเกี่ยวกับขนาด flask, ปริมาณเซลล์/ขนาด flask ให้ชัดเจน ข้อ 10.2 - เพิ่มรายละเอียดเกี่ยวกับจำนวนไวรัสและ establish titer ของสารมาตรฐานข้อ 10.3 - กำหนดค่า MOI ของไวรัสคางทูม - เพิ่มขั้นตอนการทำให้เกิดความเป็นเนื้อเดียวกันข้อ 10.5 - เพิ่มรายละเอียดการตรวจสอบปนเปื้อน จากส่วนใสที่ได้จาก flask ของ cell control ข้อ 10.10.6 - เพิ่มขั้นตอนการตรวจสอบเอกลักษณ์ ข้อ 10.10.7 - เพิ่มขั้นตอนการตรวจสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน 10.10.9 - เพิ่มขั้นตอนการจัดทำเอกสารรับรอง คุณสมบัติและวิธีการใช้งานชีววัตถุมาตรฐาน อ้างอิงข้อ 10.11.8

ตารางที่ 6 การแก้ไขข้อบกพร่องจากการตรวจประเมิน ISO guide 34: 2009 (ต่อ)

ลำดับที่	รายละเอียดข้อบกพร่อง	การดำเนินการแก้ไข
		- เพิ่มขั้นตอนการตรวจสอบความคงตัวของชีววัตถุมาตรฐานอ้างอิงข้อ 10.11.9 - เพิ่มแผนภูมิการผลิตชีววัตถุมาตรฐานสำหรับวัคซีนป้องกันโรคคางทูมหน้า 8 of 13 – 9 of 13
		2. ได้มีการปรับแก้ WS ให้สะดวกในการปฏิบัติงาน (เอกสารแนบ 13)
		3. ได้เพิ่มรายละเอียดขั้นตอนการวัด pH โดยให้ปฏิบัติตาม SOP 03 04 031 การศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกันของชีววัตถุมาตรฐานอ้างอิงทั้งเรื่อง จำนวนตัวอย่างที่สุ่ม การสุ่มตัวอย่าง ข้อ 10.10.5
		4. การป้องกัน : ไม่มี
		5. การประเมินผลกระทบ : ไม่มี
4.	ไม่พบ Technical record ที่เป็นข้อมูลดิบ (First primary data) ในการตรวจวัดค่า pH	1. การขยายผล : ไม่มี 2. ผลการวิเคราะห์หาสาเหตุ : ไม่มีการบันทึกผลการตรวจวัดค่า pH ใน WS 03 02 009 3. การแก้ไข : กำหนดให้การตรวจ pH ไว้ในคู่มือการปฏิบัติงานการเตรียมและการสอบเทียบวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานสำหรับวัคซีนป้องกันโรคคางทูม (SOP 03 04 014) ฉบับแก้ไขครั้งที่ 9 และเน้นย้ำในผู้ปฏิบัติงานบันทึกผลการทดสอบในแบบบันทึกผลการทดสอบ WS 03 02 009 4. การป้องกัน : ไม่มี 5. การประเมินผลกระทบ : ไม่มี
5.	การทำ Homogeneity ในขั้นตอนการสุ่มตัวอย่าง ไม่เป็นไปตามเอกสาร SOP 03 04 031 และไม่พบ Technical record ในการสุ่มตัวอย่าง	1. การขยายผล : ไม่มี 2. ผลการวิเคราะห์หาสาเหตุ : 3. การแก้ไข : ปรับแก้ WS 03 04 031 ให้เพิ่มเติมรายละเอียดในการสุ่มตัวอย่าง 4. การป้องกัน : ให้ปฏิบัติตาม SOP 03 04 031 อย่างเคร่งครัด 5. การประเมินผลกระทบ : ไม่มี

ตารางที่ 6 การแก้ไขข้อบกพร่องจากการตรวจประเมิน ISO guide 34: 2009 (ต่อ)

ลำดับที่	รายละเอียดข้อบกพร่อง	การดำเนินการแก้ไข
6.	ไม่พบเกณฑ์การกำหนดค่า pH (Assignment of property value)	1. การขยายผล : ไม่มี 2. ผลการวิเคราะห์หาสาเหตุ : ทดสอบ pH เพื่อเก็บเป็นข้อมูลประกอบเท่านั้น จึงไม่ได้กำหนดไว้ในเกณฑ์ 3. การแก้ไข : กำหนดช่วงค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับวัดชิ้นคางทุมเป็น 6.0 – 8.0 ในข้อ 10.10.4 SOP 03 04 014 ฉบับแก้ไขครั้งที่ 9 และมีการกำหนดใน production plan 4. การป้องกัน : ไม่มี 5. การประเมินผลกระทบ : ไม่มี

ตารางที่ 7 การแก้ไขข้อสังเกตจากการตรวจประเมิน ISO guide 34: 2009

ลำดับที่	รายละเอียดข้อสังเกตที่พบ	จำนวน (เรื่อง)
1.	ไม่พบ Validation data ที่สนับสนุนการดำเนินการ การขนส่งชีววัตถุมาตรฐานอ้างอิงตามเอกสาร SOP 03 04 032	1. การขยายผล : ทำการศึกษาการใช้น้ำแข็งแห้งเพื่อใช้ในการขนส่งชีววัตถุ 2. ผลการวิเคราะห์หาสาเหตุ : 3. การแก้ไข : ศึกษาและรายงานผลการศึกษาการใช้น้ำแข็งแห้งเพื่อใช้ในการขนส่งชีววัตถุ โดยใช้เป็นตัวแทนของชีววัตถุชนิดต่างๆ ที่ต้องขนส่งที่อุณหภูมินี้ 4. การป้องกัน : ไม่มี 5. การประเมินผลกระทบ : ไม่มี
2.	การทบทวนคำขอ ข้อเสนอ และข้อสัญญาในเอกสาร QCM บทที่ 5 และ SOP 03 00 027 ไม่มีการระบุ	1. การขยายผล : ทบทวนเอกสารคู่มือคุณภาพ 2. ผลการวิเคราะห์หาสาเหตุ : ไม่มี 3. การแก้ไข : เพิ่มเนื้อหาบทที่ 5 การทบทวนคำขอ ข้อเสนอ และข้อสัญญาให้ชัดเจน 4. การป้องกัน : ไม่มี 5. การประเมินผลกระทบ : ไม่มี
3.	การประชุม Management review ตามข้อกำหนด ISO guide 34: 2009 ไม่ครอบคลุมภาวะ Management system และ Production process มีแต่การพิจารณาเฉพาะที่เกี่ยวข้อง	1. การขยายผล : ไม่มี 2. ผลการวิเคราะห์หาสาเหตุ : ไม่มี 3. การแก้ไข : ทบทวนคู่มือการปฏิบัติงานการทบทวนการบริหาร (Management Review)

ตารางที่ 7 การแก้ไขข้อสังเกตจากการตรวจประเมิน ISO guide 34: 2009 (ต่อ)

ลำดับที่	รายละเอียดข้อสังเกตที่พบ	จำนวน (เรื่อง)
	ข้อบกพร่องจากการทำ Internal audit	(SOP 03 00 009) โดยเพิ่มการพิจารณาในส่วน ของ ISO Guide 34: 2009 ด้วย ส่วนของ Production process จะให้พิจารณาในหัวข้อ 2.1 4. การป้องกัน : ไม่มี 5. การประเมินผลกระทบ : ไม่มี
4	สถานที่และสภาวะแวดล้อมควรปรับปรุง พบ ห้องปลอดเชื้อ (Cleanroom) หมายเลข 214/1 และ 214/2 ที่ใช้สำหรับการเตรียมวัสดุอ้างอิง WRP (Working reference preparation) สำหรับ Mumps vaccine เป็นห้องที่ใช้ในการ วิเคราะห์หาความแรง พิสูจน์เอกลักษณ์ ความเป็น เนื้อเดียวกัน ความคงตัว การสอบเทียบ งานวิจัย และพัฒนาวัคซีนชนิดอื่น และผู้ปฏิบัติงานคนหนึ่ง ทำงานกับไวรัสหลายชนิด หลายผลิตภัณฑ์ จึงควร ต้องแสดงให้เห็นระบบประกันคุณภาพ ที่มีมาตรการ ควบคุมไม่ให้เกิดข้อผิดพลาดจากบุคลากร จากการปนเปื้อน และจากการใช้ห้อง Cleanroom ที่มากเกินไป	1. การขยายผล : ไม่มี 2. ผลการวิเคราะห์หาสาเหตุ : ไม่มี 3. การแก้ไข : ปัญหาปริมาณห้องปฏิบัติที่มีต้องใช้งาน ตรวจสอบผลิตภัณฑ์หลายชนิดนั้น ทางสถาบันฯ มาตรการจัดการดังนี้ - ได้จัดทำตารางจองห้องปฏิบัติ และขณะปฏิบัติงาน จะไม่มี การปฏิบัติงานร่วมกับของผลิตภัณฑ์ หลายๆ ชนิดในเวลาเดียวกัน จึงไม่มีปัญหาเรื่อง cross contamination - มีการตรวจสอบประสิทธิภาพปลอดเชื้อว่ายังคง ทำงานได้อย่างเป็นปกติ และก่อนเริ่มปฏิบัติงาน ผู้ปฏิบัติงานต้องมีการเปิด UV ตู้ปลอดเชื้อ และทำความสะอาดด้วย 70% alcohol - มีการจัดเตรียม SOP ไว้ในพื้นที่ปฏิบัติงาน เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานได้ดูขณะปฏิบัติงาน ทำให้ ไม่เกิดความสับสนถึงแม้ผู้ปฏิบัติงานจะมี หน้าที่รับผิดชอบผลิตภัณฑ์หลายชนิด 4. การป้องกัน : ไม่มี 5. การประเมินผลกระทบ : ไม่มี
5.	Material processing (การดำเนินการผลิต วัสดุอ้างอิง) ควรแก้ไขดังนี้ 1. เอกสารคู่มือคุณภาพ QCM บทที่ 23 เรื่อง กระบวนการตรวจรับวัสดุ หัวข้อและ เนื้อหา ไม่ครอบคลุมตามข้อกำหนด 2. SOP 03 04 014 เรื่อง การเตรียมและ การสอบเทียบ WRP ฉบับแก้ไขครั้งที่ 7 2.1 หน้า 1/9 ข้อ 4 นิยามและคำย่อ ข้อ 4.4 CCID ₅₀ (Cell culture infective	1. การขยายผล : ไม่มี 2. ผลการวิเคราะห์หาสาเหตุ : ไม่มี 3. การแก้ไข : 1. มีการทบทวนและแก้ไข คู่มือคุณภาพ การผลิตชีววัตถุมาตรฐานอ้างอิง ฉบับแก้ไข ครั้งที่ 3 บทที่ 23 กระบวนการผลิต 2. มีการทบทวน และแก้ไข SOP 03 04 014 ฉบับ แก้ไขครั้งที่ 8 โดยมีการแก้ไขเพิ่มเติมดังนี้ - เพิ่มเติมรายละเอียด “50%” ในนิยามและ คำย่อข้อ 4.4

ตารางที่ 7 การแก้ไขข้อสังเกตจากการตรวจประเมิน ISO guide 34: 2009 (ต่อ)

ลำดับที่	รายละเอียดข้อสังเกตที่พบ	จำนวน (เรื่อง)
	dose) ไม่มีคำว่า “50%” ในคำอธิบาย	- การใช้ค่าเฉลี่ย ปัจจุบันใช้ค่าเฉลี่ย (mean) ไม่ได้ใช้ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (geometric mean) ซึ่งแก้ไขตามคำแนะนำของนักสถิติ ซึ่งได้แก้ไขรายละเอียดใน SOP 03 04 014 ฉบับแก้ไขครั้งที่ 8 ไปแล้ว ข้อ 5.0
2.2	หน้า 2/9 บรรทัดแรก “และคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Geometric mean; G.M.)...” ไม่มีคำว่า “เรขาคณิต” หลังคำว่าค่าเฉลี่ย	- มีการเพิ่มรายละเอียดเกี่ยวกับขนาด flask, ปริมาณเซลล์/ ขนาด flask และกำหนดค่า MOI ให้ชัดเจน ในวิธีดำเนินการ (Procedures) ข้อ 10.0
2.3	หน้า 4/9 ข้อ 10 วิธีดำเนินการ ไม่พบ	- เพิ่มขึ้นตอนการทำให้มีความเป็นเนื้อเดียวกัน โดยการกวนด้วย magnetic stirrer ในข้อ 10.10.4
	- ข้อ 10.1 การประมาณจำนวนเซลล์ และการระบุขนาดของ Tissue culture flasks ที่ใช้กับการผลิต WRP และใช้กับ Control ซึ่งแตกต่างกัน	- มีการระบุชนิดของ plate ให้ชัดเจนว่าเป็น 96-well flat tissue culture plate ในวิธีดำเนินการ
	- ข้อ 10.4 Multiplicity of infection (MOI) (จำนวนไวรัส/ จำนวนเซลล์) โดยประมาณ	4. การป้องกัน : ไม่มี
2.4	หน้า 5/9 ข้อ 10.9.3 ถึง 10.9.4 ไม่พบขั้นตอนการทำให้เกิด Homogeneity	5. การประเมินผลกระทบ : ไม่มี
2.5	หน้า 6/9 ข้อ 10.10.1 “เติม Maintenance medium... ทุกหลุม” ไม่ได้ระบุว่าให้เติมในภาชนะอะไร	
6.	Homogeneity ตามเอกสาร SOP 03 04 018 หน้า 3/6 ข้อ 10.1.1 กล่าวว่า Homogeneity ของงานด้าน Cell culture ต้องมีค่า %CV < 25% แต่ในทางปฏิบัติการตรวจ Homogeneity ตามเอกสาร SOP 03 04 031 ใช้การเปรียบเทียบตามตาราง One-way ANOVA	1. การขยายผล : ไม่มี 2. ผลการวิเคราะห์สาเหตุ : ไม่มี 3. การแก้ไข : ได้มีการปรับแก้ SOP 03 04 018 ฉบับแก้ไขครั้งที่ 5 โดยอ้างถึง SOP 03 04 031 ฉบับแก้ไขครั้งที่ 3 4. การป้องกัน : มีการระบุการใช้สถิติในขั้นตอนการวางแผนการผลิตชีววัตถุมาตรฐาน

วิจารณ์

การพัฒนาศักยภาพของการจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน

เดิมสถาบันฯ ได้จัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานในรูปของเหลว ต่อมาเมื่อได้รับการจัดสรรงบประมาณจัดซื้อเครื่องทำแห้งในปี 2552 จึงได้พัฒนาการจัดเตรียมจากของเหลวมาเป็นผงแห้ง เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ เช่น มีความสะดวกในการจัดเก็บ ให้ค่าความคงตัวที่สูงสามารถเก็บไว้ใช้ได้ยาวนานหลายปีและง่ายต่อการขนส่ง จึงได้เร่งพัฒนาการจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานหลายชนิดโดยเฉพาะวัคซีนที่ใช้ในแผนสร้างเสริมภูมิคุ้มกันในประเทศตั้งแต่ปี 2553 เช่น วัคซีนป้องกันโรคคางทูม วัคซีนโรค หัด หัดเยอรมัน และวัคซีนที่ในอนาคตจะนำมาใช้ในเด็กไทย เช่น วัคซีนป้องกันโรคอุจจาระร่วงในเด็กแรกเกิดไวรัสโรตา วัคซีนทุกชนิดที่พัฒนาขึ้นจะถูกนำมาใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานของประเทศในอนาคต ซึ่งจะต้องถูกกำหนดค่าความแรงร่วมกับผู้ผลิตวัคซีนในประเทศ เช่น วัคซีนป้องกันโรคคางทูม และหัด เป็นต้น นอกจากนี้เพื่อรองรับการจัดเก็บวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน สถาบันฯ ดำเนินการจัดสร้างคลังวัคซีนมาตรฐานของภูมิภาคสืบเนื่องจากการเสนอให้ประเทศไทยเป็นแหล่งเก็บวัคซีนมาตรฐานในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในปี พ.ศ. 2553 จากการประชุม Regional National Control Laboratory Network Meeting ซึ่งในอนาคตอาคารคลังวัคซีนมาตรฐานจะถูกจัดเก็บไม่เพียงแต่วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานในประเทศเท่านั้น ยังเป็นสถานที่จัดเก็บวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ด้วย

กระบวนการพัฒนาห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านวัคซีนและการพัฒนาเพื่อรองรับระบบคุณภาพว่าด้วยการเป็นผู้ผลิตวัสดุอ้างอิง

เอกสารคุณภาพได้ถูกจัดทำขึ้นใหม่ จำนวน 13 ฉบับ เพื่อรองรับระบบคุณภาพว่าด้วยการผลิตวัสดุอ้างอิง ISO guide 34: 2009 และรองรับการตรวจประเมินระบบในปี 2557 ซึ่งสถาบันชีววัตถุ ถือเป็นหน่วยงานแรกของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ยื่นขอการรับรองจากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยใช้ระยะเวลา 2 ปี ในการพัฒนาระบบและบุคลากร รวมถึงการจัดทำฐานข้อมูลระบบคุณภาพ เช่น ฐานข้อมูลการสอบเทียบเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ฐานข้อมูลการประชุมฝึกอบรม สัมมนาตุนงานและฐานข้อมูลเอกสารมาตรฐานการปฏิบัติงาน เป็นต้น เพื่อให้สามารถตรวจสอบและติดตามข้อมูลที่เป็นปัจจุบันในระบบคุณภาพ รวมทั้งง่ายต่อการค้นหาและการจัดเก็บที่ปลอดภัย ซึ่งการจัดทำระบบคุณภาพใหม่ขึ้นในห้องปฏิบัติการถือเป็นเรื่องที่ทำด้วยความสามารถ เพราะต้องใช้เวลาศึกษาทำความเข้าใจพร้อมเปรียบเทียบกับระบบคุณภาพที่ดำเนินการอยู่คือ ISO/IEC 17025: 2005 เพื่อศึกษาความแตกต่างของข้อกำหนด (ตารางที่ 3) ก่อนดำเนินการจัดทำเอกสารเพิ่มเติม ซึ่งส่วนใหญ่เอกสารที่จัดเตรียมขึ้นใหม่ จำนวน 13 ฉบับ (ตารางที่ 1) เป็นเรื่องที่เกี่ยวข้องกับการผลิตวัสดุอ้างอิงทั้งสิ้น ซึ่งอาจมีการจัดเตรียมเอกสารเพิ่มเติมหรือแก้ไขให้สอดคล้องกับระบบคุณภาพ ISO guide 34: 2009 มากยิ่งขึ้น หลังการตรวจประเมิน

การขอการรับรองระบบคุณภาพว่าด้วยการผลิตวัสดุอ้างอิงตามข้อกำหนด ISO guide 34:2009

ได้ดำเนินการขอรับรองระบบคุณภาพ ISO guide 34: 2009 ในปี 2557 จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นการตรวจประเมินการขอรับรองการผลิตวัคซีนคางทูมอ้างอิงมาตรฐาน เนื่องจากระบบคุณภาพ ISO guide 34: 2009 จะเน้นในเรื่องข้อกำหนดว่าด้วยการจัดเตรียมสารมาตรฐานทางเคมีเป็นหลัก ซึ่งมีความแตกต่างจากการจัดเตรียมสารมาตรฐานทางชีวภาพ ที่ต้องใช้สิ่งมีชีวิตในการจัดเตรียม ดังนั้นข้อกำหนดบางข้อใน ISO guide 34: 2009 อาจจะไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้กับสารมาตรฐานทางชีวภาพ เช่น ข้อกำหนดว่าด้วยการทดสอบความไม่แน่นอนของการวัด และการทดสอบทางสถิติ เป็นต้น ทำให้ต้องมีการชี้แจงรายละเอียดและ

ทำความเข้าใจร่วมกันระหว่างผู้ตรวจประเมินและผู้รับการตรวจประเมิน อย่างไรก็ตาม สถาบันชีววัตถุ ได้พยายามแก้ไขปรับปรุงสิ่งที่เป็นข้อบกพร่อง จำนวน 6 ข้อ และข้อสังเกต จำนวน 6 ข้อ ให้สอดคล้องกับ ISO guide 34: 2009 เพื่อการพัฒนาระบบคุณภาพดังกล่าว

สรุป

การพัฒนาระบบคุณภาพเพื่อให้ได้มาตรฐานเป็นการประกันคุณภาพของห้องปฏิบัติการให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล สถาบันชีววัตถุ เป็นหน่วยงานควบคุมกำกับของรัฐในการควบคุมคุณภาพวัคซีนและชีววัตถุในห้องปฏิบัติการ ได้พัฒนาระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 ซึ่งเป็นมาตรฐานที่ยอมรับทั่วไป แต่ในการควบคุมคุณภาพวัคซีนนั้น จำเป็นต้องใช้วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานเพื่อควบคุมคุณภาพผลการทดสอบควบคู่ไปกับตัวอย่างวัคซีน สถาบันฯ จึงพัฒนาการจัดเตรียมวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานในรูปแบบแห้ง เพื่อง่ายต่อการเก็บ จัดเก็บได้นาน เนื่องจากความคงตัวสูงและที่สำคัญง่ายต่อการขนส่ง และเพื่อสร้างศักยภาพการเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงในระดับสากล กระบวนการพัฒนาห้องปฏิบัติการด้านวัคซีนโดยการพัฒนาบุคลากร การจัดระบบบริหารจัดการวัคซีนอ้างอิงมาตรฐาน ตลอดจนการจัดเตรียมเอกสารคุณภาพที่เกี่ยวข้องกับการผลิตวัคซีนอ้างอิง เพื่อขอรับการตรวจรับรองระบบคุณภาพว่าด้วยการผลิตวัคซีนอ้างอิงตามมาตรฐาน ISO guide 34: 2009 ของประเทศคาดว่าจะได้รับการรับรองในปี พ.ศ. 2558 ซึ่งจะทำให้วัคซีนอ้างอิงมาตรฐานที่ผลิตโดยสถาบันชีววัตถุ เป็นที่ยอมรับในระดับภูมิภาคและสากล

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บุคลากรทุกท่านของสถาบันชีววัตถุ ที่ได้ให้ความร่วมมือในการพัฒนาระบบคุณภาพว่าด้วยการผลิตวัคซีนอ้างอิงของสถาบันฯ และขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันฯ นางธีระนารถ จิระไพศาลพงศ์ ที่สนับสนุนให้มีการพัฒนาศักยภาพการผลิตวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานและการขอรับการตรวจประเมินตามระบบ ISO guide 34: 2009

เอกสารอ้างอิง

1. กฎกระทรวงแบ่งส่วนราชการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2552 ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 126 ตอนที่ 98 ก (ลงวันที่ 28 ธันวาคม 2552)
2. กองชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ข้อกำหนดชีววัตถุ เล่มที่ 1. นนทบุรี: บริษัท กราฟฟิคส์เพช จำกัด; 2541.
3. กองชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ข้อกำหนดชีววัตถุ เล่มที่ 2. นนทบุรี: บริษัท กราฟฟิคส์เพช จำกัด; 2545.
4. Metz B, van den Dobbelen G, van Els C, van der Gun J, Levels L, van der Pol L, et al. Quality-control issues and approaches in vaccine development. Expert Rev Vaccines 2009; 8(2): 227-38.
5. WHO. Training manual: licensing, lot release, laboratory access. Geneva: World Health Organization; 2001.
6. WHO technical report series no. 932. Annex 2: recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards (revised 2004). Geneva: World Health Organization; 2006.

7. ISO Guide 34: 2009. General requirements for the competence of reference material procedures. Geneva: International Organization for Standardization; 2009.
8. ISO/IEC 17025: 2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: International Organization for Standardization; 2005.
9. อัครชัย อาเมน, จิรเดช ปัจฉิม, พรหมฉัตร เจริญพัฒน์, ณัฐกานต์ มิ่งงามทรัพย์, สุภาพร ภูมิอมร. การศึกษาหาสูตรตำรับที่เหมาะสมในการทำแท้งวัคซีนคางทูมอ้างอิงมาตรฐาน. ว กรรมวิทย์ พ 2554; 53(2): 97-112.
10. สุภาพร ภูมิอมร, อัครชัย อาเมน, จิรเดช ปัจฉิม, สิริรัตดา ร่วมพร, สุกัลยาณี ไชยมี. การประเมินความคงตัวของวัคซีนบีซีจีชนิดผงแห้งสำหรับใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานในประเทศ. วารสารวิชาการสาธารณสุข 2557; 23(2): 369-80.

Capacity Building of International Reference Laboratory through Development and ISO guide 34: 2009 Assessments

Teerapon Kachacheewa and Supaporn Phumiamorn

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

ABSTRACT Quality system, a major infrastructure of a reference laboratory, the Institute of Biological Products (IBP), as the National Control and Reference Laboratory for biological products, was primarily implemented with the ISO/IEC 17025:2005 for assuring its testing competency. In addition to vaccine quality testing, reference vaccines are significantly required for perceptible analysis. Consequently, the laboratory competency was extended through another quality system, the ISO Guide 34:2009, the requirements for reference materials producer. Several lyophilized reference vaccines have been produced for simple and long storage; and uncomplicated transportation purpose as well due to their good stability. The regional reference vaccines bank was established for well management of the quality system. Staff development for better understanding of knowledge concerned as well as quality manual preparation and documentation have been processed. The IBP was the first organization under the Department of Medical Sciences which requested for ISO Guide 34: 2009 assessment in B.E. 2557.

Key words: reference material producer, ISO Guide 34: 2009

การพัฒนาการเป็นผู้ดำเนินการแผนทดสอบ ความชำนาญการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา

ลดาวัลย์ จิ่งสมานกุล กมลวรรณ กันแต่ง และอัจฉรา อยู่คง

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยาเป็นการประเมินความสามารถในการตรวจวิเคราะห์และพัฒนาระบบคุณภาพของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ใช้บริการทดสอบความชำนาญจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาแพง ปัจจุบันประเทศไทยมีผู้ดำเนินการเพียง 1-2 ราย และไม่ครอบคลุมรายการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาที่จำเป็น ดังนั้นเพื่อเป็นทางเลือกหรือทดแทนการให้บริการจากต่างประเทศและเพิ่มศักยภาพของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในการพัฒนาห้องปฏิบัติการ ในปี พ.ศ. 2554 สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร (สคอ.) จึงได้เริ่มโครงการการให้บริการทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยา โดยในขั้นแรกได้จัดทำโครงการนำร่องเพื่อศึกษาทดลองเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญและส่งตัวอย่างทดสอบรายการ *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* ให้แก่หน่วยงานตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 16 แห่ง และให้ทุกหน่วยงานรายงานผลการตรวจภายในเวลาที่กำหนด ซึ่งจากผลที่ได้รับเป็นการยืนยันว่าตัวอย่างที่เตรียมสามารถใช้ทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยาได้ จึงขยายการให้บริการแก่ห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชนอย่างต่อเนื่องคือปีงบประมาณ 2555 ให้บริการ 2 รายการทดสอบได้แก่ *Salmonella* spp. และ *S.aureus* แต่ละรายการทดสอบให้บริการรายการละ 2 รอบ รวม 4 รอบ มีสมาชิกรวม 109 ราย ปีงบประมาณ 2556 เพิ่มขอบข่ายการให้บริการอีก 2 รายการทดสอบ ได้แก่ *Listeria monocytogenes* และจำนวนจุลินทรีย์รายการละ 1 รอบ รวม 4 รอบ มีสมาชิกรวม 177 ราย และปีงบประมาณ 2557 ขยายขอบข่ายการให้บริการเป็น 7 รายการทดสอบ โดยเพิ่มรายการทดสอบจำนวนจุลินทรีย์, จำนวน *Bacillus cereus*, จำนวน coliforms และจำนวน *Escherichia coli* รวม 7 รอบ มีสมาชิกรวม 356 ราย เจลีสมีห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบฯ ต่อรอบเพิ่มขึ้นตามลำดับคือ ปีงบประมาณ 2555-2557 เท่ากับ 27, 44 และ 51 รายตามลำดับ ซึ่งห้องปฏิบัติการสมาชิกสามารถนำผลที่ได้ไปประเมินความสามารถในการตรวจวิเคราะห์และปรับปรุงระบบคุณภาพของห้องปฏิบัติการ รายการทดสอบทั้ง 7 รายการนี้ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043: 2010 เมื่อต้นปี พ.ศ. 2558 การเป็นผู้ดำเนินการแผนทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาของ สคอ. เป็นการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพห้องปฏิบัติการของประเทศไทยและลดค่าใช้จ่ายของห้องปฏิบัติการต่างๆ ในการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญกับหน่วยงานต่างประเทศ

บทนำ

การทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing, PT) หมายถึงการประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์ เป็นการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการต่างๆ ที่เข้าร่วมในแผนการทดสอบความชำนาญ (Inter-laboratory comparison)⁽¹⁾ โดยผู้ดำเนินการแผนทดสอบความชำนาญ (PT provider, PTP) จัดส่งตัวอย่างที่แบ่งมาจากตัวอย่างเดียวกันไปยังห้องปฏิบัติการสมาชิกในช่วงเวลาเดียวกัน เพื่อให้สมาชิกตรวจวิเคราะห์และส่งผลภายในระยะเวลาที่กำหนด การเข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญสามารถนำมาใช้ชี้แจงคุณภาพผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและชี้แจงปัญหาของการปฏิบัติงานที่เป็นต้นเหตุทำให้ผลไม่สอดคล้องกับค่ากำหนด (assigned value) รวมทั้งส่วนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น การรายงานผลที่ชัดเจน การใช้หน่วยที่ถูกต้อง และการส่งผลในระยะเวลาที่กำหนด เป็นต้น

การทดสอบความชำนาญ จัดเป็นเครื่องมือสำคัญอย่างหนึ่งในการประกันคุณภาพผลการทดสอบตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2005 ข้อ 5.9.1 (b)⁽²⁾ โดยเป็นการประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการโดยองค์กรภายนอก (external quality assessment) และองค์กรรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการกำหนดเป็นหลักเกณฑ์หรือเงื่อนไขให้ห้องปฏิบัติการที่ประสงค์จะขอการรับรองต้องมีผลการทดสอบนี้⁽¹⁾ แต่เนื่องจากในปัจจุบันประเทศไทยมี PTP ทางจุลชีววิทยาไม่มาก ห้องปฏิบัติตรวจวิเคราะห์อาหารส่วนใหญ่ต้องเข้าร่วมทดสอบความชำนาญกับหน่วยงานในต่างประเทศซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูงมาก สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร (สคอ.) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งเป็นหน่วยงานที่ได้รับการยอมรับในความสามารถด้านการตรวจวิเคราะห์อาหาร และมีอำนาจหน้าที่ในการให้การสนับสนุนและพัฒนาระบบคุณภาพของห้องปฏิบัติการด้านสาธารณสุขทั้งหน่วยงานภาครัฐและเอกชน⁽³⁾ ได้รับการร้องขอจากห้องปฏิบัติการต่างๆ ให้เตรียมตัวอย่างสำหรับเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการและนำผลที่ได้ไปประกอบการยื่นขอรับการรับรอง ดังนั้น เพื่อให้ห้องปฏิบัติการทั่วไปสามารถนำผลเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการไปปรับปรุงคุณภาพการตรวจวิเคราะห์และยื่นขอการรับรอง จึงได้พัฒนาการให้บริการด้านการทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยาอย่างเป็นระบบ โดยในขั้นแรกได้จัดทำโครงการนำร่องเพื่อทดลองระบบและดำเนินกิจกรรมทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาในเดือนกันยายน 2554 สมาชิกเริ่มต้นได้แก่ห้องปฏิบัติการของกรมฯ ที่มีภารกิจด้านการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา ซึ่งประกอบด้วยห้องปฏิบัติการในส่วนกลาง 2 แห่ง และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 14 แห่ง รายการทดสอบได้แก่ *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* จากนั้นเดือนพฤศจิกายน 2554 สคอ. จึงได้ดำเนินการแผนทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา โดยให้บริการเต็มรูปแบบแก่สมาชิกทั้งจากภาครัฐและเอกชนและนำระบบมาตรฐาน ISO/IEC 17043: 2010 มาใช้ ซึ่งมีวัตถุประสงค์ คือ 1) เพิ่มศักยภาพด้านการเป็นผู้ดำเนินการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยาของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และของประเทศ ให้สามารถพึ่งพาตนเองได้ และทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้ประหยัดเงินตราของประเทศ 2) พัฒนาศักยภาพและเสริมสร้างความเข้มแข็งของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารด้านจุลชีววิทยาของประเทศไทยให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล

วิธีการ

การพัฒนาการเป็น PTP ทางจุลชีววิทยาเพื่อให้บริการแก่สมาชิกทั้งภาครัฐและเอกชน แบ่งเป็น 4 ระยะ ได้แก่ การวางแผนขั้นต้น การวางแผนด้านการจัดการ การดำเนินการเป็น PTP และการดำเนินการขอรับรองคุณภาพตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17043: 2010

ระยะที่ 1: การวางแผนขั้นต้น (Initial planning)

เป็นการศึกษาความพร้อมด้านเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ เช่น รายการทดสอบและความถี่หรือรอบการทดสอบที่จะให้บริการ ชนิดของตัวอย่างทดสอบ ระดับหรือปริมาณของจุลินทรีย์ รวมทั้งการจัดเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการที่เหมาะสม เป็นต้น มีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1.1 จัดตั้งทีมงาน ได้แก่ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ส่วนหนึ่ง ซึ่งมีประสบการณ์ด้านการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาเป็นอย่างดี ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005⁽²⁾ จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

1.2 สำรวจและเตรียมความพร้อมของสถานที่ โดยใช้พื้นที่ของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา

1.3 สำรวจความพร้อมของเครื่องมือ ได้แก่ เครื่องทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilizer) และวัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็นต้องใช้สำหรับการทำแห้งเยือกแข็ง ได้แก่ ขวดแก้วพร้อมฝาชนิดฆ่าเชื้อได้ (สามารถเข้าเครื่อง autoclave ได้) และทนต่อความเย็นที่อุณหภูมิต่ำๆ (ต่ำกว่า -40 องศาเซลเซียส) สำหรับเครื่องมือพื้นฐานอื่นๆ ใช้เครื่องมือที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ autoclave, balance (sensitivity 0.1 กรัม), glass bottle with screw cap, glass spreading rod, glass slide, incubator, loop, needle, pH-meter, petri dishes, pipette, safety cabinet, stomacher, stomacher bag, test tube, vortex mixer, water bath

1.4 ศึกษาเอกสารเกี่ยวกับข้อกำหนดทั่วไปของการทดสอบความชำนาญ เช่น ISO/IEC 17043: 2010⁽⁴⁾, ISO/TS 22117: 2010⁽⁵⁾, ISO 13528: 2005⁽⁶⁾ เป็นต้น เพื่อให้เกิดความเข้าใจและสามารถจัดทำเอกสารคุณภาพให้สอดคล้องกับระบบได้

1.5 ศึกษาคู่มือการปฏิบัติงาน เรื่อง สถิติที่ใช้ในการทดสอบความชำนาญ⁽⁷⁾ (SOP PT 20 T4 401) และเลือกใช้สถิติเฉพาะส่วนที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยา เช่น

- ◆ การทดสอบความแปรปรวนภายในตัวอย่าง (within sample variation) เพื่อศึกษาความแปรปรวน (variation) หรือความแตกต่างของการตรวจวิเคราะห์ซ้ำโดยใช้สถิติ Cochran's test

- ◆ การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของตัวอย่างทดสอบ โดยทดสอบความแปรปรวนระหว่างตัวอย่าง (between sample variation) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (One-way ANOVA)

- ◆ การหาค่ากำหนด (assigned value) และ z-score หรือ z'-score เป็นต้น

1.6 ศึกษาวิธีเตรียมตัวอย่างทดสอบทางจุลชีววิทยาจาก ISO 16140: 2003 / Amd.2011⁽⁸⁾

1.7 ศึกษาการสุ่มตัวอย่างโดยใช้โปรแกรมจาก <http://www.randomizer.org/form.htm>⁽⁹⁾

1.8 จัดหาจุลินทรีย์มาตรฐานต่างๆ เช่น *Salmonella* Typhimurium (DMST 562), *E. coli* (DMST 4212), *S. aureus* (DMST 8840), *S. epidermidis* (DMST 15505), *Listeria monocytogenes* (DMST 17303), *L. innocua* (DMST 9011), *B. cereus* (DMST 6228) เป็นต้น แหล่งของจุลินทรีย์มาตรฐานคือ ศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยจุลินทรีย์ที่รับมาจะต้องทดสอบก่อนนำมาใช้งานเพื่อให้แน่ใจว่าเป็นจุลินทรีย์ที่บริสุทธิ์ (pure) มีชีวิต (survive) และมีคุณสมบัติตรงตามต้องการ (characteristic) หรือที่กำหนดในวิธีวิเคราะห์

1.9 ทดลองเตรียมตัวอย่างทดสอบทางจุลชีววิทยา ซึ่งตัวอย่างทดสอบที่เตรียมรอบแรกเป็นการตรวจแบบคุณภาพ (Qualitative) คือ รายการ *Salmonella* spp. และ *S. aureus* ตรวจแบบพบ/ไม่พบ โดยเตรียมตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์เติมจุลินทรีย์เป้าหมาย (target microorganisms) เช่น *Salmonella* spp., *S. aureus* และจุลินทรีย์แข่งขัน (non target หรือ competitive microorganisms) และทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง

1.10 ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity test) และความคงตัว (stability) ของตัวอย่างทดสอบ (test material) โดยใช้วิธีมาตรฐานที่ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005⁽²⁾ จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หมายเลขทะเบียน 4043/50

1.11 ส่งตัวอย่างทางไปรษณีย์ด่วนพิเศษให้ห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่มีกิจกรรมตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา รวม 16 แห่ง ประกอบด้วย ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 14 แห่ง และ สคอ. 2 แห่งเพื่อวิเคราะห์และส่งผลกลับภายในเวลาที่กำหนด

ระยะที่ 2: การวางแผนด้านการจัดการ (Management planning)

เป็นการศึกษาความเหมาะสมของขั้นตอนการดำเนินงานในแต่ละขั้นตอน รวมทั้งระยะเวลาและเอกสารต่าง ๆ ที่จำเป็น เพื่อให้สอดคล้องกับระบบคุณภาพ ISO/IEC 17043: 2010⁽⁴⁾ มีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

2.1 ทบทวน/จัดทำมาตรฐานการปฏิบัติงาน (standard operating procedure: SOP) เพื่อกำหนดระเบียบปฏิบัติงานให้เป็นไปตามขั้นตอนและสามารถนำไปปฏิบัติได้

