

วารสาร



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 56 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2557 Vol. 56 No. 2 April – June 2014

ISSN 0125-684X

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยและแลกเปลี่ยนความรู้ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ ที่ปรึกษาด้านบริหาร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นพ.อภิชัย มงคล พญ.วารุณี จินารัตน์	ภญ.จุรีภรณ์ บุญยวงศ์โรจน์ นพ.วันชัย สัตยาวิวัฒน์พงศ์
ที่ปรึกษาด้านวิชาการ	ภญ.อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์ ภญ.ดร.จงดี ว่องพินัยรัตน์ ภญ.สุภัทรา อิ่มเอิบ ดร.ปณิตดา ชิลวา	พญ.มยุรา กุสุมภ์ นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท ภญ.ดร.สุมล ปวีตรานนท์
บรรณาธิการ	สพญ.ดร.เยาวภา พงษ์สุวรรณ	
คณะบรรณาธิการ	ศ.นพ.สมชัย บวรกิตติ ศ.ดร. อรษา สุตเธียรกุล ดร.อารี ทัตติยพงศ์ นายศิริ ศรีมนโรถ นางกนกพร อธิสุข นายสุธน วงษ์ชีรี ดร.สุวรรณา เขียรอังกูร ดร.วิมล เพชรกาญจนาพงศ์ ภญ.ดร.เจริญดี ปิงสุทธีวงศ์ ดร.อารีรัตน์ ส่างแสง	ศ.ดร.นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล ศ.ดร.พิไลพันธ์ พุทธิวัฒนะ นางสาวจุไร โชติธนาทวิวงศ์ ดร.อุษาวดี ถาวร นางวิษชุดา จริยะพันธ์ นางสาวมาลินี จิตตกานต์พิชัย นางสิริภากร แสงกิจพร ดร.ประไพ วงศ์สินคมนตรี ภญ.ดร.วัลย์ลักษณ์ เมธาภัทร
เลขานุการ	นางไพรวรรณ บุญวงศ์	
ฝ่ายธุรการ	นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ นางสาวประสาน จุลวงศ์	
กำหนดออก อัตราสมาชิก	ราย 3 เดือน ในประเทศปีละ 200.- บาท ต่างประเทศปีละ 50.00 เหรียญสหรัฐอเมริกา	
สำนักงานวารสาร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 88/7 ซอยติวานนท์ 14 ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000 โทร. 0-2951-0000 โทรสาร 0-2951-1297	
พิมพ์ที่	หจก. อรุณการพิมพ์ 457/6-7 ถนนพระสุเมรุ แขวงบวรนิเวศ เขตพระนคร กรุงเทพฯ 10200 โทร. 0-2282-6036	

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 56 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2557

Vol. 56 No. 2 April – June 2014

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การตรวจหาดีเอ็นเอปนเปื้อนจาก **host cell** ในยาที่ผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพ 61
รัชฎาภรณ์ คงเมือง และบุญทริกา บุญญาภิวัฒน์
- การจัดทำสนามรังสีสำหรับการสอบเทียบค่ามาตรฐานเครื่องสำรวจรังสี 75
ประเชิญ เชษฐสิงห์ และรณยุทธ ไพศาล
- ผลของความหนาต่อค่าความดันและปริมาตรขณะแตกของถุงยางอนามัย 83
วันเพ็ญ ดวงสว่าง และสุภาวรรณ จงธรรมวัฒน์

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

- การศึกษาพฤติกรรมการบริโภคอาหารเพื่อประเมินความเสี่ยงด้านจุลชีววิทยา 91
ปราณี นาคประสิทธิ์ สันตกิจ นิลอุดมศักดิ์ และอุบลวรรณ รอดประดิษฐ์
- คุณภาพยาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูลในประเทศไทย 100
วิภาพรรณ ไสยสมบัติ สุภาณี ดวงธีรปรีชา และประสิทธิ์ โอภาส

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 56 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2557

Vol. 56 No. 2 April – June 2014

CONTENTS

Page

Original Articles

- Detection of Residual Host Cell DNA in Biotechnological Drugs** 61

Rassadaphorn Kongmoung and Boontarika Boonyapiwat

- Establishment of Known Radiation Fields for Calibration of Survey Meter** 75

Prachern Chettasingh and Roonnayut Phaisan

- The Result of Thickness to Bursting Pressure and Bursting Volume of Natural Latex Rubber Condoms** 83

Wanpen Duangsawang and Supawan Chongthamawa

Laboratory Findings

- Study on Food Consumption Behavior for Microbiological Risk Assessment** 91

Pranee Nakprasit Santakit Ninudomsak and Ubonwan Rodpradit

- The Quality of Dicloxacillin Sodium Capsules in Thailand** 100

Wipapan Saiyasombat Supanee Duangteraprecha and Prasit Opas



บทบรรณาธิการ



สวัสดีท่านผู้อ่านวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ฉบับที่ 2 ปีที่ 56 ที่เคารพทุกท่าน นับแต่ฉบับนี้เป็นต้นไป จะเป็นการดำเนินงานของคณะบรรณาธิการวารสารฯ ชุดใหม่ ซึ่งเราได้รับความกรุณาจากท่านผู้ทรงคุณวุฒิและผู้เชี่ยวชาญด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ ให้เกียรติรับเป็นคณะบรรณาธิการวารสารฯ จากภายนอกกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 4 ท่าน คือ ศาสตราจารย์ นพ.สมชัย บวรกิตติ ราชบัณฑิตสาขาแพทยศาสตร์ ศาสตราจารย์ ดร.อรชา สุตเธียรกุล คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาสตราจารย์ ดร. นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล และศาสตราจารย์ ดร.พิไลพันธ์ พุฒินะ คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล รวมทั้งที่ปรึกษาด้านบริหารซึ่งเป็นผู้บริหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ คือ นายแพทย์อภิชัย มงคล อธิบดี และรองอธิบดี 3 ท่าน นางจุริภรณ์ บุญยวงศ์วิโรจน์ แพทย์หญิงวารุณี จินรัตน์ และนายแพทย์วันชัย สัตยาอุทัยพงศ์ สำหรับที่ปรึกษาด้านวิชาการมีหลายท่านที่เคยเป็นบรรณาธิการวารสารฯ และหลายท่านเช่นกันที่เคยปฏิบัติหน้าที่เป็นผู้ทรงคุณวุฒิในสำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ ส่วนคณะบรรณาธิการซึ่งมีรายชื่ออยู่หลังปกของวารสารฯ ก็ล้วนแต่เป็นผู้เชี่ยวชาญสาขาต่างๆ ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ในกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ดิจันในฐานะบรรณาธิการวารสารฯ ต้องขอขอบคุณทุกท่านเป็นอย่างยิ่ง

ในวารสารเล่มนี้ยังคงมีบทความวิชาการที่เต็มไปด้วยข้อมูลที่น่าสนใจเช่นเดิม เป็นนิพนธ์ต้นฉบับ 3 เรื่อง เรื่องที่ 1 การตรวจหาดีเอ็นเอปนเปื้อนจากเซลล์เจ้าบ้านในยาที่ผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพ โดย คุณรัชฎาภรณ์ คงเมือง และคณะ เรื่องที่ 2 การจัดทำสนามรังสีสำหรับการสอบเทียบค่ามาตรฐานเครื่องสำรวจรังสี โดย คุณประเชิญ เชษฐสิงห์ และคณะ และเรื่องที่ 3 ผลกระทบของความหนาต่อค่าความดันและปริมาตรขณะแตกของถุงยางอนามัย โดยคุณวันเพ็ญ ดวงสว่าง และคณะ และเป็นรายงานทางห้องปฏิบัติการ 2 เรื่อง คือ การศึกษาพฤติกรรมกรรมการบริโภคอาหารเพื่อการประเมินความเสี่ยงด้านจุลชีววิทยา รายงานโดย คุณปราณี นาคประสิทธิ์ และคณะ และเรื่อง คุณภาพยาไดคลอก-ซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูลในประเทศไทย โดย คุณวิภาพรรณ ไสยสมบัติ และคณะ

ขอขอบคุณผู้ทบทวนบทความทุกท่าน (Reviewer) ในฉบับนี้ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะแก่ผู้นิพนธ์จนได้บทความที่สมบูรณ์เชิญ ผู้อ่านทุกท่านติดตามข้อมูลรายละเอียดของนิพนธ์ต้นฉบับและรายงานทางห้องปฏิบัติการตามที่กล่าวแล้ว เรายินดีที่จะรับข้อเสนอแนะจากทุกท่านเพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ต่อไป

ดร.เยวภา พงษ์สุวรรณ
บรรณาธิการ

การตรวจหาดีเอ็นเอปนเปื้อนจาก host cell ในยาที่ผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพ

รัชฎาภรณ์ คงเมือง และบุญทริกา บุญญาภิวัฒน์

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ในการผลิต recombinant protein เพื่อใช้เป็นยารักษาโรคสำหรับมนุษย์ได้มีการนำ *Escherichia coli* K-12 มาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ดีเอ็นเอจากเซลล์เจ้าบ้านเป็นสารปนเปื้อนที่สำคัญชนิดหนึ่งที่จะต้องถูกกำจัดออกไป ในระหว่างขั้นตอนการผลิต ด้วยเหตุนี้จึงต้องมีการกำหนดปริมาณการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากเซลล์เจ้าบ้านในวัตถุดิบตัวยาสําคัญ วิธีการที่ใช้ในการตรวจดีเอ็นเอปนเปื้อนจากเซลล์เจ้าบ้านควรเป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว จำเพาะ และมีความไว การศึกษาในครั้งนี้จึงได้พัฒนาวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อใช้ตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอจาก *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์และยังได้ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีนี้ด้วย ผลการทดสอบพบว่าวิธี PCR ที่ใช้ตรวจหาดีเอ็นเอจาก *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์นี้มีขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ ความจำเพาะ ความถูกต้อง ความแม่นยำ และความคงทนเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานการทดสอบความถูกต้องของอาเซียน และสามารถดำเนินการทดสอบตั้งแต่ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง การทำปฏิกิริยา PCR และการตรวจวิเคราะห์ผลแล้วเสร็จภายใน 1 วัน วิธีนี้จึงเหมาะสำหรับตรวจหาดีเอ็นเอจาก *E. coli* K-12 ที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบอินซูลินของมนุษย์ได้

บทนำ

อินซูลินของมนุษย์ (human insulin) จัดเป็นยารักษาโรคชนิดผลิตภัณฑ์เทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnological product) หรือชีวเภสัชภัณฑ์ (biopharmaceutical product) ยากลุ่มนี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิตที่นำมาปรับปรุงดัดแปลงจนได้สารที่เป็นประโยชน์ในการรักษาโรค อินซูลินเป็นฮอร์โมนที่ผลิตจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อนมีหน้าที่สำคัญในการควบคุมเมตาบอลิซึมและการสะสมของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน เดิมอินซูลินที่ใช้ทางยาได้มาจากการสกัดตับอ่อนของหมูหรือวัวเพื่อนำมาใช้รักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน แต่เนื่องจากอินซูลินของสัตว์มีลำดับของกรดอะมิโนแตกต่างจากอินซูลินของมนุษย์ทำให้ผู้ป่วยบางรายเกิดการแพ้ยาจึงมีความพยายามคิดค้นวิธีการผลิตอินซูลินของมนุษย์มาใช้ในการรักษาทดแทน เริ่มจากดัดแปลงโครงสร้างอินซูลินของสัตว์ด้วยเอนไซม์และต่อมาได้มีการพัฒนาเทคโนโลยี Recombinant-DNA (rDNA) ทำให้สามารถผลิตยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการออกฤทธิ์จำเพาะเจาะจง ลดอาการแพ้ได้ผลผลิตปริมาณสูงและต้นทุนการผลิตต่ำ ด้วยเหตุนี้เทคโนโลยี rDNA จึงเป็นที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยารักษาโรคชนิดชีวเภสัชภัณฑ์อย่างแพร่หลาย⁽²⁾ ซึ่งโดยเทคโนโลยีนี้อินซูลินสามารถผลิตจากเซลล์เจ้าบ้านต่าง ๆ หลายชนิด ได้แก่ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* รวมทั้งแบคทีเรีย *E. coli*

E. coli เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่มีการนำมาใช้อย่างมากในงานด้านพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เพื่อใช้ผลิตโปรตีนโดยเฉพาะสายพันธุ์ K-12 เนื่องจากมีข้อดีดังนี้ คือ มีการศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาและทางพันธุศาสตร์มาแล้วอย่างละเอียดสามารถดัดแปลงด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมได้ง่าย จึงมีการพัฒนาสายพันธุ์อยู่เสมอเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่เหมาะสมในการใช้ตามวัตถุประสงค์ของงาน และประการสำคัญ คือ เชื้อ *E. coli* K-12 ไม่ก่อโรคในคน สัตว์และพืช^(3, 4) หลักการผลิตอินซูลินของมนุษย์ด้วยเทคโนโลยี rDNA ทำได้โดยการนำชิ้นส่วนของยีนที่แปลรหัสเป็นอินซูลินของมนุษย์ตัดต่อเข้าไปในดีเอ็นเอพาหะ (vector) แล้วนำผ่านดีเอ็นเอพาหะนั้นเข้าไปในเชื้อ *E. coli* K-12 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้าน เมื่อนำเชื้อ *E. coli* K-12 ที่มีดีเอ็นเอพาหะซึ่งมียีนของอินซูลินของมนุษย์แทรกอยู่ไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนในสภาวะที่เหมาะสม เชื้อ *E. coli* K-12 จะสามารถผลิตอินซูลินของมนุษย์ออกมาได้ในปริมาณมาก จากนั้นต้องผ่านกระบวนการแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์เพื่อกำจัดส่วนที่ไม่ต้องการออกเสียก่อน วัตถุประสงค์อินซูลินของมนุษย์ที่ได้จะถูกนำไปใช้ผลิตเป็นยาสำเร็จรูปในระดับอุตสาหกรรมต่อไป จะเห็นได้ว่าการผลิตอินซูลินของมนุษย์ด้วยเทคโนโลยีชีวภาพต้องผ่านกระบวนการผลิตที่ซับซ้อน ด้วยเหตุนี้จึงต้องมีการควบคุมคุณภาพอย่างเข้มงวด ดีเอ็นเอจากเซลล์เจ้าบ้านที่เหลืออยู่ (residual host cell DNA) เป็นสารปนเปื้อนจากกระบวนการผลิตต้องมีการกำหนดปริมาณการปนเปื้อนไว้ในข้อกำหนดเฉพาะมาตรฐานของวัตถุดิบด้วยสำคัญด้วย⁽⁵⁾ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีข้อกำหนดเกณฑ์มาตรฐานเฉพาะของตัวยาปริมาณการปนเปื้อนดีเอ็นเอจากเซลล์เจ้าบ้านที่ยอมรับได้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มา (source of the residual) และวิธีการบริหารยา (route of administration) โดย U. S. Department of Health and Human Service, Food and Drug Administration (US FDA) และ The European Agency of the Evaluation of Medicinal Products (EMA) ได้กำหนดปริมาณการปนเปื้อนดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้านไม่เกิน 100 pg/mg^(6, 7) ขณะที่ World Health Organization (WHO) กำหนดไว้ไม่เกิน 10 ng/mg⁽⁸⁾ วิธีที่เหมาะสมสำหรับตรวจหาการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้านในยาที่ผลิตโดยเทคโนโลยีชีวภาพจึงต้องเป็นวิธีที่มีความไวสูง เพื่อสามารถตรวจหาปริมาณการปนเปื้อนที่น้อยมากได้ ต้องสามารถตรวจปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยความเข้มข้นต่ำถึง 10 pg/mg⁽⁹⁾ นอกจากนี้ต้องเป็นวิธีที่จำเพาะและสะดวกรวดเร็ว เทคนิคหลักที่ใช้ตรวจหาดีเอ็นเอจากเซลล์เจ้าบ้านปัจจุบันมีอยู่ 4 เทคนิค ได้แก่ DNA hybridization, DNA-binding protein-based residual DNA assay (Threshold assay), Polymerase Chain Reaction (PCR) และ PicoGreen analysis⁽¹⁰⁾ การศึกษาครั้งนี้เลือกใช้เทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการผลิตยาอินซูลินของมนุษย์ โดยการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12

ที่สนใจ (gene marker) ในหลอดทดลอง แล้วตรวจวิเคราะห์ผลด้วยการทำ gel electrophoresis วิธี PCR ที่ได้พัฒนานี้ได้ทำการประเมินความถูกต้องของวิธีในหัวข้อ ดังนี้ คือ ขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ (detection limit), ความจำเพาะ (specificity), ความถูกต้อง (accuracy), ความแม่นยำ (precision) และความคงทน (robustness)

วัสดุและวิธีการ

เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน

เชื้อ *E. coli* K-12 ได้จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ส่วนเชื้อ *E. coli* ATCC 8739 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ได้จากกลุ่มตรวจคุณภาพเภสัชภัณฑ์ทางชีววิทยา สำนักยา และวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

Tryptone (Difco, USA), Yeast extract (Difco, USA), Sodium chloride (Sigma-Aldrich, Switzerland), Nuclease free water (Amresco, USA), 10 x TBE buffer (Invitrogen, USA), Agarose gel (Promega, USA), Ethidium bromide (Sigma, Switzerland), SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA), Hydrochloric acid (Carlo Erba, France), Isopropanol (Carlo Erba, France), Nucleospin[®] Tissue (Macherey-Nagel, Germany), DNA Extractor Kit (Wako, Japan), Fast Start Taq DNA Polymerase kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany)

เครื่องมือ

Thermal Cycler (Biorad, USA), Dry Bath Incubator (Major Science, Taiwan), Power Supply (Biorad, USA), UV Transilluminator with digital camera (Spectronics Corporation, USA), Microcentrifuge (Labnet, USA), Agarose Gel Electrophoresis (Biorad, USA), Weighing (Mettler, USA), UV Spectrophotometer (Shimadzu, Japan)

การเตรียม genomic DNA ของ *E. coli* K-12

เพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* K-12 ใน Luria Bertani (LB) medium ประกอบด้วย tryptone 1%, yeast extract 0.5% และ sodium chloride 1% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 คืน หลังจากนั้นสกัด genomic DNA ด้วย Nucleospin[®] Tissue (Macherey-Nagel, Germany) แล้วนำ genomic DNA ที่ได้วัดปริมาณความเข้มข้นที่ความยาวคลื่น 260 nm ด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer

การเตรียมตัวอย่างยาลินซูลินของมนุษย์ด้วย DNA Extractor Kit (Wako, Japan)

ละลายผงยาลินซูลินของมนุษย์ 1 mg ด้วย 0.1 N HCl ปริมาตร 100 µl แล้วสกัดดีเอ็นเอในยาด้วย DNA Extractor Kit เพื่อใช้เป็น template สำหรับทำปฏิกิริยา PCR

การตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 ด้วยวิธี PCR

PCR primers ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ O-antigen gene (*rfb*) cluster⁽¹¹⁾ ประกอบด้วย K12IS-L 5'-CGCGATGGAAGATGCTCTGTA-3' (nt293-313 on *IS5*) และ K12-R 5'-ATCCTGCGCACCAATCAACAA-3' (nt 508-488 on *orf264*) เตรียม PCR mixture ปริมาตร 50 µl

ใน microcentrifuge tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งประกอบด้วยคือ 1 × reaction buffer (50 mM Tris/HCl, 10 mM KCl, 5mM (NH₄)₂SO₄, pH 8.3), deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) ชนิดละ 200 μM, MgCl₂ 1.5 mM และ Taq DNA Polymerase 2.5 U ส่วนประกอบเหล่านี้เป็นของ Fast Start Taq DNA Polymerase kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany) primer K12IS-L และ K12-R อย่างละ 0.2 μM DNA template และ nuclease free water จากนั้นกำหนดโปรแกรมเครื่อง thermal cycler เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอดังนี้ คือ 1 รอบที่ 95.0 °C นาน 4 นาที และ 30 รอบที่ 94.0 °C นาน 30 วินาที, 60.0 °C นาน 30 วินาที, 72.0 °C นาน 1.5 นาที ตามด้วย 1 รอบที่ 72.0 °C นาน 2 นาที แล้วทำให้เย็นที่ 4.0 °C ในการทำปฏิกิริยา PCR ทุกครั้งต้องมี positive control ซึ่งเป็น genomic DNA ของ *E. coli* K-12 ปริมาณ 100 pg และ negative control ซึ่งเป็น nuclease free water เพื่อเป็นการประกันคุณภาพการทดสอบ หลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR จะได้ PCR product ขนาด 970 base pairs (bp) นำ PCR product ที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ขนาดด้วยการทำ gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1.0% ใน 1 × TBE buffer ความดันทานไฟฟ้า 100 โวลต์ นานประมาณ 1 ชั่วโมง เปรียบเทียบขนาดของแถบ PCR product ที่ได้กับ 100 bp DNA ladder (Promega, USA) ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอขนาด 1,500, 1,000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 และ 100 bp

การประเมินความถูกต้องของวิธีตรวจหาดีเอ็นเอปนเปื้อนจากเซลล์เจ้าบ้านในยาอินซูลินของมนุษย์ด้วยวิธี PCR