2.2 ทบทวน/จัดทำแบบฟอร์ม (forms) ที่ใช้บันทึกผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและอื่น ๆ เพื่อใช้เก็บไว้เป็นหลักฐานและการทวนสอบ

2.3 เข้ารับการอบรมเพิ่มเติมเรื่อง ISO/IEC 17043: 2010, ISO 13528: 2005

2.4 จัดระบบฐานข้อมูลในส่วนของการจัดเก็บข้อมูลสมาชิก ผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ การประเมินผล ฯลฯ

2.5 กำหนดระยะเวลาดำเนินการต่าง ๆ เช่น วันเตรียมตัวอย่างทดสอบ (ก่อนวันส่งตัวอย่างประมาณ 1 เดือน กรณีที่เป็นรายการทดสอบใหม่ ๆ จะเริ่มเตรียมตัวอย่างทดสอบก่อนวันส่งตัวอย่าง 2-3 เดือน) วันที่ส่งตัวอย่าง ช่วงเวลาตรวจวิเคราะห์ของสมาชิก วันสุดท้ายของการส่งรายงานผล วันส่งรายงานฉบับสมบูรณ์ การกำหนดระยะเวลาต่าง ๆ ต้องมีการวางแผนล่วงหน้าอย่างน้อย 3 เดือน ซึ่งต้องพิจารณาให้เหมาะสมกับวันทำการของห้องปฏิบัติการด้วย เช่น ไม่ตรงกับวันหยุดยาว หรือช่วงเทศกาลประจำปี

2.6 ศึกษาและคัดเลือกบรรจุภัณฑ์ บรรจุหีบห่อที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างทดสอบที่เป็นจุลินทรีย์

ระยะที่ 3: การดำเนินการเป็น PTP (PTP operation) มีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

3.1 เปิดรับสมัครสมาชิกโดยทำหนังสือเชิญส่งไปยังห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา ทั้งภาครัฐและเอกชน และประชาสัมพันธ์โครงการผ่านแผ่นพับและ website ของ สคอ. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.2 เตรียมตัวอย่างทดสอบ (test material) โดยเติมจุลินทรีย์ในตัวอย่างและทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งบรรจุในขวดแก้ว (vial) นำเข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilizer) ปิดฝาขวดด้วยจุกยางและฝาจุกนิยัม ระบุหมายเลขกำกับแต่ละขวด เก็บตัวอย่างทดสอบไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ตัวอย่างทดสอบมีความคงตัว^(5, 10) การเติมจุลินทรีย์ต้องพิจารณาปริมาณให้เหมาะสมต่อรายการทดสอบแต่ละรายการและเป็นไปตามหลักวิชาการ^(5, 8) โดยทั่วไปการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาสามารถแบ่งเป็นสองกลุ่มใหญ่ ๆ คือ การตรวจวิเคราะห์แบบคุณภาพ (qualitative test) คือ การตรวจหาแบบพบหรือไม่พบ (detection) เช่น *L. monocytogenes* (พบ/ไม่พบ ต่อ 25 กรัม), *Salmonella* spp. (พบ/ไม่พบ ต่อ 25 กรัม), *S. aureus* (พบ/ไม่พบ ต่อ 0.1 กรัม) และการตรวจวิเคราะห์แบบปริมาณ (quantitative test) คือ การตรวจแบบนับจำนวน (enumeration) เช่น จำนวนจุลินทรีย์ (cfu/กรัม), จำนวน *B. cereus* (cfu/กรัม), จำนวน coliforms (MPN/กรัม) และจำนวน *E. coli* (MPN/กรัม) เป็นต้น

การเติมจุลินทรีย์ในการตรวจวิเคราะห์แบบคุณภาพและแบบปริมาณจะแตกต่างกัน ดังนี้

การตรวจวิเคราะห์แบบคุณภาพ

เติมจุลินทรีย์เป้าหมาย (target microorganism) ให้เหลือรอดปริมาณต่ำๆ คือ ประมาณ 10-100 cfu ต่อหน่วยทดสอบ และเติมจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายหรือจุลินทรีย์แข่งขัน (non-target microorganisms หรือ competitive microorganisms) ให้เหลือรอดในปริมาณมากกว่าจุลินทรีย์เป้าหมายอย่างน้อย 100 เท่า^(8, 11) จุลินทรีย์เป้าหมายเช่น

- ◆ *S. aureus* เติมปริมาณ 10-100 cfu ต่อ 0.1 กรัม
- ◆ *L. monocytogenes* เติมปริมาณ 10-100 cfu ต่อ 25 กรัม
- ◆ *Salmonella* spp. เติมปริมาณ 10-100 cfu ต่อ 25 กรัม

การตรวจวิเคราะห์แบบปริมาณ

เติมจุลินทรีย์เป้าหมาย (target microorganism) ให้เหลือรอดในปริมาณที่อยู่ในช่วงของการนับของแต่ละวิธี และเติมจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายหรือจุลินทรีย์แข่งขัน (non-target microorganisms หรือ competitive microorganisms) ให้เหลือรอดใกล้เคียงตัวอย่างอาหารในธรรมชาติมากที่สุด⁽⁷⁾ เช่น จำนวนจุลินทรีย์เป้าหมายเป็น

◆ จำนวนจุลินทรีย์ เติมจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (ครอบคลุมแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ) ปริมาณ 10^2 ถึง 10^6 cfu ต่อกรัม

◆ *B. cereus* เติม *B. cereus* ปริมาณ 10^2 ถึง 10^6 cfu ต่อกรัม และจุลินทรีย์แข่งขันปริมาณมากกว่า *B. cereus* อย่างน้อย 100 เท่า

◆ coliforms, *E. coli*, *S. aureus* เติมจุลินทรีย์ดังกล่าวปริมาณ 3-110,000 MPN ต่อกรัมและจุลินทรีย์แข่งขันปริมาณมากกว่าจุลินทรีย์เป้าหมายอย่างน้อย 100 เท่า

3.3 สุ่มตัวอย่างเพื่อทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว โดยใช้โปรแกรมจาก <http://www.randomizer.org/form.htm>⁽⁹⁾

3.4 ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity test) ของตัวอย่างทดสอบ

การตรวจวิเคราะห์แบบคุณภาพ

สุ่มตัวอย่างทดสอบที่มีจุลินทรีย์เป้าหมายและตัวอย่างทดสอบที่ไม่มีจุลินทรีย์เป้าหมาย (มีจุลินทรีย์อื่นๆ) ที่แบ่งบรรจุแล้วอย่างละ 10 ขวด ตรวจวิเคราะห์หาจุลินทรีย์เป้าหมายโดยใช้วิธีวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐาน (standard method) โดยได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005⁽²⁾ จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หมายเลขทะเบียน 4043/50 ได้แก่

- ◆ *L. monocytogenes* (พบ/ไม่พบ ต่อ 25 กรัม) ใช้วิธี ISO 11290-1: 1996/Amd.1: 2004⁽¹²⁾
- ◆ *Salmonella* spp. (พบ/ไม่พบ ต่อ 25 กรัม) ใช้วิธี ISO 6579: 2002/ Cor.1: 2004⁽¹³⁾
- ◆ *S. aureus* (พบ/ไม่พบ ต่อ 0.1 กรัม) ใช้วิธี BAM 2001, Chapter 12⁽¹⁴⁾

ตัวอย่างทดสอบที่เติมจุลินทรีย์เป้าหมายทุกขวดต้องตรวจพบจุลินทรีย์เป้าหมายและตัวอย่างทดสอบที่เติมจุลินทรีย์อื่นทุกขวดต้องตรวจไม่พบจุลินทรีย์เป้าหมาย

การตรวจวิเคราะห์แบบปริมาณ

สุ่มตัวอย่างทดสอบที่แบ่งบรรจุแล้วจำนวน 10 ขวด ตรวจตัวอย่างละ 2 ข้าง (duplicate) โดยใช้วิธีวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐานฯ ได้แก่

- ◆ coliforms (MPN/กรัม) ใช้วิธี BAM 2002, updated 2013 Chapter 4⁽¹⁵⁾
- ◆ *E. coli* (MPN/กรัม) ใช้วิธี BAM 2002, updated 2013 Chapter 4⁽¹⁵⁾

- ◆ จำนวนจุลินทรีย์ (cfu/กรัม) ใช้วิธี APHA, Compendium 2001, Chapter 6&7⁽¹⁶⁾
- ◆ *B. cereus* (cfu/กรัม) ใช้วิธี BAM 2001, updated 2013 Chapter 4⁽¹⁷⁾

นำผลวิเคราะห์ที่ได้มาเปลี่ยนค่าจากหน่วย cfu หรือ MPN เป็น $\log_{10}$ cfu หรือ $\log_{10}$ MPN ทดสอบความแตกต่างภายในตัวอย่าง (within sample variation) โดยใช้สถิติ Cochran's test เพื่อศึกษาความแตกต่างของการวิเคราะห์ซ้ำ (precision)

$$\text{คำนวณค่า } C = D_{\max}^2 / \sum D_i^2$$

เมื่อ D_i คือ ค่าแตกต่างของค่าซ้ำ คู่ที่ i
 $D_{\max}$ คือ ค่าแตกต่างของค่าซ้ำ คู่ที่มากที่สุด

เปรียบเทียบค่า C ที่คำนวณได้กับค่าวิกฤติในตาราง Cochran's test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (5%) โดยจำนวนซ้ำคือค่า n จำนวนตัวอย่างคือค่า k ในตาราง ซึ่งในที่นี้ค่า $n = 2$, $k = 10$ ถ้าค่าที่คำนวณได้น้อยกว่าค่าวิกฤติ แสดงว่าไม่มีความแตกต่างของการวิเคราะห์ซ้ำ ให้ทดสอบขั้นตอนต่อไป ถ้าค่า C ที่คำนวณได้มากกว่าค่าวิกฤติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ให้เปรียบเทียบค่า C ที่คำนวณได้กับค่าวิกฤติในตาราง Cochran's test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 (1%) ถ้าค่าที่คำนวณได้น้อยกว่าค่าวิกฤติให้ใช้ข้อมูลทั้งหมดในการทดสอบขั้นตอนต่อไป ถ้าค่าที่คำนวณได้มากกว่าค่าวิกฤติ ถือว่าค่าคู่่นั้นเป็น outlier และให้ตัดค่าทิ้งไปก่อนจึงทดสอบขั้นตอนต่อไป นั่นคือทดสอบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง (between sample variation) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน one-way ANOVA คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างตัวอย่าง (sampling standard deviation; S_s) ถ้าค่า F ที่คำนวณได้ น้อยกว่า $F_{crit.}$ (ค่าจากตารางที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) แสดงว่าตัวอย่างทดสอบมีความเป็นเนื้อเดียวกัน ถ้าค่า F ที่คำนวณได้มากกว่า $F_{crit.}$ ให้คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างตัวอย่าง (sampling standard deviation; S_s) เปรียบเทียบกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบความชำนาญ (standard deviation for proficiency assessment; σ_p) ถ้า S_s ไม่เกิน 0.3 เท่าของ σ_p แสดงว่าตัวอย่างทดสอบมีความเป็นเนื้อเดียวกัน

3.5 บรรจุตัวอย่างทดสอบในภาชนะและหีบห่อที่เหมาะสมพร้อมเอกสารที่เกี่ยวข้องให้สมาชิกทางไปรษณีย์ลงทะเบียน

3.6 ทดสอบความคงตัวของ (stability) ของตัวอย่างทดสอบภายหลังวันสุดท้ายที่กำหนดให้สมาชิกตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบ และตรวจวิเคราะห์โดยใช้วิธีเดียวกับการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

การตรวจวิเคราะห์แบบคุณภาพ

สุ่มตัวอย่างทดสอบที่มีจุลินทรีย์เป้าหมายและตัวอย่างทดสอบที่ไม่มีจุลินทรีย์เป้าหมาย (มีจุลินทรีย์อื่น ๆ) ที่แบ่งบรรจุแล้วอย่างละ 5 ขวดเพื่อตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างทดสอบที่เติมจุลินทรีย์เป้าหมายทุกขวดต้องตรวจพบจุลินทรีย์เป้าหมายและตัวอย่างทดสอบที่เติมจุลินทรีย์อื่นทุกขวดต้องตรวจไม่พบจุลินทรีย์เป้าหมาย

การตรวจวิเคราะห์แบบปริมาณ

สุ่มตัวอย่างทดสอบที่แบ่งบรรจุแล้วจำนวน 5 ขวดตรวจตัวอย่างละ 2 ซ้ำ (duplicate) นำผลวิเคราะห์ที่ได้มาเปลี่ยนค่าจากหน่วย cfu หรือ MPN เป็น $\log_{10}$ cfu หรือ $\log_{10}$ MPN หาค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (A) และค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ทดสอบความคงตัว (B) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยนำค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (A) ลบด้วยค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ทดสอบความคงตัว (B) ตัวอย่างทดสอบมีความคงตัวต่อเมื่อ $|A-B|$ ต้องไม่เกิน 0.3 เท่าของ σ_p ($|A-B| \leq 0.3 \sigma_p$)

3.7 หาค่ากำหนด (assigned value) ของตัวอย่างทดสอบ

การตรวจวิเคราะห์แบบคุณภาพ

ค่ากำหนดสำหรับตัวอย่างที่เติมจุลินทรีย์เป้าหมายคือพบต่อหน่วยทดสอบ (เช่น 0.1 กรัม หรือ 25 กรัม)

ค่ากำหนดสำหรับตัวอย่างที่ไม่เติมจุลินทรีย์เป้าหมายคือไม่พบต่อหน่วยทดสอบ

การตรวจวิเคราะห์แบบปริมาณ

ค่ากำหนดสำหรับการทดสอบความชำนาญฯ นี้ ใช้ค่าเฉลี่ยโรบัสต์ (robust average) ของผลวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการสมาชิกที่ได้รับการประเมินทั้งหมด (participants' consensus) คำนวณโดยใช้ robust analysis: Algorithm A⁽⁶⁾

3.8 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบความชำนาญ (PT standard deviation: $\hat{\sigma}_p$)

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบความชำนาญเป็นค่าที่บอกการกระจายของข้อมูลในกลุ่ม ใช้ตัดสินผลการวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบของห้องปฏิบัติการ ซึ่ง PTP เลือกใช้ $\hat{\sigma}_p$ เท่ากับ $0.50 \log_{10} \text{ MPN/g}$. หรือ $0.25 \log_{10} \text{ cfu/g}$. มาใช้ในการประเมินค่า z-score ของห้องปฏิบัติการทั้งหมดที่ได้รับการประเมิน

3.9 หาค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่ากำหนด (Standard uncertainty of the assigned value) เนื่องจากการหาค่ากำหนดของตัวอย่างทดสอบ (X^*) คำนวณโดยใช้ robust analysis: Algorithm A ดังนั้นค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่ากำหนด (u_x) ซึ่งติดมากับค่ากำหนดเสมอ จึงคำนวณได้จาก

$$u_x = 1.25 \times S^* / \sqrt{n}$$

$$u_x = \text{ค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่ากำหนด}$$

$$S^* = \text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโรบัสต์ (robust standard deviation)}$$

$$n = \text{จำนวนผลการทดสอบที่นำมาประเมิน}$$

เพื่อป้องกันข้อผิดพลาดในการประเมินผลซึ่งมาจากความไม่ถูกต้อง (inaccuracy) ในการคำนวณค่ากำหนด ค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่ากำหนด (u_x) ควรจะน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบความชำนาญ ($\hat{\sigma}_p$) ในกรณีที่ u_x มากกว่า 0.3 เท่าของ $\hat{\sigma}_p$ ต้องนำค่า u_x มาใช้ในการประเมินผลด้วยโดยนำค่า u_x ไปรวม $\hat{\sigma}_p$

3.10 รวบรวมผลการตรวจวิเคราะห์ของสมาชิก ประเมินผลโดยหาค่า z-score ของห้องปฏิบัติการ (Individual z-score)

3.11 จัดทำรายงานผลเบื้องต้น (interim report) สมาชิกจะได้รับรายงานเบื้องต้น ที่ประกอบด้วยค่า assigned value และผลของสมาชิก

3.12 จัดทำรายงานผลฉบับสมบูรณ์ (final report) ส่งให้สมาชิก

ระยะที่ 4: การขอรับรองตามระบบมาตรฐานสากล (Implementation for international accreditation) มีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

4.1 ตรวจติดตามภายใน (internal audit) วันที่ 10 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2557

4.2 ยื่นขอการรับรองและจัดส่งเอกสารให้หน่วยรับรอง (กรมวิทยาศาสตร์บริการ) วันที่ 11 มีนาคม พ.ศ. 2557

4.3 ประชุมทบทวนการบริหารงาน (management review) วันที่ 20 มีนาคม พ.ศ. 2557

4.4 รับการตรวจประเมินจากหน่วยรับรองกรมวิทยาศาสตร์บริการ วันที่ 24-25 กรกฎาคม พ.ศ. 2557

4.5 แก้ไขข้อบกพร่องและข้อสังเกตภายในระยะเวลาที่หน่วยรับรองกำหนด (1 เดือน)

ผล

1. การวางแผนขั้นต้น

สมาชิกทุกรายส่งผลภายในเวลาที่กำหนด และทุกรายมีผลการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. และ *S. aureus* อยู่ในเกณฑ์ที่น่าพอใจ (ผลตรงกับค่ากำหนด) คิดเป็นร้อยละ 100 จากผลที่ได้รับสรุปได้ว่าตัวอย่างทดสอบที่เตรียมนี้สามารถใช้เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยาได้ เป็นการยืนยันว่าวิธีการที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างนี้มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นวิธีการในการพัฒนาการดำเนินการต่อไป

2. การวางแผนด้านการจัดการ

เพื่อให้การดำเนินการเป็นไปตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17043: 2010 และเพื่อให้บริการห้องปฏิบัติการสมาชิกเป็นการทั่วไป (ห้องปฏิบัติการภายในและภายนอก) PTP ทางจุลชีววิทยาจึงเตรียมความพร้อมด้านการจัดการ โดยจัดเตรียมเอกสารคุณภาพที่จำเป็นต้องใช้จำนวน 3 ฉบับ ได้แก่ การสุ่มตัวอย่างทดสอบทางจุลชีววิทยา การจัดการตัวอย่างทดสอบทางจุลชีววิทยา การบรรจุหีบห่อพัสดุภัณฑ์ และแบบฟอร์มจำนวน 26 ฉบับ (ตารางที่ 1) จัดทำแผนการทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา (protocol) โดยระบุหัวข้อให้ครอบคลุมข้อกำหนด ISO/IEC 17043: 2010 เช่น ชนิดตัวอย่างทดสอบ (PT items) การบริหารจัดการตัวอย่าง (handling of PT items) การติดต่อสื่อสารกับสมาชิก (communication participant) เป็นต้น จัดทำแผนพับประชาสัมพันธ์ สำหรับบรรจุภัณฑ์และหีบห่อที่ใช้บรรจุและส่งตัวอย่างทดสอบที่เป็นจุลินทรีย์พบว่าต้องบรรจุด้วยพัสดุสามชั้น (triple packaging system) เช่น กรณีตัวอย่างทดสอบเป็น lyophilized cultures จะนำตัวอย่างทดสอบที่บรรจุในขวดแก้ว (vial) ปราสจากเชื้อ ปิดฝาขวดด้วยจุกยางและฝาจุกนิยมนิยม บรรจุในถุงพลาสติกพร้อมวัสดุกันกระแทก ซ้อนอีกชั้นใส่ในกล่องพลาสติกชนิดทนแตกไม่รั่ว และบรรจุในกล่องพัสดุอีกชั้น การบรรจุด้วยพัสดุสามชั้น เพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนดของกฎหมาย⁽¹⁸⁾ และองค์การอนามัยโลกเรื่องการขนส่งเชื้อโรคติดต่อ^(11, 12) ทั้งนี้จะติดฉลากบนขวดแก้วและกล่องพลาสติก ซึ่งระบุรหัสตัวอย่าง เดือน/ปี ที่ดำเนินงาน ชื่อรายการทดสอบ ตราสัญลักษณ์กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และเครื่องหมายระวางอันตรายจากเชื้อโรค (danger biological hazard)^(18, 19, 20)

3. การดำเนินการเป็น PTP ทางจุลชีววิทยา

ปีงบประมาณ 2555-2557 มีการรับสมาชิกภายนอกรวมทั้งเพิ่มจำนวนรอบและหรือเพิ่มรายการทดสอบอย่างต่อเนื่องดังนี้

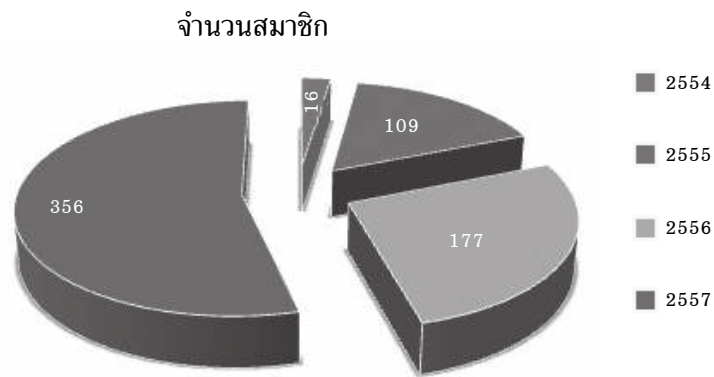
ปีงบประมาณ 2555 ดำเนินการเป็น PTP ทางจุลชีววิทยา 2 รายการทดสอบได้แก่ *Salmonella* spp. และ *S. aureus* เป็นการตรวจหาแบบพบหรือไม่พบโดยแต่ละรายการดำเนินการปีละ 2 รอบ มีสมาชิกเข้าร่วมรายการละ 61 และ 48 ราย รวม 109 ราย ปีงบประมาณ 2556 เพิ่มขอบข่ายการให้บริการเป็น 4 รายการทดสอบได้แก่ *Salmonella* spp., *S. aureus*, *L.monocytogenes* และจำนวนจุลินทรีย์รายการทดสอบละ 1 รอบ รวม 4 รอบ โดย 3 รายการแรกเป็นการตรวจหาแบบพบหรือไม่พบ ส่วนจำนวนจุลินทรีย์เป็นการตรวจแบบปริมาณ (enumeration) มีหน่วยเป็น colony forming unit (cfu) ต่อกรัม มีสมาชิกจำนวน 58, 44, 26 และ 59 ราย ตามลำดับ รวม 187 ราย สำหรับปีงบประมาณ 2557 ดำเนินการ 7 รายการทดสอบ ได้แก่ *Salmonella* spp., *S.aureus*, *L.monocytogenes*, จำนวนจุลินทรีย์, *B. cereus* (cfu ต่อกรัม), จำนวน coliforms (Most Probable Number: MPN ต่อกรัม) และจำนวน *E. coli* (MPN ต่อกรัม) โดยมีสมาชิกเข้าร่วมจำนวน 70, 66, 27, 69, 40, 38 และ 46 ราย ตามลำดับ รวม 356 ราย รวม 4 ปี (ปีงบประมาณ 2554-2557) มีสมาชิกสะสมเข้าร่วมการทดสอบจำนวน 668 ราย เฉลี่ยมีห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบฯ ต่อรอบเพิ่มขึ้นตามลำดับคือ ปีงบประมาณ 2555-2557 เท่ากับ 27, 44 และ 51 ราย ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 1, 2)

ตารางที่ 1 รายชื่อเอกสารคุณภาพ (แบบฟอร์ม)

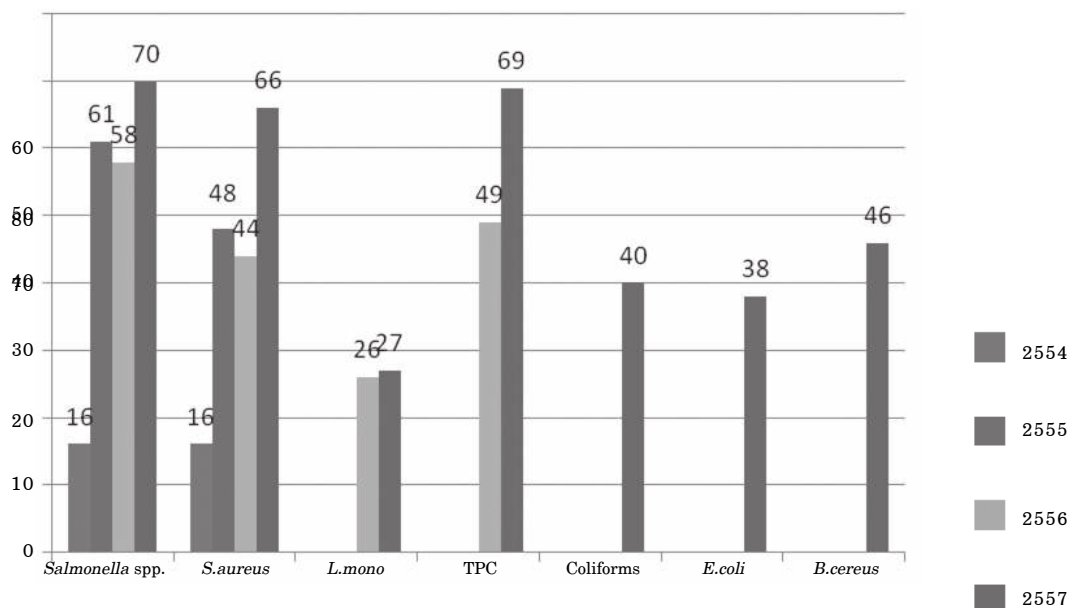
ลำดับ	ชื่อเอกสาร	เลข SOP
1.	บันทึกการตรวจสอบปริมาตร	F PT 20 T3 001
2.	บันทึกการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน	F PT 20 T4 002
3.	บันทึกการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์	F PT 20 T4 014
4.	บันทึกการตรวจวิเคราะห์ <i>L. monocytogenes</i> (MPN/g)	F PT 20 T4 015
5.	บันทึกการตรวจวิเคราะห์ <i>L. monocytogenes</i> /25 กรัม (พบ/ไม่พบ)	F PT 20 T4 016
6.	บันทึกการตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> spp. (MPN/g)	F PT 20 T4 017
7.	บันทึกการตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> spp. /25 กรัม (พบ/ไม่พบ)	F PT 20 T4 018
8.	บันทึกการตรวจวิเคราะห์ <i>S. aureus</i>	F PT 20 T4 019
9.	บันทึกการตรวจวิเคราะห์ Coliforms และ <i>Escherichia coli</i>	F PT 20 T4 020
10.	บันทึกการเตรียมตัวอย่าง	F PT 20 T4 021
11.	บันทึกการทดสอบจุลินทรีย์มาตรฐาน	F PT 20 T4 022
12.	Sterility Test	F PT 20 T4 023
13.	บันทึกการตรวจวิเคราะห์ <i>B. cereus</i>	F PT 20 T4 024
14.	ใบสมัครเข้าร่วมแผนฯ ทางจุลชีววิทยา	F PT 20 T6 012
15.	แบบตอบรับตัวอย่าง	F PT 20 T6 014
16.	คำแนะนำสำหรับห้องปฏิบัติการ	F PT 20 T6 015
17.	แบบรายงานผลทางห้องปฏิบัติการ	F PT 20 T6 016
18.	บันทึกการทดสอบ ประจำปี	F PT 20 T6 031
19.	สรุปผลการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการสมาชิก (Detection)	F PT 20 T6 032
20.	บันทึกการทำลายตัวอย่างทดสอบความชำนาญ	F PT 20 T6 033
21.	รายชื่อสมาชิกประจำปี	F PT 20 T6 034
22.	สรุปผลการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการสมาชิก (Enumeration)	F PT 20 T6 035
23.	บันทึกการตอบรับตัวอย่างของสมาชิก	F PT 20 T6 037
24.	การประเมินผลห้องปฏิบัติการสมาชิก (Enumeration)	F PT 20 T7 001
25.	รายงานเบื้องต้น (Detection)	F PT 20 T7 002
26.	รายงานเบื้องต้น (Enumeration)	F PT 20 T7 003

ตารางที่ 2 ผลการเป็นผู้ดำเนินการแผนทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยา

รายการ	ปีงบประมาณ			
	2554	2555	2556	2557
รายการทดสอบ	2	2	4	7
รอบการทดสอบ	1	4	4	7
จำนวนสมาชิก	16	109	177	356
จำนวนสมาชิกเฉลี่ยต่อรอบ	16	27	44	51



ภาพที่ 1 แผนภูมิแสดงจำนวนสมาชิกระหว่างปีงบประมาณ 2554-2557



ภาพที่ 2 แผนภูมิแสดงรายการทดสอบและจำนวนสมาชิกการทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยาระหว่างปีงบประมาณ 2554-2557

4. การขอรับรองตามระบบมาตรฐานสากล

ได้รับการตรวจประเมินเมื่อวันที่ 24-25 กรกฎาคม พ.ศ. 2557 พบข้อบกพร่องทางวิชาการจำนวน 4 ข้อ ข้อสังเกต 1 ข้อ ซึ่งข้อบกพร่องได้แก่ 1) ไม่พบบันทึกการประเมินผลฝึกอบรมความสามารถในการปฏิบัติงาน 2) ไม่พบข้อมูลของสมาชิก 1 รายในกราฟแท่ง (histogram) 3) มีการเลือกใช้วิธีการหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบความชำนาญ (PT standard deviation: $\hat{\sigma}_p$) ไม่เหมาะสม คือเลือกใช้ค่า $0.50 \log_{10}$ MPN/g หรือ $0.30 \log_{10}$ MPN/g มาประเมินค่า Z-score 4) การหาค่ากำหนดในโปรแกรม excel ไม่ได้นำค่าคงที่มาใช้ในการคำนวณ ทำให้ค่า robust SD เปลี่ยนจากค่า 0.157 เป็น 0.154 สำหรับข้อสังเกตได้แก่ บันทึกหลายฉบับลงข้อมูลไม่ครบถ้วน เช่น บันทึกการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกการทำลายตัวอย่าง ซึ่งผู้ดำเนินการฯ แก้ไขส่งให้หน่วยงานรับรองตามระยะเวลาที่กำหนดและได้รับการรับรองเรียบร้อยแล้วเมื่อวันที่ 26 มกราคม พ.ศ. 2558

วิจารณ์

การพัฒนาการเป็น PTP ทางจุลชีววิทยาให้เป็นไปตามมาตรฐานสากลนั้น โดยปกติผู้ดำเนินการฯ จะต้องจัดทำเอกสารคุณภาพจำนวนมากเพื่อให้สอดคล้องกับทุกกิจกรรมตามข้อกำหนดที่จำเป็นต้องดำเนินการคือ ISO/IEC 17043: 2010⁽⁴⁾ ซึ่งเป็นข้อกำหนดทั่วไปเกี่ยวกับความสามารถในการจัดการแผนการทดสอบความชำนาญ (ด้านวิชาการ 10 ข้อ ด้านบริหาร 15 ข้อ) และ ISO/TS 22117: 2010⁽⁵⁾ ซึ่งเป็นข้อกำหนดเฉพาะของการทดสอบความชำนาญของการตรวจวิเคราะห์อาหารและอาหารสัตว์ทางจุลชีววิทยา มีข้อกำหนดทางวิชาการ 18 ข้อ บางกิจกรรมหรือบางข้อกำหนดอาจต้องเตรียมหรือจัดทำเอกสารคุณภาพหลายฉบับและบางฉบับอาจมีการบันทึกหลายลักษณะ เช่น การควบคุมสภาวะแวดล้อม (อากาศภายในห้องปฏิบัติการ โต๊ะทำงาน) ในระหว่างปฏิบัติงาน (เตรียมตัวอย่างทดสอบตัวอย่าง) ต้องสะอาด มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนน้อยหรือไม่มี เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ รวมถึงวิธีตรวจวิเคราะห์และวิธีทางสถิติ ต้องควบคุมให้เป็นไปตามข้อกำหนด แต่เนื่องจากห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาของ สคอ. ได้รับการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตาม ISO/IEC 17025: 2005⁽²⁾ ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2551 และการให้บริการทดสอบความชำนาญทางเคมีบางรายการได้รับการรับรองตาม ISO/IEC 17043: 2010⁽⁴⁾ ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2555 PTP ทางจุลชีววิทยาจึงได้ศึกษา ทบทวน และนำเอกสารคุณภาพในระบบดังกล่าวมาใช้ทำให้ลดภาระด้านการจัดทำเอกสารคุณภาพลงได้จำนวนมาก

การเตรียมตัวอย่างทดสอบนั้นนับเป็นหัวใจสำคัญ เนื่องจากตัวอย่างทดสอบต้องมีความเป็นเนื้อเดียวกันและมีความคงตัวตลอดระยะเวลาของการตรวจวิเคราะห์^(4, 5) ซึ่งการเตรียมตัวอย่างทดสอบทางจุลชีววิทยาส่งส่วนใหญ่ต้องเติมจุลินทรีย์เป้าหมาย (target microorganism) และจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายหรือจุลินทรีย์แข่งขัน (non-target microorganisms หรือ competitive microorganisms) และมีขั้นตอนหรือกระบวนการต่าง ๆ เช่น การทำให้แห้ง (dry) หรือการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilized) เพื่อเก็บรักษาจุลินทรีย์เหล่านี้ไม่ให้เจริญเพิ่มจำนวนและต้องให้เหลือรอดชีวิตในปริมาณที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ เช่นในกรณีการตรวจหา (detection) คือตรวจแบบพบหรือไม่พบ ควรมีจุลินทรีย์เป้าหมายให้เหลือเท่ากับหรือน้อยกว่า 100 เซลต่อหน่วยน้ำหนักของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ (เช่น ต่อตัวอย่าง 0.1 กรัม หรือ 1 กรัม หรือ 25 กรัม) และควรมีจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายมากกว่าจุลินทรีย์เป้าหมายอย่างน้อย 100 เท่า เพื่อให้เกิดการเจริญแข่งขันระหว่างจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด ส่วนกรณีการตรวจแบบปริมาณ (enumeration) คือ ตรวจแบบนับจำนวนเป็น cfu ต่อกรัมหรือ MPN ต่อกรัม ต้องเติมจุลินทรีย์เป้าหมายให้เหลือปริมาณที่เหมาะสมต่อการนับ เช่น จำนวนแบคทีเรีย ควรมีค่าในการนับจำนวนระหว่าง 25 ถึง 250⁽¹⁶⁾ หรือ 10 ถึง 300⁽²²⁾ ส่วนจำนวน *S. aureus* หรือ *B. cereus* ควรมีค่าระหว่าง 20 ถึง 200^(14, 17) หรือ 10 ถึง 150⁽²²⁾ และต้องมีจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายในตัวอย่างทดสอบ 10^4 ถึง 10^6 เซล เป็นต้น ซึ่งปัญหาการเตรียมตัวอย่างทดสอบให้มีจุลินทรีย์เป้าหมาย และจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายให้เหลือในปริมาณที่เหมาะสมต่อการนำไปเป็นตัวอย่างทดสอบสำหรับแต่ละรายการจึงอาจต้องเติมในปริมาณที่แตกต่างกัน เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดเมื่อนำมาผ่านกระบวนการเก็บรักษาจะมีอัตราการตายไม่เท่ากัน ดังนั้นการเติมจุลินทรีย์ในปริมาณที่เท่ากันจึงอาจเหลือรอดชีวิตไม่เท่ากัน ซึ่งโดยปกติแบคทีเรียแกรมบวก (เช่น *S. aureus* และ *B. cereus* เป็นต้น) จะทนต่อสภาพแวดล้อมดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (เช่น coliforms, *E. coli*, *Salmonella* spp.) ขณะที่แบคทีเรียที่สร้างสปอร์จะทนกว่าแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ ส่วนยีสต์หรือราจะทนความแห้งแล้งได้ดีกว่าแบคทีเรีย ดังนั้นการเตรียมตัวอย่างอาหารแต่ละประเภทโดยการเติมจุลินทรีย์เป้าหมายและจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายแต่ละชนิดเพื่อใช้เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยา จึงต้องทำการศึกษาการตายหรือการบาดเจ็บของจุลินทรีย์นั้น ๆ เพื่อที่จะได้เติมปริมาณจุลินทรีย์ได้อย่างถูกต้อง โดยปกติจุลินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทำให้แห้งจะมีปริมาณลดลงอย่างน้อย $0.5 \log_{10}$ cfu หรือ MPN⁽¹⁰⁾ เช่น ต้องการให้มีจุลินทรีย์เป้าหมาย 100 เซลต่อ 25 กรัม ($2.0 \log_{10}$ cfu

ต่อ 25 กรัม) จากการทดลองพบว่า เมื่อผ่านกระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง ปริมาณจุลินทรีย์จะลดลง $1.0 \log_{10}$ cfu ดังนั้นจึงต้องเติมจุลินทรีย์ $3.0 \log_{10}$ cfu เป็นต้น

การได้รับข้อบกพร่องจากการตรวจประเมินในเรื่องไม่พบบันทึกการประเมินผลการอบรมความสามารถ และข้อมูลของสมาชิกที่แสดงในกราฟแท่ง (histogram) ผู้ดำเนินการได้จัดทำบันทึกและข้อมูลพร้อมทั้งแจ้งผู้เกี่ยวข้องทราบ สำหรับเรื่องของการหาค่ากำหนดและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบความชำนาญ โดยใช้ robust analysis algorithm A ซึ่งผู้ดำเนินการและเจ้าหน้าที่เข้าใจคลาดเคลื่อน ไม่ได้นำค่าคงที่ในรอบที่ 1 (iteration 1) แต่นำค่าเริ่มต้น (iteration 0) มาใช้ในการคำนวณรอบที่ 2 (iteration 2) จึงเพิ่มการอบรมในเรื่องดังกล่าว ส่วนการที่ผู้ดำเนินการเลือกค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบความชำนาญแบบคงที่ $0.3 \log_{10}$ MPN หรือ $0.5 \log_{10}$ MPN โดยไม่ใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบที่คำนวณได้ robust analysis algorithm A เพราะผู้ดำเนินการต้องการพัฒนาห้องปฏิบัติการสมาชิกให้สามารถตรวจได้ค่าที่ใกล้เคียงกัน (precision) และแม่นยำ (accuracy) มากขึ้นแบบคงที่ โดยไม่ขึ้นกับผลการตรวจวิเคราะห์ของสมาชิกในแต่ละรอบ ปัจจุบันผู้ดำเนินการใช้ค่า $0.25 \log_{10}$ สำหรับการตรวจวิเคราะห์ที่มีหน่วยเป็น cfu และ $0.5 \log_{10}$ สำหรับการตรวจวิเคราะห์ที่มีหน่วยเป็น MPN

สำหรับปัญหาอื่นที่ PTP ทางจุลชีววิทยาประสบเช่น ผู้ดำเนินงานตรวจสอบการชำระเงินได้ยากเนื่องจากสมาชิกบางรายชำระเงินแล้วแต่ไม่ได้แจ้งให้ผู้ดำเนินงานทราบ ทั้งที่กำหนดให้สมาชิกส่งสำเนาการชำระเงินให้ผู้ดำเนินการด้วย ทำให้ต้องตรวจสอบทุกรอบก่อนที่จะส่งผลให้สมาชิก แต่ในขณะนี้กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้พัฒนาการจ่ายเงินเป็นระบบ electronic payment ทำให้การชำระเงินของสมาชิกและการตรวจสอบของผู้ดำเนินการง่ายขึ้น นอกจากนี้การรายงานผลของสมาชิก ส่วนใหญ่จะรายงานผลทาง e-mail ซึ่งในระยะแรกใช้ e-mail เฉพาะของผู้ดำเนินการ ทำให้ทีมงานไม่สามารถตอบหรือรับ e-mail ได้อย่างรวดเร็ว และมี mail อื่น ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการทดสอบความชำนาญ ผู้ดำเนินการจึงขอ e-mail address ใหม่กับกรมฯ เป็นกรณีพิเศษ (ปกติข้าราชการ 1 คนจะได้รับเพียง 1 e-mail address) และได้รับอนุมัติแล้วเมื่อต้นปี พ.ศ. 2558 ซึ่งจะทำให้การตอบหรือรับการติดต่อจากสมาชิกสะดวกเร็วขึ้น เนื่องจากทีมงานที่กำหนดไว้ทุกคนสามารถได้ตอบทาง e-mail ใหม่นี้ได้ นอกจากนี้บางครั้งผู้ดำเนินการไม่ได้รับผลหรือได้รับผลล่าช้า (โดยเฉพาะการส่ง Fax) เนื่องจากเครื่องแฟกซ์ที่เป็นสายตรงจะมีประจำที่ฝ่ายบริหารงานทั่วไปของ สคอ. ดังนั้น ผู้ดำเนินงานต้องสอบถามจากสมาชิกเป็นราย ๆ

สรุป

การพัฒนาการเป็นผู้ดำเนินการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง จาก 2 รายการทดสอบ จำนวนสมาชิก 109 ราย เป็น 7 รายการทดสอบ จำนวนสมาชิก 356 รายภายใน 3 ปี และได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043: 2010 แสดงถึงความสำเร็จและการบรรลุวัตถุประสงค์ ทำให้ลดค่าใช้จ่ายของสมาชิกและของประเทศ นอกจากนี้ยังทำให้สามารถนำข้อมูลที่ได้นำไปประเมินผลความสามารถรวมทั้งพัฒนาระบบคุณภาพของห้องปฏิบัติการ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้เขียนขอขอบคุณนายปรีชา จิงสมานกุล ที่กรุณาให้คำแนะนำด้านเทคนิคและวิชาการ นางสาวทิพวรรณ นิงน้อย ให้คำแนะนำด้านสถิติ และนางกนกพร อธิสุข ผู้จัดการคุณภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043: 2010 ซึ่งทุกท่านสนับสนุนการดำเนินงานทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยาจนได้รับการรับรองทุกรายการที่ขอรับการรับรอง

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. นโยบายและหลักเกณฑ์การทดสอบความชำนาญ การเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการและการประเมินความสามารถการทดสอบ. SOP No. N 07 15 003 แก้ไขครั้งที่ 08 วันที่ออกเอกสาร 3 ธันวาคม 2557.
2. ISO/IEC 17025: 2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 2nd ed. Geneva, Switzerland: ISO; 2005.
3. กฎกระทรวงแบ่งส่วนราชการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2552. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 126 ตอนที่ 98 ก (ลงวันที่ 28 ธันวาคม 2552).
4. ISO/IEC 17043: 2010. Conformity assessment -- General requirements for proficiency testing. Geneva, Switzerland: ISO; 2010.
5. ISO/TS 22117: 2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva, Switzerland: ISO; 2010.
6. ISO 13528: 2005. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. Geneva, Switzerland: ISO; 2005.
7. สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. สถิติที่ใช้ในการทดสอบความชำนาญ. SOP PT 20 T4 401 แก้ไขครั้งที่ 05 วันที่ออกเอกสาร 19 สิงหาคม 2557.
8. ISO 16140:2003/Amd.1:2011. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Protocol for the validation of alternative method. Geneva, Switzerland: ISO; 2011.
9. Research randomizer. 2008. [cited 2011 Aug 24]: [1 screen]. Available from: URL: <http://www.randomizer.org/form.htm>
10. National Association of Testing Authorities (NATA). Maintenance and preservation of microbial cultures in a laboratory culture collection. Australia; 1992. Technical note 14.
11. ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media. Geneva, Switzerland: ISO; 2014.
12. ISO 11290-1:1996/Amd. 1:2004. Microbiological of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method/Amendment 1: Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusive of precision data. Geneva, Switzerland; ISO 2004.
13. ISO 6579:2002/Cor.1:2004(E). Microbiology of food and animal feeding stuffs -- horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Geneva, Switzerland: ISO; 2004.
14. Bennett RW, Lancette GB. Bacteriological Analytical Manual: chapter 12 *Staphylococcus aureus*. 2001. [cited 2011 Aug 24]: [6 screens]. Available from: URL: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm>
15. Bacteriological Analytical Manual: chapter 4 enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. 2002. [cited 2011 Aug 24]: [18 screens]. Available from: URL: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>
16. Downes FP, Ito K, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington, DC: American Public Health Association; 2001. p. 53-68.
17. Bacteriological Analytical Manual: chapter 14 *Bacillus cereus*. 2001. [cited 2011 Aug 24]: [5 screens]. Available from: URL: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070875.htm>

18. กฎกระทรวงสาธารณสุข เรื่องกำหนดหลักเกณฑ์การปฏิบัติของหน่วยงานที่ได้รับยกเว้นไม่ต้องขออนุญาตในการผลิต ครอบครอง จำหน่าย นำเข้า ส่งออก หรือนำผ่านซึ่งเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ.2552. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 126 ตอนที่ 86 ก (ลงวันที่ 20 พฤศจิกายน 2552).
 19. Introduction to the transport of infectious substances. In: World Health Organization. Laboratories biosafety manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: WHO; 2004. p. 94-7.
 20. Safety in the laboratory. In: World Health Organization. Quality assurance in bacteriology and immunology. 3rd ed. New Delhi, India: WHO; 2012. p. 77-85.
 21. Food Examination Performance Assessment Scheme. FEPAS assessment 89. Sand Hutton: Central Science Laboratory; 2004.
 22. ISO 7218:2007/Amd.1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- General requirements and guidance for microbiological examinations. Geneva, Switzerland: ISO; 2013.
-

Development of Proficiency Testing Providing for Food Microbiological Testing Laboratory

Ladawan Chungsamankool Kamonwan Kantaeng and Atchara Ukong

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

ABSTRACT Microbiological Proficiency testing (PT) is an external assessment of the performance of microbiological laboratories. It is also a tool for the quality system development. Many laboratories participated in the expensive PT schemes organized from abroad due to the lack of local PT provider. The few local providers existing in Thailand do not cover all necessary test items in food microbiological testing. In order to increase the capability of the Department of Medical Sciences in strengthening the performance of food testing laboratories in Thailand as well as to help laboratories improve their quality and reduce the cost of using the PT provider from abroad, in 2011, the Bureau of Quality and Safety of food (BQSF) launched the project on food microbiological PT. At the initial phase, test materials for *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* were prepared and sent to 16 food analysis laboratories of DMSc to analyze and submit the result within the established timeframe. The results confirmed that the prepared test materials were appropriate and could be used as PT microbiological samples. Therefore, the PT schemes were operated to service other government and private laboratories. In 2012, two PT schemes were provided for 2 rounds with two test items on *Salmonella* spp. and *S. aureus*, and with 109 laboratories participating. In 2013, the scope of service extended to include the 2 new tests of *L. monocytogenes*, and total plate count, and each test was for one round. The total of participants were 177. In 2014, the PT schemes for *B. cereus*, coliforms and *E. coli* were introduced and the total schemes become 7 with 356 participants. The number of participating laboratories increased continuously from 2012 to 2014, (27, 44 and 51 laboratories per round, respectively). In early 2015, all PT schemes were ISO/IEC 17043: 2010 accredited. In conclusion, the development of the PT schemes in microbiological testing of food at the BQSF has facilitated the improvement and development of testing laboratory quality in many laboratories in Thailand and reduced the cost from participation with PTP in foreign countries.

Key words: Proficiency Testing, Microbiology, Laboratory evaluation

การวิเคราะห์สารเร่งเนื้อแดงคลอนบิวเตอร์อลในเนื้อหมู โดยใช้เทคนิค Exact-matching double IDMS: ผลการเข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัด APMP.QM-S6 Clenbuterol in Porcine Meat

กิตติยา เขียร์แมน พรหทัย กันแก้ว ปรียาภรณ์ พุกรอด ศรภุชณ์ มาบำรุง และปนัดดา ชิลวา
ฝ่ายมาตรวิทยาเคมีและชีวภาพ สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ คลองห้า คลองหลวง ปทุมธานี 12120

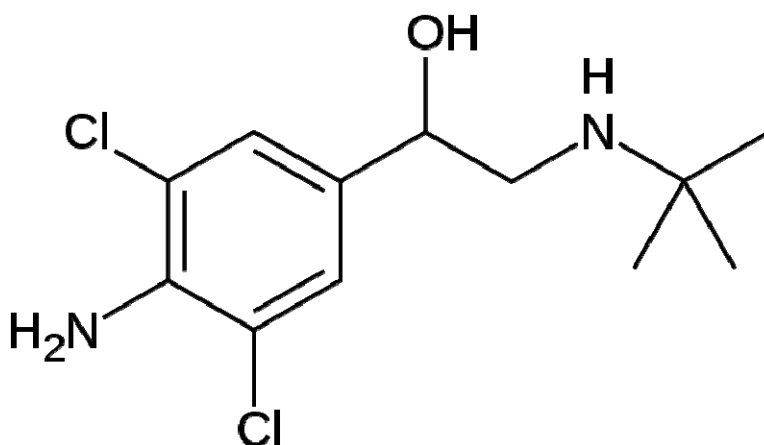
บทคัดย่อ สารคลอนบิวเตอร์อล (clenbuterol) เป็นสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ (β -agonists) มีการแอบใช้เป็นตัวเร่งเนื้อแดง และเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์เลี้ยงเพื่อเป็นอาหาร มีการออกกฎหมายห้ามใช้สารคลอนบิวเตอร์อลในหลายๆ ประเทศ เนื่องจากส่งผลกระทบต่อสุขภาพ ดังนั้นฝ่ายมาตรวิทยาเคมีและชีวภาพของสถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ (มว.) จึงได้เข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัดระดับนานาชาติ APMP.QM-S6: Clenbuterol in porcine meat ซึ่งเป็นการวัดสารคลอนบิวเตอร์อลในเนื้อหมูดัดแปลง เทคนิคการวัดที่ใช้คือ เทคนิค exact-matching double IDMS โดยมีขั้นตอนดังนี้ คือ การทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสภาวะต่าง (alkaline hydrolysis) การตกตะกอนโปรตีนด้วยกรด (acid precipitation) การกำจัดไขมัน (defatting) การสกัดตัวอย่างแบบของเหลว-ของเหลว (liquid-liquid extraction) การสกัดตัวอย่างแบบของแข็ง (solid phase extraction, SPE) แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ high performance liquid chromatography tandem mass spectrometer (HPLC-MS/MS) ผลการวัดมีสมบัติการสอบกลับได้ (metrological traceability) เนื่องจากมีการประเมินความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานที่ใช้ ผลการวัดในตัวอย่าง APMP.QM-S6 พบที่ระดับความเข้มข้น $5.0 \mu\text{g/kg}$ มีค่าความไม่แน่นอนของการวัดที่ 5.0% และผลการเข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัด APMP.QM-S6 ของประเทศไทย สอดคล้องกับสถาบันมาตรวิทยาประเทศอื่นๆ เป็นอย่างดี โดยค่าอ้างอิงของการเปรียบเทียบผลการวัด (Supplementary Comparison Reference Value, SCR.V) มีค่าเท่ากับ $5.216 \mu\text{g/kg}$ และค่าความไม่แน่นอน $0.131 \mu\text{g/kg}$

Accepted for publication, 10 November 2014

บทนำ

สารเร่งเนื้อแดง clenbuterol (clenbuterol) โครงสร้างดังภาพที่ 1 เป็นสารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ (β -agonists) ซึ่งในทางการแพทย์ใช้ผลติยารักษาคน สาร clenbuterol มีสรรพคุณในการขยายหลอดลม รักษาโรคหอบหืด ช่วยให้อากาศไหลเวียนดีขึ้น ช่วยให้อากาศในปอดขยายตัว และเพิ่มการสลายตัวของไขมันที่สะสมในร่างกาย แต่อาจมีผลข้างเคียง เช่น ทำให้มีอาการกล้ามเนื้อสั่น หัวใจเต้นเร็วกว่าปกติ กระวนกระวาย วิงเวียน ปวดศีรษะ เป็นต้น⁽¹⁾ อย่างไรก็ตาม มีการลักลอบนำสาร clenbuterol มาใช้ผิดวัตถุประสงค์ คือ ใช้เป็นสารเร่งเนื้อแดงโดยผสมในอาหารและน้ำสำหรับเลี้ยงหมู เพื่อให้หมูมีเนื้อแดงมาก มีไขมันน้อยซึ่งทำให้ได้ราคาดี⁽²⁾

การบริโภคเนื้อสัตว์ที่มีสารเร่งเนื้อแดงตกค้างอยู่ จะส่งผลต่อการทำงานของระบบประสาทที่ควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด หลอดลม กระเพาะปัสสาวะ เป็นต้น อาจมีอาการมือสั่น กล้ามเนื้อกระตุก ปวดศีรษะ หัวใจเต้นเร็วผิดปกติ กระวนกระวาย วิงเวียนศีรษะ บางรายมีอาการเป็นลม นอนไม่หลับ คลื่นไส้ อาเจียน มีอาการทางจิตประสาท และเป็นอันตรายมากสำหรับหญิงมีครรภ์ ผู้ที่เป็นโรคหัวใจ ความดันโลหิตสูง เบาหวาน และโรคไฮเปอร์ไทรอยด์⁽¹⁾ การตรวจวัดการตกค้างของสารเร่งเนื้อแดง clenbuterol สามารถตรวจได้จากการตกค้างที่ส่วนต่างๆ ของสุกร ได้แก่ เครื่องใน ตับ ไต เนื้อ และไขมัน นอกจากนี้ยังพบในปัสสาวะด้วยเช่นกัน ซึ่งสามารถตรวจวัดการตกค้างได้โดยใช้เครื่องมือ LC-MS/MS หรือ GC-MS⁽³⁾



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารเร่งเนื้อแดง clenbuterol (Clenbuterol)

คณะกรรมการอาหารและยา (Codex Alimentarius Commission - CAC) ได้กำหนดมาตรฐานอาหารให้มีระดับปริมาณสาร clenbuterol ที่ยอมให้ตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit, MRL) ในเนื้อสัตว์ (muscle) ที่ระดับ 0.2 $\mu\text{g/kg}$ (Codex Alimentarius, Maximum Residue Limits for Clenbuterol, year of adoption 2003)⁽⁴⁾

กิจกรรมการเข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัด (International laboratory comparison) เป็นภารกิจสำคัญของสถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติในการเป็นตัวแทนของประเทศไทย เพื่อแสดงความสามารถในการวัดในรายการนั้นๆ ดังนั้นในกลางปี 2556 สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ (มว.) ได้เข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัดนานาชาติระดับภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิก (Asia-Pacific Metrology Programme, APMP) ในรายการ APMP.QM-S6: clenbuterol in porcine meat โดยมีสถาบันมาตรวิทยาแห่งเขตปกครองพิเศษฮ่องกง (Government Laboratory, Hong Kong, China (GLHK)) เป็นเจ้าภาพ ห้องปฏิบัติการของสถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ หรือห้องปฏิบัติการที่ทำหน้าที่แทนสถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ (designated institute) จากประเทศต่างๆ เข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัดรวมทั้งหมด

7 ห้องปฏิบัติการ ได้แก่ บราซิล ไทย จีน ฮองกง กรีซ เม็กซิโก และนิวซีแลนด์ นอกจากนี้ยังมี 2 ห้องปฏิบัติการจากประเทศไทยที่มีความเชี่ยวชาญ และมีประสบการณ์ในการวัดเข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัดแบบ pilot study (APMP.QM-P22) ซึ่งถูกจัดควบคุมไปด้วย โดยผู้จัดได้กำหนดให้แต่ละห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมโครงการจะต้องทำการวิเคราะห์หาปริมาณสาร clenbuterol ในเนื้อหมูบดแห้ง⁽⁵⁾

เทคนิคการวิเคราะห์สารเร่งเนื้อแดง clenbuterol ที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อินทรีย์เคมีของ มว. นำมาใช้ในการเข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัดนานาชาติครั้งนี้ คือ เทคนิค exact-matching double IDMS ซึ่งมีศักยภาพเป็นวิธีมาตรฐานปฐมภูมิ (primary method) และสามารถสอบกลับไปยัง SI units ได้^(6, 7) โดยอาศัยหลักการเติมไอโซโทป (isotopic analogue) ของสารที่ต้องการวัด (D_9 -clenbuterol) ที่ทราบปริมาณแน่นอนลงในทั้งสารมาตรฐาน (calibration standard) และตัวอย่าง (sample) ในปริมาณเท่ากัน ซึ่งจะเรียกว่า calibration blend solution และ sample blend solution ปริมาณของสาร clenbuterol ใน calibration blend solution จะถูกเติมให้เท่ากับในตัวอย่างที่ได้ค่ามาคร่าว ๆ ก่อนหน้านี้ จากนั้นทำการวัดความเข้มของพีค (peak intensity) ของไอออนสารมาตรฐาน (clenbuterol) เอง และตัว isotopic analogue (D_9 -clenbuterol) โดยใช้ mass spectrometer และวัดการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของจำนวนไอโซโทป และคำนวณความเข้มข้นของสารที่สนใจจากสมการที่ (1)⁽⁸⁾

$$w_x = w_{z, c} \frac{w_{zc}, m_y, m_{z, c}, R_B}{m_x, m_{y, c}, R_{B, C}} \quad (1)$$

โดยที่ $w_x, m_{z, c}$ คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในตัวอย่าง และใน calibration standard ตามลำดับ $w_x, m_{z, c}$ คือ มวลของตัวอย่าง และมวลของ calibration standard ตามลำดับ $w_y, m_{y, c}$ คือ มวลของ isotopic analogue ที่เติมลงในตัวอย่าง และใน calibration standard ตามลำดับ และ $R_B, R_{B, C}$ คือ อัตราส่วนของจำนวน isotope ที่เติมลงในตัวอย่าง และใน calibration blend ตามลำดับ

รายงานฉบับนี้ได้นำเสนอวิธีการวิเคราะห์สารเร่งเนื้อแดง clenbuterol โดยใช้เทคนิค exact-matching double IDMS การประมาณค่าความไม่แน่นอนและการสอบกลับได้ทางมาตรวิทยาของผลการวัด รวมถึงผลของการเข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัด APMP.QM-S6 เพื่อเป็นการเผยแพร่ความรู้ให้แก่ห้องปฏิบัติการทดสอบในประเทศได้นำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการตนเอง และสามารถปรับปรุงเพื่อให้ได้ผลการวัดที่มีความถูกต้องมากขึ้น

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

ตัวอย่าง APMP.QM-S6 เป็นตัวอย่างเนื้อหมู ที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยกระบวนการ freeze dried และมีการบดให้ละเอียด ลักษณะตัวอย่างเป็นผงสีน้ำตาลอ่อน บรรจุอยู่ในขวดสีชา ปริมาณ 2 g โดยตัวอย่างได้ผ่านการฉายรังสีแกมมา (12 kGy, 18 hours) ผู้จัดได้ระบุว่าตัวอย่างมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1 g/kg - 50 µg/kg และกำหนดให้มีการวิเคราะห์ความชื้นในตัวอย่างหมูบดแห้ง เพื่อใช้ในการรายงานผลออกมาเป็น mass fraction ของสาร clenbuterol ต่อน้ำหนักแห้ง

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐาน : clenbuterol.HCl ผลิตภัณฑ์ Dr. Ehrenstorfer, D_9 -clenbuterol.HCl ผลิตภัณฑ์ Dr. Ehrenstorfer

สารเคมี : acetonitrile (HPLC grade LAB-SCAN), dichloromethane (AR grade LAB-SCAN), hexane (HPLC grade LAB-SCAN), methanol (HPLC grade LAB-SCAN), sodium hydroxide AR grade, conc. HCl (SIGMA-ALDRICH), ethyl acetate (HPLC grade LAB-SCAN), 2-propanol, acetic acid (AR grade MERCK), phosphate buffer (pH 6.0), Tris buffer (pH 8.0), Protease Type XIV of *Streptomyces griseus*, (SIGMA), formic acid, KH_2PO_4 AR grade, KOH (LOBA CHEMIE)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่ง มีความละเอียด 5 ตำแหน่ง, 2 ตำแหน่ง, shaking incubator, centrifuge (Eppendorf 5810 centrifuge, Fronine Laboratory), evaporator (Caliper TurboVap, Life Science, Inc.) และ LC-MS/MS (Shimadzu LC system equipped with API 4000 QTRAP MS/MS, AB Sciex) คอลัมน์ที่ใช้คือ Phenomenex Gemini, 5 μ , C_{18} , 110 Å (150 × 4.6 mm) และ Guard column คือ Phenomenex C_{18} (4.0 × 2.0 mm), Injection volume: 5 μL , Column temperature: 40°C, Sample temperature: 15°C โดยใช้สภาวะของเครื่อง LC-MS/MS (ตารางที่ 1 และตารางที่ 2) ทำการวิเคราะห์ด้วย Multiple Reaction Monitoring (MRM) ESI positive mode

ตารางที่ 1 สภาวะของเครื่อง HPLC สำหรับใช้ในการหาปริมาณสารเคลือบเตอรอลในเนื้อหมูดแห้ง

Time (min)	Module	Event	Parameter
0.10	System Controller	Start	
1.00	Pumps	Pump B conc.	5
3.00	Pumps	Pump B conc.	15
3.01	Pumps	Pump B conc.	40
10.00	Pumps	Pump B conc.	50
12.00	Pumps	Pump B conc.	95
13.00	Pumps	Pump B conc.	5
15.00	System Controller	Stop	

ตารางที่ 2 สภาวะของเครื่อง MS/MS สำหรับใช้ในการหาปริมาณสารเคลือบเตอรอลในเนื้อหมูดแห้ง

Analyte	Reaction	Dwell Time (s)	Declustering Potential, EP (eV)	Entrance Potential, DP(eV)	Collision Energy, CE (eV)	Collision Cell Exit Potential, CXP (eV)
Clenbuterol*	277.1 > 203.0	0.1	50	10.0	24	15
Clenbuterol**	277.1 > 168.1	0.1	50	10.0	42	15
D ₉ -clenbuterol*	286.2 > 204.1	0.1	48	10.0	24	15
D ₉ -clenbuterol**	286.2 > 169.1	0.1	48	10.0	42	15

หมายเหตุ : สำหรับ *คือไอออนหลัก (primary ion) ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ (quantification) และ **คือ ไอออนรอง (secondary ion) ที่ใช้ในการยืนยัน (confirmation)

การเตรียมสารละลายและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน clenbuterol เป็นสารมาตรฐานที่หาซื้อได้จากตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทย ทั้งนี้ทางห้องปฏิบัติการได้ทำการประเมินความบริสุทธิ์ของสารโดยใช้ mass balance approach ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography UV-detector (HPLC-UV) ในการหาปริมาณ organic impurities/related structure impurities, ใช้เทคนิค Thermogravimetric analysis (TGA) ในการหาปริมาณ volatile and non-volatile residues และใช้เทคนิค Karl Fischer titration (KFT) ในการหาปริมาณน้ำ ในการเตรียมสารละลายมาตรฐานจะใช้เครื่องซึ่งมีความละเอียดเลขหลังจุดทศนิยม 5 ตำแหน่ง และได้รับการสอบเทียบ โดยซึ่งสารมาตรฐานของแข็งมาอย่างต่ำ 10 mg ลงในขวดแก้วสีชาขนาด 40 mL จากนั้นเติม methanol ประมาณ 25 g แล้วทำการชั่งน้ำหนักของสารละลายอย่างถูกต้องอีกครั้ง จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้น (stock standard solution) ที่มีความเข้มข้นเป็นหน่วย mass fraction, mg/g โดยความเข้มข้นคำนวณจากน้ำหนักของสารมาตรฐานในหน่วย mg ต่อน้ำหนักรวมของสารมาตรฐานและตัวทำละลายในหน่วย g การเตรียมสารละลาย intermediate standard solution เตรียมโดยการเจือจางสารละลาย stock standard solution ด้วย methanol โดยการชั่งเช่นเดียวกัน แล้วคำนวณความเข้มข้นของสารละลายที่เตรียมได้ในหน่วย mg/g สำหรับ working solution หรือที่เรียกว่าสารละลายมาตรฐานที่นำไปใช้งานจริง สามารถเตรียมได้ในทำนองเดียวกัน สารละลายทั้งหมดที่ได้จากการเตรียมจะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และจะต้องทำการเตรียม working solution ใหม่เสมอสำหรับแต่ละ batch ของการทดลอง นอกจากนี้สารละลาย stock solution, intermediate solution และ working solution ของ Isotopically-labelled analogue (D_9 -clenbuterol) สามารถเตรียมได้ในทำนองเดียวกันกับสารละลายมาตรฐาน clenbuterol ดังที่กล่าวมาข้างต้น

การหาความชื้นในตัวอย่าง

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างหุบุด 0.5 g ด้วยเครื่องซึ่งมีความละเอียด 5 ตำแหน่ง แล้วนำไปเก็บใน dessicator ซึ่งมีสาร anhydrous calcium sulphate (DRIERITE®) เป็นสารดูดความชื้น หลังจากเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลาอย่างต่ำ 20 วัน นำออกมาชั่งน้ำหนักที่เหลือ คำนวณน้ำหนักที่หายไปเป็นค่าความชื้น จากนั้นนำไปเก็บต่อใน dessicator เป็นระยะเวลา 10 วัน แล้วนำมาชั่งอีกครั้ง ทำซ้ำไปเรื่อย ๆ จนกว่าน้ำหนักที่ได้คงที่ ซึ่งการหาความชื้นในตัวอย่างจะต้องทำไปพร้อม ๆ กันกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง

วิธีวิเคราะห์

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างประกอบด้วย 6 ขั้นตอนที่สำคัญ คือ การเตรียม blends การทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ต่อด้วยการตกตะกอนด้วยโปรตีน (protein precipitation) การกำจัดไขมันในเนื้อสัตว์ (defatting) การสกัดตัวอย่างแบบของเหลว-ของเหลว (liquid-liquid extraction) และการสกัดตัวอย่างแบบของแข็ง (solid phase extraction, SPE) สุดท้ายนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ LC-MS/MS

1. การเตรียม blends สองชนิด คือ calibration blend (CB, สารมาตรฐาน) และ sample blend (SB, ตัวอย่าง) สำหรับ calibration blend เตรียมจากตัวอย่างหุบุดแห้งที่ไม่มีการปนเปื้อนของสาร clenbuterol 0.5 g (sample blank) และทำการเติมสารละลายมาตรฐาน clenbuterol ให้มีปริมาณใกล้เคียงกับปริมาณ clenbuterol ในตัวอย่างที่หาค่าได้คร่าว ๆ จากเทคนิค external calibration curve สำหรับ sample blend เตรียมโดยการชั่งตัวอย่างหุบุดแห้ง APMP.QM-S6 ปริมาณ 0.5 g แล้วทำการเติมสารละลาย D_9 -clenbuterol ลงในทั้ง sample blend และ calibration blend ในปริมาณที่มีค่าจำนวนโมลเท่ากับจำนวนโมลของสารละลายมาตรฐาน clenbuterol (ที่ถูกเติมลงไปใน calibration blend ก่อนหน้านี้) จากนั้นเติมสารละลาย เติม Tris buffer pH 8.0 ปริมาณ 10 mL

2. การทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดยการเติมเอนไซม์ protease type XIV of *Streptomyces griseus* ปริมาณ 100 μL (50 g/1 mL ของ tris buffer, pH 8) และปั่นผสม จากนั้น incubate ไว้ที่ 55 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (ข้ามคืน) ปั่นผสมให้เข้ากัน ปลอ่ยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. วิธีการตกตะกอนโปรตีน (protein precipitation) โดยการปรับสารถละลายให้เป็นกรด (pH = 1) ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (ประมาณ 350 μL) และปั่นสารถละลายผสม ปลอ่ยทิ้งไว้ 10 นาที ให้โปรตีนตกตะกอน ทำการแยกเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นสารถละลายโดยนำตัวอย่างเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารถละลายสีเหลืองใส่หลอดพลาสติกใหม่ โดยกรองผ่านตัวกรองใยแก้วขนาด 1 μm จะได้สารถละลายสีเหลืองอ่อนประมาณ 10 mL

4. วิธีการกำจัดไขมันในเนื้อสัตว์ (defatting) โดยการเติม hexane 10 mL ปั่นผสม แล้วนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนสารถละลาย hexane ออก แล้วปรับสารถละลายของเหลวให้เป็นด่าง (pH = 9.5 – 10) ด้วย 10 M NaOH (ประมาณ 500 μL)

5. วิธีการสกัดตัวอย่างแบบของเหลว-ของเหลว (liquid-liquid extraction) สกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลายผสม ethyl acetate: isopropanol (99:1, v/v) จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 mL นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนสารถละลายอินทรีย์ (ชั้นบน) แล้วระเหยส่วนที่สกัดได้ให้แห้งด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้ก๊าซไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 45 °C เติม methanol 100 mL และเติมสารถละลาย phosphate buffer (pH = 6.0) 5 mL แล้วทำการ sonicate 1 นาที

6. วิธีการสกัดตัวอย่างแบบของแข็ง (solid phase extraction, SPE) โดย clean-up ตัวอย่างด้วย VertiPak™ C8/SCX SPE Tubes 6 mL ใช้สภาวะดังนี้ คือ condition: methanol 2 mL, equilibrate: Milli-Q water 2 mL และ phosphate buffer (pH = 6.0) 2 mL, loading: บรรจุตัวอย่างประมาณ 5 mL, wash 1: ล้างด้วย 1 M acetic acid 1 mL ทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ, wash 2: ล้างด้วย methanol 2 mL ทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ และ elute: ชะด้วยตัวทำละลายผสม ethyl acetate : ammonia (32%), 97:3 (v/v) 12 mL (6 mL $\times$ 2 ครั้ง)

ระเหยส่วนที่สกัดได้ให้แห้งด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้ก๊าซไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 45 °C เติมสารถละลายผสม 0.1% formic acid ในตัวทำละลาย Milli-Q water: acetonitrile (9:1, v/v) ปริมาณ 750 μL ผสมโดย sonicate กรองด้วย PTFE filter 0.2 μm ใส่ขวดเพื่อฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS

การคำนวณหาปริมาณโดย Exact-Matching Calibration

สำหรับการคำนวณหาปริมาณสาร clenbuterol เกิดจากการนำอัตราส่วนพื้นที่พีคที่วัดได้ทั้ง primary และ secondary ions ใน sample blend และ calibration blend มาคำนวณโดยใช้สมการที่ (2)

$$w_x = F_P \cdot F_E \cdot F_I \cdot w_{Z,C} \cdot \frac{m_Y \cdot m_{Z,C}}{F_{drymass} \cdot m_X \cdot m_{Y,C}} \cdot \frac{R'_B}{R'_{B,C}}, F_{drymass} = \left[1 - \frac{\%moisture}{100} \right] \quad (2)$$

w_x คือ mass fraction ของ clenbuterol ในตัวอย่างเนื้อหมูปดแห้งที่ต้องการหา มีหน่วย $\mu\text{g/kg}$

$w_{Z,C}$ คือ mass fraction ของ clenbuterol ใน calibration standard มีหน่วย $\mu\text{g/kg}$

m_x คือ มวลของตัวอย่างเนื้อหมูปดแห้งที่ชั่งมาเพื่อใช้ในการเตรียม sample blend มีหน่วย g

m_y คือ มวลของสารถละลาย internal standard (D_9 -clenbuterol) ที่เติมลงไปในตัวอย่างเป็นหมูปดเพื่อเตรียม sample blend มีหน่วย g

$m_{Z,C}$ คือ มวลของสารละลายมาตรฐาน clenbuterol ที่เติมลงไปเพื่อใช้เตรียม calibration blend มีหน่วย g

$m_{Y,C}$ คือ มวลของสารละลาย internal standards (D_9 -clenbuterol) ที่เติมลงไปเพื่อเตรียม calibration blend มีหน่วย g

R'_B และ $R'_{B,C}$ คือ อัตราส่วนพื้นที่พีคที่วัดได้ใน sample blend และใน calibration blend ตามลำดับ โดยคำนวณจากไอออนของ clenbuterol ทหารด้วยไอออนของ D_9 -clenbuterol

F_P และ F_E คือ method precision effect, interference effect และ extraction effect ตามลำดับ ซึ่งจะกำหนดให้มีค่าเท่ากับ 1 แต่จะนำค่าความไม่แน่นอนจากผลกระทบเหล่านี้มารวมอยู่ในการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดรวม (combined standard uncertainty)

F_P คือ dry mass correction factor ซึ่งได้มาจากการหาความชื้นในตัวอย่างหมูปดแห้ง

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด ยึดหลักการตาม Eurachem Guide⁽⁹⁾ และ JCGM 100:2008 (Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement)⁽¹⁰⁾ สำหรับการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดจากการใช้เทคนิค exact-matching double IDMS นั้น จะขึ้นอยู่กับสมการหลักที่ใช้ในการคำนวณ (สมการที่ 2) และการรวมค่าความไม่แน่นอนของการวัดจากแหล่งต่างๆ สามารถรวมกันได้ดังสมการที่ (3)

$$\frac{u(w_x)}{w_x} = \sqrt{\left(\frac{u(w_{Z,C})}{w_{Z,C}}\right)^2 + \left(\frac{u(m_Y)}{m_Y}\right)^2 + \left(\frac{u(m_{Y,C})}{m_{Y,C}}\right)^2 + \left(\frac{u(m_X)}{m_X}\right)^2 + \left(\frac{u(m_{Z,C})}{m_{Z,C}}\right)^2 + \left(\frac{u(F_P)}{F_P}\right)^2 + \left(\frac{u(F_I)}{F_I}\right)^2 + \left(\frac{u(F_{drymass})}{F_{drymass}}\right)^2 + \left(\frac{u(F_E)}{F_E}\right)^2} \quad (3)$$

โดยที่ $u(w_{Z,C})$ เป็นค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของ mass fraction ของสารละลายมาตรฐาน clenbuterol ที่ใช้ในการเตรียม calibration blend คำนวณจากค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของความบริสุทธิ์ของ clenbuterol น้ำหนักของสารที่ใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน และการเปรียบเทียบสารละลายมาตรฐาน (standard comparison) $u(m_Y)$, $u(m_{Y,C})$, $u(m_X)$, $u(m_{Z,C})$ เป็นค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของน้ำหนักต่างๆ คำนวณจาก bias และ precision ของเครื่องชั่ง

F_P เป็นค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของปัจจัย precision ของวิธี ซึ่งคำนวณจาก standard deviation of the mean (sdm) ของการซ้ำ

F_E เป็นค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของปัจจัยจากการสกัด ซึ่งคำนวณมาจาก bias ของการสกัด liquid-liquid extraction และ solid phase extraction

F_I เป็นค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของปัจจัยจากตัวรบกวนใน mass spectrometer (interference effect) ซึ่งคำนวณมาจาก bias ระหว่าง primary ion pair และ secondary ion pair

$F_{drymass}$ เป็นค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของปัจจัย dry mass correction ซึ่งคำนวณมาจากการวิเคราะห์หาความชื้นในตัวอย่าง

สำหรับค่าความไม่แน่นอนจาก R'_B และ $R'_{B,C}$ ซึ่งเป็นค่าความไม่แน่นอนที่เกิดจากการวัด isotope amount ratios ใน sample blend และ calibration blend ตามลำดับ จะถือว่าถูกคิดรวมอยู่ในปัจจัย precision ของวิธีอยู่แล้ว ซึ่งถ้าหากมีปัจจัยอะไรก็ตามที่ส่งผลกระทบต่อการวัด ratio R'_B และ $R'_{B,C}$ ก็จะถือว่ามีส่วนน้อยมาก

และสามารถหักล้างกันได้ที่สุดในที่สุด เนื่องจากทั้ง sample blend และ calibration blend ถูกเตรียมให้เหมือนกัน (exact-matched) ทั้งในเรื่องความเข้มข้น, ตัวกลาง และ isotope ratio

การควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์

เนื่องจากไม่มีวัสดุอ้างอิงรับรองของสารเคลือบเตอรอลที่อยู่ในตัวกลางที่เหมือนกับตัวอย่างจริง (ในเนื้อหมู) ที่วิเคราะห์ ดังนั้นการควบคุมคุณภาพ (quality control, QC) จึงดำเนินการจากการวิเคราะห์ spiked sample จำนวน 2 ซ้ำ ทุกครั้งควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง โดยให้ค่า accuracy (% recovery) และ precision (% RSD) อยู่ในช่วงเกณฑ์กำหนด

ผล

ผลจากการวัดค่าความชื้นในตัวอย่างหมูปอด APMP.QM-S6 ได้ค่าความชื้นเท่ากับ $1.07\% \pm 0.04\%$ ($k = 2.0$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $n = 4$) ซึ่งค่าความชื้นที่ได้นำไปใช้ในการคำนวณ mass fraction ของสารเคลือบเตอรอลต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้งต่อไป ผลจากการประเมินความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานเคลือบเตอรอลโดยใช้เทคนิค HPLC-UV, TGA และ KFT ได้ค่าความบริสุทธิ์ $99.32\% \pm 0.13\%$ ($k = 2.0$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) นอกจากนี้ผลจากการควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์โดยใช้ spiked sample ทำการสร้าง control chart ตลอดช่วงระยะเวลาของการวิเคราะห์ ได้ผลอยู่ในช่วงเกณฑ์ที่ยอมรับ ทั้ง accuracy (% recovery, ในช่วง 95% - 105%) และ precision (% RSD < 3%)