การทดสอบความถูกต้องของวิธีต้องเติม genomic DNA ของ *E. coli* K-12 ที่เตรียมขึ้นเองลงไปยาอินซูลินของมนุษย์ เพราะตัวอย่างของยาที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ตรวจไม่พบว่ามี การปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากเซลล์เจ้าบ้าน ยาอินซูลินของมนุษย์ที่ใช้ในการทดสอบผลิตมาจากเซลล์เจ้าบ้านชนิด *E. coli* K-12 ได้มาจากผู้ผลิตจำนวน 2 ราย คือ A และ B ยาจากผู้ผลิต A ใช้ทดสอบหัวข้อ ชีตจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ ความจำเพาะ ความถูกต้อง ความแม่นยำ และความคงทน ส่วนยาจากผู้ผลิต B ใช้ทดสอบหัวข้อความจำเพาะเท่านั้น

ชีตจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ (Detection Limit)

เตรียม genomic DNA ของ *E. coli* K-12 ให้มีความเข้มข้น 10 ng/μl, 1 ng/μl, 100 pg/μl, 10 pg/μl และ 1 pg/μl เติมดีเอ็นเอแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 μl ลงในผงยาอินซูลินของมนุษย์ 1 mg ซึ่งละลายอยู่ใน 0.1 N HCl ปริมาตร 100 μl แล้วดำเนินการต่อตามขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วย DNA Extractor Kit จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR

ความจำเพาะ (Specificity) แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ

- ผลของสายพันธุ์เชื้อและแบคทีเรียชนิดอื่น

เตรียม genomic DNA ของ *E. coli* K-12, *E. coli* ATCC 8739 และ *S. aureus* ATCC 6538 ความเข้มข้น 100 pg/μl เติมดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ปริมาตร 1 μl ลงในผงยาอินซูลินของมนุษย์ 1 mg ซึ่งละลายอยู่ใน 0.1 N HCl ปริมาตร 100 μl แล้วดำเนินการต่อตามขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วย DNA Extractor Kit จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR

- ผลของส่วนประกอบอื่นที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์

เตรียม genomic DNA ของ *E. coli* K-12 ความเข้มข้น 100 pg/μl ลงในผงยาอินซูลินของมนุษย์จากผู้ผลิต 2 ราย (A และ B) 1 mg ซึ่งละลายอยู่ใน 0.1 N HCl ปริมาตร 100 μl แล้วดำเนินการสกัดดีเอ็นเอที่อยู่ในยาและ 0.1 N HCl ต่อตามขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วย DNA Extractor Kit จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR

ความถูกต้อง (Accuracy)

เตรียม genomic DNA ของ *E. coli* K-12 ความเข้มข้น 100 pg/μl ลงในผงยาอินซูลินของมนุษย์ 1 mg ซึ่งละลายอยู่ใน 0.1 N HCl ปริมาตร 100 μl จำนวน 3 ชุดแล้วดำเนินการติดตามขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วย DNA Extractor Kit จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR เปรียบเทียบผลการทดสอบกับ genomic DNA ของ *E. coli* K-12 ความเข้มข้น 100 pg/μl ที่นำมาทำ PCR จำนวน 3 ชุดเช่นกัน

ความแม่นยำ (Precision) แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ

- Repeatability

เตรียม genomic DNA ของ *E. coli* K-12 ความเข้มข้น 100 pg/μl ลงในผงยาอินซูลินของมนุษย์ 1 mg ซึ่งละลายอยู่ใน 0.1 N HCl ปริมาตร 100 μl จำนวน 5 ชุดแล้วดำเนินการติดตามขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วย DNA Extractor Kit จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ภายในวันเดียวกันมาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR

- Intermediate precision

เตรียม genomic DNA ของ *E. coli* K-12 ความเข้มข้น 100 pg/μl ลงในผงยาอินซูลินของมนุษย์ 1 mg ซึ่งละลายอยู่ใน 0.1 N HCl ปริมาตร 100 μl แล้วดำเนินการติดตามขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วย DNA Extractor Kit จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR แล้วดำเนินการซ้ำตั้งแต่แรกโดยวันที่ทดสอบต่างกัน

ความคงทน (Robustness) ดำเนินการทดสอบ 2 สภาวะ

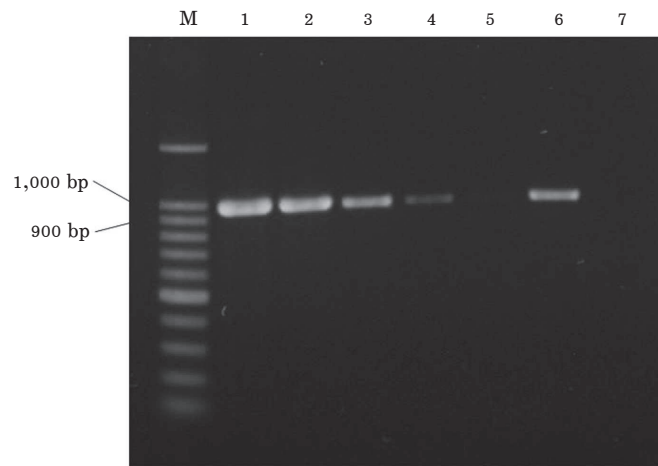
- เตรียมตัวอย่างเหมือนหัวข้อการหาขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์โดยเปลี่ยนแปลงโปรแกรมเครื่อง thermal cycler เพื่อเพิ่มจำนวนรอบของปฏิกิริยา PCR จาก 30 เป็น 35 รอบ
- หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR นำ PCR product ไปทำ gel electrophoresis เปลี่ยนชนิดสีย้อมดีเอ็นเอจาก SYBR® Safe DNA Gel Stain เป็น ethidium bromide

ผล

การประเมินความถูกต้องของการตรวจหาดีเอ็นเอปนเปื้อนจากเซลล์เจ้าบ้านในยาอินซูลินของมนุษย์ด้วยวิธี PCR

ขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์

จากการตรวจหาการปนเปื้อนของ DNA จาก *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์ด้วยวิธี PCR พบว่าผงยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 ปนเปื้อนความเข้มข้น 10 ng/mg, 1 ng/mg, 100 pg/mg และ 10 pg/mg ให้ผลเป็นบวกโดยตรวจพบแถบ PCR product ขนาด 970bp เช่นเดียวกับ positive control ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเห็นได้ชัดเจนและมีความแตกต่างกันตามปริมาณของดีเอ็นเอที่ปนเปื้อน สำหรับผงยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 ปนเปื้อนความเข้มข้น 1 pg/mg ให้ผลเป็นบวกเช่นเดียวกัน แต่แถบของ PCR product ที่เกิดขึ้นเห็นไม่ชัดเจน ส่วน negative control ให้ผลเป็นลบ คือ ไม่ปรากฏว่ามีแถบของดีเอ็นเอใด ๆ เกิดขึ้น (ภาพที่ 1) ด้วยวิธี PCR ที่พัฒนาในครั้งนี้นี้สามารถตรวจหาการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจาก *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์ความเข้มข้นต่ำที่สุด 10 pg/mg (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ชุดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์

Lane M : 100 bp DNA ladder

Lane 1 : PCR product ของยาคีนของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA 10 ng/mg

Lane 2 : PCR product ของยาคีนของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA 1 ng/mg

Lane 3 : PCR product ของยาคีนของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA 100 pg/mg

Lane 4 : PCR product ของยาคีนของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA 10 pg/mg

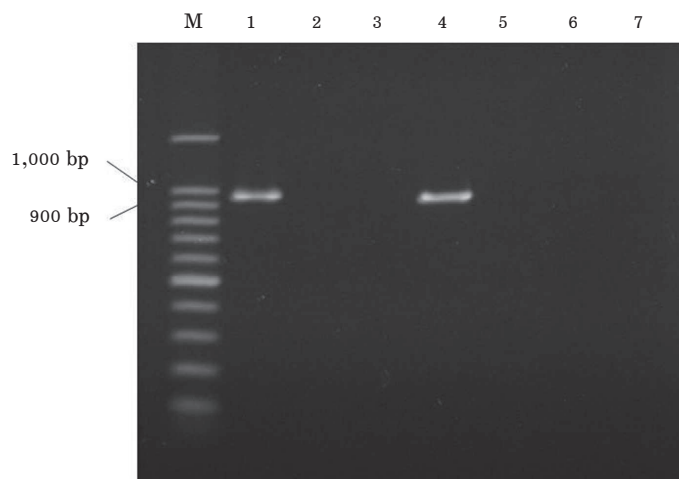
Lane 5 : PCR product ของยาคีนของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA 1 pg/mg

Lane 6 : Positive control

Lane 7 : Negative control

ความจำเพาะ

จากการตรวจหาการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากเชื้อ *E. coli* K-12, *E. coli* ATCC 8739 และ *S. aureus* ATCC 6538 ในยาคีนของมนุษย์ด้วยวิธี PCR พบว่าเฉพาะผงยาที่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจาก *E. coli* K-12 เท่านั้นที่ให้ผลเป็นบวก พบ PCR product ขนาด 970 bp เช่นเดียวกับ positive control ส่วนผงยาที่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ จาก *E. coli* ATCC 8739 และ *S. aureus* ATCC 6538 ให้ผลเป็นลบเช่นเดียวกับ negative control (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ความจำเพาะ โดยการทดสอบกับแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์

Lane M : 100 bp ladder

Lane 1 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12

Lane 2 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของ *E. coli* ATCC 8739

Lane 3 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของ *S. aureus* ATCC 6538

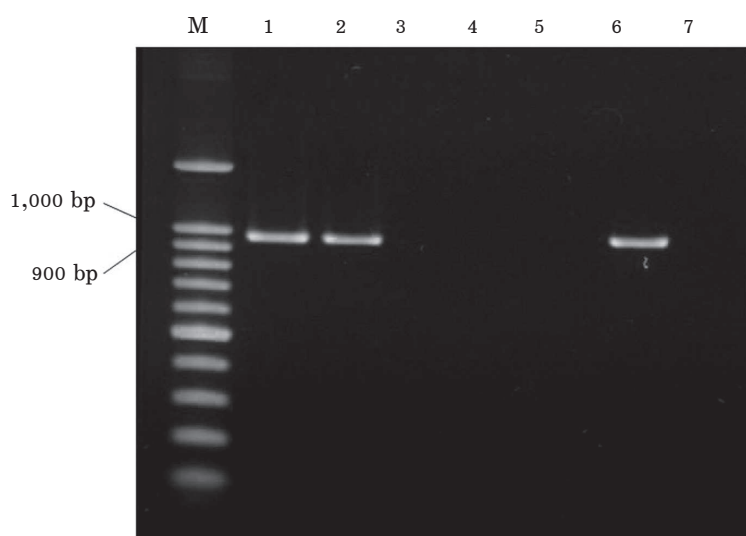
Lane 4 : PCR product จากดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 (Positive control)