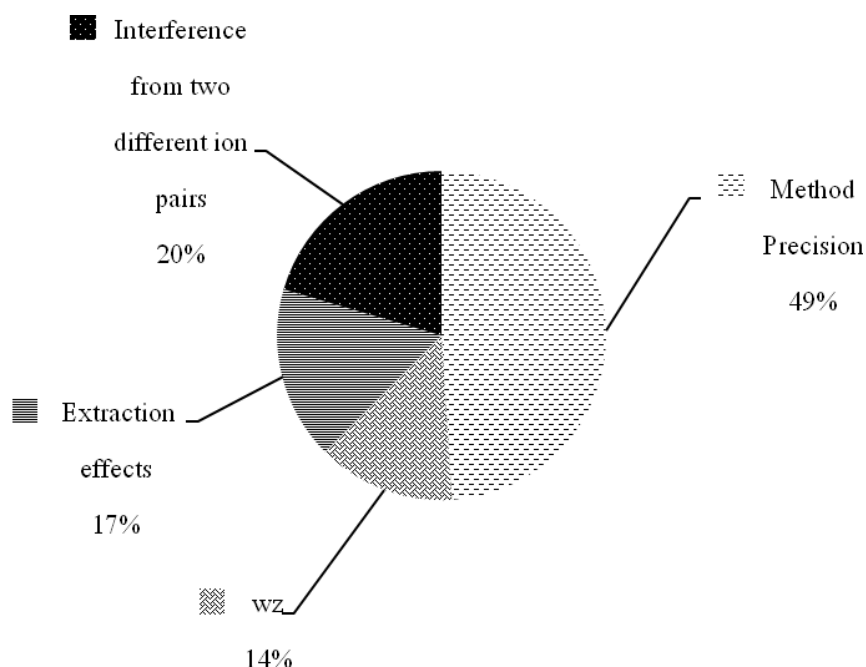
ผลการตรวจวิเคราะห์สารเร่งเนื้อแดงในตัวอย่าง APMP.QM-S6 ด้วยเทคนิค exact-matching double IDMS โดยค่าที่ห้องปฏิบัติการรายงาน เกิดจากค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 การทดลอง (iterations) โดยแต่ละการทดลองทำการวิเคราะห์ 4 ซ้ำ และมีการปรับแก้ค่าด้วยค่าความชื้นที่วัดได้ มีค่าเฉลี่ย และค่าความไม่แน่นอนเท่ากับ $5.00 \mu\text{g/kg} \pm 0.25 \mu\text{g/kg}$ ($k = 2.03$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) ซึ่งค่าอ้างอิงของโปรแกรมเปรียบเทียบผลการวัด (Supplementary Comparison Reference Value, SCRv) เท่ากับ $5.216 \mu\text{g/kg} \pm 0.131 \mu\text{g/kg}$ ($k = 2.78$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)⁽¹¹⁾ แหล่งของความไม่แน่นอนของการวัดหาปริมาณสารเคลือบเตอรอลในเนื้อหมูปอดแห้ง แสดงรายละเอียด (ตารางที่ 3) และเมื่อเทียบเป็นสัดส่วนแหล่งของความไม่แน่นอนจากแหล่งต่างๆ (ภาพที่ 2) พบว่าแหล่งความไม่แน่นอนที่ใหญ่ที่สุดมาจาก precision ของวิธี (49%) รองลงมาจากตัวรบกวน (interference) ในระบบ mass spectrometer (20%) จากการสกัด (extraction, 17%) และแหล่งความไม่แน่นอนจากการเตรียมสารมาตรฐาน (m_y , 14%) สำหรับแหล่งความไม่แน่นอนจากแหล่งอื่นๆ เช่น จากการชั่ง (m_y , $m_{z,c}$, m_x , $m_{y,c}$) และจากปัจจัย dry mass correction ($F_{drymass}$) มีขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับจาก 4 แหล่งที่กล่าวมา

ตารางที่ 3 Uncertainty budget ของการวัดหาปริมาณสารเคลือบเตอรอลในเนื้อหมูปอดแห้ง

Parameter (unit)	Typical value	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty (%)
$w_{z,c}$ ($\mu\text{g/kg}$)	8.3414	0.076265	0.9143%
m_y (g)	0.28809	0.000049	0.0172%
$m_{z,c}$ (g)	0.28933	0.000049	0.0171%
m_x (g)	0.51371	0.000049	0.0096%
$m_{y,c}$ (g)	0.29174	0.000049	0.0170%

ตารางที่ 3 Uncertainty budget ของการวัดหาปริมาณสาร clenbuterol ในเนื้อหมูบดแห้ง (ต่อ)

Parameter (unit)	Typical value	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty (%)
$F_{drymass}$ (1)	0.98928	0.000061	0.0062%
F_P (1)	1.000	0.01697	1.697%
F_E (1)	1.000	0.0100	1.000%
F_I	1.000	0.0110	1.097%
Combined relative standard uncertainty			2.43%



ภาพที่ 2 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวัดปริมาณสาร clenbuterol ในเนื้อหมูบดแห้ง

เมื่อเปรียบเทียบค่าที่ มว. (NIMT) รายงานกับค่าที่รายงานโดยประเทศอื่นๆ ที่เข้าร่วม พบว่าห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ได้ผลการวัดอยู่ในช่วงของค่าอ้างอิง และค่าความไม่แน่นอนของ SCRv ของโปรแกรมการเปรียบเทียบผลการวัดที่เสนอโดยเจ้าภาพผู้จัด ยกเว้นห้องปฏิบัติการ A และ F (ตารางที่ 4)

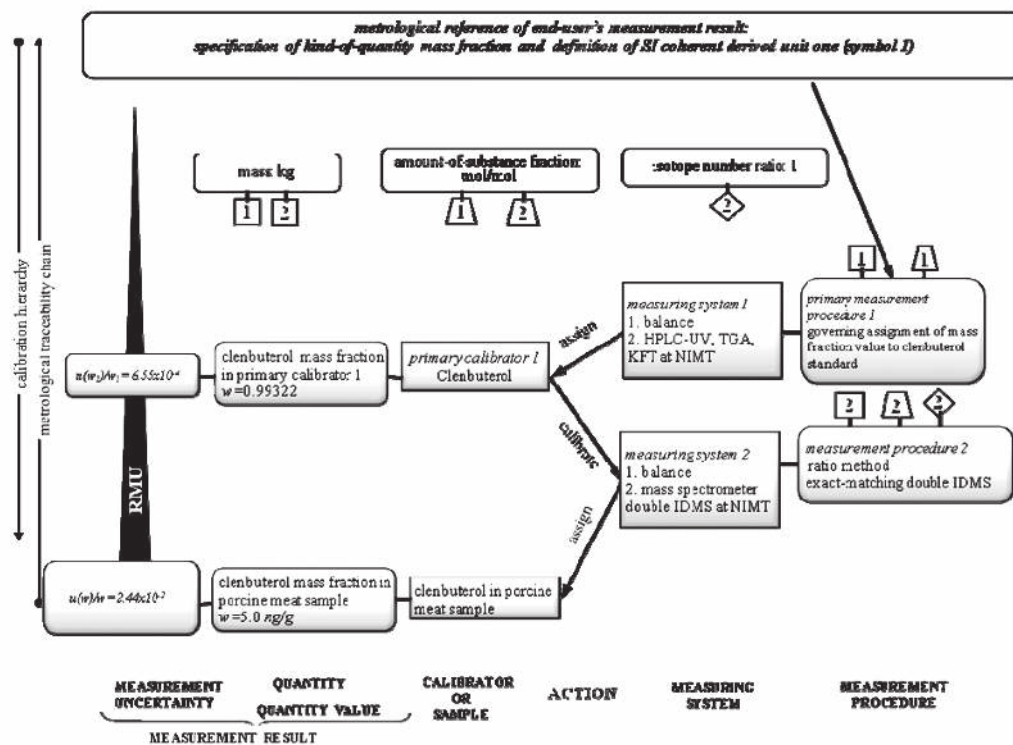
ตารางที่ 4 ค่าปริมาณสารเคลือบเตอรอลในเนื้อหมูดแห้ง และ expanded uncertainty (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) รายงานโดยประเทศต่างๆ ที่เข้าร่วม APMP.QM-S6⁽¹¹⁾

NMIs/DIs	Mass fraction ($\mu\text{g/kg}$) on dry mass basis	Expanded uncertainty ($\mu\text{g/kg}$)
A	4.43	0.82
มว. (NIMT)	5.00	0.25
B	5.18	0.50
C	5.30	0.40
D	5.30	0.68
E	5.30	0.29
F	9.97	0.89
ค่าอ้างอิง (SCRV)	5.216	0.131

หมายเหตุ : เนื่องจากการเผยแพร่ผลการวัดของประเทศอื่นด้วย จึงใช้สัญลักษณ์ A, B, C, D, E และ F แทนชื่อของประเทศอื่นๆ ที่เข้าร่วม

การสอบกลับได้ทางมาตรวิทยาของผลการวัด

ผลการวัดสารเคลือบเตอรอลในเนื้อหมูดแห้งที่ได้สามารถสอบกลับได้ทางมาตรวิทยาโดยการเชื่อมโยงไปสู่หน่วยการวัดที่ได้มาจาก SI คือ หน่วย mass fraction ซึ่งรายงานในหน่วย $\mu\text{g/kg}$ สามารถแปลงหน่วยได้เป็น g/g เท่ากับ 1 (SI coherent derived unit “one” (1)) ในการอธิบายความสามารถในการสอบกลับได้ของผลการวัดครั้งนี้ สามารถแสดงผ่าน 3 กระบวนการด้วยกัน กล่าวคือ กระบวนการแรกสารมาตรฐานเคลือบเตอรอลที่นำมาใช้ในการเตรียมเป็น calibrator ได้รับการประเมินค่าความบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค HPLC-UV, TGA และ KFT ซึ่งค่าความบริสุทธิ์ที่ได้มีสมบัติในการสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา กระบวนการที่สอง ทุกขั้นตอนในการเตรียมสารละลายมาตรฐานหรือการเตรียมตัวอย่าง จะเตรียมโดยใช้เครื่องชั่งที่ได้รับการสอบเทียบ ซึ่งจะทำให้ผลการวัดที่ได้จากเครื่องชั่ง คือ มวล (mass) สามารถสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา ผ่านกิโลกรัมของ มว. ไปยังกิโลกรัมมาตรฐานของโลก (prototype of the kilogram) ซึ่งมีอยู่หนึ่งเดียวในโลกที่ BIPM ณ กรุงปารีส กระบวนการที่สาม คือ วิธีการวัดที่นำมาใช้คือ เทคนิค exact-matching double IDMS ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันว่าเป็น primary ratio method โดยอาศัยหลักการวัด isotope number ratio ทำให้ผลการวัดมีความถูกต้องสูง และได้มีการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดอย่างละเอียดรอบคอบ โดยได้มีการนำปัจจัยอื่นๆ ที่นอกเหนือจากสมการการคำนวณหลัก ที่อาจจะส่งผลต่อการวัด มาคิดรวมอยู่ในการประมาณค่าความไม่แน่นอนสุดท้ายอีกด้วย เมื่อ 3 กระบวนการดังกล่าวได้เกิดขึ้น จึงทำให้ผลการวัดสารเคลือบเตอรอลในเนื้อหมูดแห้งมีสมบัติการสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา และสามารถเขียนเป็น metrological traceability chain (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 โซ่การสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา (metrological traceability chain) ของผลการวัดปริมาณสาร clenbuterol ในเนื้อหมูบดแห้ง

โดยจุดสูงสุดของโซ่การสอบกลับได้ทางมาตรวิทยาเป็น หน่วย SI (SI coherent derived unit “one” (1)) สัญลักษณ์สี่เหลี่ยมจัตุรัส (แทนหน่วยเอสไอ kg) สี่เหลี่ยมคางหมู (แทนหน่วยเอสไอ mol/mol) และสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูน (แทนการวัด isotope number ratio) จะติดอยู่กับกล่อง “measurement procedure” แสดงหน่วยการวัดที่เกี่ยวข้อง ซึ่งจะทาบเชื่อมโยงไปยังส่วนบนสุดของโซ่ ตัวเลข 1 และ 2 ที่ระบุไว้ในกล่องสี่เหลี่ยมทั้งสามชนิดแทน primary measurement procedure 1 และ measurement procedure 2 ตามลำดับ มีกิจกรรมเกิดขึ้น 2 กิจกรรมที่ทำให้เกิดเป็นโซ่ คือ ถ่ายค่า (assign) และสอบเทียบ (calibrate) โดย measuring system จะทำหน้าที่ในการถ่ายค่า (assign) และตัว calibrator จะทำหน้าที่ในการสอบเทียบ (calibrate) ซึ่งผลที่ได้คือ ผลการวัด (measurement results) จะประกอบด้วยค่าปริมาณ (quantity value = value + measurement unit) และล่างสุดของโซ่กระบวนการ calibration hierarchy จะทำให้มีค่าความไม่แน่นอนของการวัด (relative measurement uncertainty, RMU) เพิ่มขึ้น

วิจารณ์

วิธีการวัดสารเร่งเนื้อแดงในหมูบดแห้งโดยเทคนิค exact-matching double IDMS เป็นวิธีที่ใช้ในการวัดเพื่อความถูกต้องสูง สามารถนำไปใช้ในการวัดต่างๆ เช่น เพื่อให้ค่าอ้างอิง (certified value) แก้ววัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material, CRM) ให้ค่าอ้างอิงแก่โปรแกรมทดสอบความชำนาญ (proficiency testing scheme, PT) หรือให้ค่าอ้างอิงกรณีที่มีข้อโต้แย้งของผลการวัด

เทคนิค exact-matching double IDMS นอกจากจะต้องทำให้ peak area หรือสัญญาณที่ได้ mole ratio ทั้งใน calibration blend และ sample blend มีความใกล้เคียงกันให้มากที่สุดแล้ว ชนิดของตัวกลาง (matrix)

จะต้องใกล้เคียงกันด้วย เนื่องจากผลกระทบจากตัวกลางนี้เป็นปัญหาหลักในการวิเคราะห์ทางด้านเคมีที่จะทำให้เกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ได้ ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากผลของ matrix suppression หรือ matrix enhancement ดังนั้นในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค exact-matching double IDMS จึงต้องเตรียม calibration blend ใน matrix blank ชนิดเดียวกันหรือใกล้เคียงกับตัวอย่างจริงให้มากที่สุด เพื่อให้ผลกระทบจากปัจจัยนี้ทั้งในตัวอย่าง และใน calibration blend มีปริมาณเท่ากัน และถือว่าสามารถหักล้างกันได้มากที่สุด

การประเมินความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานที่นำมาใช้มีความจำเป็น เนื่องจากเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ผลการวัดนั้นมีสมบัติการสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา (metrological traceability) ทั้งนี้ข้อตกลงของการเปรียบเทียบผลการวัดด้านเคมีในระดับนานาชาติ (ทั้งระดับโลก, CCQM และระดับภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก, APMP) ได้กำหนดว่าผลการวัดของประเทศผู้เข้าร่วมแบบ key comparison/supplementary comparison จะสามารถนำค่าคิดรวมเป็นค่าอ้างอิง KCRV/SCRV ได้ก็ต่อเมื่อผลการวัดนั้นมี metrological traceability กล่าวคือ การวัดนั้นจะต้องมีการใช้สารมาตรฐานที่เป็น CRM หรือถ้าไม่สามารถจัดหาสารมาตรฐานที่เป็น CRM ได้ ก็จะต้องมีการประเมินความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานที่นำมาใช้

การวิเคราะห์สารในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ (β -agonists) จัดว่าเป็นการวัดที่มีความท้าทายสูง เนื่องจากสารเหล่านี้จะจับกับไขมัน หรือโปรตีน ซึ่งจะต้องมีวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ดี ต้องมั่นใจได้ว่าสารเหล่านี้จะหลุดออกมาหมดเวลาทำการสกัด นอกจากนี้สภาวะที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสเพื่อให้สารเร่งเนื้อแดงเคลือบเตอรอลหลุดออกมาจากเนื้อเยื่อสัตว์มีความสำคัญมาก การเติมเอนไซม์ลงไปในสภาวะความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสมจะช่วยให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซิสมีความสมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งจากการทดลองได้ลองใช้วิธีการไฮโดรไลซิสทั้งในสภาวะกรด⁽¹²⁾ และสภาวะเบส⁽¹³⁾ โดยการไฮโดรไลซิสในสภาวะกรด (pH 5.2) โดยใช้เอนไซม์ β -Glucuronidase (incubate at 37 °C, 16 hours) พบว่าผลการวัดในตัวอย่าง APMP.QM-S6 ที่ได้จากการทำซ้ำไม่สอดคล้องกัน ได้ค่าที่กระจายกันมาก แต่เมื่อเปลี่ยนเป็นการไฮโดรไลซิสในสภาวะเบส (pH 8.0) โดยใช้เอนไซม์ protease type XIV of *Streptomyces griseus* (incubate at 55 °C, 16 hours) พบว่าให้ผลการวัดในตัวอย่าง APMP.QM-S6 จากการทำซ้ำที่สอดคล้องกันเป็นอย่างดี ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการไฮโดรไลซิสในสภาวะเบส สำหรับการกำจัดตัวรบกวนโปรตีนสามารถทำได้ง่ายโดยการเติมกรดลงไปทำให้โปรตีนเสียสภาพ (degradation) จากนั้นจะเกิดการแยกชั้นโปรตีนออกมา ซึ่งง่ายต่อการกำจัดทิ้ง ไขมันเป็นตัวรบกวนที่มีขั้วต่ำซึ่งจะพบมากในตัวอย่างที่เป็นเนื้อสัตว์สามารถกำจัดออกได้โดยการเติม hexane ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว นอกจากนี้การใช้เทคนิค liquid-liquid extraction และ solid phase extraction (SPE) เป็นการกำจัดสารอินทรีย์ตัวอื่นๆ ที่ไม่สนใจ โดยอาศัยสภาพความเป็นขั้วที่ต่างกันและการเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็นการลดตัวรบกวนใน mass spectrometer ซึ่งส่งผลให้ผลการวัดที่ได้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ค่าความไม่แน่นอนของการวัดที่ได้จากเทคนิค exact-matching double IDMS มีขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับเทคนิคอื่นๆ เช่น external calibration curve หรือ standard addition เนื่องจากในสมการการคำนวณหลักมีพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง คือ mass (uncertainty จากการชั่งจะมีขนาดเล็กมาก) ความเข้มข้นของ working standard ซึ่งถูกเตรียมโดยการชั่ง (gravimetric preparation) ทำให้ uncertainty มีขนาดเล็กเช่นกัน ปัจจัยหลักของแหล่งความไม่แน่นอนจึงมาจากการวิเคราะห์ซ้ำ (method precision) ลำดับการฉีดตัวอย่างโดยใช้เทคนิค bracketing⁽¹⁴⁾ (การฉีดคั่นระหว่าง calibration blend และ sample blend) นอกจากจะช่วยในเรื่อง instrumental drift แล้ว ยังช่วยให้ precision ของผลการวัดดียิ่งขึ้นด้วย

จากการเข้าร่วมเปรียบเทียบการวัด APMP.QM-S6 ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อินทรีย์เคมี ฝ่ายมาตรวิทยาเคมีและชีวภาพของ มว. ได้แสดงศักยภาพในการวัดทั้งได้ผลการวัดที่สอดคล้องกับผลจากห้องปฏิบัติการของสถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติของประเทศอื่นๆ และมีค่าความไม่แน่นอนของการวัดที่มีขนาดเล็ก นอกจากนั้นผลจากการเข้าร่วม

เปรียบเทียบผลการวัดในระดับนานาชาติ APMP.QM-S6 ยังเป็นการทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่ได้ทำการพัฒนา (method validation) อีกด้วย ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อินทรีย์เคมี ได้ผ่านการประเมินระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025: 2005 (ผ่าน peer review, pathway C) เมื่อเดือนเมษายน 2557 ในรายการวัดอื่นๆ รวมถึงรายการนี้ด้วย นับเป็นก้าวสำคัญที่นำไปสู่การประกาศความสามารถของการวัดโดยการ claim CMC (Calibration Measurement Capability) บนเว็บไซต์ของ BIPM ซึ่งเป็นแผนที่จะดำเนินการต่อไปในปี 2558 และปัจจุบันรายการวัดสารเร่งเนื้อแดง clenbuterol ได้เปิดให้บริการอย่างเป็นทางการแก่ผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญ หรือ ผู้ผลิต CRM ที่ต้องการค่าอ้างอิงรับรอง

สรุป

จากการที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อินทรีย์เคมีได้พัฒนาวิธีการวัดสารเร่งเนื้อแดง clenbuterol ในเนื้อหมู บดแห้ง โดยใช้เทคนิค exact-matching double IDMS และได้ใช้วิธีนี้เข้าร่วมเปรียบเทียบผลการวัดระหว่างประเทศ และได้ผลการเปรียบเทียบที่มีความถูกต้องสูง มีความไม่แน่นอนของการวัดขนาดเล็กและผลการวัดมีความสอดคล้องได้ทางมาตรวิทยานั้น ถือว่าเป็นการประกาศความสามารถในการวัดครั้งนี้ให้ประเทศอื่นๆ ได้รับรู้ให้ต่างประเทศยอมรับในมาตรฐานการวัดทางด้านเคมี ว่ามีความเท่าเทียมกับนานาชาติ และสถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติสามารถกระจายเผยแพร่ความสามารถในการวัดด้านนี้ ให้แก่ห้องปฏิบัติการในประเทศไทยที่ทำการตรวจวัดสาร clenbuterol เพื่อสามารถวัดได้อย่างถูกต้อง มีความน่าเชื่อถือ และสอดคล้องได้ โดยผ่านการผลิตวัสดุอ้างอิงรับรอง (CRM) หรือ การกำหนดค่าอ้างอิงให้กับโปรแกรมทดสอบความชำนาญ (PT) ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

สำหรับการเปรียบเทียบการวัดครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก สพ.ญ.สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์ จากสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ในการให้คำปรึกษา รวมทั้งอนุเคราะห์ให้ยืมสารเคมีบางส่วน และขอขอบคุณ มว. ที่ให้การสนับสนุนในเรื่องค่าใช้จ่ายต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างที่ได้ทำการวิเคราะห์ในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Spiller HA, James KJ, Scholzen S, Borys DJ. A descriptive study of adverse events from clenbuterol misuse and abuse for weight loss and bodybuilding. *Subst Abus* 2013; 34(3): 306-12.
2. Kuiper HA, Noordam MY, van Dooren-Flipsen MM, Schilt R, Roos AH. Illegal use of beta-adrenergic agonists: European community. *J Anim Sci* 1998; 76(1): 195-207.
3. Elliott CT, McEvoy JD, McCaughey WJ, Shortt DH, Crooks SR. Effective laboratory monitoring for the abuse of the beta-agonist clenbuterol in cattle. *Analyst* 1993; 118(4): 447-8.
4. Codex Alimentarius Commission. Maximum residue limits for clenbuterol. [online]. 2012; [cited 2014 Apr 17]; [1 screen]. Available from: URL: <http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/vetdrugs/details.html; jsessionid=0DB0C8B130F8E59454A24F70BD22F850?id=13>
5. Sin DWM, Ho C, Yip YC. APMP supplementary comparison and pilot study clenbuterol in porcine meat (APMP.QM-S6 and APMP.QM-P22). Hong Kong, China: Government Laboratory (GLHK); 2013.
6. Richter W. Primary methods of measurement in chemical analysis. *Accredit Qual Assur* 1997; 2(8): 354-9.

7. De Bièvre P, Peiser HS. Basic equations and uncertainties in isotope-dilution mass spectrometry for traceability to SI of values obtained by this primary method. *Fresenius J Anal Chem* 1997; 359(7-8): 523-5.
8. Mackay LG, Taylor CP, Myers RB, Hearn R, King B. High accuracy analysis by isotope dilution mass spectrometry using an iterative exact matching technique. *Accred Qual Assur* 2003; 8(5): 191-4.
9. Ellison SLR, Williams A, editors. *EURACHEM/CITAC Guide: quantifying uncertainty in analytical measurement*. 3rd ed. United Kingdom: EURACHEM; 2012.
10. JCGM 100:2008 Evaluation of measurement data -- guide to the expression of uncertainty in measurement. JCGM; 2008.
11. Sin DWM, Ho C, Yip YC. Draft a report of APMP.QM-S6 APMP supplementary comparison clenbuterol in porcine meat. Hong Kong, China: Government Laboratory, (GLHK); 2014.
12. Shao B, Jia X, Zhang J, Meng J, Wu Y, Duan H, et al. Multi-residual analysis of 16 β -agonists in pig liver, kidney and muscle by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 2009; 114: 1115-21.
13. สัจจิตรา พงศ์วิวัฒน์. เอกสารการประชุม ASEAN Food Reference Laboratory for Veterinary Drug Residues (AFRL for VDR) เรื่อง Analytical method for beta-agonists. วันที่ 13-16 สิงหาคม 2556. ปทุมธานี: สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์; 2556.
14. Muaksang K. Development of reference methods and reference materials for trace level antibiotic residues in food using IDMS [dissertation]. Sydney, Australia: The University of New South Wales; 2009.

Analysis of Clenbuterol in Porcine Meat Utilizing an Exact-Matching Double IDMS: Interlaboratory Comparison Result: APMP.QM-S6 Clenbuterol in Porcine Meat

Kittiya Shearman Pornhatai Kankaew Preeyaporn Pookrod

Sornkrit Marbumrung Panadda Silva

Chemical Metrology and Biometry Department, The National Institute of Metrology, Thailand (NIMT), Klong 5, Klong Luang, Pathumthani, 12120

ABSTRACT Clenbuterol is a type of β -agonist which has been used as an illegal growth promoter in meat production. The presence of clenbuterol in meat for human consumption is a health risk for consumers and is therefore forbidden in many countries. The Organic Analysis Laboratory of the National Institute of Metrology, Thailand (NIMT) participated in the interlaboratory comparison, APMP.QM-S6: Clenbuterol in porcine meat. The measurement method used was the exact-matching double isotope dilution mass spectrometry (IDMS) technique. This measurement procedure involved alkaline hydrolysis, acid precipitation, defatting, liquid-liquid extraction, solid phase extraction (SPE) clean-up and analysis of sample extracts by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) operating in positive ion multiple reaction monitoring (MRM) mode. The purity of clenbuterol standard obtained from the in-house purity assessment utilized metrological traceability of measurement results. The mass fraction of clenbuterol in APMP.QM-S6 sample reported by NIMT was 5.0 $\mu\text{g/kg}$ with 5.0% relative expanded uncertainty (at the 95 % confidence interval) which was in agreement with results from other metrology institutes. The Supplementary Comparison Reference Value (SCRV) was 5.216 $\mu\text{g/kg} \pm 0.131 \mu\text{g/kg}$.

Key words: Clenbuterol, exact-matching double IDMS, interlaboratory comparison

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณเดกซาเมทาโซน และเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณ โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง

จิราณัฐ แจ่มทวีกุล สุเมธ เทียงธรรม วลัยลักษณ์ เมธากัทร และจิตรา ชัยวัฒน์

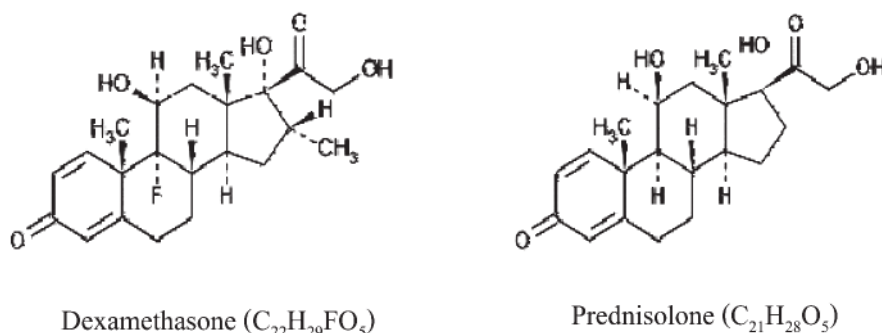
สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ วิธีวิเคราะห์หาปริมาณเดกซาเมทาโซน (Dexamethasone) และเพรดนิโซโลน (Prednisolone) ที่ปนปลอมในยาแผนโบราณถูกพัฒนาขึ้นโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ใช้คอลัมน์ Hypersil BDS RP-8 มีส่วนผสมของ acetonitrile และน้ำเป็นสารละลายตัวพา และเตรียมตัวอย่างโดยเทคนิคการสกัดแยกสารด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid Phase Extraction, SPE) จากการทดสอบความถูกต้องของวิธี พบว่ามีช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงที่ 250-12,500 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน เท่ากับ 0.9987 และ 0.9988 ตามลำดับ ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีโดยการเติมสารละลายเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในตัวอย่างที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 500, 6,000 และ 12,000 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าค่าร้อยละการคืนกลับของสารมาตรฐาน อยู่ในช่วง 100.30-104.53 และ 100.02-102.18 ตามลำดับ และร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเที่ยง อยู่ในช่วง 0.04-2.01 และ 0.15-2.47 ตามลำดับ ปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ปริมาณได้ของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน มีค่าเท่ากับ 250.14 และ 249.30 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จึงกล่าวได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ในการเฝ้าระวังการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทนำ

เดกซาเมทาโซน (Dexamethasone) มีชื่อทางเคมีว่า 9-Fluoro-11 β , 17, 21-trihydroxy-16 α -methylpregna-1, 4-diene-3, 20-dione สูตรโมเลกุล $C_{22}H_{29}FO_5$ น้ำหนักโมเลกุล 392.47 มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น ไม่ละลายน้ำ และเพรดนิโซโลน (Prednisolone) มีชื่อทางเคมีว่า 11 β , 17, 21-Trihydroxypregna-1, 4-diene-3, 20-dione สูตรโมเลกุล $C_{21}H_{28}O_5$ น้ำหนักโมเลกุล 360.45 มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ละลายน้ำได้เล็กน้อย (รูปที่ 1)^(1, 2, 3)

เดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนจัดเป็นยาในกลุ่มคอร์ติโคสเตียรอยด์ (corticosteroid)⁽⁴⁾ ซึ่งเป็นยาควบคุมพิเศษ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ยาควบคุมพิเศษ ฉบับลงวันที่ 26 พฤษภาคม 2521⁽⁵⁾ ในทางการแพทย์ใช้เป็นยาด้านอักเสบและแก้แพ้ ใช้รักษาอาการแพ้ชนิดรุนแรงหรือเรื้อรัง เช่น หอบหืด แพ้ยา โรคภูมิแพ้ทางผิวหนัง หรือกลุ่มโรคอิมมูน เช่น อัมพาตจากไขสันหลัง โรคไตเรื้อรัง (nephrotic) เอสแอลอี (Systemic Lupus Erythematosus, SLE) เป็นต้น ผู้ที่ใช้ยานี้ต้องอยู่ในความดูแลของแพทย์อย่างใกล้ชิด เพราะหากได้รับติดต่อกันเป็นระยะเวลานานอาจทำให้เกิดอาการบวม น้ำ กระเพาะอาหารทะลุ กระดูกพรุน ภูมิคุ้มกันร่างกายต่ำทำให้ติดเชื้อได้ง่าย อาจเกิดโรคแทรกซ้อนที่เป็นอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ ยากลุ่มคอร์ติโคสเตียรอยด์มีผลต่อร่างกายเกือบทุกระบบ ต้องระมัดระวังในการใช้ยานี้ในผู้ป่วยโรคความดันโลหิต โรคหัวใจ และโรคเบาหวาน⁽⁶⁾ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน

ในปีงบประมาณ 2553 สำนักยาและวัตถุเสพติดได้ทำการตรวจวิเคราะห์การปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในผลิตภัณฑ์ยาแผนโบราณ ด้วยเทคนิคกระดาษกรอง (Thin-layer Chromatography) จำนวน 302 ตัวอย่าง ตัวอย่างส่วนใหญ่ส่งตรวจโดยผู้บริโภครและสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ผลการตรวจพบว่าการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน จำนวน 53 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 17.5⁽⁷⁾ โดยพบการปนปลอมในตัวอย่างทั้งในรูปแบบยาลูกกลอน ยาเม็ดรูปทรงกระบอก ยาผง และยาแคปซูล ตัวอย่างที่พบการปนปลอมของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนมักมีข้อความแสดงสรรพคุณแก้ปวดเมื่อย ปวดตามข้อ แก้อัมพฤกษ์ อัมพาต ฯลฯ ไม่มีเลขทะเบียนตำรับยา ไม่ทราบแหล่งผลิตที่แน่ชัด และพบว่าผู้บริโภคส่วนใหญ่มักเป็นกลุ่มผู้สูงอายุ ผู้มีโรคประจำตัว เช่น หอบหืด หรือผู้ที่ทำงานหนัก ทำให้มีอาการปวดเมื่อย จึงเป็นผู้ที่มีความเสี่ยงสูงที่จะได้รับยาแผนโบราณที่ไม่ปลอดภัย แม้หน่วยงานคุ้มครองผู้บริโภคด้านสาธารณสุขจะได้ดำเนินการณรงค์เพื่อป้องกันและแก้ไขปัญหาดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง แต่ยังคงตรวจพบการปนปลอมในจำนวนใกล้เคียงกับที่เคยตรวจพบในปีที่ผ่านมา ซึ่งอาจเป็นผลมาจากกระแสนิยมการใช้สมุนไพรเพื่อรักษาโรค โดยมีความเชื่อมั่นในสรรพคุณและมั่นใจว่าไม่มีอันตรายหรือมีพิษน้อยกว่ายาแผนปัจจุบัน แต่กลับมีผู้ฉวยโอกาสปนปลอมตัวยาดังกล่าวในผลิตภัณฑ์ยาแผนโบราณเพื่อหวังผลทาง

การค้า และยังพบการปนปลอมสารดังกล่าวในยาแผนโบราณและยาที่มาจากสมุนไพรในต่างประเทศ เช่น สิงคโปร์ มาเลเซีย สหรัฐอเมริกา^(8, 9) การที่จะทำให้ประชาชนตระหนักถึงพิษภัยและมีความรู้ความเข้าใจในการเลือกซื้อผลิตภัณฑ์ ยาแผนโบราณให้มากขึ้น จึงจะต้องรู้ถึงปริมาณการปนปลอมยาแผนปัจจุบันดังกล่าวในผลิตภัณฑ์ยาแผนโบราณ เพื่อประโยชน์ต่อตัวผู้บริโภคและแพทย์ผู้รักษาผู้ป่วยที่ได้รับยาแผนโบราณที่มีการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและ เพรดนิโซโลน โดยก่อนหน้านี้มีการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจเอกลักษณ์และหาปริมาณสารสเตียรอยด์ที่ปนปลอมในยา ที่มาจากสมุนไพร^(10, 11, 12) อาหารสัตว์⁽¹³⁾ ปัสสาวะ⁽¹⁴⁾ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูงที่ใช้ ตัวตรวจวัดเป็นยูวี^(10, 11, 12) หรือแมสสเปกโตรมิเตอร์⁽¹⁴⁾ นอกจากนี้ยังมีวิธีมาตรฐานในการหาปริมาณเดกซาเมทาโซนที่ ระบุในตำราฟาร์มาโคเปียของสหรัฐอเมริกาที่ใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง และใช้สารละลาย ตัวพาแบบ isocratic ที่มีส่วนผสมระหว่าง acetonitrile และน้ำ⁽¹⁾ แต่เนื่องจากในปัจจุบันสำนักยาและวัตถุเสพติด มีวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจเอกลักษณ์เดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณหรือยาที่มาจากสมุนไพร ด้วยเทคนิคแรงขับเคลื่อนบางเท่านั้น อีกทั้งวิธีการดังกล่าวมีขั้นตอนการสกัดที่ยุ่งยาก ต้องใช้คลอโรฟอร์มซึ่งเป็นตัวทำละลาย อินทรีย์ที่มีความเป็นพิษ⁽¹⁵⁾ และยังไม่มียวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน ในยาแผนโบราณหรือยาที่มาจากสมุนไพรซึ่งมีความหลากหลายขององค์ประกอบทางเคมี จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องแยก สิ่งรบกวนการตรวจวัดปริมาณเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนออก ลดขั้นตอนการสกัด เพิ่มประสิทธิภาพการแยก และใช้วิธีที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน ดังนั้นจึงได้ศึกษาและพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณการปนปลอมสเตียรอยด์ดังกล่าวในยา แผนโบราณด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูงที่มีตัวตรวจวัดเป็นยูวี ซึ่งวิธีนี้นิยมใช้ในการตรวจ เเชิงปริมาณ เนื่องจากให้ผลรวดเร็ว ไม่ยุ่งยาก ถูกต้องและแม่นยำ

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐานเดกซาเมทาโซนของสำนักยาและวัตถุเสพติด ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.20 รุ่นผลิต 652008, สารมาตรฐานเพรดนิโซโลนของตำราฟาร์มาโคเปียสหรัฐอเมริกา ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.40 รุ่นผลิต N1J277, Methanol HPLC grade ผลิตภัณฑ์ของ Mallinckrodt ประเทศสหรัฐอเมริกา, Acetonitrile HPLC grade ผลิตภัณฑ์ ของ Mallinckrodt ประเทศสหรัฐอเมริกา, น้ำความบริสุทธิ์สูง (Type I water) ผลิตจากเครื่องของ Millipore ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง ผลิตภัณฑ์ของ Waters Millipore Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา รุ่น 2695-2996, คอลัมน์ Hypersil BDS C8 ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร บรรจุอนุภาค ขนาด 5 ไมโครเมตร ผลิตภัณฑ์ของ Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา, การ์ดคอลัมน์ Phenomenex C8 ขนาด 3.0×4.0 มิลลิเมตร ผลิตภัณฑ์ของ Phenomenex Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา, ตัวดูดซับ Chromobond[®] Cartridge รุ่น HRX เป็น hydrophobic polystyrene-divinylbenzene ขนาดความจุ 200 มิลลิกรัม ผลิตภัณฑ์ ของ MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี, เครื่องผสมสารละลาย ผลิตภัณฑ์ของ Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา รุ่น 232, เครื่องหมุนเหวี่ยง ผลิตภัณฑ์ของ Precision Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา, เครื่องเขย่าความถี่สูง ผลิตภัณฑ์ของ Elma ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี รุ่น Elmasonic S100H, เครื่องชั่ง ผลิตภัณฑ์ของ Mettler Toledo ประเทศสหรัฐอเมริกา รุ่น AT261, แผ่นเมมเบรน สำหรับกรองชนิดไนลอน ผลิตภัณฑ์ของ Vertical Chromatography Co., Ltd. ประเทศไทย ขนาด 0.45 ไมครอน เส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร

ตัวอย่าง

ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่ได้จากผลิตภัณฑ์ยาแผนโบราณรูปแบบลูกกลอนและรูปแบบผงที่ได้จากการส่งตัวอย่างมาทดสอบกับทางสำนักยาและวัตถุเสพติด ซึ่งได้ตรวจสอบด้วยเทคนิคแรงกลศาสตร์แล้วพบว่าไม่พบการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน โดยบดรวมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำมาอบที่ 55-60 องศาเซลเซียสจนแห้งและบดซ้ำอีกครั้ง บรรจุในภาชนะปิดสนิทป้องกันแสงและความชื้น

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ซึ่งผงตัวอย่าง 14 กรัม ละลายใน 25% v/v methanol จำนวน 200 มิลลิลิตร ปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐาน Dexamethasone Stock Solution (DSS) และ Prednisolone Stock Solution (PSS) แยกเตรียมสารละลายมาตรฐานเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนใน 25% v/v methanol ให้แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐานผสม (Mixed Standard Solution, MSS) ปิ่เปิดสารละลายมาตรฐาน DSS และ PSS อย่างละ 20.0 มิลลิลิตร ลงในขวดปริมาตรขนาด 50.0 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย 25% v/v methanol

สารละลายมาตรฐานสำหรับกราฟมาตรฐาน เตรียมสารละลายมาตรฐาน MSS ในสารละลายตัวอย่าง โดยปรับปริมาตรด้วย 25% v/v methanol นำมาสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งให้มีระดับความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 250, 1,250, 2,500, 5,000, 7,500, 10,000 และ 12,500 ไมโครกรัมต่อลิตร

การเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid Phase Extraction, SPE)

ซึ่งผงตัวอย่างน้ำหนัก 0.35 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด เติม 25% v/v methanol จำนวน 10.0 มิลลิลิตร นำไปผสมด้วยเครื่องผสมสารละลายอย่างน้อย 1 นาที นำไปเขย่าสารด้วยความถี่สูงต่อเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงประมาณ 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

เตรียมความพร้อมของตัวดูดซับที่บรรจุใน cartridge ด้วย methanol และน้ำ อย่างละ 3 มิลลิลิตร

ปิ่เปิดสารละลายใสที่ได้หลังจากการปั่นแยกตะกอนแล้ว จำนวน 3 มิลลิลิตร ใส่ลงใน cartridge จากนั้นใส่ 5% v/v methanol จำนวน 3 มิลลิลิตร ลงใน cartridge เพื่อขจัดสารที่ไม่จับกับตัวดูดซับออก และชะสารเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนออกมาด้วย methanol จำนวน 6 มิลลิลิตร

การพัฒนาวิธี

การศึกษาการแยกเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง

ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน สารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานโดยใช้สารละลายตัวพาที่มีส่วนผสมของ acetonitrile และน้ำ ในอัตราส่วน 40:60, 30:70 และใช้สารละลายตัวพาแบบ gradient program (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 สารละลายตัวพาแบบ Gradient program

เวลา (นาที)	อัตราการไหล (มิลลิลิตร/นาที)	Acetonitrile (%)	น้ำ (%)
0.0	1.0	28	72
3.0	1.2	22	78
5.0	0.8	25	75
12.0	0.8	30	70
14.0	1.5	28	72
15.0	1.5	28	72
16.0	1.0	28	72

การศึกษาการดูดซับของตัวกรอง

ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมผ่านและไม่ผ่านแผ่นเมมเบรนสำหรับกรองชนิดไนลอน ขนาด 0.45 ไมครอน เส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร และคำนวณร้อยละของการดูดซับสารของตัวกรอง โดยต้องไม่มากกว่าร้อยละ 5⁽¹⁶⁾

การตรวจวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้จาก SPE จำนวน 2.0 มิลลิลิตร และน้ำ จำนวน 2.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปกรองผ่านเมมเบรนชนิดไนลอน ขนาด 0.45 ไมครอน ใส่ขวดสำหรับวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง HPLC โดยมีสภาวะของเครื่องดังต่อไปนี้

- คอลัมน์ : Hypersil BDS C 8, 5 ไมครอนเมตร ขนาด 4.6 × 150 มิลลิเมตร
- การ์ดคอลัมน์ : C8 ขนาด 4.0 × 3.0 มิลลิเมตร
- อุณหภูมิคอลัมน์ : 30 °C
- สารละลายตัวพา : Gradient program (ตารางที่ 1)
- อัตราการไหล : 0.8–1.5 มิลลิลิตรต่อนาที
- เครื่องตรวจวัด : Diode array detector, ความยาวคลื่นที่ 190–400 นาโนเมตร
- ปริมาตรที่ฉีด : 80 ไมโครลิตร

ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง อย่างละ 80 ไมโครลิตร จำนวน 3 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีคและหาปริมาณของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในหน่วยไมโครกรัมต่อลิตร จากสมการเส้นตรง

$$Y = AX + B \quad \dots\dots\dots(1)$$

Y คือ พื้นที่ใต้พีค

A คือ ความชันของเส้นกราฟ

X คือ ความเข้มข้นของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน (ไมโครกรัมต่อลิตร)

B คือ จุดตัดแกน Y

จากสมการ (1) จะได้ความเข้มข้นของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน (ไมโครกรัมต่อลิตร) ซึ่งเมื่อนำไปแทนค่าในสมการ (2) จะได้ปริมาณเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่อยู่ในตัวอย่างทั้งหมด (m)

$$m = X \times \text{Dilution factor} \times 10^{-3} \quad \dots\dots\dots(2)$$

$$M = m/W \quad \dots\dots\dots(3)$$

Dilution factor เท่ากับ $10 \times 6/3 \times 4/2 = 40$

m คือ ไมโครกรัมของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน ในตัวอย่าง

M คือ ปริมาณเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน ในหน่วยไมโครกรัมต่อกรัม

W คือ ปริมาณตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ (กรัม)

การทดสอบความถูกต้องของวิธี (Method Validation)^(17, 18, 19)

การทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ (Chromatographic system suitability)

ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมที่ระดับความเข้มข้น 6,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ซ้ำ 5 ครั้ง เข้าเครื่อง HPLC คำนวณร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ต้องไม่มากกว่า 2.0, tailing factor ของพีคเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนต้องไม่มากกว่า 2.0 และ resolution ระหว่างพีคเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนต้องไม่น้อยกว่า 2

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

โดยการฉีดตัวทำละลาย สารละลายมาตรฐานผสม สารละลายตัวอย่างที่ไม่มีการปนปลอมของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนจำนวน 5 ตัวอย่าง เข้าเครื่อง HPLC จากโครมาโทแกรมต้องไม่มีการรบกวนของสารอื่นๆ ต่อพีคของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่เติมในสารละลายตัวอย่างและผ่านการสกัดด้วย SPE ที่ระดับความเข้มข้น 250, 1,250, 2,500, 5,000, 7,500, 10,000 และ 12,500 ไมโครกรัมต่อลิตร แต่ละระดับความเข้มข้นฉีดซ้ำ 3 ครั้ง เข้าเครื่อง HPLC นำค่าเฉลี่ยแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐานหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ซึ่งค่าที่ได้ควรมีค่าใกล้เคียง 1

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ชั่งผงตัวอย่างน้ำหนัก 0.35 กรัม เติมสารละลายมาตรฐานผสมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ระดับความเข้มข้น 500, 6,000 และ 12,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC คำนวณร้อยละการคืนกลับ (% Recovery) ที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 6,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ต้องมีร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 80-110 และที่ระดับความเข้มข้น 12,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ต้องมีร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 90-107^(18, 19)

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

ความทำซ้ำได้ (Repeatability)

เตรียมตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานผสมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ระดับความเข้มข้น 500, 6,000 และ 12,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยคำนวณค่าร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ซึ่งจะคิดเป็นช่วงที่ระดับความเข้มข้น 500, 6,000 และ 12,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ต้องมีร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่มากกว่า 10.5, 7.4 และ 5.2 ตามลำดับ^(18, 19)

Intermediate precision

ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานผสมเตตราไฮโดรคาโนลินและเพรดนิโซโลนที่ระดับความเข้มข้น 500, 6,000 และ 12,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ 3 วัน นำไปคำนวณทางสถิติโดยวิธี Analysis of variance (ANOVA) เพื่อพิจารณาความแตกต่างของผลวิเคราะห์ระหว่างวัน

การทดสอบความทน (Ruggedness)

ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีการปนปลอมเตตราไฮโดรคาโนลินและเพรดนิโซโลน จำนวน 8 ซ้ำ โดยนักวิเคราะห์ 2 คน แล้วนำไปคำนวณทางสถิติโดยวิธี t-test เพื่อพิจารณาความแตกต่างของผลวิเคราะห์ของนักวิเคราะห์ 2 คน

การตัดสินความแตกต่างของผลวิเคราะห์ให้พิจารณาจากค่า p-value ถ้าค่า p-value มากกว่า 0.05 ถือว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับ 6,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ด้วยคอลัมน์ 2 รุ่นการผลิต แล้วนำไปคำนวณร้อยละความแตกต่างสัมพัทธ์ (Relative Percent Difference, RPD) เพื่อพิจารณาความแตกต่างของผลวิเคราะห์ของคอลัมน์ทั้งสองรุ่นการผลิต

การตัดสินความแตกต่างของผลวิเคราะห์ให้พิจารณาจากร้อยละความแตกต่างสัมพัทธ์ ต้องมีค่าไม่มากกว่า 3.0

การทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit Of Detection, LOD)

ฉีดสารละลายตัวอย่างผสมเตตราไฮโดรคาโนลินและเพรดนิโซโลนที่ระดับความเข้มข้นที่ให้ขนาดสัญญาณเป็น 3 เท่าของขนาดสัญญาณรบกวน ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบได้

การทดสอบหาขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (Limit Of Quantitation, LOQ)

ฉีดสารละลายตัวอย่างผสมเตตราไฮโดรคาโนลินและเพรดนิโซโลนที่ระดับความเข้มข้นที่ให้ขนาดสัญญาณเป็น 10 เท่าของขนาดสัญญาณรบกวน และนำค่าประมาณการของปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้มาเตรียมสารละลายที่ความเข้มข้นดังกล่าว และฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยคำนวณร้อยละของการคืนกลับ (% Recovery) ต้องอยู่ในช่วงยอมรับได้คือร้อยละ 80-110 และค่าร้อยละการเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ต้องไม่เกินร้อยละ 10.5^(18, 19)

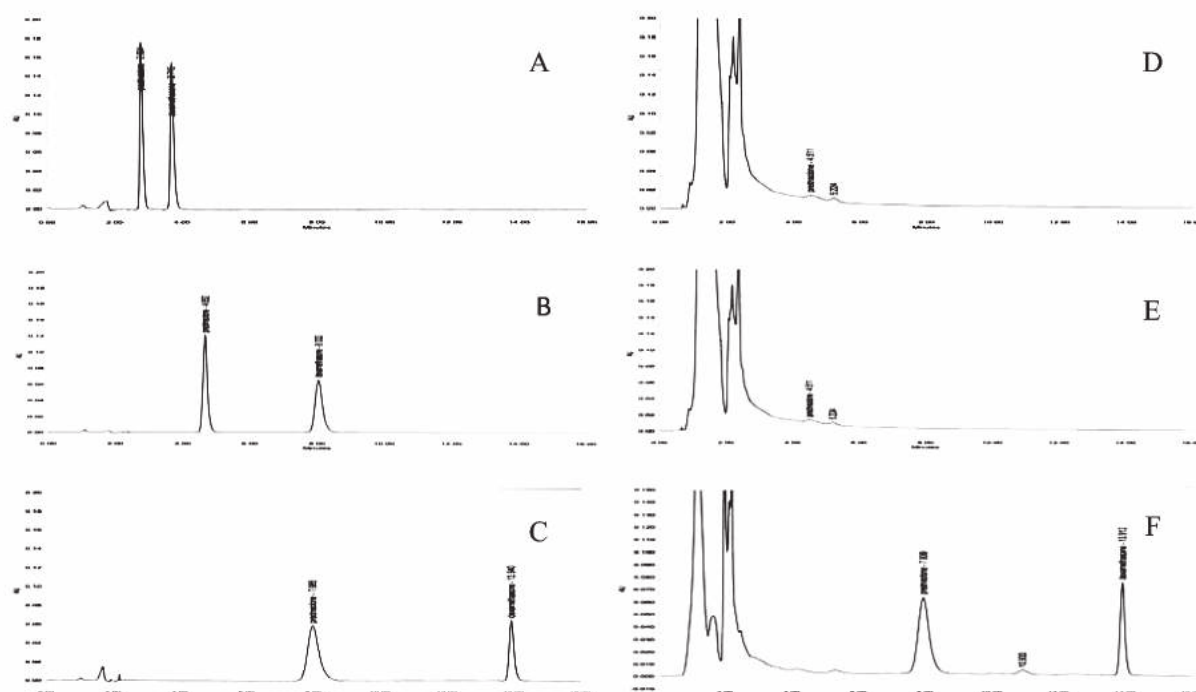
การตรวจปริมาณการปนปลอมเตตราไฮโดรคาโนลินและเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

นำตัวอย่างยาแผนโบราณชนิดยาเม็ด ยามขี้ และยาน้ำ ที่ส่งตรวจที่สำนักงานและวัตถุประสงค์ จำนวน 15 ตัวอย่าง เพื่อหาวิเคราะห์หาปริมาณการปนปลอมเตตราไฮโดรคาโนลินและเพรดนิโซโลนในตัวยาดังกล่าวด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

ผล

การศึกษาการแยกเตตราไฮโดรคาโนลินและเพรดนิโซโลนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง

ผลการแยกเตตราไฮโดรคาโนลินและเพรดนิโซโลนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง โดยการใช้สารละลายตัวพาแบบ gradient program ตาม (ตารางที่ 1) สามารถแยกพีคเตตราไฮโดรคาโนลินและเพรดนิโซโลนออกจากพีคบริเวณอื่นๆ ได้ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่ไม่พบการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน

(A), (B) และ (C) สารละลายมาตรฐานผสมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในสารละลายตัวพาสสมระหว่าง acetonitrile และน้ำ อัตราส่วน 40:60, 30:70 และแบบ gradient program ตามลำดับ

(D) และ (E) สารละลายตัวอย่างที่ไม่พบการปนปลอมของสารสเดียรอยดในสารละลายตัวพาสสมระหว่าง acetonitrile และน้ำ อัตราส่วน 40:60 และ 30:70 ตามลำดับ

(F) สารละลายตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในสารละลายตัวพาสแบบ gradient

การศึกษาการดูดซับของตัวกรอง

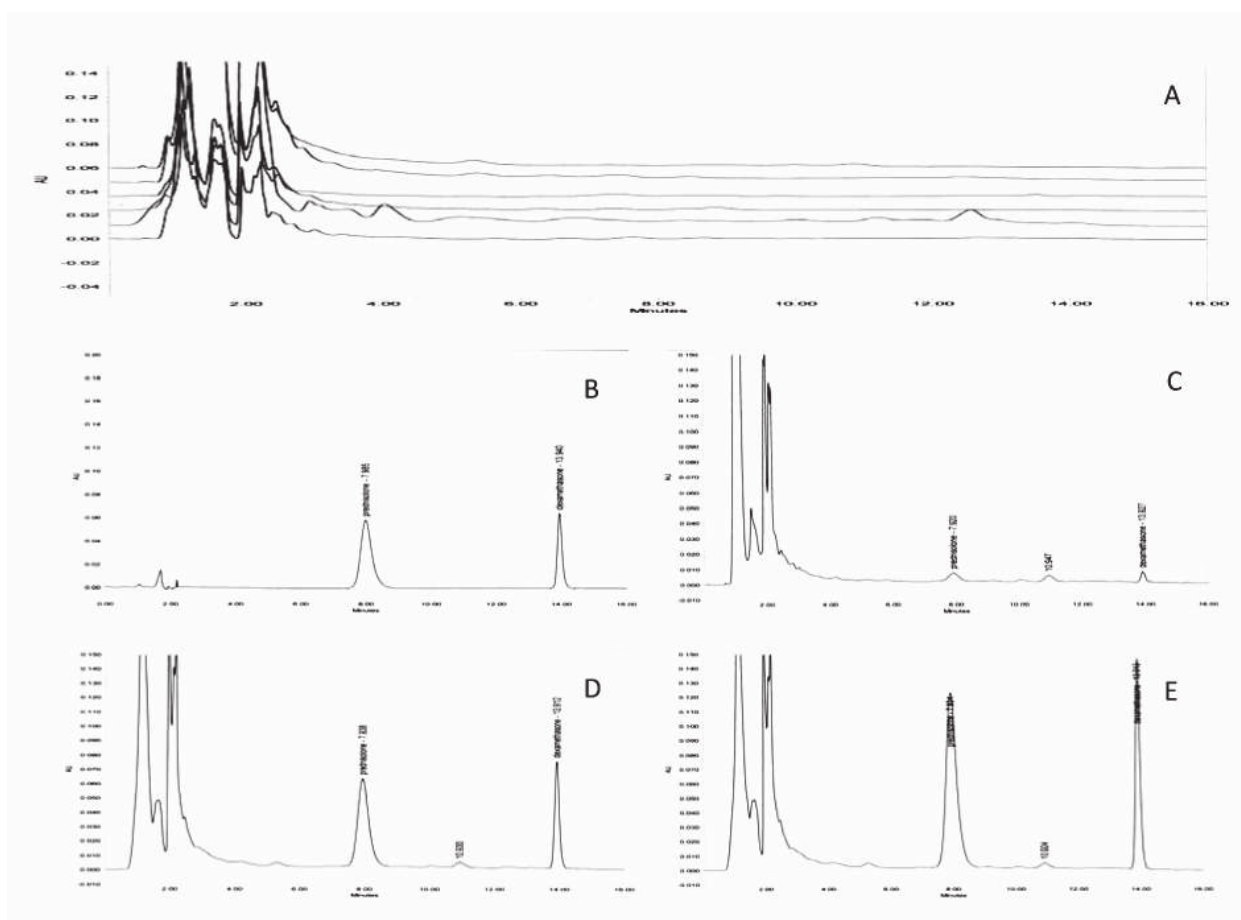
จากการฉีดสารละลายมาตรฐานที่ผ่านเมมเบรน พบว่าพื้นที่ใต้พีคของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนลดลงคิดเป็นร้อยละ 0.39 และ 0.30 ตามลำดับ

การทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ

จากการฉีดสารละลายมาตรฐานผสมพบพีคของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่เวลาประมาณ 13.8 นาที และ 7.8 นาที ตามลำดับ โดยมีค่า tailing factor ของยาทั้งสองตัวเท่ากับ 1.0 และค่าร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการฉีดสารละลายมาตรฐานผสมที่ระดับความเข้มข้น 6,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ซ้ำ 5 ครั้ง เท่ากับ 0.1 และ 0.3 ตามลำดับ และมีค่า resolution ระหว่างพีคเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน เท่ากับ 13.2 ซึ่งแสดงถึงความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟในการตรวจวิเคราะห์ต่อไปได้

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง

จากการฉีดสารละลายตัวอย่างที่ไม่มีการปนปลอมของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน สารละลายมาตรฐานผสม สารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 500, 6,000 และ 12,000 ไมโครกรัมต่อลิตร เข้าเครื่อง HPLC ซึ่งไม่พบพีคของสารอื่นมารบกวนพีคของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน (ภาพที่ 3)

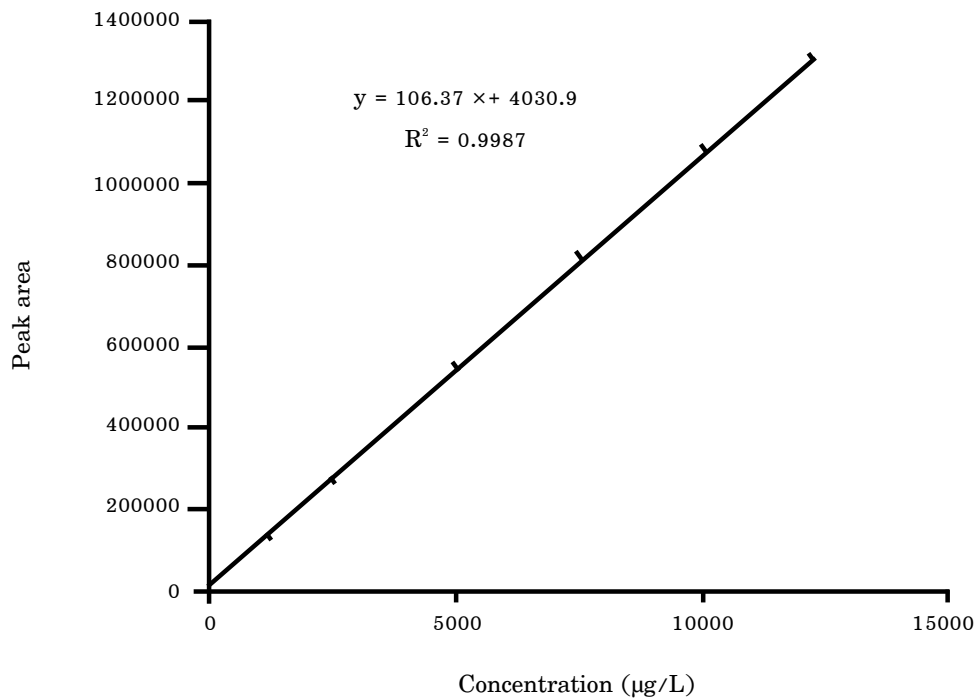


ภาพที่ 3 โครมาโตแกรมการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของสารละลาย

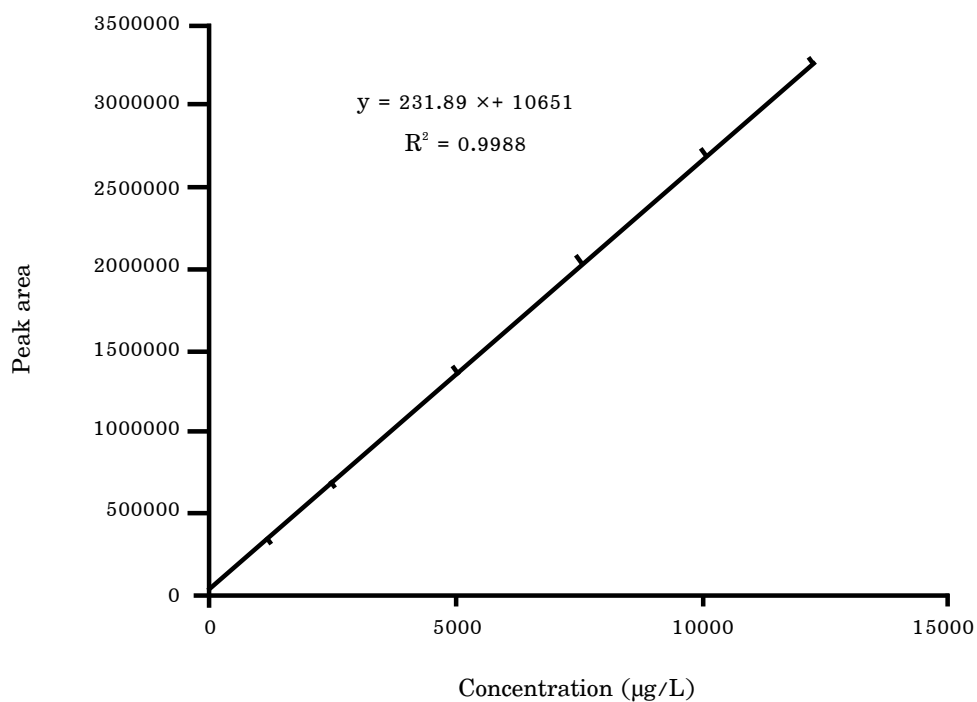
- (A) สารละลายตัวอย่างที่ไม่พบการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน 5 แหล่ง
- (B) สารละลายมาตรฐานเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน
- (C) สารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อลิตร หลังผ่าน SPE
- (D) สารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 6,000 ไมโครกรัมต่อลิตร หลังผ่าน SPE
- (E) สารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 12,000 ไมโครกรัมต่อลิตร หลังผ่าน SPE

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

จากการฉีดสารละลายมาตรฐานผสม เดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่เติมลงในสารละลายตัวอย่าง ในช่วงความเข้มข้น 250.14–12,507.18 และ 249.30–12,464.76 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ได้กราฟเป็นเส้นตรง ตลอดช่วงความเข้มข้น โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.9987 และ 0.9988 ตามลำดับ (ภาพที่ 4 และ 5)



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเดกซาเมทาโซนและพื้นที่ใต้พีค



ภาพที่ 5 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเพรดนิโซโลนและพื้นที่ใต้พีค

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

โดยการเติมสารละลายมาตรฐานเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ 3 ระดับความเข้มข้น ได้ร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) ของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนอยู่ในช่วงร้อยละ 100.30-104.53 และ 100.02-102.18 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

ชนิดของ สารละลายมาตรฐาน ที่เติม	ปริมาณที่เติม (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ปริมาณที่พบ (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ยของปริมาณที่พบ (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ยของ ร้อยละ การคืนกลับ	ร้อยละ การเบี่ยงเบน มาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)
เดกซาเมทาโซน	500.29	512.54	522.97	104.53	2.01
	500.29	533.59			
	500.29	522.79			
	6,003.45	6,193.98	6,187.99	103.07	0.12
	6,003.45	6,179.54			
	6,003.45	6,190.45			
	12,006.90	12,044.35	12,042.60	100.30	0.04
	12,006.90	12,037.76			
	12,006.90	12,045.69			
เพรดนิโซโลน	498.59	511.52	498.70	100.02	2.47
	498.59	497.68			
	498.59	486.90			
	5,983.08	6,105.15	6,113.58	102.18	0.25
	5,983.08	6,104.71			
	5,983.08	6,130.88			
	11966.17	11,993.03	11,993.29	100.23	0.15
	11966.17	11,975.14			
	11966.17	12,011.71			

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

จากการฉีดสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่าวิธีนี้มีความสามารถทำซ้ำได้ โดยมีค่าร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) อยู่ในช่วง 0.04-2.01 และ 0.15-2.47 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

จากการทดสอบ Intermediate precision โดยการวิเคราะห์ซ้ำ 3 วัน วันละ 3 ซ้ำ ที่ 3 ระดับความเข้มข้น และนำไปทดสอบสถิติ Analysis of variance (ANOVA)⁽²⁰⁾ พบว่าผลการวิเคราะห์ทั้ง 3 วัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า p-value ของการวิเคราะห์เดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนอยู่ที่ 0.50 และ 0.10 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำในแต่ละวัน

วันที่	ระดับความเข้มข้นที่ศึกษา (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ปริมาณเฉลี่ยที่ตรวจพบ เดกซาเมทาโซน	(ไมโครกรัมต่อลิตร $\pm$ %RSD) เพรดนิโซโลน
1	500	522.97 $\pm$ 2.01	498.70 $\pm$ 2.47
	6,000	6187.99 $\pm$ 0.12	6113.58 $\pm$ 0.25
	12,000	12042.60 $\pm$ 0.04	11,993.29 $\pm$ 0.15
2	500	483.62 $\pm$ 1.77	538.52 $\pm$ 0.48
	6,000	6149.25 $\pm$ 0.04	6145.09 $\pm$ 0.08
	12,000	12007.12 $\pm$ 0.04	11983.14 $\pm$ 0.14
3	500	508.96 $\pm$ 0.43	532.29 $\pm$ 0.39
	6,000	6155.33 $\pm$ 0.26	6101.75 $\pm$ 0.23
	12,000	12099.32 $\pm$ 0.97	12016.24 $\pm$ 0.94
p-value (between day)		0.500.10	

การทดสอบความทน (Ruggedness)

นักวิเคราะห์ 2 คน วิเคราะห์ 8 ซ้ำ นำไปทดสอบสถิติ t-test พบว่าผลการวิเคราะห์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า p-value ของการวิเคราะห์เดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนอยู่ที่ 0.48 และ 0.94 ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

จากการเปลี่ยนคอลัมน์รุ่นผลิตภัณฑ์ 8447 และ 12341 พบว่าผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกัน โดยค่าร้อยละความแตกต่างสัมพัทธ์ (Relative Percent Difference, RPD) ของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนอยู่ที่ 0.32 และ 0.95 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำโดยการเปลี่ยนนักวิเคราะห์

นักวิเคราะห์ที่	ค่าเฉลี่ยของปริมาณเดกซาเมทาโซน (ไมโครกรัมต่อลิตร $\pm$ %RSD)	ค่าเฉลี่ยของปริมาณเพรดนิโซโลน (ไมโครกรัมต่อลิตร $\pm$ %RSD)
1	1847.72 $\pm$ 1.25	1,472.71 $\pm$ 4.92
2	1814.19 $\pm$ 7.05	1,475.48 $\pm$ 5.45
p-value (between analyst)		0.48
		0.94

การทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit Of Detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (Limit Of Quantitation, LOQ)

ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน มีค่าเท่ากับ 128.34 และ 124.95 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ปริมาณได้ของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน มีค่าเท่ากับ 250.14 และ 249.30 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ปริมาณได้ของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน มีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 90.66–95.60 และ 89.44–96.86 ตามลำดับ และค่าร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 2.21 และ 2.63 ตามลำดับ

การตรวจปริมาณการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

ผลการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในตัวอย่าง จำนวน 15 ตัวอย่าง พบการปนปลอมทั้งเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน จำนวน 2 ตัวอย่าง พบการปนปลอมเดกซาเมทาโซนอย่างเดียว จำนวน 7 ตัวอย่าง และไม่พบการปนปลอมสารดังกล่าว จำนวน 6 ตัวอย่าง โดยตรวจพบปริมาณการปนปลอมเดกซาเมทาโซนในช่วง 57.67–246.65 ส่วนในล้านส่วน และพบปริมาณการปนปลอมเพรดนิโซโลน 1967.78 ส่วนในล้านส่วน ส่วนอีก 1 ตัวอย่างตรวจพบเพรดนิโซโลน 22.04 ส่วนในล้านส่วน แต่มีปริมาณต่ำกว่าขีดจำกัดของการวัดปริมาณ

วิจารณ์

วิธีการตรวจเอกลักษณ์การปนปลอมของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณด้วยเทคนิครังคเลขฉิวบาง ซึ่งพัฒนาโดยสำนักยาและวัตถุเสพติด ไม่สามารถหาปริมาณการปนปลอมของตัวยาดังกล่าวได้ จึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณการปนปลอมของตัวยาดังกล่าวในยาแผนโบราณ ซึ่งดัดแปลงมาจากการหาปริมาณเดกซาเมทาโซนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูงในตำราฟาร์มาโคเปียของสหรัฐอเมริกา⁽¹⁾ โดยใช้สารละลายตัวพาแบบ isocratic ที่มีส่วนผสมของ acetonitrile และน้ำ โดยมีอัตราส่วน 1:2 และพบว่ามีการศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณของสเตียรอยด์ในยาแผนโบราณ^(10, 11) โดยใช้สารละลายตัวพาแบบ isocratic เช่นเดียวกับตำราฟาร์มาโคเปียของสหรัฐอเมริกา แต่มีส่วนผสมของ acetonitrile และน้ำ ในอัตราส่วน 30:70 โดยในวิธีการดังกล่าวสามารถแยกพีคสารละลายมาตรฐานผสมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนออกจากกันได้ แต่ไม่สามารถแยกสารรบกวนในสารละลายตัวอย่างออกจากพีคของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งจะมีผลต่อความถูกต้องของการวิเคราะห์หาปริมาณสารดังกล่าว (ภาพที่ 2) เนื่องจากยาแผนโบราณและยาที่มาจากสมุนไพรมีความหลากหลายขององค์ประกอบทางเคมี ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องใช้สารละลายตัวพาที่มีส่วนผสมของ acetonitrile และน้ำ แบบมีการเปลี่ยนองค์ประกอบของสารละลายตัวพาแบบ gradient program ตามตารางที่ 1 สามารถแยกพีคเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนได้อย่างมีประสิทธิภาพและไม่พบการรบกวนจากองค์ประกอบที่หลากหลายของสมุนไพรต่างๆ ในสูตรตำรับ

การเตรียมตัวอย่างโดยใช้เทคนิคการสกัดแยกด้วยตัวดูดซับของแข็งสามารถกำจัดสารรบกวนการตรวจวิเคราะห์บางส่วนออกไปได้ โดยตัวดูดซับของแข็งที่เลือกใช้เป็น hydrophobic polystyrene-divinylbenzene adsorbent resin มีคุณสมบัติเหมาะสมในการสกัดแยกด้วยยาสำคัญในตัวอย่างได้หลายรูปแบบ ทั้งจากยาเม็ด ยาครีม จากปัสสาวะ หรือเลือดได้^(21, 22) โดยในการสกัดแยกต้องเตรียมความพร้อมของตัวดูดซับที่บรรจุใน cartridge ด้วย methanol และน้ำก่อนเสมอ เพื่อให้ตัวดูดซับมีความเหมาะสมกับสารละลายที่นำมาสกัด และช่วยให้อนุภาคของสารที่สนใจสัมผัสกับตัวดูดซับให้ได้มากที่สุด โดยหลังจากผ่านสารละลายตัวอย่างลงในตัวดูดซับของแข็งและชะสารที่ไม่ต้องการออกด้วย 5%v/v methanol เนื่องจากเป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ต้องรอให้ตัวดูดซับแห้งก่อนแล้วจึงชะเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนออกด้วย methanol จำนวน 6 มิลลิลิตร ในส่วนของคอลัมน์ เลือกใช้คอลัมน์ชนิด reverse phase C8 พร้อมการ์ดคอลัมน์ reverse phase C8 เนื่องจากหาง่าย ราคาไม่แพง และมีสภาพไม่มีขั้ว เช่นเดียวกับ C18 แต่จำนวนคาร์บอนน้อยกว่า จึงทำให้พีคของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนถูกชะออกมาได้เร็วกว่าคอลัมน์ชนิด reverse phase C18

ในการศึกษานี้ได้เลือกตัวอย่างยาแผนโบราณสองรูปแบบ คือ ยาลูกกลอน และยาผง เป็นตัวแทนของยาแผนโบราณที่นำมาศึกษา เนื่องจากเป็นรูปแบบของยาแผนโบราณที่มีองค์ประกอบของสมุนไพรหลายชนิด อีกทั้งในขั้นตอนการทำให้เป็นเม็ดยาลูกกลอนต้องมีสารยึดเกาะ เช่น น้ำผึ้ง น้ำแป้ง สำหรับยาผงซึ่งส่วนใหญ่ คือยาหอม เป็นยาผงที่มีองค์ประกอบของสมุนไพรมากกว่า 40 ชนิด จึงครอบคลุมองค์ประกอบของสมุนไพรที่อาจมีผลต่อการตรวจวิเคราะห์ได้

ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นจึงมีความเป็นไปได้ในการที่จะนำไปประยุกต์ใช้ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณการปนปลอมของ เดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณรูปแบบอื่นๆ ได้ เช่น ยาแคปซูล ยาเม็ด ยาน้ำ และยาทวน

วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถหาปริมาณเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ปนปลอมในยาแผนโบราณได้ อ้างอิง หลักการประเมินความถูกต้องตาม ICH Guideline⁽¹⁷⁾ โดยไม่พบว่ามี การรบกวนจากสารอื่นซึ่งแสดงถึงความจำเพาะของ วิธี เมื่อทดสอบความเป็นเส้นตรงด้วย standard addition ในช่วง 250–12,500 ไมโครกรัมต่อลิตร ได้ค่าสัมประสิทธิ์ ความสัมพันธ์ ใกล้เคียง 1 แสดงว่าวิธีนี้มีความเป็นเส้นตรงตลอดช่วงที่ทำการศึกษา ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี วิเคราะห์หาปริมาณเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 500, 6,000 และ 12,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่าเฉลี่ยร้อยละการคืนกลับของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนอยู่ในช่วง 100.30–104.53 และ 100.02–102.18 ตามลำดับ และวิธีนี้มีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงทั้งนักวิเคราะห์ และรุ่นของคอลัมน์ได้

ทั้งนี้ เมื่อนำวิธีวิเคราะห์หาปริมาณที่พัฒนาขึ้นไปใช้ตรวจหาการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน ในตัวอย่างยาแผนโบราณที่ส่งตรวจกับสำนักงานและวัตถุเสพติด จำนวน 15 ตัวอย่าง ให้ผลสอดคล้องกับวิธีการตรวจ เอกลักษณะด้วยเทคนิคครุฑพิวบางที่ทางสำนักงานและวัตถุเสพติดใช้อยู่ โดยพบการปนปลอมทั้งเดกซาเมทาโซนและ เพรดนิโซโลน จำนวน 2 ตัวอย่าง ปนปลอมเดกซาเมทาโซนเพียงอย่างเดียว จำนวน 7 ตัวอย่าง และเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณ การปนปลอมสารดังกล่าวด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่าปริมาณการปนปลอมเดกซาเมทาโซนอยู่ในช่วง 57.67–246.65 ส่วน ในล้านส่วน และพบตัวอย่างยาแผนโบราณ 1 ตัวอย่าง ที่มีการปนปลอมเพรดนิโซโลนในปริมาณ 1967.78 ส่วนในล้าน ส่วน ส่วนอีกหนึ่งตัวอย่างพบการปนปลอมเพรดนิโซโลนแต่มีปริมาณต่ำกว่าขีดจำกัดของการวัดปริมาณ ดังนั้นวิธีการ ดังกล่าวที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจเอกลักษณ์และหาปริมาณการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนได้ในคราว เดียวกัน จึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการตรวจวิเคราะห์การปนปลอมสารดังกล่าวในยาแผนโบราณ และการ ศึกษาจะเป็นประโยชน์มากยิ่งขึ้นเมื่อศึกษาร่วมกับการสำรวจพฤติกรรมกรรมการบริโภคยาแผนโบราณของประชาชนเพื่อ สื่อสารความเสี่ยงและแจ้งเตือนภัยในการบริโภคยาแผนโบราณที่มีการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนต่อไป

สรุป

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่มีความ จำเพาะ ความเที่ยง และความแม่นยำสูง สามารถที่จะนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยา แผนโบราณในห้องปฏิบัติการได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการสื่อสารความเสี่ยงและแจ้งเตือนภัยจากการใช้ยาแผนโบราณ ที่มีการปนปลอมตัวยาแผนปัจจุบันดังกล่าวเพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มตรวจคุณภาพเภสัชภัณฑ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ สำนักงานและวัตถุเสพติด ที่ช่วยจัดเตรียม อุปกรณ์ และตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักงานและวัตถุเสพติดที่ให้การสนับสนุน ทางด้านงบประมาณและข้อเสนอแนะ ทำให้การศึกษาครั้งนี้ลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. The United States Pharmacopeia–The National Formulary. 32nd ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention; 2009. p. 2083–7, 3368–70.
2. Dexamethasone. [online]. [cited 2012 Oct 6]: [8 screens]. Available from: URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Dexamethasone>

3. Prednisolone. [online]. [cited 2012 Oct 6]: [4 screens]. Available from: URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Prednisolone>
4. คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา. บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2551. พิมพ์ครั้งที่ 2. นนทบุรี: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข; 2552. หน้า 40.
5. กองควบคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. รวมกฎหมายด้านยา ออกตามความในพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 และฉบับแก้ไขเพิ่มเติม. นนทบุรี: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข; 2546. หน้า 223.
6. Reynolds JEF, editor. Martindale: the extra pharmacopoeia. 30th ed. London: The Pharmaceutical Press; 1993. p. 712-22.
7. สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานประจำปี 2553. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ; 2554.
8. Siri DNBC, Lai CS, Haris MRHM. Screening of adulterants in unregistered herbal products in Malaysia. *Der Pharma Chemica* 2013; 5(2): 278-85.
9. คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. อย่าให้สเตรอยด์ลายนวล (อีกต่อไป). ยาวีพากซ์. [วารสารออนไลน์]. 2555; [สืบค้น 2 ธ.ค. 2556]; 5(15): [32 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <http://www.thaidrugwatch.org/download/series/series15.pdf>
10. Ku YR, Wen KC, Ho LK, Chang YS. Solid-phase extraction and high performance liquid chromatographic determination of steroids adulterated in traditional Chinese medicines. *J Food Drug Anal* 1999; 7(2): 123-30.
11. Ku YR, Liu YC, Lin JH. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic analysis of prednisone adulterated in a foreign herbal medicine. *J Food Drug Anal* 2001; 9(3): 150-2.
12. Klinsunthorn N, Petsom A, Nhujak T. Determination of steroids adulterated in liquid herbal medicines using QuEChERS sample preparation and high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 2011; 55(5): 1175-8.
13. Gonzalo-Lumbreras R, Muñiz-Valencia R, Santos-Montes A, Izquierdo-Hornillos R. Liquid chromatographic method development for steroids determination (corticoids and anabolics): application to animal feed samples. *J Chromatogr A* 2007; 1156(1-2): 321-30.
14. Thevis M, Schänzer W, Geyer H, Thieme D, Grosse J, Rautenberg C, et al. Traditional Chinese medicine and sports drug testing: identification of natural steroid administration in doping control urine samples resulting from musk (pod) extracts. *Br J Sports Med* 2013; 47(2): 109-14.
15. ศูนย์ข้อมูลพิษวิทยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. คลอโรฟอร์ม. [ออนไลน์]. 2543; [สืบค้น 2 ธ.ค. 2556]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: http://webdb.dmso.moph.go.th/ifc_toxic/a_tx_1_001c.asp?info_id=78
16. Kiehm K, Dressman JB. Evaluation of drug adsorption to membrane filters under biowaiver test conditions. *Dissolution Technology* 2008 [cited 2011 Dec 11]; [5 screens]. Available from: URL: http://www.dissolutiontech.com/DTresour/200811Articles/DT200811_A02.pdf
17. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedure: text and methodology Q2(R1). Geneva, Switzerland: ICH Steering Committee; 2005.
18. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
19. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. 2002; [cited 2010 Feb 12]; [38 screens]. Available at: URL: http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf

20. ชุศรี วงศ์ตันะ. เทคนิคการใช้สถิติเพื่อการวิจัย. พิมพ์ครั้งที่ 8. กรุงเทพฯ: เทพเนรมิตการพิมพ์; 2544.
 21. New chromobond HR-X from macherey-nagel. 2008. [cited 2010 Jan 9]: [1 screen]. Available from: URL: http://www.labmate-online.com/news/chromatography/1/macherey-nagel_gmbh/new_chromabond_hr-x_from_macherey-nagel/1303/
 22. Thurman EM, Mills MS. Solid-phase extraction: principles and practice. New York: John Wiley & Sons; 1998. p. 45-81.
-

Method Development for Determination of Dexamethasone and Prednisolone in Traditional Drug by High-Performance Liquid Chromatography

**Jiranuch Jamtaweekul Sumate Thiangthum Waliluk Matapatara
and Chitra Chaiyawat**

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

ABSTRACT The quantitative determination of the adulterated dexamethasone and prednisolone in traditional drug was developed by using high performance liquid chromatography (HPLC) with reversed phase C8 column (Hypersil BDS) and a mixture of acetonitrile and purified water as a mobile phase. The sample solution was cleaned up by solid phase extraction (SPE). The method validation data showed good linearity at the concentration range of 250–12,500 µg/L with the correlation coefficient of 0.9987 and 0.9988 for dexamethasone and prednisolone, respectively. Accuracy and precision were performed by adding 500, 6,000 and 12,000 µg/L of each of dexamethasone and prednisolone to sample matrix. The percentages of recovery were 100.30–104.53 and 100.02–102.18 for dexamethasone and prednisolone, respectively. The relative standard deviations of dexamethasone and prednisolone were 0.04–2.01 and 0.15–2.47, respectively. The limit of quantitation of dexamethasone and prednisolone are 250.14 and 249.30 µg/L, respectively. Therefore, the developed HPLC method is suitable for surveillance of the dexamethasone and prednisolone adulterants in traditional herbal medicines.