Lane 5 : PCR product จากดีเอ็นเอของ *E. coli* ATCC 8739

Lane 6 : PCR product จากดีเอ็นเอของ *S. aureus* ATCC 6538

Lane 7 : Negative control

ส่วนการทดสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจาก *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์จากผู้ผลิต 2 ราย พบว่าผลทั้งหมดเป็นบวก ตรวจพบ PCR product ขนาด 970 bp เช่นเดียวกับ positive control ส่วนผลการทดสอบ 0.1 N HCl ซึ่งเป็น diluent ช่วยละลายผงยาพบว่า เป็นลบเช่นเดียวกับ negative control (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ความจำเพาะ โดยการทดสอบในสถานะที่มีส่วนประกอบในตัวอย่างที่แตกต่างกัน

Lane M : 100 bp ladder

Lane 1 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์จากผู้ผลิต A ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA

Lane 2 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์จากผู้ผลิต B ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA

Lane 3 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์จากผู้ผลิต A

Lane 4 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์จากผู้ผลิต B

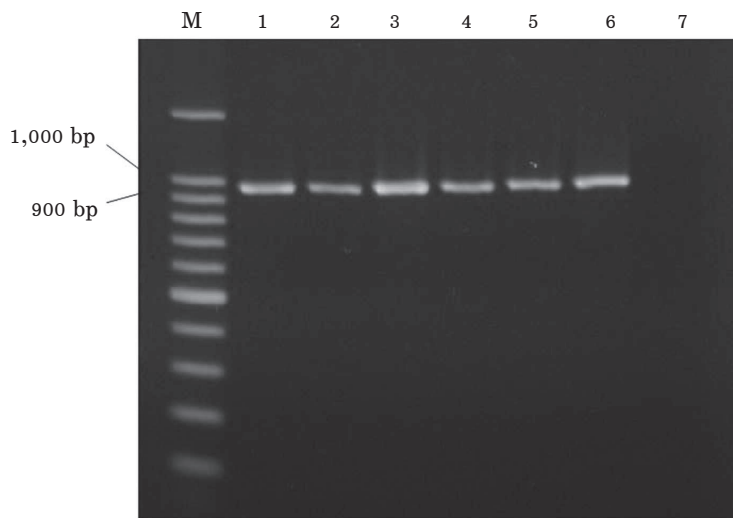
Lane 5 : PCR product ของ 0.1 N HCl

Lane 6 : Positive control

Lane 7 : Negative control

ความถูกต้อง

การตรวจหาการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์ทั้ง 3 ชุดให้ผลบวก เช่นเดียวกับ positive control ทั้ง 3 ชุด โดยตรวจพบ PCR product ขนาด 970 bp ส่วน negative control ตรวจไม่พบแถบของดีเอ็นเอใดๆ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ความถูกต้อง

Lane M : 100 bp ladder

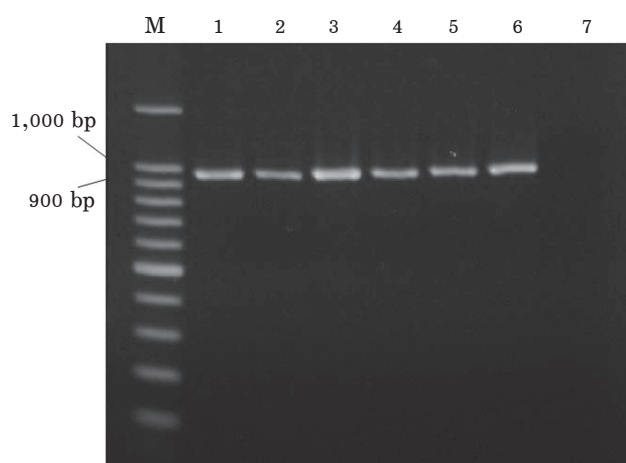
Lane 1, 2 และ 3: PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA

Lane 4, 5 และ 6: PCR product ของ host cell DNA (Positive control)

Lane 7 : Negative control

ความแม่นยำ

การตรวจหาการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์โดยการทำซ้ำภายในวันเดียวกัน ทั้งหมด 5 ชุด ให้ผลเป็นบวกเหมือนกันทั้งหมด ตรวจพบ PCR product ขนาด 970 bp เช่นเดียวกับ positive control ส่วน negative control ให้ผลเป็นลบ ตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอใดๆ (ภาพที่ 5) ส่วนการตรวจหาการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์โดยการทดสอบต่างวันพบว่าให้ผลเหมือนกัน คือ ยาที่มีการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 และ positive control ให้ผลบวก ตรวจพบ PCR product ขนาด 970 bp ส่วน negative control ให้ผลเป็นลบ ตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอใดๆ (ภาพที่ 6)



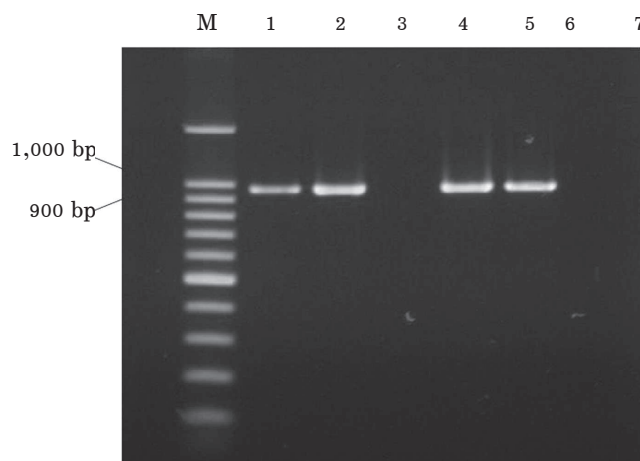
ภาพที่ 5 ความแม่นยำแบบ Repeatability

Lane M : 100 bp ladder

Lane 1, 2, 3, 4 และ 5: PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA ที่ทำการทดสอบในวันเดียวกัน

Lane 6 : Positive control

Lane 7 : Negative control



ภาพที่ 6 ความแม่นยำแบบ Intermediate precision

Lane M : 100 bp ladder

Lane 1 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA ทดสอบวันที่ 1

Lane 2 : Positive control ทดสอบวันที่ 1

Lane 3 : Negative control ทดสอบวันที่ 1

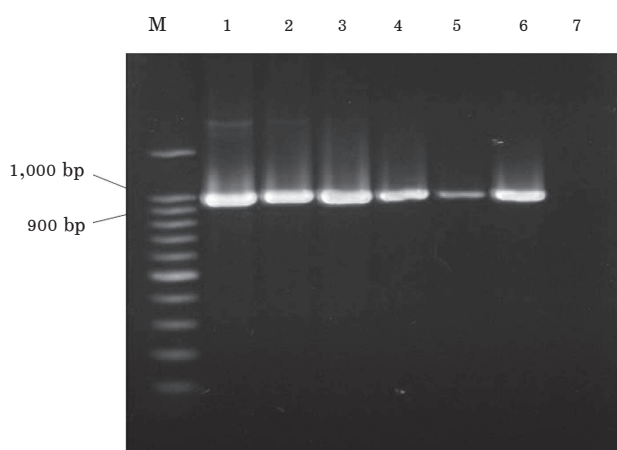
Lane 4 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA ทดสอบวันที่ 2

Lane 5 : Positive control ทดสอบวันที่ 2

Lane 6 : Negative control ทดสอบวันที่ 2

ความคงทน

การเพิ่มจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR จาก 30 รอบ เป็น 35 รอบ สามารถตรวจหาการปนเปื้อนจาก ดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์ปริมาณต่ำสุดได้ถึง 1 pg/mg ซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำกว่าการตรวจ โดยการทำปฏิกิริยา 30 รอบ พบ PCR product ขนาดเท่ากับ positive control คือ 970 bp แถบ PCR product ของการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอปริมาณ 1 pg/mg เห็นได้ชัดเจน ส่วนแถบ PCR product ของการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอ ปริมาณอื่นๆ ที่เกิดขึ้นจะหนามากกว่าการทำปฏิกิริยา PCR 30 รอบ ส่วน negative control ให้ผลเป็นลบตรวจ ไม่พบแถบดีเอ็นเอใดๆ (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ความคงทนของการทำปฏิกิริยา PCR 35 รอบ

Lane M : 100 bp DNA ladder

Lane 1 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA 10 ng/mg

Lane 2 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA 1 ng/mg

Lane 3 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA 100 pg/mg

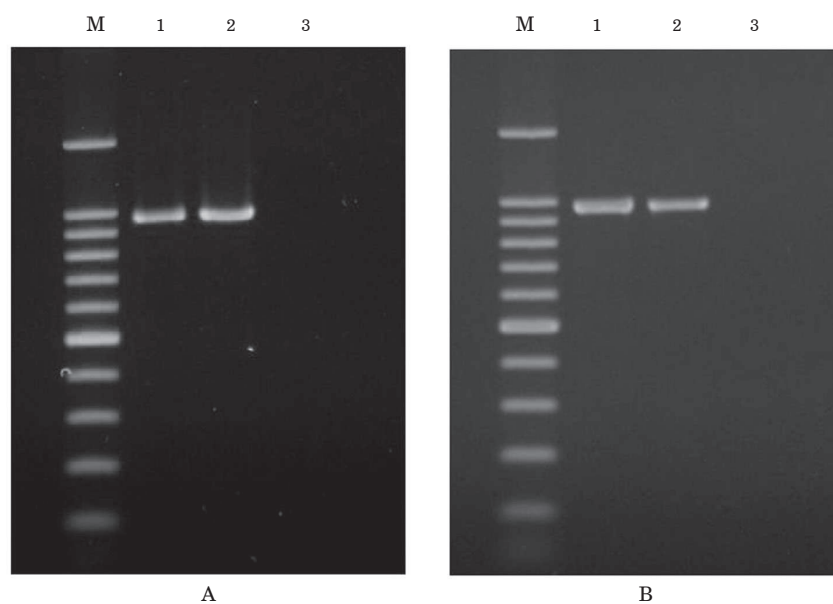
Lane 4 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA 10 pg/mg

Lane 5 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนจาก host cell DNA 1 pg/mg

Lane 6 : Positive control

Lane 7 : Negative control

การเปลี่ยนชนิดสีย้อมเพื่อตรวจสอบ PCR product ที่ได้ พบว่าการใช้สีย้อมทั้ง SYBR[®] Safe DNA Gel Stain และ ethidium bromide ให้ผลเหมือนกัน คือ ยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 และ positive control พบแถบ PCR product ขนาด 970 bp ส่วน negative control ให้ผลเป็นลบ สิ่งที่แตกต่างกันคือสีที่เกิดขึ้น สีของแถบ PCR product ที่ย้อมด้วย SYBR[®] Safe DNA Gel Stain จะติดสีเขียว ส่วนสีของแถบ PCR product ที่ย้อมด้วย ethidium bromide จะติดสีส้ม (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ความคงทนของสีย้อม DNA ระหว่าง SYBR[®]Safe DNA Gel Stain (A) และ ethidium bromide (B)

Lane M : 100 bp ladder

Lane 1 : PCR product ของยาอินซูลินของมนุษย์ที่มีการปนเปื้อนของ host cell DNA

Lane 2 : Positive control

Lane 3 : Negative control

วิจารณ์

ในกระบวนการผลิตยาโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพต้องมีการนำเซลล์เจ้าบ้านมาเพาะเลี้ยงหรือหมัก เพื่อให้มีการสร้างโปรตีนที่ต้องการในปริมาณที่เพียงพอ ก่อนที่จะนำมาทำให้บริสุทธิ์เพื่อกำจัดส่วนที่ไม่ต้องการออกไป ดีเอ็นเอจากเซลล์เจ้าบ้านทั้งที่มาจาก prokaryote, eukaryote, cell culture และเซลล์อื่นๆ ที่มีการปนเปื้อนมากับผลิตภัณฑ์ยา อาจทำให้เกิดมะเร็งหรือเกิดอาการข้างเคียงได้ ถึงแม้ว่ายังไม่มีรายงานว่าดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนจะส่งผลเสียต่อมนุษย์ แต่มีการรายงานตรวจพบผลเสียดังกล่าวแล้วในสัตว์ทดลอง การปนเปื้อนดีเอ็นเอจากเซลล์เจ้าบ้านจึงจำเป็นต้องทำการตรวจสอบ การตรวจหาดีเอ็นเอจากเซลล์เจ้าบ้านที่ปนเปื้อนในยาอินซูลินของมนุษย์ด้วยวิธี PCR ครั้งนี้เป็นการทดสอบแบบ limit test โดยกำหนดปริมาณการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจาก *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์ไว้ไม่เกิน 100 pg/mg เกณฑ์กำหนดมาตรฐานนี้คณะผู้วิจัยเลือกจากปริมาณการปนเปื้อนของดีเอ็นเอตามที่ US FDA และ EMEA ได้แนะนำไว้ ซึ่งเกณฑ์นี้มีความเข้มงวดกว่าของ WHO

การเตรียมตัวอย่างยาอินซูลินของมนุษย์เพื่อสกัดดีเอ็นเอก่อนนำไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วย commercial kit (DNA Extractor kit, Wako Chemicals) อาศัยหลักการทำงานของ chaotrope (sodium iodide) และ detergent (sodium N-lauroyl sarcosinate) ทำให้ดีเอ็นเอแยกออกจากยา จากนั้นดีเอ็นเอจะเกิดการตกตะกอนร่วมกับ glycogen ที่อยู่ใน isopropanol เนื่องจาก commercial kit ชนิดนี้สามารถสกัดดีเอ็นเอปริมาณน้อยๆ ได้ด้วยค่า recovery สูงถึง 80 - 120%⁽¹²⁾ จึงเหมาะสำหรับเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอปนเปื้อนในยาที่ผลิตจากเทคโนโลยีชีวภาพมากกว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วย phenol และ chloroform ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ทั่วไปในงานอณูชีววิทยา (molecular biology) ที่มีค่า recovery ต่ำ⁽⁹⁾

วิธี PCR ที่พัฒนาครั้งนี้มีความจำเพาะต่อเซลล์เจ้าบ้านเนื่องจาก primer คู่ที่ใช้เพิ่มขยายดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR นี้ออกแบบมาจากบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อ *E. coli* K-12 โดย primer คู่นี้ได้ถูกนำมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อ *E. coli* K-12 เพื่อประเมินความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการด้านพันธุวิศวกรรมศาสตร์⁽¹³⁾ การปนเปื้อนของดีเอ็นเอจาก *E. coli* ATCC 8739 ซึ่งเป็นตัวแทนของ *E. coli* สายพันธุ์อื่นและ *S. aureus* ATCC 6538 ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อแกรมบวกไม่สามารถเพิ่มขยายโดย primer คู่นี้ได้ ถึงแม้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้งสองชนิดดังกล่าวสูงถึง 100 ng ก็ยังให้ผลลบเช่นเดิมเป็นการยืนยันว่าวิธีนี้มีความจำเพาะสูงขณะที่วิธีอื่นที่ใช้ primer ที่ออกแบบมาจาก 16S ribosomal DNA ของ *E. coli* ไม่มีความจำเพาะต่อเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* K-12 เพราะ *E. coli* ทุกสายพันธุ์จะสามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอบริเวณนี้ได้⁽¹⁴⁾

ปฏิกิริยา PCR นี้เป็นปฏิกิริยาแบบ hot start PCR ซึ่งจะมีความแตกต่างจาก PCR แบบธรรมดา มีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันการเกิด PCR product ชนิดไม่จำเพาะ ซึ่งเกิดจากการเกาะของ primer เข้ากับสายแม่พิมพ์แบบไม่จำเพาะในช่วงเริ่มต้นของปฏิกิริยา ดังนั้นการเลือกใช้ Fast start Taq DNA polymerase ซึ่งเป็น DNA polymerase ที่มีการเติม blocking group ที่ไม่ทนความร้อนจับอยู่จะทำให้ DNA polymerase ไม่สามารถทำงานได้ในช่วงแรก จนกว่าจะมีการเพิ่มอุณหภูมิในหลอดทดลองสูงไปที่ 95 °C จนทำให้ blocking group ถูกขจัดออกไปแล้ว DNA polymerase จึงจะสามารถทำงานได้ ด้วยเหตุนี้ปฏิกิริยา PCR ที่เกิดจะมีความจำเพาะและประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นไปอีก⁽¹⁵⁾

หลังจากทำปฏิกิริยา PCR เสร็จสิ้นแล้วนำ PCR product มาตรวจสอบผลโดยการทำ gel electrophoresis ในการศึกษาใช้สีย้อม SYBR® Safe DNA gel แทน ethidium bromide เนื่องจากสีย้อม SYBR® Safe DNA gel เป็นสียชนิด fluorescent dye มีความปลอดภัยและความไวสูงกว่า ethidium bromide⁽¹⁶⁾

ตามแนวทางการทดสอบความถูกต้องของวิธีการทดสอบสารเจือปนในเชิงหาขีดจำกัด (limit test) ของอาเซียนได้กำหนดลักษณะเฉพาะเพียง 2 ลักษณะ คือ ขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์และความจำเพาะ⁽¹⁾ การทดสอบ

ครั้งนี้ได้ดำเนินการทดสอบลักษณะเฉพาะเพิ่มเติมในหัวข้อ ความแม่นยำ ความถูกต้องและความคงทนด้วยเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนว่าวิธีการตรวจหาดีเอ็นเอปนเปื้อนนี้มีความเหมาะสมในการนำไปใช้จริง วิธีนี้สามารถตรวจหาดีเอ็นเอของ *E. coli* K-12 ที่ปนเปื้อนในยาอินซูลินของมนุษย์ที่ผลิตจากเซลล์ *E. coli* K-12 ได้ปริมาณต่ำสุดถึง 10 pg/mg⁽⁹⁾ มีความจำเพาะ ความแม่นยำ ความถูกต้องและความคงทนเป็นไปตามมาตรฐานของอาเซียน อย่างไรก็ตามวิธีนี้ซึ่งเป็นวิธี PCR แบบดั้งเดิม (Conventional PCR) ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น ไม่สามารถตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้น และปริมาณดีเอ็นเอใน PCR product ได้ ปัจจุบันได้มีเทคโนโลยี real-time PCR ซึ่งจะสามารถตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอได้ ซึ่งมีการนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากเซลล์เจ้าบ้านในยาที่ผลิตจากเทคโนโลยีทางชีวภาพแล้ว^(17, 18) เทคนิค real-time PCR ต้องอาศัยเครื่อง thermal cycler พิเศษที่ถูกออกแบบมาเพื่อรองรับการทำงานนี้โดยเฉพาะ ในอนาคตจากความรู้ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะพัฒนาต่อยอดสำหรับตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอปนเปื้อนจากเซลล์เจ้าบ้านในยาที่ผลิตจากเทคโนโลยีทางชีวภาพด้วย real-time PCR ได้ต่อไป

สรุป

ได้ประเมินความถูกต้องของวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้านในยาอินซูลินที่ผลิตจากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* K-12 พบว่าวิธีนี้มีข้อจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ ความจำเพาะ ความแม่นยำ ความถูกต้องและความคงทนเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของอาเซียน อีกทั้งเป็นวิธีที่มีขั้นตอนดำเนินการง่าย สะดวก รวดเร็ว ใช้เวลาดำเนินการทดสอบแล้วเสร็จภายใน 1 วัน จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจหาการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจาก *E. coli* K-12 ในยาอินซูลินของมนุษย์ที่ผลิตจากเซลล์ดังกล่าวในห้องปฏิบัติการ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ. ดร.จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *E. coli* K-12 และขอขอบคุณบริษัท Eli Lilly (ประเทศไทย) จำกัด และบริษัท Sanofi-Aventis Deutschland (ประเทศไทย) จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ยาอินซูลินของมนุษย์ สำหรับการศึกษาในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. กองควบคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, ผู้รวบรวม. ASEAN analytical validation guideline. กรุงเทพฯ. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. 2549.
2. Pickup J. Human insulin. Br Med J 1986; 292(6514): 155-7.
3. National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Service. Guidelines for research involving recombinant or synthetic nucleic acid molecules. 2013; [cited 2013 Jan 10]; [132 screens]. Available from: URL: http://oba.od.nih.gov/oba/rac/Guideline/NIH_Guidelines.htm
4. U.S. Environmental Protection Agency. *Escherichia coli* K-12 derivatives final risk assessment. 1997; [cited 2013 Jul 9]; [11 screens]. Available from: URL: <http://epa.gov/oppt/biotech/pubs/fra/fra004.htm>
5. International Conference on Harmonisation of Technical Requirement for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Specification: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products Q6B. Geneva: ICH; 1999.