Key words: dexamethasone, prednisolone, traditional drug, solid phase extraction, high performance liquid chromatography

การพัฒนาแผ่นแปะผิวหนังจากสมุนไพรบัวบก

พรศรี ประเสริฐวารี จิราณัฐ มิ่งเมือง เสาวณีย์ ทองดี ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง และณัฏฐรา จันทร์สุวานิชย์
สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง นครบุรี 11000

บทคัดย่อ บัวบก เป็นสมุนไพรที่มีการนำมาใช้เป็นยา เครื่องสำอาง อาหารเสริม และผลิตภัณฑ์สุขภาพ สารสกัดบัวบกมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ ฤทธิ์สมานแผล ลดการเกิดคีลอยด์ และฤทธิ์ต้านจุลชีพ การนำส่งยาสู่ผิวหนังเป็นการพัฒนาเภสัชภัณฑ์ในรูปแบบแผ่นแปะที่ออกฤทธิ์ได้นาน เพื่อลดความถี่ในการใช้ สะดวกในการบริหารทางเภสัชกรรม โดยแผ่นแปะผิวหนังที่เตรียมเพื่อศึกษาในครั้งนี้ประกอบด้วยชั้น backing และชั้น adhesive ที่มีการเติมสารสกัดสมุนไพร ศึกษาความแตกต่างของพอลิเมอร์ เช่น ethyl cellulose (EC), eudragit E 100, eudragit NE 30 D และ hydroxypropyl methyl cellulose ในความเข้มข้นต่างๆ กัน (1.0%, 2.0% และ 3.0% w/v) สำหรับชั้น backing และชั้น adhesive รวมทั้ง plasticizer 2 ชนิด คือ triacetin และ dibutyl phthalate (DBP) จากการศึกษาพบว่า EC 2.0% และ triacetin 30% เป็นพอลิเมอร์ที่เหมาะสมในการเตรียมแผ่นแปะในชั้น backing ซึ่งแผ่นแปะผิวหนังที่ได้มีความใส ยึดหยุ่น และแข็งแรง โดยเครื่องทดสอบแรงดึง (Tensile Tester) และมีความพรุนน้อย เมื่อส่องด้วยกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) แผ่นแปะชั้น adhesive พอลิเมอร์ที่เหมาะสมคือ eudragit NE 30 D 6.0% และ DBP 0.5% เมื่อทดสอบการซึมผ่านของแผ่นแปะสมุนไพรด้วย Franz's Diffusion Cell การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญที่ซึมผ่านแผ่นแปะสมุนไพรด้วยวิธี HPLC พบว่ามีปริมาณ madecassoside และ asiaticoside ซึมผ่าน คิดเป็น 41.2% และ 94.7% ตามลำดับ ผลจากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการนำสมุนไพรมาพัฒนาในรูปแบบนำส่งยาผ่านผิวหนังใหม่ ๆ สำหรับในผู้ป่วยแผลกดทับ

Accepted for publication, 11 March 2015

บทนำ

ปัจจุบันรูปแบบยาที่ได้รับความนิยมมากที่สุดคือ รูปแบบยารับประทาน ซึ่งง่ายต่อการบริหารยา สะดวกปลอดภัย และไม่ก่อให้เกิดความเจ็บปวด แต่พบว่ามีข้อเสียหลายประการ เช่น ยาอาจถูกทำลายได้ในทางเดินอาหาร การเกิดเมตาบอลิซึมของยาที่ตับ (Hepatic first pass metabolism) ยาอาจถูกทำลายในกระเพาะอาหาร และความไม่สม่ำเสมอของยาในระดับเลือด ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ใช้ทางผิวหนังมีหลายรูปแบบ เช่น ครีม ขี้ผึ้ง โลชั่น สารละลาย และแผ่นแปะ (Transdermal patch) โดยผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดมีวัตถุประสงค์ในการดูดซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังที่แตกต่างกัน ถ้าตัวยามีการซึมผ่านไม่มากนัก อาจให้ผลการรักษาแบบเฉพาะที่ (Local effect) แต่ถ้าตัวยามีความสามารถซึมผ่านชั้นผิวหนังได้ลึกจนถึงเนื้อเยื่อชั้นในเข้าสู่กระแสเลือดได้ และสามารถออกฤทธิ์แบบทั่วร่างกาย (systemic effect)⁽¹⁾ ดังนั้นจึงเป็นที่มาของการพัฒนาแผ่นแปะผิวหนังจากสมุนไพรบัวบก เพื่อให้ตัวยาลดปล่อยเข้าสู่ร่างกายได้สม่ำเสมอ เพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ลดจำนวนครั้งในการใช้ยา หลีกเลี่ยงความเจ็บปวดจากการใช้ยาฉีด เพิ่มความสะดวกในการบริหารยา และสามารถแก้ไขข้อบกพร่องของรูปแบบยารับประทานได้

บัวบก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Centella asiatica* (L.) Urban วงศ์ Apiaceae (Umbelliferae) สมุนไพรชนิดนี้มีการนำมาใช้เป็นยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพ มีรายงานว่าสารสกัดของบัวบกมีสารกลุ่ม triterpene เช่น asiatic acid และ madecassic acid และอนุพันธ์ของ triterpene ester เช่น asiaticoside และ madecassoside⁽²⁾ ซึ่งแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายด้านคือ ฤทธิ์สมานแผล^(3, 4) ลดการเกิดคีลอยด์⁽⁵⁾ ลดการอักเสบ ลดการเกิดแผลในกระเพาะอาหารเนื่องจากภาวะความเครียด⁽⁶⁾ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ⁽⁷⁾ และฤทธิ์ในการห้ามเลือด เป็นต้น

โครงสร้างของผิวหนัง

ผิวหนังคนจัดเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่มากที่สุด คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 12-16 ของน้ำหนักตัว ทำหน้าที่ควบคุมความร้อน การสูญเสียน้ำออกจากร่างกาย และป้องกันไม่ให้สารแปลกปลอมจากภายนอกเข้าสู่ร่างกาย ผิวหนังเป็นเยื่อเลือกผ่านที่สามารถให้สารที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำผ่านได้ แบ่งตามโครงสร้างได้เป็น 3 ชั้น คือ หนังกำพร้า (Epidermal), หนังแท้ (Dermis) และชั้นไขมันใต้ผิวหนัง (Subcutaneous fat layer) หนังกำพร้าเป็นชั้นของผิวหนังที่สำคัญที่สุดในการนำส่งยาทางผิวหนัง ประกอบด้วยชั้น stratum corneum ซึ่งเป็นอุปสรรคที่สำคัญต่อการนำส่งยาสู่ผิวหนัง ถัดเข้ามาคือ ชั้นหนังแท้ ประกอบด้วย หลอดเลือด ท่อน้ำเหลือง ระบบประสาท และต่อมเหงื่อ มีหน้าที่ลำเลียงออกซิเจนและสารอาหารให้กับเนื้อเยื่อ โดยระบบไหลเวียนนี้มีความสำคัญในกระบวนการซ่อมแซมบาดแผล⁽⁸⁾ ชั้นในสุดคือ ชั้นไขมันใต้ผิวหนัง เป็นชั้นที่มีความสำคัญในการเป็นฉนวนป้องกันความร้อนและควบคุมอุณหภูมิร่างกายให้ปกติ ตลอดจนป้องกันอันตรายจากภายนอก⁽⁹⁾

ระบบนำส่งยาทางผิวหนังแบ่งได้ 5 ชนิด⁽¹⁾

1. ระบบควบคุมการแพร่โดยแผ่นกาว (Pressure adhesive matrix devices)
2. ระบบควบคุมการปลดปล่อยด้วยเมมเบรน (Membrane moderated devices)
3. ระบบควบคุมด้วยพอลิเมอร์แผ่นกาวเมมเบรน (Adhesive membrane system)
4. ระบบแหล่งเก็บตัวยานาโนจิ๋ว (Microreservoir system)
5. ระบบควบคุมด้วยพอลิเมอร์เมทริกซ์ชนิดไม่ยึดติด (Non - adhesive polymeric matrix devices)

การเตรียมแผ่นแปะสมุนไพรบัวบกเพื่อควบคุมอัตราการปลดปล่อยตัวยาในอัตราคงที่ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของยา⁽¹⁾ ประกอบด้วย Backing layer เป็นชั้นที่ป้องกันตัวยามีการซึมผ่าน และป้องกันสิ่งแวดล้อมจากภายนอกเข้าสู่ผลิตภัณฑ์ และชั้น Adhesive layer เป็นชั้นที่เติมสารสกัดสมุนไพรบัวบก โดยสารสำคัญกระจายอยู่บนพอลิเมอร์ชั้นนี้ และมีคุณสมบัติในการยึดเกาะผิวหนัง ซึ่งผลิตภัณฑ์แผ่นแปะผิวหนังจากสมุนไพรบัวบกที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลชีพ รวมทั้งซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เสียไป สามารถนำไปใช้รักษาในผู้ป่วยที่มีบาดแผลได้ และเพื่อเป็นข้อมูลในการนำสารสกัดสมุนไพรมาพัฒนาในรูปแบบเภสัชภัณฑ์ใหม่ ๆ ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สารเคมี

Hydroxypropyl Methyl Cellulose (HPMC), Ethyl Cellulose (EC), Eudragit E100, Triacetin, Dibutyl Phthalate (DBP), Polyethylene Glycol 400 (PEG 400), Polyvinyl Pyrrolidone K 30 (PVP K30), Sodium Hydroxide Pellets GR ISO, Monobasic Potassium Phosphate (KH_2PO_4)

เครื่องมือและอุปกรณ์

Scanning Electron Microscope (SEM) (Hitachi รุ่น S510), Cutting Machine (DUMBBELL รุ่น SDAP 100N), Tensile Tester (Tinius Olsen รุ่น H25KS), Franz Diffusion Cell (Logan Model SFDC-6)

1. การเตรียมสารสกัดสมุนไพรบัวบก

นำตัวอย่างสมุนไพรบัวบกจากจังหวัดนนทบุรีมาตรวจสอบสมุนไพรดังกล่าวว่าเป็น *Centella asiatica* (L.) Urban จริง โดยนำมาศึกษาเปรียบเทียบกับตัวอย่างธรรมชาติจากจังหวัดพัทลุง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่นักพฤกษศาสตร์ของสถาบันวิจัยสมุนไพร เก็บมาจากธรรมชาติ และนำมาตรวจระบุชนิดตามหลักพฤกษอนุกรมวิธานพืช พบว่าเป็นพืชในวงศ์ Apiaceae ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Centella asiatica* (L.) Urban⁽¹⁰⁾ จัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หมายเลขตัวอย่างคือ DMSC 5185 และนำมาตรวจคุณภาพทางเคมีโดยวิธีที่ระบุไว้ในตำรายาสมุนไพรไทย (THP, 2004) นำสมุนไพรบัวบกมาล้างและทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง จากนั้นอบที่อุณหภูมิ 45 °C 24 ชั่วโมง จนแห้ง นำสมุนไพรที่อบแห้งมาทำการบดสกัดด้วย 95% ethanol ด้วย Soxhlet apparatus นำสารละลายที่ได้จากการสกัดมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator สกัดแยกส่วนด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate ทำให้สารสกัดที่ได้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วย HPLC

2. การเตรียมชั้น Backing ของแผ่นแปะ

เตรียมสารละลายชั้น backing โดยเปรียบเทียบพอลิเมอร์ 2 ชนิด คือ Ethyl Cellulose (EC) และ Eudragit E 100 และเปรียบเทียบ plasticizer 2 ชนิด คือ Triacetin เปรียบเทียบกับ Dibutyl Phthalate (DBP) อบที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยเตรียม 2% สารละลายพอลิเมอร์ และ 30%, 40% และ 50% plasticizer โดยคำนวณจากปริมาณของพอลิเมอร์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การพัฒนาสูตรตำรับในชั้น backing

Rx.	1	2	3	4	5	6
EC	2 g	2 g	2 g	-	-	-
Eudragit E 100	-	-	-	2 g	2 g	2 g
Triacetin	0.6 g	0.8 g	1.0 g	-	-	-
DBP	-	-	-	0.6 g	0.8 g	1.0 g
Ethanol qs to	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

3. การเตรียมชั้น **Adhesive** ที่เติมสารสกัดสมุนไพร

เตรียมชั้น adhesive ด้วย Eudragit NE 30 D เปรียบเทียบกับ Hydroxypropyl Methyl Cellulose (HPMC) ปริมาณ 4%, 5% และ 6% ลงใน DI water ตามลำดับ และ 0.5% DBP เติมสารสกัดสมุนไพร 1% และ 2% ตามลำดับ พร้อมทั้งคนตลอดเวลา จากนั้นเทลง petri dish และนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4. การประเมินคุณสมบัติของแผ่นฟิล์มในชั้น **backing**

4.1 การศึกษาทางกายภาพ ลักษณะความใส ความเรียบ

4.2 การวัดความพรุนของแผ่นฟิล์ม โดยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) (Hitachi รุ่น S510)

4.3 การทดสอบเชิงกลของแผ่นฟิล์มโดยเครื่อง Tensile Tester (Tinius Olsen รุ่น H25KS)

5. การทดสอบการปลดปล่อยสารสำคัญจากแผ่นแปะสมุนไพร โดย **Franz's Diffusion Cell (Logan Model SFDC-6)**

1. เตรียม Phosphate Buffer pH 5.8

2. เตรียมแผ่น nylon membrane filters

3. อุ่น medium ให้มีอุณหภูมิ 37 °C แล้วใส่ลงในตัว cell โดยระวังไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น ภายในตัว cell

4. เตรียมแผ่นแปะสมุนไพรที่ใช้ทดสอบ โดยตัดให้มีขนาดเท่าเส้นผ่าศูนย์กลางของ cell แล้วนำไปวางบนตัว cell ที่มีแผ่น membrane รองอยู่

4.1 เริ่มจับเวลาตั้งแต่แผ่นแปะสมุนไพรสัมผัสกับ medium

4.2 สุ่มตัวอย่างปริมาตร 500 µl ตามเวลาที่กำหนด (15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, 390 และ 420 นาที ตามลำดับ) โดยเก็บตัวอย่างสารละลายที่ซึมผ่านจากแผ่นแปะสมุนไพร จากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญจากสารละลายที่ซึมผ่านจากแผ่นแปะสมุนไพรด้วย HPLC

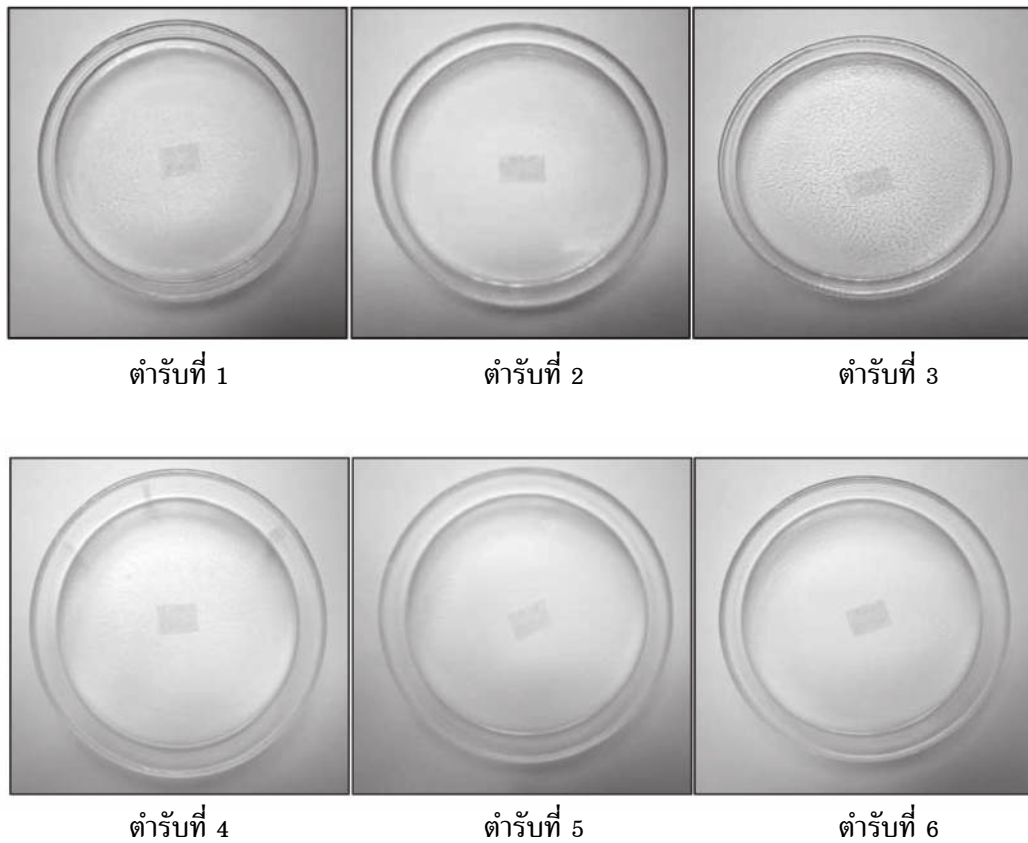
ผล

1. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

การควบคุมคุณภาพทางเคมี โดยการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นและปริมาณสารสำคัญด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่าสารสกัดบับกมีปริมาณความชื้น 6.3% (w/w) และมีปริมาณสาร madecassoside และ asiaticoside เป็น 0.9% (w/w) และ 0.47% (w/w) ตามลำดับ

2. การเตรียมชั้น **Backing** ของแผ่นแปะ

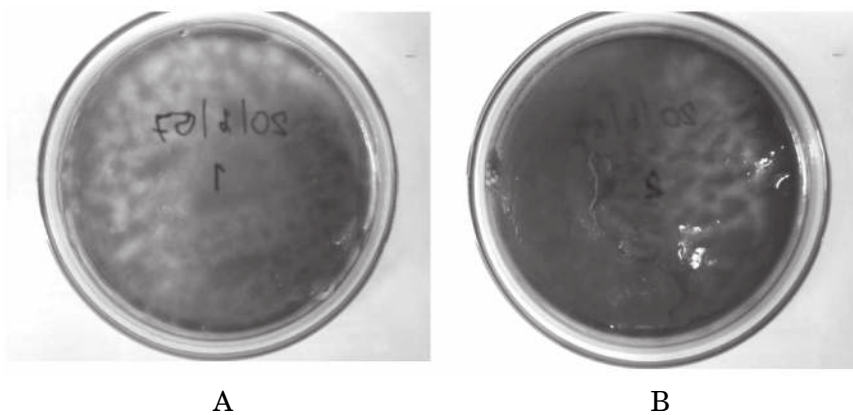
พบว่า Ethyl Cellulose (EC) ตำรับที่ 1-3 และ Eudragit E 100 ตำรับที่ 4-6 ให้แผ่นฟิล์มมีลักษณะใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 1) ซึ่งเหมาะในการนำไปพัฒนาเป็นแผ่นแปะสมุนไพรได้ แต่ในการศึกษาดำรับที่ประกอบด้วย Eudragit E 100 ไม่สามารถลอกออกจาก petri dish ได้



ภาพที่ 1 แสดงแผ่นฟิล์มที่เตรียมจาก Ethyl Cellulose ตำรับที่ 1-3 และ Eudragit E 100 ตำรับที่ 4-6 ตามลำดับ

3. การเตรียมชั้น **Adhesive** ที่เติมสารสกัดสมุนไพรบัวบก

พบว่าพอลิเมอร์ทั้ง 2 ชนิด คือ Eudragit NE 30 D และ HPMC ให้แผ่นแปะที่มีลักษณะภายนอกเหมือนกันคือ ความใส แต่ HPMC ไม่มีคุณสมบัติในการยึดเกาะผิวหนังเหมือน Eudragit NE 30 D จึงนำ Eudragit NE 30 D ที่เติมสารสกัดสมุนไพรบัวบก 1% และ 2% (ภาพที่ 2) มาทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

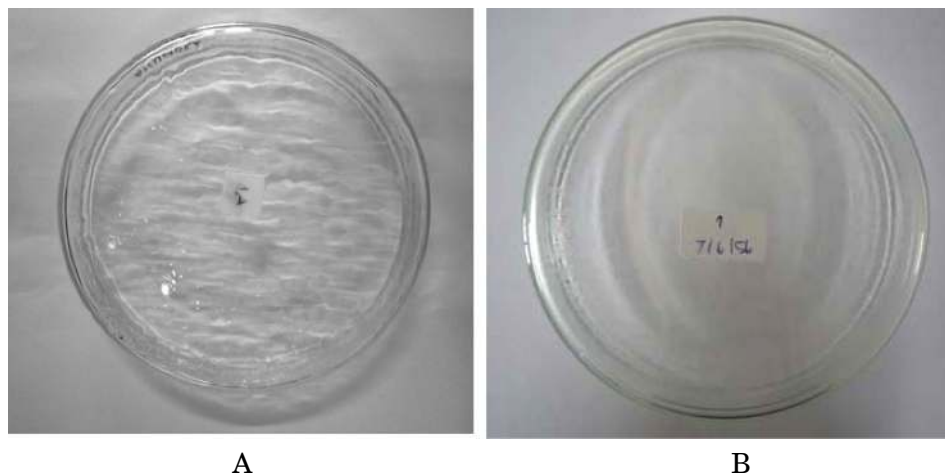


ภาพที่ 2 แผ่นฟิล์ม เติมสารสกัดสมุนไพรบัวบก (A) 1% และ (B) 2% ตามลำดับ

4. การประเมินคุณสมบัติของแผ่นฟิล์มในชั้น backing

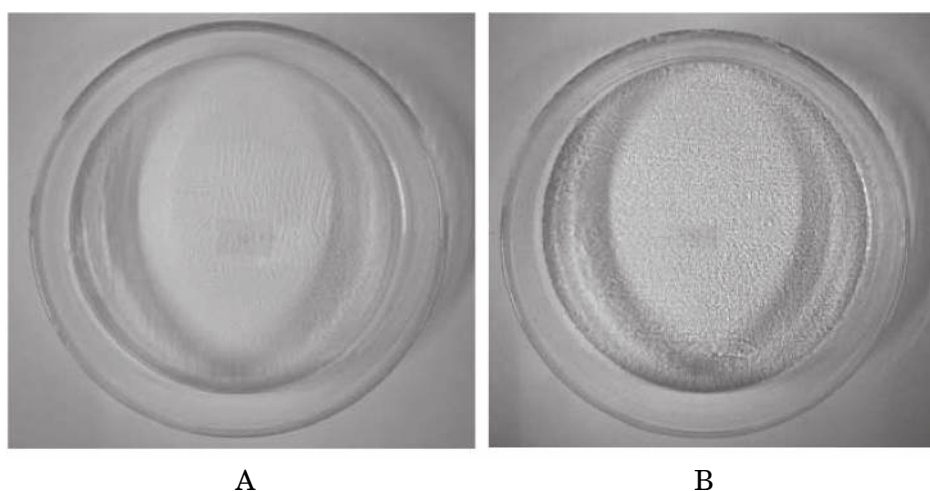
4.1 การศึกษาทางกายภาพ ลักษณะความใส ความเรียบ

ผลจากการเปรียบเทียบชนิดของพอลิเมอร์ พบว่า Ethyl Cellulose เมื่อเปรียบเทียบกับ Eudragit E 100 แสดงลักษณะทางกายภาพที่เหมือนกันคือ ฟิล์มมีความใสใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แสดงแผ่นฟิล์มที่เตรียมจาก (A) Ethyl Cellulose และ (B) Eudragit E 100 ตามลำดับ

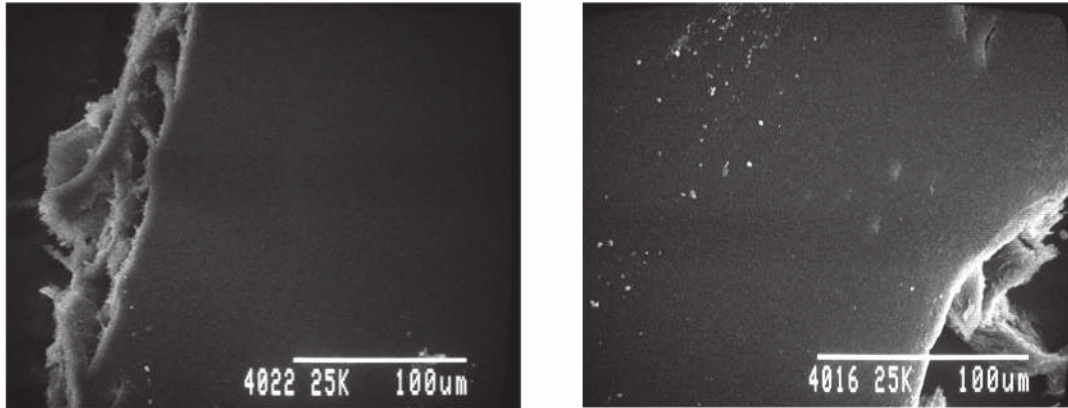
ผลจากการเปรียบเทียบชนิดของ plasticizer พบว่า Triacetin และ DBP ได้แผ่นฟิล์มที่มีความเรียบต่างกันเล็กน้อย โดย Triacetin ได้แผ่นฟิล์มที่มีความเรียบกว่า DBP (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แสดงแผ่นฟิล์มชั้น backing ที่เตรียมจาก plasticizer 2 ชนิด คือ (A) Triacetin และ (B) Dibutyl Phthalate ตามลำดับ

4.2 การวัดความพรุนของแผ่นฟิล์มโดยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM)

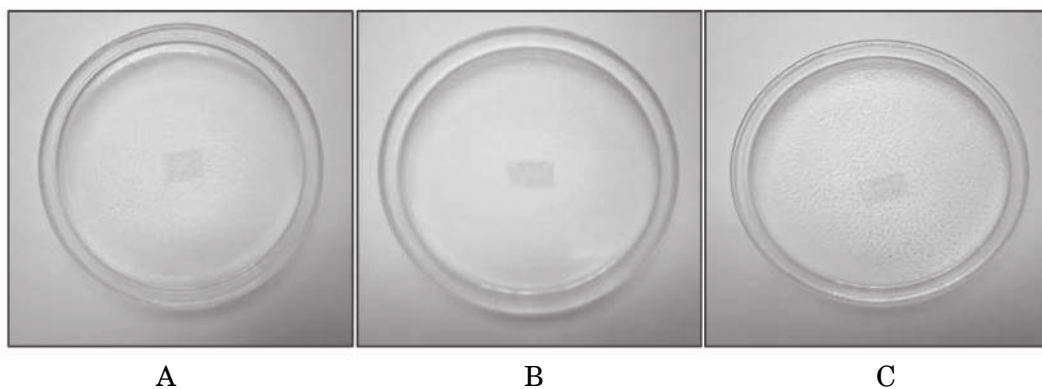
ในการศึกษา plasticizer เพื่อเตรียมชั้น backing พบว่าตำรับที่ใช้ Triacetin แสดงลักษณะความพรุนของแผ่นฟิล์มน้อยกว่า คือ ฟิล์มมีลักษณะเรียบมากกว่าตำรับที่ใช้ DBP (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 แสดงลักษณะความพรุนของแผ่นฟิล์ม เปรียบเทียบ plasticizer 2 ชนิด คือ (A) Triacetin และ (B) Dibutyl Phthalate ตามลำดับ

4.3 การทดสอบเชิงกลของแผ่นฟิล์มโดยเครื่อง Tensile Tester

พบว่าพอลิเมอร์ ที่เหมาะสมสำหรับแผ่นฟิล์มชั้น backing คือ EC และ plasticizer ที่เหมาะสม คือ Triacetin โดยแผ่นฟิล์มที่ได้มีความใส เรียบ ทุกตำรับ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แสดงแผ่นฟิล์มชั้น backing ที่มีความเข้มข้นของ Triacetin เท่ากับ (A) 30%, (B) 40% และ (C) 50% ตามลำดับ

จากการทดสอบเชิงกล พบว่าปริมาณ plasticizer ที่เหมาะสมในตำรับคือ 30% เมื่อเทียบกับ 40% และ 50% ตามลำดับ ตำรับที่มี 30% Triacetin ให้แผ่นฟิล์มที่มีความแข็งแรงมากที่สุด (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงค่าความแข็งแรงของแผ่นฟิล์มที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเครื่อง Tensile Tester

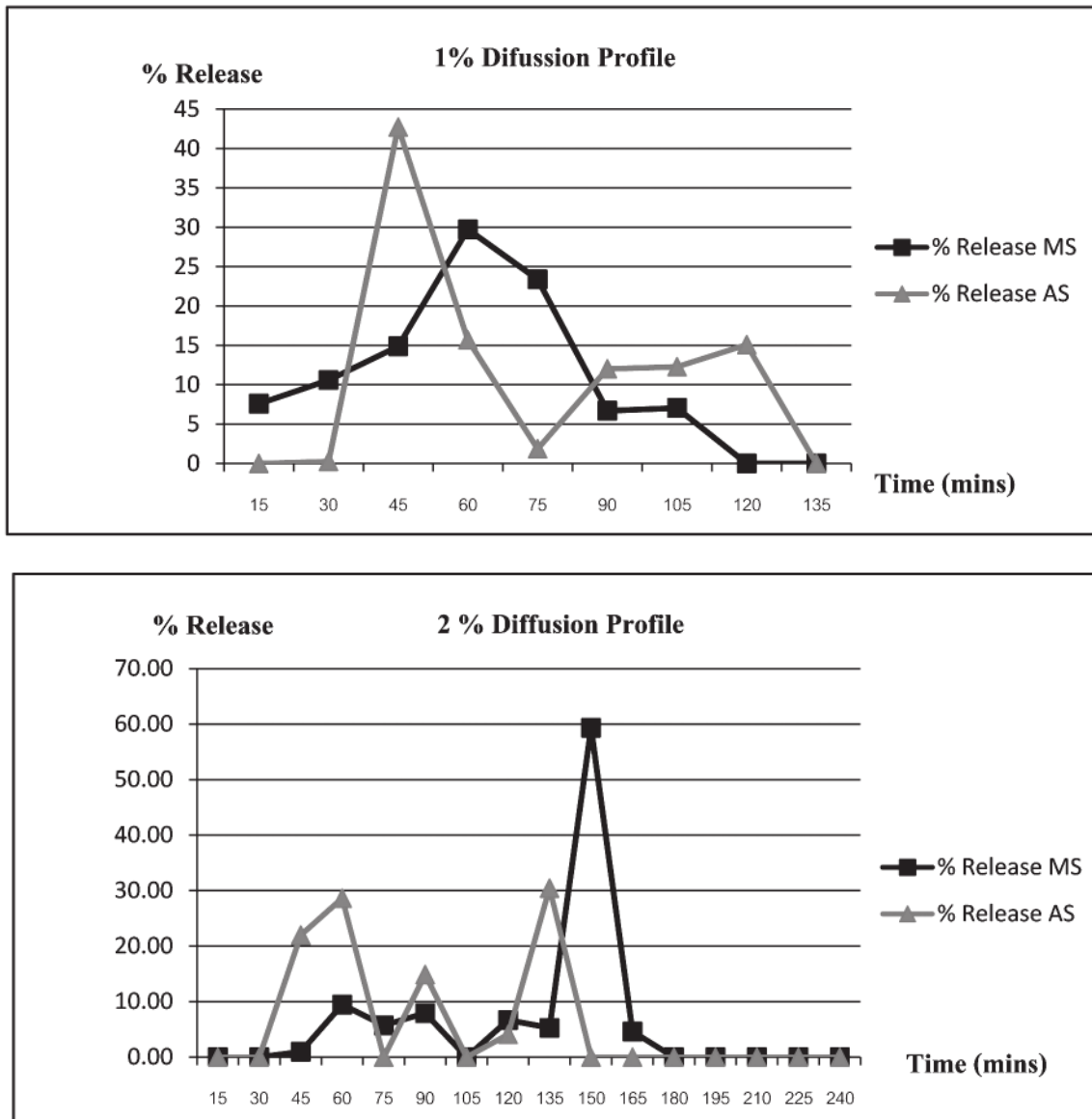
	พอลิเมอร์	Plasticizer	ความหนา (มิลลิเมตร)	ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	Braek (N)	ค่าเฉลี่ย (N)
1.	EC	30% Triacetin	0.1140		38.16	
			0.1370	0.1340	38.82	38.92
			0.1510		39.40	
2.	EC	40% Triacetin	0.1420		31.72	
			0.1490	0.1487	33.12	32.23
			0.1550		31.84	
3.	EC	50% Triacetin	0.1380		30.40	
			0.1420	0.1507	29.12	28.59
			0.1720		26.24	
4.	EC	30% DBP	0.1640		13.36	
			0.1530	0.1583	16.98	15.02
			0.1580		14.72	
5.	EC	40% DBP	0.1380		11.88	
			0.1240	0.1347	10.85	10.94
			0.1420		10.10	
*6.	EC	50% DBP	-		-	
			-		-	
			-	-	-	
			-		-	

* เนื่องจากฟิล์มที่ได้มีลักษณะนิ่มมาก ไม่สามารถนำมาทดสอบได้

5. การทดสอบการปลดปล่อยสารสำคัญจากแผ่นแปะสมุนไพร โดย Franz's Diffusion Cell

สำหรับแผ่นฟิล์มชั้น adhesive พบว่า 6% Eudragit NE 30 D และ 0.5% DBP ให้แผ่นฟิล์มที่มีลักษณะดีที่สุดคือ มีความใส และยืดหยุ่นดี

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญจากแผ่นแปะสมุนไพรที่เติมสารสกัดสมุนไพรบัวบก 1% และ 2% โดยเก็บตัวอย่างตามเวลาที่กำหนด พบว่าการปลดปล่อยสารสำคัญ madecassoside และ asiaticoside หมดที่เวลา 135 นาที และ 180 นาที ตามลำดับ มีปริมาณ madecassoside และ asiaticoside ที่ถูกปลดปล่อยออกมา คิดเป็น 41.2% (w/w) และ 94.7% (w/w) (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 แสดงปริมาณการซึมผ่านของ madecassoside (MS) และ asiaticoside (AS) ในแผ่นแปะสมุนไพรบัวบก 1% และ 2% ณ เวลาที่กำหนด