6. U.S. Department of Health and Human Service Food and Drug Administration. Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use. 1997; [cited 2013 Jan 20]; [50 screens]. Available from: URL: http://www.fda.gov/cber/gdlns/ptc_mab.pdf
7. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Position statement on the use of tumourigenic cells of human origin for the production of biological and biotechnological medicinal products. 2001; [cited 2013 Jan 20]; [5 screens]. Available from: URL: <http://www.tga.gov.au/pdf/euguide/bwp114300en.pdf>
8. World Health Organization. Acceptability of cell substrates for production of biologicals. 1987; [cited 2013 Jan 20]; [32 screens]. Available from: URL: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_747.pdf
9. U.S. Pharmacopeial Convention. General Chapter<1130> Nucleic acid-based techniques—approaches for detecting trace nucleic acids (residual DNA testing). 2012; [cited 2013 Mar 15]; [5 screens]. Available from: URL: http://usp35.infostar.com.cn/uspnf/pub/data/v35300/usp35nf30s0_c1130.html
10. Mehta S, Keer JT. Performance characteristics of host-cell DNA quantification methods. Bio Process Technical. [serial online]. 2007 oct; [cited 2013 Jan 30]; [8 screens]. Available From: URL: http://www.bioprocessintl.com/multimedia/archive/00076/070509ar06_76445a.pdf
11. Kuhnert P, Nicolet J, Frey J. Rapid and accurate identification of Escherichia coli K-12 strains. Appl Environ Microbiol 1995; 61(11): 4135-9.
12. Cai H, Gu X, Scanlan MS, Lively CR. Development of a quantitative PCR assay for residual mouse DNA and comparison of four sample purification methods for DNA isolation. J Pharm Biomed Anal 2011; 55(1): 71-7.
13. Kuhnert P, Frey J. Tools for safety assessment identification and monitoring of Escherichia coli K-12 safety strains. 1996; [cited 2012 dec 25]; [4 screens]. Available from: URL: http://www.bats.ch/bats/publikationen/1996-1_e.coli/96-1_e-coli_k12.php
14. Goldman M, Geier M, Zehnder D, Wang A, Henriksson T. Use of polymerase chain reaction for detecting DNA contaminants in pharmaceutical recombinant. Clin Chem 1991; 37(9): 1523-5.
15. Roche Applied Science. FastStart Taq DNA polymerase, dNTPack manual. 2011; [cited 2013 May 26]; [19 screens]. Available from: URL: https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/04738314001_en_06.pdf
16. Singer VL, Lawlor TE, Yue S. Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test). Mutat Res 1999; 439(1): 37-47.
17. Skoblov MY, Shibanova ED, Kovaleva EV, Bairamashvilli DI, Skoblov YS, Miroshnikov AI. DNA assay for recombinant pharmaceutical substances using the real-time PCR technique. Russ J Bioorg Chem 2010; 36(1): 104-8.
18. Lee DH, Bae JE, Lee JH, Shin JS, Kim IS. Quantitative detection of residual E. coli host cell DNA by real-time PCR. J Microbiol Biotechnol 2010; 20(10): 1463-70.

Detection of Residual Host Cell DNA in Biotechnological Drugs

Rassadaphorn Kongmoung and Boontarika Boonyapiwat

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

ABSTRACT *Escherichia coli* K-12 strains have been frequently used as host strain for the manufacture of recombinant proteins intended for human therapeutic use. Residual host cell DNA is an important impurity that should be eliminated during the downstream process. Therefore, the amount of residual host cell DNA in the drug substance is limited. The analytical method for detection of host cell DNA in biotechnological drug should be rapid, specific and sensitive. In this study, the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique was developed and validated to detect residual *E. coli* K-12 host cell DNA in human insulin. The results demonstrated that detection limit, specificity, accuracy, precision and robustness were acceptable to the ASEAN Analytical Guideline. All of steps including the sample preparation, the PCR reaction and the sample analysis can be performed within 1 day. It is concluded that the PCR method is suitable for detection of residual *E. coli* K-12 host cell DNA in the human insulin substance.

Keyword : residual host cell DNA, *E. coli* K-12, PCR, human insulin

การจัดทำสนามรังสี สำหรับการสอบเทียบค่ามาตรฐานเครื่องสำรวจรังสี

ประเชษฐ เชนฐสิงห์ และรณยุทธ ไพศาล

สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การสอบเทียบเครื่องสำรวจรังสีของห้องปฏิบัติการรังสีมาตรฐานทุติยภูมิใช้รังสีแกมมาจากสารกัมมันตรังสีซีเซียม-137 เป็นสนามรังสีอ้างอิง มีค่าอัตราปริมาณรังสียังผล Ambient dose equivalent ($H^*(10)$) เพียงค่าเดียวเท่ากับ 1849.82 $\mu\text{Sv/h}$ ซึ่งไม่เพียงพอ จำเป็นต้องจัดทำสนามรังสีเพิ่มเติมให้เพียงพอแก่ความต้องการ สำหรับใช้สอบเทียบในย่านการวัด ดังนี้ 3000, 2000, 1000, 500, 300, 200, 100, 50, 30, 20, 10 และ 5 $\mu\text{Sv/h}$ การจัดทำสนามรังสีต้องสร้างถ้ำตะกั่วขึ้นใหม่ ให้มีช่องเปิดที่สามารถปรับเปลี่ยนความหนาแผ่นตะกั่วที่ช่องเปิดนี้ได้ เพื่อทำหน้าที่ควบคุมปริมาณรังสีที่ผ่านออกมาได้อย่างเหมาะสม กล่าวคือ เป็นปริมาณรังสีที่ให้อัตราการวัดอยู่ระหว่าง 30% ถึง 70% ของสเกลเต็มแผ่นตะกั่วที่ใช้มี 12 ความหนา คือ 2, 6, 12, 18, 22, 26, 32, 40, 44, 48, 54 และ 64 มิลลิเมตร ผลการวัดปริมาณรังสีด้วยหัววัดรังสีมาตรฐานปฏิบัติการได้ค่าปริมาณรังสี $H^*(10)$ มีค่า 1435.89, 947.21, 496.96, 239.11, 166.71, 99.93, 53.32, 22.99, 14.40, 10.64, 5.43 และ 3.44 $\mu\text{Sv/h}$ ตามลำดับ มีค่าความไม่แน่นอน 2.0% ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยส่วนใหญ่แล้วสนามรังสีที่จัดทำขึ้นมีความเหมาะสมสำหรับใช้สอบเทียบเครื่องสำรวจรังสี ยกเว้นย่านการวัด 5 $\mu\text{Sv/h}$

บทนำ

เครื่องสำรวจรังสีเป็นเครื่องวัดรังสีชนิดแสดงค่าทันทีจัดอยู่ในเครื่องวัดระดับป้องกัน ใช้วัดปริมาณรังสีหรืออัตราปริมาณรังสีในพื้นที่ควบคุมรังสี การรายงานผลการวัดในปัจจุบันเป็นปริมาณรังสีส่งผล Ambient dose equivalent ใช้สัญลักษณ์ $H^*(10)$ เครื่องสำรวจรังสีมีภาคการแสดงผลการวัด 2 แบบ คือแบบเข็ม และแบบตัวเลข เครื่องสำรวจรังสีที่ภาคการแสดงผลแบบเข็มจะมีย่านการวัดได้มากกว่าหนึ่งย่าน เช่น 0-3, 0-5, 0-10 $\mu\text{Sv/h}$ (นิยมเขียนสั้นเป็น 3, 5, 10 $\mu\text{Sv/h}$) ส่วนเครื่องสำรวจรังสีที่ภาคการแสดงผลการวัดแบบตัวเลขมีย่านการวัดเดียว เช่น 9000 $\mu\text{Sv/h}$ ย่านการวัดที่พบส่วนมากได้แก่ ย่านการวัดที่ 3000, 2000, 1000, 500, 300, 200, 100, 50, 30, 20, 10 และ 5 $\mu\text{Sv/h}$ ก่อนการใช้งานครั้งแรก เครื่องสำรวจรังสีต้องได้รับการสอบเทียบกับสนามรังสีอ้างอิงทุกย่านการวัดเท่าที่จะเป็นไปได้ และควรได้รับการสอบเทียบเป็นประจำทุก ๆ 12 ถึง 14 เดือน⁽¹⁾ ห้องปฏิบัติการรังสีมาตรฐานทุติยภูมิ (Secondary Standard Dosimetry Laboratory, SSDL) สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ ให้บริการการสอบเทียบเครื่องสำรวจรังสีเฉพาะที่ใช้วัดรังสีฟิสิกส์ (รังสีแกมมา รังสีเอกซ์) ชนิดเคลื่อนที่ (Portable gamma survey meter) การสอบเทียบใช้วิธี 4 เรียกว่า การกำหนดค่าปัจจัยการสอบเทียบในสนามรังสีที่ทราบค่า⁽¹⁾ (Determination of the calibration factor in a known radiation field) โดยใช้สนามรังสีแกมมาจากสารกัมมันตรังสีซีซีเอ็ม-137 เป็นสนามรังสีอ้างอิง มีค่าอัตราปริมาณรังสี $H^*(10)$ เท่ากับ 1849.82 $\mu\text{Sv/h}$ ที่ระยะห่างจากแหล่งกำเนิดรังสี 200 เซนติเมตร ในอากาศ ซึ่งค่าอัตราปริมาณรังสีที่มีอยู่ไม่สามารถนำมาใช้สอบเทียบเครื่องสำรวจรังสีที่มีย่านการวัดที่น้อยกว่า 2000 $\mu\text{Sv/h}$ ได้ ดังนั้นห้องปฏิบัติการรังสีมาตรฐานทุติยภูมิ จึงจำเป็นต้องจัดทำสนามรังสีให้มีค่าอัตราปริมาณรังสี $H^*(10)$ ที่สามารถใช้สอบเทียบย่านการวัดที่ 3000, 2000, 1000, 500, 300, 200, 100, 50, 30, 20, 10 และ 5 $\mu\text{Sv/h}$ ได้ บนพื้นฐานของค่าอัตราปริมาณรังสีเดิมหรือแหล่งกำเนิดรังสีเดิม โดยใช้แผ่นตะกั่วกัน เพื่อลดทอนอัตราปริมาณรังสีลง กำหนดให้อัตราปริมาณรังสีที่ใช้สอบเทียบในแต่ละย่านการวัด ต้องให้ค่าวัดรังสีอยู่ระหว่าง 1 ใน 3 ถึง 2 ใน 3 หรือ 30% ถึง 70% เทียบกับสเกลการวัดเดิม⁽²⁾

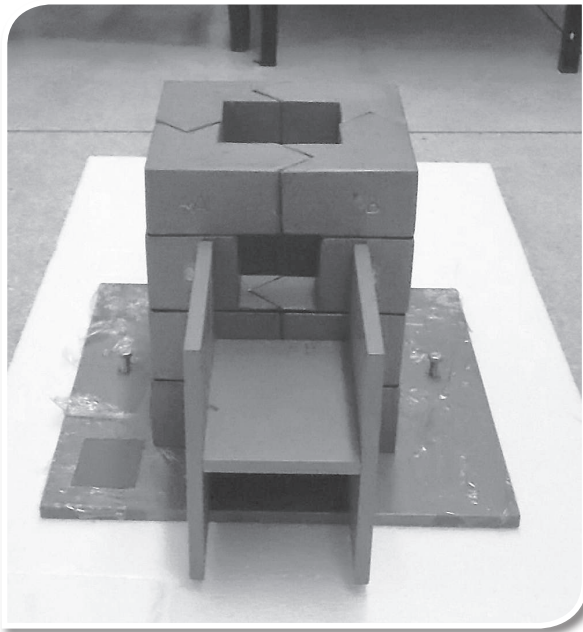
วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือ

1. หัววัดรังสีมาตรฐานปฏิบัติการ : 600cc Type 2575C S/n 480
2. เครื่องวัดรังสีมาตรฐานปฏิบัติการ : Wellhofer Dose 1 S/n 1185
3. เครื่องวัดความกดอากาศ : Lambrecht Prazisions
4. เครื่องวัดอุณหภูมิ : Hygrometer Testo 608-H1
5. สารกัมมันตรังสีซีซีเอ็ม-137

วิธีดำเนินการ

1. จัดทำถ้ำตะกั่วและวัสดุกรองรังสี ออกแบบและสั่งทำถ้ำตะกั่วขึ้นใหม่ เพื่อควบคุมลำรังสีแกมมา ให้แผ่รังสีออกมาเพียงทิศทางเดียว ถ้ำตะกั่วที่ทำขึ้นใหม่เป็นทรงสี่เหลี่ยมกลวง ขนาดสูง 30 เซนติเมตร กว้าง 20 เซนติเมตร ยาว 20 เซนติเมตร และหนา 5 เซนติเมตร (ภาพที่ 1) ประกอบด้วย ชั้นส่วนทั้งหมดรวม 24 ชั้น สามารถถอดหรือประกอบได้ ด้านหน้าจะมีช่องเปิดสี่เหลี่ยมขนาด 6 เซนติเมตร



ภาพที่ 1 ถ้ำตะกั่วที่จัดทำขึ้นใหม่



ภาพที่ 2 การติดตั้งถ้ำตะกั่วที่จัดทำขึ้นใหม่บนถ้ำตัวเดิม

สำหรับให้รังสีแกมมาแผ่ออกมา และมีฐานสำหรับใส่วัสดุกรองรังสี ถ้ำตะกั่วที่ทำขึ้นใหม่จะติดตั้งบนถ้ำตะกั่วเดิม (ภาพที่ 2) วัสดุกรองรังสีเป็นแผ่นตะกั่ว สำหรับการลดทอนปริมาณรังสีให้ได้ปริมาณรังสีตามความต้องการ แผ่นตะกั่วเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 10 เซนติเมตร มีความหนาต่างกัน 7 ค่า ดังนี้ 30, 20, 10, 8, 6, 4 และ 2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แผ่นตะกั่วสำหรับลดทอนปริมาณรังสี

2. วัดอัตราปริมาณรังสี **kerma** และ **H*(10)** เริ่มต้น อัตราปริมาณรังสี **kerma** และ **H*(10)** เริ่มต้นคือปริมาณรังสีที่ไม่มีแผ่นตะกั่วกั้น การวัดปริมาณรังสีจะใช้หัววัดรังสีมาตรฐานปฏิบัติการ ซึ่งได้รับการถ่ายทอดค่าสัมประสิทธิ์การสอบเทียบ N_K จากหัววัดรังสีมาตรฐานอ้างอิง และหัววัดรังสีมาตรฐานอ้างอิง ได้รับการสอบเทียบจากห้องปฏิบัติการรังสีมาตรฐานปฐมภูมิ National Physical Laboratory, NPL สหราชอาณาจักร ปริมาณรังสีจะวัดที่ระยะห่างจากต้นกำเนิดรังสีถึงหัววัดรังสี 200 เซนติเมตรในอากาศ คำนวณค่าอัตราปริมาณรังสี **kerma** จากสมการ

$$\dot{K} = \frac{N_K^{ws} (\overline{M} - \overline{M}_B) k_T k_P}{t} \quad (1)$$

เมื่อ	$\dot{K}$	คือ	อัตราปริมาณรังสี air kerma
	N_K^{ws}	คือ	สัมประสิทธิ์การสอบเทียบของเครื่องวัดรังสีมาตรฐานปฏิบัติการ
	$\bar{M}$	คือ	ค่าวัดปริมาณรังสีเฉลี่ย
	$\bar{M}_B$	คือ	ค่าปริมาณรังสีพื้นหลัง
	k_T	คือ	ค่าแก้ไขอุณหภูมิอากาศ
	k_p	คือ	ค่าแก้ไขความกดอากาศ
	t	คือ	ค่าเวลาการวัด และ คำนวณ $H^*(10)$ คำนวณจากสมการ

$$H^*(10) = h\dot{K} \quad (2)$$

เมื่อ h คือ conversion coefficient สำหรับรังสีแกมมา พลังงาน 0.6616 MeV จากสารกัมมันตรังสี ซีเซียม-137 มีค่า 1.2 Sv/Gy

ผลการวัด คำนวณเป็นอัตราปริมาณรังสี kerma เริ่มต้น มีค่าเท่ากับ 1541.52 $\mu\text{Gy/h}$ และอัตราปริมาณรังสี $H^*(10)$ เริ่มต้น มีค่าเท่ากับ 1849.82 $\mu\text{Sv/h}$

3. **คำนวณความหนาแผ่นตะกั่ว** ความหนาแผ่นตะกั่วที่ใช้ต้องให้ค่าวัดปริมาณรังสีในแต่ละย่านการวัด ควรอ่านค่าได้ อยู่ระหว่าง 1 ใน 3 ถึง 2 ใน 3 หรือ 30% ถึง 70% เทียบกับสเกลย่านการวัดสูงสุดในแต่ละย่านการวัด การคำนวณความหนาแผ่นตะกั่วจำเป็นต้องทราบค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนเชิงเส้น แต่แผ่นตะกั่วที่จัดทำขึ้นไม่ทราบค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนเชิงเส้น จำเป็นต้องทำการทดลอง โดยวัดปริมาณรังสีที่ระยะ 200 เซนติเมตร ตามความหนาแผ่นตะกั่ว คือ ไม่มีแผ่นตะกั่ว, 10, 14 และ 20 มิลลิเมตร ได้ค่าปริมาณรังสีเฉลี่ย 0.5142, 0.1698, 0.1065 และ 0.0056 nC ตามลำดับ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนเชิงเส้น คำนวณจากสมการ

$$\mu_{pb, lin} = \frac{\ln(I_0/I)}{X_{pb}} \quad (3)$$

เมื่อ	$\mu_{pb, lin}$	คือ	สัมประสิทธิ์การดูดกลืนเชิงเส้นของแผ่นตะกั่ว
	I_0	คือ	ค่าอ่านปริมาณรังสี ที่ไม่มีแผ่นตะกั่ว
	I	คือ	ค่าอ่านปริมาณรังสี ที่มีแผ่นตะกั่ว
	$X_{pb, lin}$	คือ	ความหนาแผ่นตะกั่ว

ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนเชิงเส้นของแผ่นตะกั่วที่ใช้ คำนวณค่าเฉลี่ยได้ค่าเท่ากับ 0.1115 mm^{-1} (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนเชิงเส้นของแผ่นตะกั่ว

ความหนาแผ่นตะกั่ว mm	ค่าวัดปริมาณรังสี nC	สัมประสิทธิ์การดูดกลืนเชิงเส้น mm^{-1}
ไม่มีแผ่นตะกั่ว	0.5142	-
10	0.1698	0.1108
14	0.1065	0.1125
20	0.0056	0.1112
	ค่าเฉลี่ย	0.1115

การคำนวณค่าความหนาแน่นตะกั่วจะใช้ค่าที่ครึ่งหนึ่งของสเกลของย่านการวัดของแต่ละย่าน และชดเชยค่าปริมาณรังสีพื้นหลัง คำนวณจากสมการ

$$\mu_{pb, lin} = \frac{\ln(H^*(10)_0 / (0.5R_i - B))}{\mu_{pb, lin}} \quad (4)$$

เมื่อ	$x_{Pb, i}$	คือ	ความหนาแน่นตะกั่วที่ต้องการแต่ละย่านการวัด
	$H^*(10)_0$	คือ	ปริมาณรังสีเริ่มต้น มีค่าเท่ากับ 1849.82 $\mu\text{Sv/h}$
	R_i	คือ	ค่าสเกลการวัดสูงสุดของแต่ละย่านการวัด
	B	คือ	อัตราปริมาณรังสีพื้นหลังมีค่า 1.0 $\mu\text{Sv/h}$
	$\mu_{pb, lin}$	คือ	สัมประสิทธิ์การดูดกลืนเชิงเส้น มีค่า 0.1115 mm^{-1}

ผลการคำนวณค่าความหนาแน่นตะกั่วสำหรับย่านการวัด 3,000, 2,000, 1000, 500, 300, 200, 100, 50, 30, 20, 10 และ 5 $\mu\text{Sv/h}$ คือ 1.9, 5.5, 11.7, 17.9, 22.5, 26.1, 32.4, 38.8, 43.6, 47.6, 54.8 และ 63.5 มิลลิเมตร เนื่องจากแผ่นตะกั่วที่จัดทำมีความหนาน้อยสุดเพียง 2 มิลลิเมตร จำเป็นต้องปรับความหนาแน่นตะกั่วที่คำนวณได้ให้สอดคล้องกับแผ่นตะกั่วที่มี ซึ่งจะได้ความหนาแน่นตะกั่วที่ต้องใช้ดังนี้ 2, 6, 12, 18, 22, 26, 32, 40, 44, 48, 54 และ 64 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าอัตราปริมาณรังสี Air kerma ของสนามรังสีแกมมาตามความหนาแน่นตะกั่ว

ย่านการวัด $\mu\text{Sv/h}$	ความหนาแน่นตะกั่ว		อัตราปริมาณรังสี Air kerma $\mu\text{Gy/h}$	ความไม่แน่นอน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($k=2$)
	ที่คำนวณ mm	ใช้งานจริง mm		
3,000	1.9	2	1,196.57	2.0%
2,000	5.5	6	789.34	2.0%
1,000	11.7	12	414.13	2.0%
500	17.9	18	199.26	2.0%
300	22.5	22	138.93	2.0%
200	26.1	26	83.28	2.0%
100	32.4	32	44.43	2.0%
50	38.8	40	19.16	3.0%
30	43.6	44	12.00	3.5%
20	47.6	48	8.87	4.0%
10	54.8	54	4.52	5.5%
5	63.5	64	2.86	6.0%