วิจารณ์

ในการศึกษาพบว่าพอลิเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมชั้น backing สามารถเตรียมเป็นแผ่นฟิล์มได้มีลักษณะใกล้เคียงกัน โดยความพรุนของแผ่นฟิล์มจะบ่งชี้ถึงความเรียบของแผ่นฟิล์มชั้น backing ได้ดี โดยพบว่าสามารถทำให้เกิดแผ่นฟิล์มใสได้ไม่แตกต่างกัน ทั้ง EC และ Eudragit E 100 แต่ Eudragit E 100 ไม่สามารถลอกแผ่นฟิล์มออกจากภาชนะ ทำให้ไม่สามารถนำแผ่นฟิล์มไปศึกษาต่อได้ โดยพอลิเมอร์มีความเฉพาะเจาะจงกับชนิดของ plasticizer ที่ใช้ร่วมกัน พบว่าพอลิเมอร์ที่เตรียมโดย EC และ plasticizer ที่ใช้ DBP ให้แผ่นฟิล์มที่มีความเปราะบางมากและไม่มีความยืดหยุ่น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่มีผู้วิจัยมาแล้ว⁽¹¹⁾ เมื่อนำมาทดสอบเชิงกลของแผ่นฟิล์ม พบว่า EC ให้ความแข็งแรงของฟิล์มที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปริมาณของ Triacetin ในแต่ละตำรับ ส่วนพอลิเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมชั้น adhesive คือ Eudragit NE 30 D โดยปริมาณ DBP มีผลต่อแผ่นแปะ โดยปริมาณ DBP ที่เหมาะสมจะช่วยให้แผ่นแปะมีความยืดหยุ่นพอเหมาะ หากปริมาณ DBP ไม่เหมาะสมจะทำให้แผ่นแปะมี

ความมันมากเกินไป ไม่ยืดหยุ่น⁽¹²⁾ ซึ่งแผ่นแปะที่ได้มีคุณสมบัติที่ดีกว่า HPMC เพราะแผ่นแปะที่ได้มีคุณสมบัติในการยึดเกาะผิวหนังได้ดีกว่า มีความยืดหยุ่นดีกว่า โดยสามารถนำมาตัดสินใจในการเลือกพอลิเมอร์ที่เหมาะสมในการพัฒนาตำรับแผ่นแปะสมุนไพร

เมื่อทดสอบการปลดปล่อยสารสำคัญจากแผ่นแปะสมุนไพรบัวบก โดย Franz's Diffusion Cell พบว่า แผ่นแปะสมุนไพรบัวบก 1% และ 2% มีการปลดปล่อยสารสำคัญ madecassoside และ asiaticoside หมดที่เวลา 135 นาที และ 180 นาที ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองสูตรตำรับมีแนวโน้มที่ปลดปล่อยสารสำคัญ madecassoside และ asiaticoside ในทิศทางเดียวกัน ซึ่งหากมีการเติมสารสกัดสมุนไพรเพิ่มขึ้น ผลลัพธ์ที่แผ่นแปะสมุนไพรจะมีการปลดปล่อยที่นานขึ้น เพื่อยืดระยะเวลาในการบริหารยาและลดความถี่ในการใช้ยา จึงเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในผู้ป่วยที่มีบาดแผล ด้วยสรรพคุณของบัวบกที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ และฤทธิ์สมานแผล

สรุป

EC 2% และ Triacetin 30% เป็นพอลิเมอร์ที่เหมาะสมในการเตรียมแผ่นแปะชั้น backing ที่ดีที่สุด ซึ่งแผ่นแปะที่ได้มีความใส ยืดหยุ่น และแข็งแรง ส่วนแผ่นแปะชั้น adhesive พอลิเมอร์ที่เหมาะสมคือ Eudragit NE 30 D 6% และ DBP 0.5% ให้ลักษณะแผ่นแปะสมุนไพรที่มีลักษณะที่ดี สามารถยึดติดบนผิวหนัง มีการปลดปล่อยสารสำคัญ madecassoside และ asiaticoside คิดเป็น 41.2% และ 94.7% ตามลำดับ เมื่อทดสอบการซึมผ่านด้วย Franz's Diffusion Cell และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วย HPLC แผ่นแปะสมุนไพรบัวบก 1% และ 2% มีการปลดปล่อยสารสำคัญ madecassoside และ asiaticoside หมดที่เวลา 135 นาที และ 180 นาที ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณสุภาวรรณ จงธรรมวัฒน์ คุณอิสราภา เบี้ยวทุ่งน้อย สำนักวิจัยและเครื่องมือแพทยกรรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์การทดสอบเชิงกลของแผ่นฟิล์ม และคุณพญกษวรรณ เจตนจันทร์ คุณปฐมพงษ์ ลิทธิสมาน สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์การวัดความพรุนของแผ่นฟิล์ม

เอกสารอ้างอิง

1. ปราณีต โอปะณะโสภิต. ระบบนำส่งยา. พิมพ์ครั้งที่ 3. นครปฐม: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร; 2557.
2. จิราหนู มิ่งเมือง, จารีย์ บันสิทธิ์, ประไพ วงศ์สินคงม่น, อัครชัย ช่วยพรม, อดิรัตน์ บุญรอด. ข้อกำหนดคุณภาพทางเคมีของสารสกัดด้วยน้ำของบัวบก. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. 2551; 6(2) ฉบับเสริม: 73.
3. Hong SS, Kim JH, Li H, Shim CK. Advanced formulation and pharmacological activity of hydrogel of the titrated extract of *C. asiatica*. Arch Pharm Res 2005; 28(4): 502-8.
4. Shetty BS, Udupa SL, Udupa AL, Somayaji SN. Effect of *Centella asiatica* L (Umbelliferae) on normal and dexamethasone-suppressed wound healing in Wistar Albino rats. Int J Low Extrem. Wounds 2006; 5(3): 137-43.
5. Health Concerns. Wound healing: an online reference. [online]. [8 screens]. Available from: URL: <http://www.lef.org/protocols/prtel-111.shtml>
6. Chatterjee TK, Chakraborty A, Pathak M, Sengupta GC. Effects of plant extract *Centella asiatica* (Linn.) on cold restraint stress ulcer in rats. Indian J Exp Biol 1992; 30(10): 889-91.

7. Tschesche R, Wulff G. Über die antimikrobielle Wirksamkeit von Saponinen. *Z Naturforschg* 1965; 20b: 543-546.
 8. Williams AC. Transdermal and topical drug delivery. London: The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain; 2003. p. 1-13.
 9. Flynn GL. Cutaneous and transdermal delivery: processes and systems of delivery. In: Banker GS, Rhodes CT, editors. *Modern Pharmaceutics. Drugs and the pharmaceutical sciences* vol. 72. New York: Marcel Dekker; 1995. p. 239-298.
 10. Hedge IC, Lamond JM. Umbelliferae (apiaceae). In: *Flora of Thailand* vol. 5 part 4. Bangkok: Chutima Press; 1992. p. 447-448.
 11. Suwannachote K, Rittidej GC. Development of transdermal patch comprising *Centella asiatica* extract. *Adv Mater Res* 2010; 93-94: 389-92.
 12. จิตรลดา วรรณอารยชัย, กุลวรรณ ศรีสุนันท์, โมเรศ ศรีบ้านไผ่, การพัฒนาสูตรตำรับยา Diclofenac ในรูปแบบแผ่นแปะผิวหนัง. กรุงเทพฯ : ภาควิชาอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2546.
-

The Development of Transdermal Patch From *Centella asiatica* (L.) Urban

Pornsri Prasertwaree Jiranuch Mingmuang Saowanee Thongdee

Sakwichai Onthong and Nuchattra Chansuwanich

Medicinal Plant Research Institute Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT Asiatic pennywort or *Centella asiatica* (L.) Urban is a Herbal medicine, which is used for medicines, cosmetics, food supplement and health products. The pharmacological activities of pennywort are for wound healing, keloid treatment and antimicrobial activity. Transdermal drug patch for pennywort developed to reduce frequency for product usage per day. This helps for the pharmacy administration. The developed transdermal delivery system, was comprised of backing layer and adhesive layer which loaded herbal extraction. Different polymers such as ethyl cellulose (EC), eudragit E 100, eudragit NE 30 D, hydroxypropyl methyl cellulose with various concentrations (1.0%, 2.0% and 3.0% w/v) for backing layer and adhesive layer were studied. In addition, two plasticizers triacetin and dibutyl Phthalate (DBP) were also studied for the transdermal delivery system. The result demonstrated that 2.0% EC and 30% triacetin was suitable for backing layer in transdermal patch because transdermal patch was clear, flexible durable for tensile tester and contained few porosity detected by Scanning Electron Microscope (SEM). The preparation adhesive layer from polymer 6.0% eudragit NE 30 D and 0.5% DBP is the most appropriate for the system. The cell diffusion study by Franz's method using high performance liquid chromatograph (HPLC) demonstrated that both active ingredients in pennywort, madecassoside and asiaticoside are found at 41.2% and 94.7%, respectively. The results of this study are use for new transdermal device for bedsore's patient.

Key word: Transdermal Patch, *Centella asiatica* (L.) Urban, Franz's Diffusion Cell

ชีววิทยาของยุงพาหะโรคไข้เลือดออกและซีโรทัยป์ ของเชื้อไวรัสเดงกีในวงจรการเกิดโรคในประเทศไทย

อุษาวดี ถาวรระ* พายุ ภักดีนวน* อภิวัฏ ธวัชสิน* จักรวาล ชมภูศรี* ชญาดา ขำสวัสดิ์*
ยุทธนา ภูทรัพย์* อัจฉรา ภูมิ** อธิกรมล เพ็งสกุล*** เผล็จ สิริยะเสถียร** สมชาย แสงกิจพร*

* สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

** คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

*** คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90110

บทคัดย่อ คณะผู้วิจัยได้ออกสำรวจและเก็บตัวอย่างยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) และยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) จากภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย เพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรทัยป์ต่าง ๆ รวมถึงศึกษาข้อมูลด้านชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคไข้เลือดออกของยุงพาหะทั้งสองชนิดดังกล่าว ผลการสำรวจในพื้นที่ 25 จังหวัดของประเทศไทยพบยุงพาหะทั้งสองชนิดได้ในทุกจังหวัด โดยพบยุงลายบ้านได้จนถึงระดับความสูง 1,509 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล ในขณะที่ยุงลายสวนพบได้จนถึงระดับความสูง 1,928 เมตร ทั้งนี้พบว่ายุงทั้งสองชนิดมีนิสัยชอบกัดดูดเลือดคนต่างไปจากเดิมโดยเริ่มกัดตั้งแต่เช้ามืดจนถึงพลบค่ำ นอกจากนี้ยังพบอีกว่ายุงทั้งสองชนิดออกหากินในเวลากลางวันอีกด้วย ผลการศึกษาอัตราการกัดของยุงทั้งสองชนิดพบว่ายุงลายบ้านมีอัตราการกัดสูงสุดในฤดูร้อน ในขณะที่ยุงลายสวนมีอัตราการกัดสูงสุดในฤดูหนาว และจากการศึกษาอัตราการติดเชื้อของยุงพาหะในธรรมชาติ โดยตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกีในยุงทั้งสองชนิดที่จับได้ในพื้นที่วิจัยทั้ง 25 จังหวัดด้วยเทคนิค semi-nested RT-PCR ผลพบเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ในยุงทั้งสองชนิดที่จับได้ในพื้นที่วิจัย ได้แก่ DEN-1, DEN-2, DEN-3 และ DEN-4 โดยที่อัตราการพบเชื้อไวรัสเดงกีแต่ละซีโรทัยป์ในยุงลายบ้านและยุงลายสวนแตกต่างกันในแต่ละจังหวัด ทั้งนี้ยุงลายบ้านมีอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีสูงกว่ายุงลายสวน ค่าสูงสุดพบในภาคใต้เท่ากับร้อยละ 37.75 ในยุงลายบ้าน ขณะที่ค่าสูงสุดในยุงลายสวนพบในภาคใต้เช่นกันเท่ากับร้อยละ 24.2 นอกจากนี้ยังตรวจพบเชื้อไวรัสเดงกีในลูกน้ำยุงและยุงเพศผู้แสดงว่ามีการถ่ายทอดเชื้อจากยุงรุ่นแม่ไปสู่รุ่นลูก ทำให้เกิดวัฏจักรการติดเชื้อของยุงในธรรมชาติ และพบว่าเชื้อไวรัสเดงกีสองซีโรทัยป์ ภายในยุงตัวเดียวกันอีกด้วย ซึ่งพบทั้งในยุงลายบ้านและยุงลายสวน ปรากฏการณ์นี้บ่งบอกว่าพื้นที่ที่พบนั้น ๆ มีความเสี่ยงต่อการระบาดของโรคไข้เลือดออกเนื่องจากยังคงมีเชื้ออยู่ในยุงพาหะ จำเป็นต้องแนะนำให้ประชาชนป้องกันตนเองจากการถูกยุงกัดและกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุง

Accepted for publication, 29 May 2015

บทนำ

โรคไข้เดงกีและไข้เลือดออกเกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีประกอบด้วย 4 ซีโรทัยป์ คือ ไวรัสเดงกีซีโรทัยป์ 1 (DEN-1), ไวรัสเดงกีซีโรทัยป์ 2 (DEN-2), ไวรัสเดงกีซีโรทัยป์ 3 (DEN-3) และ ไวรัสเดงกีซีโรทัยป์ 4 (DEN-4) ติดต่อกันผ่านการกัดของยุงพาหะ⁽¹⁾ ในประเทศไทยมีรายงานพบยุงพาหะโรคไข้เลือดออกที่สำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ ยุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) และยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) โดยมียุงลายบ้านเป็นพาหะหลัก⁽²⁾ ปัจจุบันถึงแม้จะมีการผลิตวัคซีนสำหรับโรคดังกล่าว แต่พบว่ายังคงเป็นแค่วัคซีนที่อยู่ในระหว่างการทดลองและผลที่ได้ยังไม่ครอบคลุมทุกซีโรทัยป์ของไวรัสเดงกีและทุกช่วงอายุของกลุ่มประชากร^(3, 4) จึงนับได้ว่าโรคไข้เลือดออกเป็นโรคที่ยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญมากโรคหนึ่งของประเทศ

การเฝ้าระวังเกี่ยวกับผู้ป่วยและเชื้อไวรัสไข้เลือดออก เป็นหนึ่งในแนวทางการควบคุมโรคไข้เลือดออกที่สำคัญ แต่ถึงแม้จะมีการเฝ้าระวังผู้ป่วยและสุ่มตัวอย่างเลือดนำมาตรวจ แต่การพบผู้ป่วยและเชื้อไวรัสไข้เลือดออกในผู้ป่วยนี้ มักเริ่มเข้าสู่ช่วงต้นของการระบาดแล้ว ซึ่งหากมาตรการในการควบคุมโรคไม่มีประสิทธิภาพและรวดเร็วพอ โรคจะแพร่กระจายออกไปอย่างกว้างขวางจนเกินกำลังที่จะควบคุม⁽⁵⁾ เหตุนี้จึงจำเป็นต้องหามาตรการที่มีประสิทธิภาพในเชิงรุก และมีการประชาสัมพันธ์แจ้งเตือนภัยก่อนเกิดการระบาดแทนการเฝ้าระวังโดยใช้ข้อมูลผู้ป่วยดังกล่าวข้างต้น

ปัจจุบันข้อมูลพื้นฐานด้านชีววิทยา นิเวศวิทยาและการติดเชื้อไวรัสเดงกีในยุงที่เป็นปัจจุบัน สำหรับนำไปใช้แจ้งเตือนภัยและควบคุมยุงพาหะให้มีประสิทธิภาพยังไม่มี ประกอบกับในบางพื้นที่ของประเทศไทยยังคงมีรายงานจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกสูงขึ้น ทั้งที่เจ้าหน้าที่สาธารณสุขจังหวัดได้ดำเนินการควบคุมยุงลายบ้านซึ่งเป็นพาหะหลักอย่างสม่ำเสมอ ทำให้เกิดสมมติฐานว่าสาเหตุการป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกอาจเกิดจากยุงลายสวนที่เป็นพาหะรอง ซึ่งมีแหล่งเพาะพันธุ์แตกต่างกันด้วย โดยที่ยุงลายบ้านมีแหล่งเพาะพันธุ์ที่สำคัญอยู่ในภาชนะบริเวณชายคาบ้าน เช่น ตุ่มใส่น้ำดื่ม น้ำใช้ บ่อคอนกรีตในห้องน้ำ จานรองขาตู้กันมด ยางรถยนต์ จานรองกระถางต้นไม้ เป็นต้น ในขณะที่ยุงลายสวนมีแหล่งเพาะพันธุ์ที่สำคัญอยู่นอกชายคาบ้าน และส่วนใหญ่เป็นสิ่งที่มิมีในธรรมชาติและวัสดุเหลือทิ้ง เช่น กระบอกไม้ไผ่ กะลามะพร้าว โพรงต้นไม้ ขวดพลาสติกและขวดแก้ว เป็นต้น⁽⁶⁾ ปัจจุบันการรณรงค์กำจัดลูกน้ำยุงพาหะส่วนใหญ่พุ่งเป้าไปที่แหล่งเพาะพันธุ์ของยุงลายบ้าน ทำให้ไม่ครอบคลุมไปถึงแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงลายสวน จึงทำให้ความชุกชุมของยุงลายสวนเพิ่มมากขึ้นและวัฏจักรของโรคไข้เลือดออกยังคงมีอยู่ ซึ่งต้องปรับกลยุทธ์ในการควบคุมยุงพาหะ การศึกษาศักยภาพในการเป็นพาหะโรคไข้เลือดออกของยุงลายบ้านเปรียบเทียบกับยุงลายสวนในแต่ละภาคของประเทศไทย ตลอดจนศึกษาข้อมูลด้านชีววิทยาและนิเวศวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของยุงลายบ้านและยุงลายสวน จะได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการแจ้งเตือนภัยโรคไข้เลือดออก และช่วยกระตุ้นให้ประชาชนตื่นตัวในการร่วมมือจัดการแหล่งเพาะพันธุ์ยุง อีกทั้งสามารถนำข้อมูลไปปรับใช้ประกอบการวางแผนควบคุมโรคไข้เลือดออก ลักษณะการนำเสนอจะใช้ภาษาและวิธีการที่สามารถเข้าใจได้ง่าย เพื่อให้เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง นำข้อมูลไปเผยแพร่สู่ประชาชนเพื่อก่อให้เกิดความกระตือรือร้นที่จะร่วมมือควบคุมพาหะนำโรค ผลการวิจัยจะได้เกิดประโยชน์ต่อสาธารณะ

วัสดุและวิธีการ

การคัดเลือกพื้นที่วิจัย

พื้นที่วิจัยเป็นพื้นที่ที่เสี่ยงต่อโรคไข้เลือดออก ซึ่งเกิดโรคไข้เลือดออกซ้ำซากในรอบ 5 ปี และอยู่ในเขตอุตสาหกรรมหรือแหล่งท่องเที่ยว โดยคัดเลือกจำนวน 25 จังหวัดทั่วทุกภาคของประเทศ ประกอบด้วยพื้นที่ในภาคกลาง 6 จังหวัด ได้แก่ นนทบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี นครสวรรค์ เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ภาคเหนือ 5 จังหวัด ได้แก่ เพชรบูรณ์ ตาก พิษณุโลก เชียงราย และเชียงใหม่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 6 จังหวัด ได้แก่ นครราชสีมา ขอนแก่น

หนองคาย บุรีรัมย์ ร้อยเอ็ด และอุบลราชธานี ภาคตะวันออก 2 จังหวัด ได้แก่ ระยอง และจันทบุรี ภาคใต้ 6 จังหวัด ได้แก่ สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ ตรัง สงขลา และพัทลุง โดยดำเนินการเก็บข้อมูลระหว่างปี พ.ศ. 2549-2553

การหาอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีของยุงลายบ้านและยุงลายสวน

เก็บตัวอย่างยุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) และยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) ด้วยการใช้สวิงโฉบในพื้นที่วิจัย 25 จังหวัด โดยเก็บตัวอย่างจังหวัดละ 2 อำเภอๆ ละ 2 ตำบล โดยแบ่งเก็บตัวอย่างยุงแต่ละบ้านเป็น pool ของระยะลูกน้ำ ตัวเต็มวัยเพศผู้ และตัวเต็มวัยเพศเมีย pool ละ 5 ตัว รวมอย่างน้อย 160 pools ต่อจังหวัด

สำหรับการเก็บตัวอย่างเพื่อหาอัตราการติดเชื้อ 2 ซีโรทัยป์ในยุงตัวเดียวกัน ตัวอย่างยุงลายบ้านและยุงลายสวนเพศเมีย จะถูกตรวจแยกเป็นตัวย่อย ชนิดละ 50 ตัวต่อจังหวัด ทั้งนี้การจำแนกชนิดของยุงลายใช้หลักอนุกรมวิธานของแมลง⁽⁷⁾ จากนั้นตัวอย่างลูกน้ำและยุงตัวเต็มวัยที่เก็บได้จะถูกแช่ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) เพื่อนำกลับมาตรวจหาเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ด้วยวิธี semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction (semi-nested RT-PCR) เพื่อหาซีโรทัยป์ของเชื้อเดงกีในยุง แล้วนำผลการศึกษามาได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลซีโรทัยป์ในคนในพื้นที่เดียวกัน (ที่มาของข้อมูลซีโรทัยป์ในผู้ป่วย : จากห้องปฏิบัติการฝ่ายอาชีวโรส สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข) โดยแสดงผลในรูปของกราฟ

วิธี semi-nested RT-PCR

สกัดอาร์เอ็นเอของไวรัสเดงกีจากยุงระยะตัวเต็มวัยและลูกน้ำ โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Invisorb® Spin Virus RNA MiniKit ตามวิธีที่ระบุในคู่มือการใช้งาน จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี semi-nested RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ D1 (5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3'), TS1 (5'-CGTCTCAGTGATCGGGG-3'), TS2 (5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'), TS3 (5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3') และ TS4 (5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3')⁽⁸⁾ ปฏิกริยา RT-PCR ประกอบด้วย 2X Reaction Mix (0.4 mM dNTP, 3.2mM MgSO₄) ปริมาตร 12.5 µl,ไพรเมอร์ D1, TS1, TS2, TS3 และ TS4 ชนิดละ 1.0 µl, อาร์เอ็นเอตัวอย่างปริมาตร 5.0 µl, Super Script III™ Taq (ผลิตภัณฑ์ของ Invitrogen®) จำนวน 1.0 µl แล้วเติม ddH₂O จนครบปริมาตร 25.0 µl โดยใช้ขั้นตอนดังนี้คือ ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอที่ได้ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 2 นาที และขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอจำนวน 40 รอบซึ่งประกอบด้วยการใช้อุณหภูมิ 94°C, 50°C และ 72°C ช่วงอุณหภูมิละ 30 วินาที และสุดท้ายจึงทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่อุณหภูมิ 72°C โดยใช้เวลา 7 นาที หลังจากปฏิบัติกริยา RT-PCR เสร็จสิ้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิบัติกริยาจะถูกนำไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบน agarose gel ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยที่ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากไวรัสเดงกีซีโรทัยป์ DEN-1, DEN-2, DEN-3 และ DEN-4 มีขนาด 482 bp, 119 bp, 290 bp และ 392 bp ตามลำดับ สุดท้ายจึงทำการบันทึกข้อมูลจากการถ่ายภาพเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์ผลต่อไป

การศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของยุงลายบ้านและยุงลายสวน

ศึกษาพฤติกรรมการกัดของยุงลายบ้านและยุงลายสวนในพื้นที่อำเภอบางบัวทอง จ.นนทบุรี โดยอาสาสมัคร 6 คนนั่งจับยุงในภาคสนามทุกชั่วโมงๆ ละ 20 นาที โดยเริ่มจับตั้งแต่วเวลา 06.00 น. จนถึง 06.00 น. ของวันถัดไป

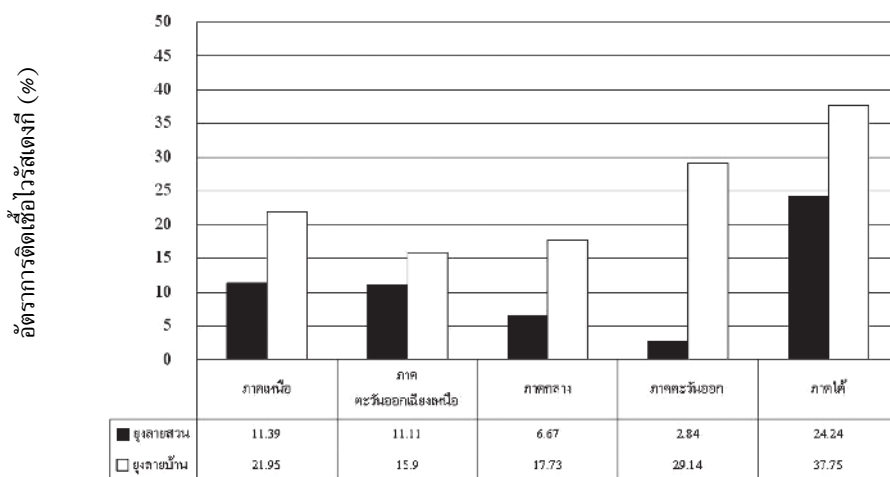
จากนั้นนำยุงที่จับได้มาจำแนกชนิด เพศ ตามหลักอนุกรมวิธานของแมลง⁽⁷⁾ แล้วคำนวณหาอัตราการกัดเป็นจำนวนยุง/คน/ชั่วโมงและศึกษาข้อมูลด้านการแพร่กระจายของยุงลายบ้านและยุงลายสวนบนพื้นที่สูงในจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง และอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ พื้นที่สูงในจังหวัดเชียงราย ได้แก่ ดอยตุง โดยเก็บตัวอย่างยุง ทั้งระยะลูกน้ำและตัวเต็มวัยในพื้นที่ดังกล่าวและนำกลับมาจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ

ผล

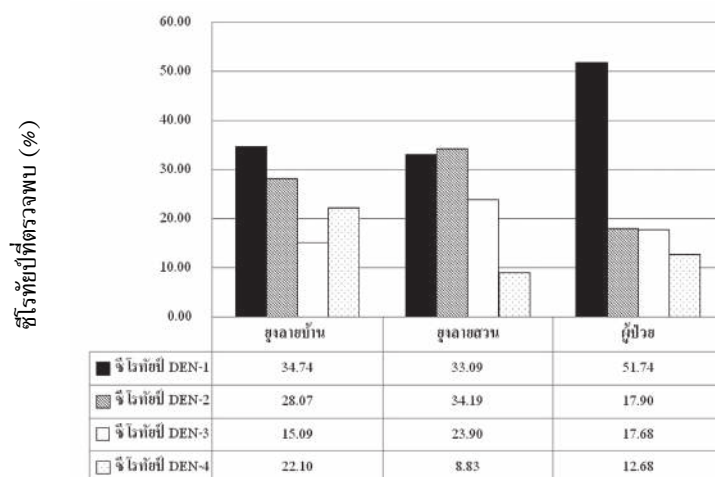
อัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีของยุงลายบ้านและยุงลายสวน

ผลการศึกษาพบว่าอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีของยุงลายบ้านและยุงลายสวนในภาคใต้ของประเทศไทย มีอัตราการติดเชื้อสูงสุดคือร้อยละ 37.75 และ 24.24 (ภาพที่ 1)

จากเชื้อไวรัสเดงกีที่ตรวจพบในยุงลายบ้านและยุงลายสวน เมื่อวิเคราะห์ซีโรทัยป์พบว่า พบทั้ง 4 ซีโรทัยป์ โดยพบซีโรทัยป์ DEN-1 และ DEN-2 มากที่สุด นอกจากนี้พบว่าซีโรทัยป์ของเชื้อไวรัสเดงกีที่ตรวจพบในผู้ป่วย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2549-2553 มากที่สุดคือ ซีโรทัยป์ DEN-1 (ภาพที่ 2)

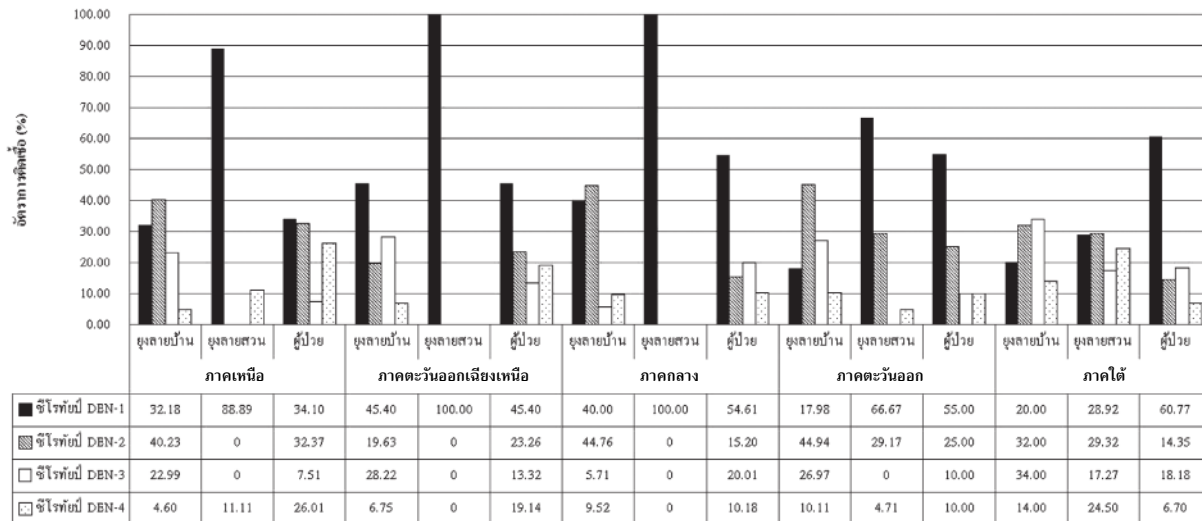


ภาพที่ 1 อัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีของยุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) และยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) ในภาคต่างๆ ของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2549 - 2553



ภาพที่ 2 ซีโรทัยป์ของเชื้อไวรัสเดงกีในยุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) ยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) และในผู้ป่วย ระหว่าง ปี พ.ศ. 2549- 2553

เมื่อวิเคราะห์ซีโรทัยป์ของเชื้อไวรัสเดงกีในยุงลายบ้าน ยุงลายสวน และผู้ป่วย ในปี พ.ศ. 2549–2553 โดยแยกตามภาคต่างๆ พบว่าเชื้อไวรัสเดงกีซีโรทัยป์ DEN-1 ถูกตรวจพบมากที่สุดในยุงลายสวนและผู้ป่วยในทุกภาคของประเทศไทย (ภาพที่ 3)

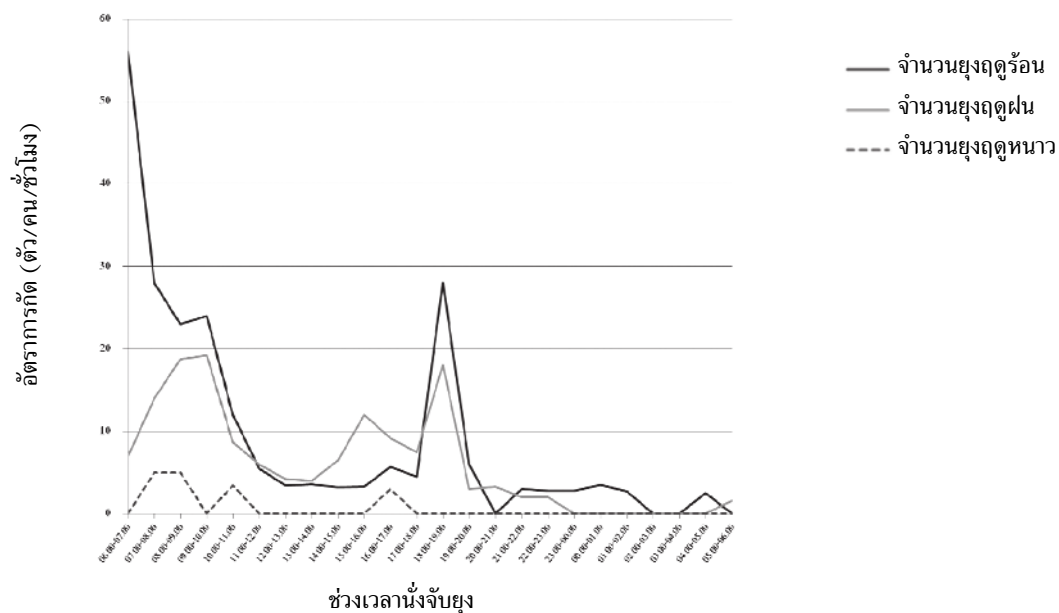


ภาพที่ 3 อัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีแต่ละซีโรทัยป์ของยุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) ยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) และจากข้อมูลผู้ป่วย ในปี พ.ศ. 2549–2553 แยกตามภาคต่างๆ ของประเทศไทย

นอกจากนี้ ผลการศึกษายังพบอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีในยุงลายเพศผู้ยุงลายบ้านและยุงลายสวน ทั้งสองชนิด ร้อยละ 19.5 (780/4,000 pools) และพบอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีในลูกน้ำร้อยละ 18.7 (748/4,000 pools) ทั้งนี้ยังพบการติดเชื้อไวรัสเดงกี 2 ซีโรทัยป์ในยุงตัวเดียวกัน ทั้งในยุงลายบ้านและยุงลายสวนเพศเมียอีกด้วย โดยที่ในยุงลายบ้านซีโรทัยป์ที่พบในยุงตัวเดียวกัน คือ DEN-1 กับ DEN-4, DEN-1 กับ DEN-2 และ DEN-2 กับ DEN-4 โดยพบอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีร้อยละ 1.6 (4/250 pools), 1.2 (3/250 pools) และ 0.4 (1/250 pools) ตามลำดับ ส่วนในยุงลายสวนซีโรทัยป์ที่พบในยุงตัวเดียวกันคือ DEN-2 กับ DEN-3 ซึ่งพบอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีร้อยละ 6.8 (17/250 pools)

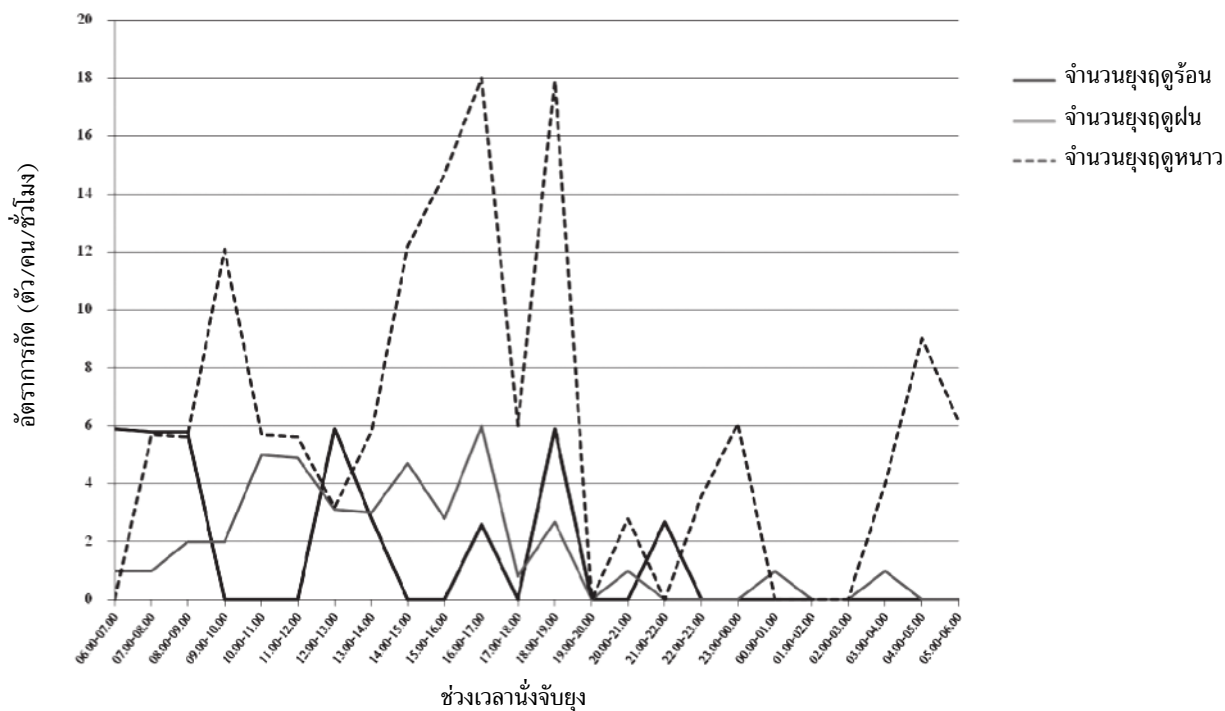
ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของยุงลายบ้านและยุงลายสวน

ผลการศึกษาพฤติกรรมการกัดของยุงลายบ้านและยุงลายสวน พบว่ายุงลายบ้านมีอัตราการกัดสูงสุดในฤดูร้อนคือ ช่วงเวลา 06.00–10.00 น. และ 18.00–19.00 น. รองลงมาในฤดูฝน คือ ช่วงเวลา 09.00–10.00 น., 15.00–16.00 น. และ 18.00–19.00 น. และอัตราการกัดต่ำสุดในฤดูหนาว คือ ช่วงเวลา 07.00–08.00 น., 10.00–11.00 น. และ 17.00–18.00 น. (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 อัตราการกัดของยุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) ในช่วงฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว

ส่วนยุงลายสวนมีอัตราการกัดสูงสุดในฤดูหนาว คือ ช่วงเวลา 16.00-17.00 น. และ 18.00-19.00 น. รองลงมาคือฤดูร้อนในช่วงเวลา 06.00-10.00 น., 12.00-13.00 น. และ 18.00-19.00 น. และอัตราการกัดต่ำสุดในฤดูฝนในช่วงเวลา 16.00-17.00 น. (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 อัตราการกัดของยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) ในช่วงฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว

จากการสำรวจยุงลายบ้านและยุงลายสวนบนพื้นที่สูงในจังหวัดเชียงใหม่ ณ อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ และพื้นที่ดอยตุง จังหวัดเชียงราย พบว่าพบยุงลายบ้านจนถึงระดับความสูง 1,509 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล (ดอยตุง) แต่ที่ระดับความสูง 1,928 เมตร (ดอยอ่างขาง) พบเฉพาะยุงลายสวน ในขณะที่ที่ระดับความสูง 2,565 เมตร (ดอยอินทนนท์) สํารวจไม่พบยุงลายทั้งสองชนิด

วิจารณ์

งานวิจัยนี้ศึกษาเกี่ยวกับอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกี ในยุงพาหะไข้เลือดออกได้แก่ ยุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) และยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) ในภาคต่างๆ ของประเทศไทย พบว่าอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งในยุงลายบ้านและยุงลายสวน พบสูงสุดในภาคใต้โดยเมื่อพิจารณาถึงสภาพภูมิศาสตร์และภูมิอากาศของภาคใต้ของประเทศไทยแล้วพบว่ามีความชื้นและฝนตกเกือบตลอดทั้งปี ซึ่งเป็นลักษณะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยุงพาหะ ประกอบกับเป็นพื้นที่ที่อุดมไปด้วยแหล่งเพาะพันธุ์ เนื่องจากการทำสวนยางพาราและปาล์มน้ำมันเป็นจำนวนมาก ทั้งนี้ยังอุดมไปด้วยแหล่งท่องเที่ยวทางธรรมชาติอย่างอุทยาน น้ำตกและสวนสาธารณะ จึงทำให้จำนวนยุงพาหะที่พบมีจำนวนมากกว่าภาคอื่นๆ⁽⁹⁾ และพบรายงานผู้ป่วยไข้เลือดออกสูงในทุกปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปี 2550 และ 2553 ซึ่งพบอัตราป่วยสูงสุดในภาคใต้ เมื่อเทียบกับภาคอื่นๆ (137.96 ต่อประชากรแสนคน และภาคเหนือ 73.25 ต่อประชากรแสนคน และสำหรับใน พ.ศ. 2553 ซึ่งเป็นปีที่พบผู้ป่วยไข้เลือดออกสูงมาก (116,947 ราย, สำนักโรคติดต่อมาโดยแมลงปี 2553) โดยพบอัตราป่วยสูงสุดในภาคใต้ (332.21 ต่อประชากรแสนคน) รองลงมา คือ ภาคเหนือ (179.61 ต่อประชากรแสนคน) ภาคกลาง (166.04 ต่อประชากรแสนคน) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (138 ต่อประชากรแสนคน) เนื่องจากภาคใต้มีจำนวนผู้ป่วยสูงสุด และมีจำนวนยุงพาหะสูง จึงทำให้พบอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีในยุงสูงตามไปด้วย จะเห็นได้ว่าหากอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีในยุงสูงจะพบอัตราป่วยไข้เลือดออกสูงด้วยเช่นกัน อนึ่งยังพบว่าอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีในยุงลายบ้านสูงกว่าในยุงลายสวนในทุกภาคของประเทศไทย ซึ่งอาจเนื่องจากลักษณะนิสัยการหาเหยื่อของยุงลายบ้านซึ่งหาแหล่งเลือดภายในบ้านทำให้มีโอกาสเจอแหล่งเลือดมากกว่ายุงลายสวน ประกอบกับลักษณะแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงลายบ้านที่เกิดจากวัสดุที่มนุษย์สร้างขึ้น เช่น ตุ่มน้ำ บ่อคอนกรีต เป็นต้น ซึ่งจะมีน้ำเต็มตลอดเวลาแม้แต่ในฤดูแล้ง ทำให้ยุงลายบ้านสามารถเพาะพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี⁽¹⁰⁾ ตรงกันข้ามกับยุงลายสวนที่หากินในสวนทำให้มีโอกาสเจอแหล่งเลือดน้อยกว่า และแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงลายสวนยังอยู่กลางแจ้งจึงอาจแห้งในฤดูร้อน และถูกชะทำลายโดยน้ำฝนได้ง่ายกว่าอีกด้วย⁽¹¹⁾ พบอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีในยุงลายสวนร้อยละ 2.8-24.2 โดยพบสูงสุดในภาคใต้เช่นกันซึ่งจากการค้นพบดังกล่าวเป็นข้อบ่งชี้ว่ายังคงมียุงลายสวนที่เป็นพาหะอยู่ในพื้นที่ ซึ่งหากต้องการตัดวงจรโรคไข้เลือดออก จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องควบคุมยุงลายสวนเหล่านี้นด้วย

เมื่อพิจารณาถึงซีโรทัยป์ของไวรัสเดงกีที่ตรวจพบในยุงลายบ้านตามภาคต่างๆ พบว่าภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง ตรวจพบซีโรทัยป์ DEN-2 มากที่สุด ภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบซีโรทัยป์ DEN-1 มากที่สุดและภาคใต้พบซีโรทัยป์ DEN-3 มากที่สุด ในขณะที่ในยุงลายสวนตรวจพบซีโรทัยป์ DEN-1 มากกว่าซีโรทัยป์อื่นๆ ในทุกภาค ยกเว้นภาคใต้พบซีโรทัยป์ DEN-1, DEN-2 และ DEN-4 มีจำนวนใกล้เคียงกัน อนึ่งในภาพรวมทั้งประเทศในยุงลายบ้านตรวจพบเชื้อไวรัสเดงกีซีโรทัยป์ DEN-2 สูงสุด ส่วนในยุงลายสวนพบซีโรทัยป์ DEN-1 สูงสุด ในขณะที่ในผู้ป่วยพบซีโรทัยป์ DEN-1 สูงสุด ทั้งนี้ในพื้นที่ที่มีซีโรทัยป์ไม่ครบทั้ง 4 ซีโรทัยป์ประชากรในพื้นที่นั้นจะเสี่ยงต่อการเป็นโรคไข้เลือดออก

นอกจากนี้ยังตรวจพบเชื้อไวรัสเดงกี 2 ซีโรทัยป์ภายในยุงตัวเดียวกันอีกด้วยซึ่งตรงกับรายงานผลการวิจัยที่พบได้ทั้งในผู้ป่วย⁽¹²⁾ และในตัวยุง⁽¹³⁾ ปรากฏการณ์นี้บ่งบอกว่าพื้นที่นั้น มีความเสี่ยงในการระบาดของโรคไข้เลือดออกและพบการติดเชื้อไวรัสเดงกีในยุงลายเพศผู้ทั้งยุงลายบ้านและยุงลายสวนสูงถึงร้อยละ 19.5 และในลูกน้ำยุงร้อยละ 18.7 อีกด้วย สอดคล้องกับรายงานของ Thavara *et al.*⁽¹³⁾ และ Chompoosri⁽¹⁴⁾ ซึ่งพบได้จาก

การตรวจเชื้อไวรัสซิกุนกุนยาในยุงลายบ้านและยุงลายสวนด้วยเช่นกัน⁽⁸⁾ แสดงให้เห็นว่ามีการถ่ายทอดเชื้อจากยุงรุ่นแม่ไปสู่รุ่นลูก (transovarial transmission) ทำให้เกิดเป็นวัฏจักรการติดเชื้อมาตรึงในธรรมชาติ ซึ่งยากต่อการตัดวงจรการระบาดของโรคไข้เลือดออก

จากผลการศึกษาชีววิทยาของยุงลายบ้านและยุงลายสวน พบยุงทั้งสองชนิดได้ในทุกจังหวัดที่วิจัย โดยสามารถพบยุงลายบ้านได้จนถึงระดับความสูง 1,509 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล ในขณะที่ยุงลายสวนพบได้จนถึงระดับความสูง 1,928 เมตร ข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการระบาดของโรคไข้เลือดออกในพื้นที่ภูเขาสูงของประเทศไทย (สูงกว่า 1,500 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล) มีโอกาสสูงที่พาหะจะเป็นยุงลายสวน ดังนั้นการควบคุมโรคไข้เลือดออกในหมู่บ้านชาวเขาจึงควรให้ความสำคัญกับแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงลายสวนให้มากขึ้นด้วย

สภาพภูมิอากาศและอุณหภูมิเป็นตัวแปรที่สำคัญอย่างมากต่อยุงพาหะนำโรคไข้เลือดออก เนื่องจากมีผลต่อระยะเวลาพัฒนาในวงจรชีวิตของยุงพาหะ ซึ่งอาจช่วยยืดชีวิตของยุงพาหะออกไปทำให้มีเวลาในการส่งผ่านเชื้อนานขึ้น หรือทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตลดลงทำให้ปริมาณของยุงพาหะเพิ่มมากขึ้นและมีอัตราการกัดสูงขึ้นเป็นต้น⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ ทั้งนี้ประเทศไทยตั้งอยู่ในภูมิศาสตร์เขตร้อนชื้นที่อุณหภูมิของทั้ง 3 ฤดู (ฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว) แตกต่างกันไม่มาก แต่มีปริมาณความชื้นและน้ำฝนที่เป็นปัจจัยสำคัญต่อการระบาดของโรคไข้เลือดออก⁽¹⁸⁾ แตกต่างกันชัดเจน ซึ่งจากการศึกษาพฤติกรรมการกัดของยุงลายทั้งสองชนิดในแต่ละฤดูพบว่า ยุงลายบ้านมีพฤติกรรมการกัดเปลี่ยนแปลงไปจากรายงานของ Yasuno และ Tonn⁽¹⁹⁾ ที่พบว่ายุงลายมีอัตราการกัดสูงสุดที่ 3 ชั่วโมงก่อนพระอาทิตย์ตกดินคือ เวลาประมาณ 14.00 – 17.00 น. โดยการทดลองนี้พบว่าในฤดูร้อนและฤดูฝนยุงลายบ้านมีช่วงเวลากัดสูงหลายช่วงในแต่ละวัน โดยที่ช่วงเวลากัดสูงสุดในฤดูร้อนพบในช่วงเช้าระหว่างเวลา 06.00-10.00 น. และช่วงเย็นเวลา 18.00-19.00 น. ฤดูฝนช่วงเวลากัดสูงสุดมี 3 ช่วง คือเวลา 09.00-10.00 น., 15.00-16.00 น. และ 18.00-19.00 น. ในขณะที่ฤดูหนาวช่วงเวลากัดสูงสุดมี 3 ช่วงคือเวลา 07.00-08.00 น., 10.00-11.00 น. และ 17.00-18.00 น. นอกจากนี้ยังพบอีกว่ายุงทั้งสองชนิดมีพฤติกรรมกัดในช่วงกลางคืนด้วย

ผลการศึกษาพฤติกรรมการกัดของยุงลายสวนพบว่า ฤดูร้อนช่วงเวลากัดสูงสุดมี 3 ช่วงคือ เวลา 06.00-10.00 น., 12.00-13.00 น. และ 18.00-19.00 น. ฤดูฝนช่วงเวลากัดสูงสุดคือ เวลา 16.00-17.00 น. และฤดูหนาวช่วงเวลากัดสูงสุดมี 2 ช่วงคือ 15.00-16.00 น. และ 18.00-19.00 น. พบว่ายุงลายสวนมีอัตราการกัดสูงสุดในฤดูหนาว ซึ่งอาจเป็นเพราะในปีที่ทำการวิจัยมีปริมาณน้ำฝนมากทำให้แหล่งเพาะพันธุ์ของยุงลายสวนที่อยู่กลางแจ้งถูกชะทำลายจนทำให้เวลาในการเพิ่มจำนวนของยุงในช่วงฤดูฝนชะลอตัวและเริ่มเพิ่มมากขึ้นในช่วงต้นของฤดูหนาว ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าว ทำให้เกิดการเลื่อนเวลาการระบาดได้⁽¹¹⁾ ผลจากการศึกษาพฤติกรรมการกัดของยุงในแต่ละฤดูนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าสภาพภูมิอากาศมีผลอย่างมากต่อพฤติกรรมการกัดของยุงลาย

สรุป

จากการศึกษาข้อมูลด้านชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคไข้เลือดออกของยุงลายบ้านและยุงลายสวน พบว่าช่วงเวลาที่ยุงทั้งสองชนิดชอบกัดดูดเลือดคนเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมโดยเริ่มกัดตั้งแต่เช้ามืดจนถึงพลบค่ำรวมทั้งในเวลากลางคืนด้วย ทั้งนี้ยุงลายบ้านมีอัตราการกัดสูงสุดในฤดูร้อน ในขณะที่ยุงลายสวนมีอัตราการกัดสูงสุดในฤดูหนาว จากการศึกษาอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีของยุงทั้งสองชนิดในธรรมชาติ พบว่ายุงลายบ้านมีอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกีมากกว่ายุงลายสวน และตรวจพบเชื้อไวรัสเดงกีได้ในลูกน้ำยุงและยุงเพศผู้ นอกจากนี้ยังตรวจพบเชื้อไวรัสเดงกีสองซีโรทัยป์ภายในยุงตัวเดียวกัน ทั้งในยุงลายบ้านและยุงลายสวนอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผชช.สุรภี อนันตปรีชา และเจ้าหน้าที่ฝ่ายอาชีวไวรัส สำหรับข้อมูลซีโรทัยป์ของเชื้อไวรัสในผู้ป่วย และเจ้าหน้าที่ฝ่ายชีววิทยาและนิเวศวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข สำหรับการออกสำรวจและเก็บตัวอย่างภาคสนาม รวมถึงเจ้าหน้าที่จากสำนักงานป้องกันควบคุมโรคและสำนักงานสาธารณสุขจังหวัด ที่ช่วยประสานงานการเก็บตัวอย่างในพื้นที่วิจัย และขอขอบคุณ ผทว.ปรางค์ ขวลิตร่าง ผชช.นพพร อนันตสินกุล และคุณอารีรัตน์ ส่งแสง ที่ได้ให้คำแนะนำตลอดจนตรวจแก้ผลงาน

เอกสารอ้างอิง

- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev 1998; 11(3): 480-96.
- Strickman D, Kittayapong P. Dengue and its vectors in Thailand: introduction to the study and seasonal distribution of Aedes larvae. Am J Trop Med Hyg 2002; 67(3): 247-59.
- Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. Trends Microbiol 2002; 10(2): 100-3.
- Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SR, Ismail HI, Chotpitayasunondh T, Chua MN, et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. Lancet 2014; 384(9951): 1358-65.
- ดวงพร ศรีสวัสดิ์, ชัยวัฒน์ วาศศิริ, บรรณาธิการ. คู่มือการป้องกันและควบคุมโรคไข้เลือดออกสำหรับองค์กรปกครองส่วนท้องถิ่น. นนทบุรี : กลุ่มโรคไข้เลือดออก สำนักโรคติดต่ออันตรายโดยแมลง กระทรวงสาธารณสุข; 2551.
- Arunachalam N, Tana S, Espino F, Kittayapong P, Abeyewickreme W, Wai KT, et al. Eco-bio-social determinants of dengue vector breeding: a multicountry study in urban and periurban Asia. Bull World Health Organ 2010; 88(3): 173-84.
- Rueda LM. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. Zootaxa 2004; 589: 1-60.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992, 30(3): 545-51.
- Thavara U, Tawatsin A, Pengsakul T, Bhakdeenuan P, Chanama S, Anantapreecha S, et al. Out-break of chikungunya fever in Thailand and virus detection in field population of vector mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). Southeast Asian J Trop Med Public Health 2009; 40(5): 951-62.
- Thavara U, Tawatsin A, Chansang C, Kong-ngamsuk W, Paosriwong S, Boon-Long J, et al. Larval occurrence, oviposition behavior and biting activity of potential mosquito vectors of dengue on Samui Island, Thailand. J Vector Ecol 2001; 26(2): 172-80.
- Wongkoon S, Jaroensutasinee M, Jaroensutasinee K. Climatic variability and dengue virus transmission in Chiang Rai, Thailand. Biomedica 2011; 27: 5-13.
- Wang WK, Chao DY, Lin SR, King CC, Chang SC. Concurrent infections of two dengue virus serotypes among dengue patients in Taiwan. J Microbiol Immunol Infect 2003; 36(2): 89-95.
- Thavara U, Siriyasatien P, Tawatsin A, Asavadachanukorn P, Anantapreecha S, Wongwanich R, et al. Double infection of heteroserotypes of dengue viruses in field populations of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and serological features of dengue viruses found in patients in southern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2006; 37(3): 468-76.



14. Chompoosri J, Thavara U, Tawatsin A, Anantapreecha S, Siriyasatien P. Seasonal monitoring of dengue infection in *Aedes aegypti* and serological feature of patients with suspected dengue in 4 central provinces of Thailand. Thai J Vet Med 2012; 42(2): 185-93.
 15. Watts DM, Burke DS, Harrison BA, Whitmire RE, Nisalak A. Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. Am J Trop Med Hyg 1987; 36(1): 143-52.
 16. Russell RC. Mosquito-borne arboviruses in Australia: the current scene and implications of climate change for human health. Int J Parasitol 1998; 28(6): 955-69.
 17. Karim MN, Munshi SU, Anwar N, Alam MS. Climatic factors influencing dengue cases in Dhaka city: a model for dengue prediction. Indian J Med Res 2012; 136(1): 32-9.
 18. Reiter P. Climate change and mosquito-borne disease. Environ Health Perspect 2001; 109(Suppl 1): 141-61.
 19. Yasuno M, Tonn RJ. A study of biting habits of *Aedes aegypti* in Bangkok, Thailand. Bull World Health Organ 1970; 43(2): 319-25.
-

Biology of Dengue Vectors and Serotypes of Dengue Virus in infectious Cycle in Thailand

Usavadee Thavara* Payu Bhakdeenuan* Apiwat Tawatsin*
 Jakkrawarn Chompoosri* Chayada Khumsawads* Yuttana Phusup*
 Atchara Phumee** Theerakamol Pengsakul*** Padet Siriyasatien**
 Somchai Sangkitporn*

* National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

** Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

*** Faculty of Medical Technology, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand.

Running title: *Biology of Dengue Vectors and Serotypes of Dengue Virus*¹

ABSTRACT Biological studies on dengue vectors, *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* and prevalence of dengue viruses found in both species were carried out in 25 provinces of Thailand. Both vectors were usually found in all provinces; however, *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* could be found up to 1,509 and 1,928 meters above sea level, respectively. It was found that the biting rhythm of dengue vectors was different from previous studies. Both species frequently fed on humans during daytime from dawn to dusk, but they sometimes also seek for blood meal at night. Biting rates of *Ae. aegypti* were high in summer while those of *Ae. albopictus* were in winter. The semi-nested RT-PCR technique was used to detect dengue virus in both species to demonstrate prevalence of the virus in mosquito vectors. It was found that 4 serotypes of dengue viruses were detected in both vector collected from 25 provinces. The prevalence of each serotype of dengue viruses found in each vector varied from province to province, while the infection rates in *Ae. aegypti* were higher than those of *Ae. albopictus*. Occurrence of dengue viruses found in larvae and adult male mosquitoes reveals the role of transovarial transmission of dengue viruses in field populations of the vectors and elucidates circulation of dengue viruses in vectors in endemic areas. Double infections of two serotypes of dengue viruses were also detected in individual *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*. The incidence of multi-serotypes of dengue viruses found in field populations of both vectors in the same areas is suspected to initiate epidemic of dengue fever. Therefore, it needs to get rid of larval breeding places and personal protection from mosquito bites.

Key words: *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, Biology, Dengue infection rate

กรณีศึกษา : ความผิดพลาดในการคำนวณสถิติ จากค่าลอการิทึม

สุธน วงษ์ชัย* กิตติพงษ์ เกิดฤทธิ์** สุรศักดิ์ หมั่นพล* มะลิวัลย์ หอมจันทร์*
และพรหมภัสสร ดิษสระ*

*สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

**สำนักโรคติดต่อทางเดินหายใจ กรมควบคุมโรค ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ได้ทบทวนค่าสถิติของผลงานวิจัยการตรวจปริมาณไวรัส ซัยโตเมกาโลไวรัส (Cytomegalo virus, CMV) ที่นำเสนอในวารสารระดับนานาชาติ (J Mol Diagn. Mar 2009; 11(2): 87-92.) พบความผิดพลาดจากการคำนวณที่ละเอียดถี่ถ้วน การคำนวณตัวเลขลอการิทึม ทำให้ค่าเฉลี่ยคณิตศาสตร์ต่ำกว่าค่าที่ถูกต้อง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณจากค่าลอการิทึมโดยตรงมีค่าผิดพลาดในทางต่ำกว่าค่าที่ถูกต้อง ทำให้ได้ข้อสรุปที่ผิดพลาดว่า ผลเฉลี่ยจากการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ 23 แห่ง ได้ผลไม่แตกต่างจากค่าอ้างอิง และส่งผลให้สถิติทั้งหมดที่ใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานผิดพลาดทั้งหมดคือ Pair t-test, 95% Confidence Intervals, Coefficient of Variance, Correlation Coefficient และส่งผลต่อข้อสรุปของผู้ประพันธ์ที่ว่าผลตรวจวิเคราะห์ปริมาณ CMV ระหว่างห้องปฏิบัติการทั้ง 4 ระดับนั้น มีค่าไม่แตกต่างกัน ทำให้ผู้ประพันธ์ลดความสำคัญเรื่องความผันแปรของค่า CMV load ในการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ แต่ไปให้ความสำคัญกับเชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบ

บทนำ

ลอการิทึมเป็นวิธีการนำเสนอและคำนวณข้อมูลตัวเลขยกกำลังให้สะดวกขึ้น ส่วนประกอบของตัวเลขลอการิทึมมี 2 ส่วน คือ ตัวเลขหน้าจุดทศนิยม (Characteristic) ระบุระดับเลขยกกำลัง ตัวเลขหลังจุดทศนิยม (Mantissa) แสดงตัวเลขนัยสำคัญของการวัด ในบทความนี้จะใช้ลอการิทึมฐาน 10 โดยละค่าฐานไว้ในที่เข้าใจ ลอการิทึม ประดิษฐ์ขึ้นโดย John Napier of Merchiston นักคณิตศาสตร์ นักฟิสิกส์ นักดาราศาสตร์ และ นักวิทยาศาสตร์ ชาวสกอตผู้มีชีวิตอยู่ ค.ศ. 1550-1617 ได้ตีพิมพ์ลอการิทึมครั้งแรกเมื่อ ค.ศ. 1614 ที่เมืองเอดินเบิร์ก เป็นภาษาละติน ชื่อ Merifici Logarithmorum Descriptio และแปลเป็นภาษาอังกฤษใน ค.ศ. 1616

กฎพื้นฐานในการคำนวณลอการิทึมที่เกี่ยวข้องใช้แค่ การบวกและการลบเลขลอการิทึมให้เป็นการคูณและการหาร ตามลำดับ ดังตัวอย่างข้างล่าง

การบวก	$\log M + \log N = \log (M*N)$
ตัวอย่างการคำนวณ	$\log 5 + \log 2 = \log (5*2) = \log 10 = 1$
ขณะที่	$\log 5 = 0.699, \log 2 = 0.301$
	หากบวกค่าลอการิทึมโดยตรงจะได้ $\log 7$ ซึ่งมีค่า $\text{antilog } 7 = 0.845$
การลบ	$\log M - \log N = \log (M/N)$
ตัวอย่างการคำนวณ	$\log 5 - \log 2 = \log (5/2) = \log 2.5 = 0.398$
	หากนำค่าลอการิทึมมาลบโดยตรงจะได้ $\log 3$ ซึ่งมีค่า $\text{antilog } 3 = 0.477$

จะเห็นว่าการคำนวณที่ใช้ค่าลอการิทึมจำเป็นต้องใช้กฎการคำนวณของลอการิทึม ไม่ใช่การบวกหรือลบตัวเลขลอการิทึมโดยตรง ทางเลือกสำหรับผู้ไม่สันทัด อาจแปลงค่าลอการิทึมกลับเป็นตัวเลขยกกำลัง ซึ่งเป็นค่าสัมบูรณ์ที่ใช้คำนวณโดยตรงได้

วิธีการ

ในบทความนี้จะใช้ข้อมูลระดับไวรัส CMV จากการเปรียบเทียบระหว่าง 23 ห้องปฏิบัติการ ที่รายงานในวารสาร J Mol Diagn. Mar 2009; 11(2): 87-92 เรื่อง **Multi-Site PCR-Based CMV Viral Load Assessment-Assays Demonstrate Linearity and Precision, but Lack Numeric Standardization.** A Report of the Association for Molecular Pathology ซึ่งได้รับอนุญาตให้ใช้ข้อมูลจากเจ้าของลิขสิทธิ์ บริษัท Elsevier Inc., ใช้โปรแกรมสถิติของเอกเซล แต่เปลี่ยนข้อมูลลอการิทึมเป็นค่าสัมบูรณ์ก่อนคำนวณตัวสถิติทั้งหมด แล้วแปลงค่าที่คำนวณได้เป็นลอการิทึม (ตารางที่ 1 และ 2)

ตารางที่ 1 ข้อมูลระดับ CMV load, copies/ml จาก 23 ห้องปฏิบัติการ ในค่าลอการิทึม
* ค่าที่ไม่แสดงในตารางเป็นค่าที่ต่ำกว่า 50 copies/ml

ค่าเฉลี่ยระดับ CMV load จากสมาชิก 23 ห้องปฏิบัติการ				
Laboratory	CMV Viral 2.70 copies/ml	DNA 3.70 copies/ml	Panels 4.70 copies/ml	5.70 copies/ml
1	4.12	4.37	5.08	5.97
2	*	*	4	4.78
3	3.27	4.04	5.18	5.74
4	2.92	3.89	5.01	5.75
5	2.54	3.17	4.47	5.02
6	3.02	3.64	4.79	5.94
7	3.53	4.72	5.77	6.58
8	3.06	3.98	4.97	6.02
9	2.79	3.59	4.76	5.7
10	3.36	4.31	5.27	6.25
11	2.77	3.84	4.92	5.93
12	2.98	3.76	4.63	5.68
13	2.59	3.8	4.71	5.66
14	4.08	5.2	6.1	7.25
15	2.04	3.2	4.26	5.56
16	2.71	3.68	4.73	5.67
17	*	3.45	4.14	4.75
18	2.51	3.5	4.62	5.63
19	*	3.29	4.3	4.97
20	2.6	3.68	4.72	5.68
21	2.53	3.54	4.46	5.47
22	2.3	2.95	3.74	4.83
23	3.41	4.3	5.04	5.45
Mean	2.96	3.81	4.77	5.66

(ที่มา: ประยุกต์จากตารางที่ 2 ของเอกสารอ้างอิง 2 ได้รับอนุญาตให้ใช้ได้ จากเจ้าของลิขสิทธิ์ บริษัท Elsevier Inc.,)

ผล

ค่าของตัวสถิติจากวารสารที่ศึกษาที่คำนวณจากค่าลอการิทึมโดยตรง และไม่ทำตามกฎการคำนวณบวกหรือลบค่าลอการิทึมเปรียบเทียบกับค่าตัวสถิติที่คำนวณจากค่าสัมบูรณ์ได้แสดงรายละเอียดในตารางที่ 2 ดังนี้

1. ค่าเฉลี่ยทางคณิตศาสตร์ที่แสดงในวารสารเป็นค่าที่คำนวณผิดอย่างชัดเจน เนื่องจาก

- 1.1 คำนวณค่าเฉลี่ยทางคณิตศาสตร์จากค่าลอการิทึมโดยไม่ทำตามกฎการบวกค่าลอการิทึม
- 1.2 ค่าที่ต่ำกว่าขีดจำกัดในการตรวจที่ 50 copies/ml พบ 3 ค่า เมื่อตรวจตัวอย่างอ้างอิงที่ 500 copies/ml และค่าที่ต่ำกว่าขีดจำกัดในการตรวจที่ 50 copies/ml พบ 1 ค่า เมื่อตรวจตัวอย่างอ้างอิงที่ 5000 copies/ml ถูกเฉลี่ยไม่นำมาคำนวณด้วย ทั้งๆ ที่อาจจะมีค่า ตั้งแต่ 0 - 50 copies/ml ทำให้ค่าเฉลี่ยทางคณิตศาสตร์สูงกว่าค่าที่ควรจะเป็น

จากตารางที่ 2 ค่าอ้างอิงของเชื้อมาตรฐานที่ใช้มีค่าลอการิทึมเป็น 2.7, 3.7, 4.7 และ 5.7 หรือ 500, 5000, 50000, 500000 copies/ml ขณะที่ค่าเฉลี่ยทางคณิตศาสตร์ในวารสารเป็น 2.96, 3.81, 4.77, 5.66 หรือ 912, 6457, 58884 และ 4570888 copies/ml ตามลำดับ เมื่อทดสอบทางสถิติด้วย Paired t-test, two tail, $t = 0.345$, $p = 0.376$ สรุปว่าค่าที่ได้จาก 23 ห้องปฏิบัติการ ไม่แตกต่างจากค่าอ้างอิง

หากคำนวณค่าเฉลี่ยทางคณิตศาสตร์โดยใช้กฎการบวกของลอการิทึมจะได้ค่าเฉลี่ยลอการิทึมเป็น 3.33, 3.81, 4.77, 5.66 หรือ 2156, 16147, 138298 และ 1404755 copies/ml ตามลำดับ เมื่อทดสอบทางสถิติด้วย Paired t-test, two tail, $t = 25.8855$, $p = 0.0008$ สรุปว่าค่าที่ได้จาก 23 ห้องปฏิบัติการ แตกต่างจากค่าอ้างอิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2. ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและสถิติอื่นๆ ที่ใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานร่วมในการคำนวณที่แสดงในวารสารเป็นค่าที่คำนวณผิดอย่างชัดเจนเพราะไม่ทำตามกฎการลบค่าลอการิทึมรวมถึงความผิดพลาดในข้อ 1.1 และ 1.2

- 2.1 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในวารสารเป็น 0.54, 0.53, 0.53, 0.58 คิดเป็น 3.5, 3.4, 3.4, 3.8 copies/ml ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปไม่ได้ หากการขีดจำกัดในการตรวจหาอยู่ที่ 50 copies/ml

หากคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยใช้กฎการลบของลอการิทึมจะได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานลอการิทึมเป็น 3.57, 4.53, 5.43 และ 6.56 หรือ 3684, 33816, 271659, 3656718 copies/ml ตามลำดับ

- 2.2 ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variance). ในวารสารเป็น 18.40%, 13.86%, 11.17% และ 10.20% ขณะที่คำนวณจากค่าสัมบูรณ์เป็น 171%, 209%, 196%, 256% ตามลำดับ ทำให้ข้อสรุปของผู้ประพันธ์ผิดพลาด ที่ว่า ค่าที่เปลี่ยนแปลงในระดับ 3-5 เท่า มีนัยสำคัญต่อการรักษา

- 2.3 ค่าระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากวารสารที่คำนวณเป็นค่าลอการิทึม 0.24, 0.22, 0.22, 0.24 หรือประมาณ 1.7 copies/ml ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปไม่ได้หากการขีดจำกัดในการตรวจหาอยู่ที่ 50 copies/ml

หากคำนวณค่าระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้กฎการลบของลอการิทึมจะได้ค่าระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ลอการิทึม เป็น 1.56, 1.89, 2.22, 2.68 หรือ 1615, 14130, 119058, 1602598 copies/ml ตามลำดับ

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบค่าตัวสถิติที่คำนวณจากข้อมูลลอการิทึมโดยตรง กับค่าตัวสถิติที่คำนวณจากค่าสัมบูรณ์ โดย CMV load ของตัวอย่างอ้างอิงเป็น copies/ml อยู่ในค่าลอการิทึมและค่าสัมบูรณ์ แสดงในวงเล็บ

	2.70 (500) copies/ml	3.70 (5000) copies/ml	4.70 (50000) copies/ml	5.70 (500000) copies/ml
1. ค่าที่คำนวณจากลอการิทึมโดยตรง				
1.1 ค่าเฉลี่ยคณิตศาสตร์	2.96 (912)	3.81 (6457)	4.77 (58884)	5.66 (457088)
1.2 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.54 (3.5)	0.53 (3.4)	0.53 (3.4)	0.58 (3.8)
1.3 ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%)	18.40	13.86	11.17	10.20
1.4 ค่าระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (+/-)	0.24 (1.7)	0.22 (1.7)	0.22 (1.7)	0.24 (1.7)
2. ค่าที่คำนวณจากค่าสัมบูรณ์หรือใช้กฎการบวกหรือลบค่าลอการิทึมแล้วแปลงกลับเป็นค่าลอการิทึม				
2.1 ค่าเฉลี่ยคณิตศาสตร์	3.33 (2156)	4.21 (16147)	5.14 (138298)	6.15 (1404755)
2.2 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	3.57 (3680)	4.53 (33800)	5.43 (272000)	6.56 (3660000)
2.3 ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%)	171	209	196	256
2.4 ค่าระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (+/-)	3.57 (1610)	4.53 (14100)	5.53 (111000)	6.56 (1602598)

วิจารณ์

สรุปความผิดพลาดจากการละเลยกฎการคำนวณค่าลอการิทึมและผลกระทบในการคำนวณค่าสถิติต่าง ๆ ที่นำเสนอในวารสาร J Mol Diagn. Mar 2009; 11(2): 87-92 เรื่อง Multi-Site PCR-Based CMV Viral Load Assessment-Assays Demonstrate Linearity and Precision, but Lack Numeric Standardization. A Report of the Association for Molecular Pathology. ดังนี้

1. ค่าเฉลี่ยทางคณิตศาสตร์ที่แสดงในวารสารเป็นค่าที่คำนวณผิด ได้ค่าต่ำกว่าค่าที่เป็นจริงตามการทดลอง ส่งผลให้ผู้รายงานสรุปว่า ค่า CMV load ที่ได้จากห้องปฏิบัติการ 23 แห่ง ไม่แตกต่างจากค่าอ้างอิง ทั้ง ๆ ที่ค่าดังกล่าวแตกต่างจากค่าอ้างอิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หากผู้วิจัยได้คำนวณอย่างถูกต้อง จะต้องยุติการศึกษาในขั้นต่อไป แล้วเริ่มต้นวิเคราะห์หาสาเหตุแห่งความผิดพลาดนี้

2. ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและสถิติอื่น ๆ ที่ใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานร่วมในการคำนวณที่แสดงในวารสารเป็นค่าที่ต่ำกว่าค่าที่เป็นจริง ทำให้สรุปว่าความแม่นยำระหว่างห้องปฏิบัติการ อยู่ในระดับที่เปรียบเทียบกันได้ และได้แสดงค่าความแม่นยำที่ต่ำกว่าจะเป็นจริงได้ อาทิ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในวารสารเป็นค่าลอการิทึมเป็น 0.54, 0.53, 0.53,

0.58 คิดเป็น 3.5, 3.4, 3.4, 3.8 copies/ml ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปไม่ได้ หากขีดจำกัดในการตรวจหาอยู่ที่ 50 copies/ml

3. ค่าสถิติที่ใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในการคำนวณผิดพลาดทั้งหมด เช่น ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน และค่าระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ได้ค่าต่ำเกินจะเป็นจริงในทางปฏิบัติได้ โดยแสดงค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเพียง 10-20% ส่วนค่าระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 บวกลบเพียง 2 copies/ml ทำให้ผู้วิจัยสรุปผิดว่าผลตรวจที่เปลี่ยนแปลงในระดับ 3-5 เท่า มีนัยสำคัญต่อการรักษา

สรุป

การคำนวณชุดข้อมูลที่เป็นลอการิทึมต้องทำตามกฎของลอการิทึม หากคำนวณโดยเพิกเฉยต่อกฎทำแบบตัวเลขปกติจะได้ผลลัพธ์ทางคณิตศาสตร์ที่ผิดพลาด ผลการวิเคราะห์ทางสถิติผิดพลาด ได้ผลสรุปที่ผิดพลาด และอาจนำไปสู่การใช้งานทางคลินิกที่ผิดพลาด หากเป็นผลงานวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในบทความที่ใช้เป็นกรณีศึกษาครั้งนี้ สรุปว่าผลตรวจ CMV load ระหว่าง 23 ห้องปฏิบัติการ มีค่าไม่แตกต่างกันหรือ เปรียบเทียบกันได้นั้น เป็นการสรุปที่ผิดพลาดเนื่องจาก ได้ละเลยการใช้กฎการคำนวณลอการิทึม ซึ่งแท้ที่จริงแล้ว ผลตรวจ CMV load ระหว่าง 23 ห้องปฏิบัติการ มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผู้วิจัยต้องค้นหาสาเหตุของความแตกต่างกัน ก่อนที่จะเปรียบเทียบค่า CMV load ระหว่างห้องปฏิบัติการต่อไป ผู้เขียนบทความได้แสดงวิธีการและข้อควรระวังไว้ในกลุ่มเฟสบุ๊ค อี เลินนี่ <https://www.facebook.com/groups/labqualitycenter> เรื่อง คำนวณลอการิทึม ระวังพลิกล็อก ตั้งแต่ พ.ศ. 2555 แต่ไม่มีประจักษ์พยานที่เป็นวารสารตีพิมพ์ ข้อมูลจากวารสารฉบับนี้จึงเป็นเพียงตัวอย่างการคำนวณที่ละเลยความหมายและกฎของลอการิทึม

เอกสารอ้างอิง

1. John Napier. [online]. 2014 [cited 2014 Oct 16]: [6 screens]. Available from: URL: http://en.wikipedia.org/wiki/John_Napier
2. Wolff DJ, Heaney DL, Neuwald PD, Stellrecht KA, Press RD. Multi-site PCR-based CMV viral load assessment—assays demonstrate linearity and precision, but lack numeric standardization: a report of the association for molecular pathology. J Mol Diagn 2009; 11(2): 87-92.
3. การคำนวณค่าล็อกการิทึม. [ออนไลน์]. 2558; [สืบค้น 28 ม.ค. 2558]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://www.facebook.com/groups/labqualitycenter>

Failure in Calculating The Statistics from Logarithm Values: Case Study

Suthon Vongsheree* Kittipoong Keardrit** Surasak Muenphon*
Maliwan Homchan* and Prompussorn Dissara*

**Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nontaburi 11000. Thailand. **Bureau of the Vector-Borne Diseases, Department of Diseases Control, Tiwanond Road, Nontaburi 11000. Thailand.*

ABSTRACT The statistics of an article on multi-center evaluation of the viral loads (Cytomegalo virus, CMV) presented in international journals (J Mol Diagn. Mar 2009; 11 (2): 87-92., were reviewed to check the validity of statistical calculation by using logarithmic rules. There were gross errors in log calculation of the means CMV loads which lead to missed conclusion that CMV loads amongst 23 laboratories were not different from the reference values, statistically. The Standard deviations (SD) was missed calculated from the log values directly, resulting in lower SD, compared to those calculated by using the absolute values. All statistics those using SD were miss-calculated : the pair t-test, 95% confidence intervals, Coefficient of Variance, Correlation Coefficient and affected the conclusions of the author that there was no difference in CMV load determination amongst these 23 laboratories. Hence, the significant CMV load variation amongst 23 laboratories were neglected and the need for reference materials were over-emphasized.

Key words: miss calculation, Logarithmic data, error means and SD



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

ซอยโรงพยาบาลบำราศนราดรุร 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