4. วัดปริมาณรังสีตามความหนาแน่นตะกั่ว การวัดปริมาณรังสีจะใช้หัววัดรังสีมาตรฐานปฏิบัติการระยะห่างจากต้นกำเนิดรังสี ถึงหัววัดรังสี 200 เซนติเมตร ในอากาศ ตามค่าความหนาแน่นตะกั่วที่คำนวณไว้ คำนวณค่าอัตราปริมาณรังสี kerma จากสมการ (1) ตามความหนาแน่นตะกั่วได้ค่าดังนี้ 1196.57, 789.34, 414.13, 199.26, 138.93, 83.28, 44.43, 19.16, 12.00, 8.87, 4.52 และ 2.86 $\mu\text{Gy/h}$ (ตารางที่ 2) คำนวณค่าอัตราปริมาณรังสี $H^*(10)$ จากสมการ (2)

5. ทดสอบการใช้งาน ทดลองสอบเทียบเครื่องสำรวจรังสีแกมมาด้วยสนามรังสีที่จัดทำขึ้น ย่านการวัดละ 20 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่นำมาใช้ทดสอบเป็นเครื่องสำรวจรังสีชนิดที่การแสดงผลการวัดแบบเข็มของผู้รับบริการที่ใช้งานปกติ อยู่ในสภาพดี เพื่อประเมินความเหมาะสม โดยปริมาณรังสีควรอ่านค่าได้อยู่ระหว่าง 1 ใน 3 ถึง 2 ใน 3 หรือ 30% ถึง 70% ของสเกลย่านการวัด

ผล

ค่าอัตราปริมาณรังสี $H^*(10)$ ของสนามรังสีแกมมา ตามความหนาแน่นตะกั่ว มีค่า ดังนี้ 1435.89, 947.21, 496.96, 239.11, 166.71, 99.93, 53.32, 22.99, 14.40, 10.64, 5.43 และ 3.44 $\mu\text{Sv/h}$ ตามลำดับ มีค่าความไม่แน่นอน⁽³⁾ 2.0% ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และผลการทดสอบการใช้งานของค่าอัตราปริมาณรังสี $H^*(10)$ กับเครื่องสำรวจรังสีที่ภาคแสดงผลการวัดแบบเข็มของผู้รับบริการ ในย่านการวัดที่ 3,000, 2,000, 1,000, 500, 300, 200, 100, 50, 30, 20, 10 และ 5 $\mu\text{Sv/h}$ ให้ผลการทดสอบ ดังนี้ 45% -50%, 45% -50%, 47% -52%, 45% -50%, 50% -61%, 45% -55%, 48% -59%, 41% -51%, 38% -58%, 43% -64%, 43% -65% และ 50% -85% ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ค่าอัตราปริมาณรังสี Ambient dose equivalent, $H^*(10)$ ของสนามรังสีแกมมา และผลการทดสอบปริมาณรังสีกับเครื่องสำรวจรังสี

อัตราปริมาณรังสี $H^*(10)$ $\mu\text{Sv/h}$	ย่านการวัด $\mu\text{Sv/h}$	อัตราปริมาณรังสี $H^*(10)$ เทียบกับสเกล	ผลการทดสอบปริมาณรังสี $H^*(10)$ เทียบกับสเกล
1,435.89	3,000	48%	45% -50%
947.21	2,000	47%	45% -50%
496.96	1,000	50%	47% -52%
239.11	500	48%	45% -50%
166.71	300	56%	50% -61%
99.93	200	50%	45% -55%
53.32	100	53%	48% -59%
22.99	50	46%	41% -51%
14.40	30	48%	38% -58%
10.64	20	53%	43% -64%
5.43	10	54%	43% -65%
3.44	5	69%	50% -85%

วิจารณ์

ถ้าตะกั่วที่จัดทำขึ้นใหม่ได้รับการออกแบบให้แยกชั้นได้จึงมีข้อดีคือ มีความสะดวกในการรื้อถอน หรือ ประกอบขึ้นใหม่ เนื่องจากแต่ละชั้นมีน้ำหนักไม่มากสามารถยกได้ด้วยคนเดียว ดังนั้น เมื่อถึงเวลาที่ต้องเปลี่ยนฐานรองต้นกำเนิดรังสีซีซีเอ็ม-137 (Source holder) เพราะฐานรองต้นกำเนิดรังสีมีอายุในการใช้งานประมาณ 3 ถึง 4 ปี ฐานรองต้นกำเนิดรังสีทำจากอะลูมิเนียม มีความหนา 0.5 มิลลิเมตร เมื่อได้รับรังสีโดยตรงตลอดเวลาทำให้เสื่อมสภาพไม่มีความแข็งแรงเพียงพอที่จะห่อหุ้มต้นกำเนิดรังสีได้ ต้นกำเนิดรังสีจะหลุดออกจากฐานรองต้นกำเนิดรังสี จำเป็นต้องเปลี่ยนฐานรองต้นกำเนิดรังสีใหม่ก่อนการเปลี่ยนฐานรองต้นกำเนิดรังสีจะต้องรื้อถอนถ้าตะกั่ว

ออกก่อนซึ่งไม่มีความยุ่งยาก อีกทั้งยังใช้เป็นวัสดุกำบังรังสีขณะเปลี่ยนฐานรองต้นกำเนิดรังสีได้ด้วย ส่วนข้อเสียคือ การประกอบถั่วตะกั่วชิ้นใหม่จะส่งผลต่อค่าอัตราปริมาณรังสี เนื่องจากการประกอบชิ้นส่วนใหม่ในแต่ละครั้งอาจจะไม่สนิทเหมือนเดิม จำเป็นต้องตรวจสอบค่าอัตราปริมาณรังสีก่อนการใช้งาน สำหรับช่องเปิดด้านหน้ารูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 6 เซนติเมตร จะให้ขนาดสนามรังสีที่ระยะ 200 เซนติเมตร ประมาณ 120×120 ตารางเซนติเมตร มีขนาดใหญ่เพียงพอที่จะครอบคลุมหัววัดรังสีของเครื่องสำรวจรังสีแกมมาทุกชนิด แผ่นตะกั่วสำหรับกรองรังสีออกแบบให้มีหุ้จมีข้อดีคือ สามารถถือได้ ทำให้การเปลี่ยนความหนาแผ่นตะกั่ว สามารถกระทำได้ง่าย ส่วนข้อเสีย แผ่นตะกั่วมีความหนาน้อยสุด 2 มิลลิเมตร จากการคำนวณความหนาแผ่นตะกั่วให้ได้ปริมาณรังสีตามความต้องการ จำเป็นต้องปรับค่าความหนาแผ่นตะกั่วให้สอดคล้องกับแผ่นตะกั่วที่มีอยู่ ค่าความหนาแผ่นตะกั่วที่ใช้งานจริงจึงมีค่าไม่ละเอียดเท่ากับค่าความหนาที่ได้จากการคำนวณ (ตารางที่ 2) ดังนั้นควรมีแผ่นตะกั่วความหนา 1 มิลลิเมตร สนามรังสีแกมมาที่จัดทำขึ้นจำนวน 12 สนาม สำหรับใช้สอบเทียบเครื่องสำรวจรังสี ในย่านการวัดที่ 3,000, 2,000, 1,000, 500, 300, 200, 100, 50, 30, 20, 10 และ 5 $\mu\text{Sv/h}$ โดยส่วนใหญ่ ให้ค่าอัตราปริมาณรังสี $H^*(10)$ อยู่ระหว่าง 30% ถึง 70% เทียบกับสเกลการวัดสูงสุด ยกเว้นย่านการวัดที่ 5 $\mu\text{Sv/h}$ ให้ค่าอัตราปริมาณรังสี $H^*(10)$ อยู่ระหว่าง 50%-85% ซึ่งไม่เป็นไปตามความต้องการ ในทางปฏิบัติแล้ว หากจำเป็นต้องใช้สอบเทียบตามที่ได้รับบริการร้องขอ ก็สามารถกระทำได้ เนื่องจากค่าปริมาณรังสียังไม่เกินสเกลย่านการวัดสูงสุด การกำหนดค่าปริมาณรังสีแกมมาสำหรับการสอบเทียบไว้ที่ 30% ถึง 70% เทียบกับสเกลย่านการวัดสูงสุด ใช้งานได้ดีกับเครื่องสำรวจรังสีแกมมาชนิดแสดงผลการวัดแบบเข็ม ซึ่งเครื่องสำรวจรังสีแกมมาที่แสดงผลการวัดแบบตัวเลข ไม่จำเป็นต้องเลือกสนามรังสีที่ให้ค่าระหว่าง 30% ถึง 70% เนื่องจากเครื่องสำรวจรังสีชนิดนี้มีย่านการวัดที่กว้าง และสามารถปรับย่านการวัดด้วยตัวเองได้ การสอบเทียบจึงเลือกใช้สนามรังสีได้ทุกสนามที่มีค่าปริมาณรังสีไม่เกินค่าสเกลย่านการวัดสูงสุด ยกเว้นผู้รับบริการมีประสงค์ให้สอบเทียบในย่านการวัดรังสีที่ผู้รับบริการร้องขอ ควรเลือกใช้สนามรังสีให้สอดคล้องกับย่านการวัดรังสีที่ผู้รับบริการร้องขอ

สรุป

สนามรังสีแกมมาที่จัดทำขึ้นสามารถนำมาใช้สำหรับสอบเทียบเครื่องสำรวจรังสีเฉพาะที่ใช้วัดรังสีฟोटอน (รังสีแกมมา รังสีเอกซ์) ชนิดเคลื่อนที่ได้ ในเทอมของปริมาณรังสียังผล Ambient dose equivalent ($H^*(10)$) ในย่านการวัดที่ 3000, 2000, 1000, 500, 300, 200, 100, 50, 30, 20 และ 10 $\mu\text{Sv/h}$ ตามลำดับ ส่วนย่านการวัดที่ 5 $\mu\text{Sv/h}$ นั้น สนามรังสีที่จัดทำขึ้นไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้สอบเทียบ เว้นแต่ผู้รับบริการร้องขอ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณศิริ ศรีมนโรด นักฟิสิกส์รังสีชำนาญการพิเศษ รักษาการแทนผู้อำนวยการ สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ สำหรับข้อเสนอแนะทุกประการ

เอกสารอ้างอิง

1. International Atomic Energy Agency. Calibration of radiation protection monitoring instruments, Safety reports series no. 16. Vienna: IAEA; 2000.
2. International Atomic Energy Agency. Handbook on calibration of radiation protection monitoring instruments, Technical reports series no. 133. Vienna: IAEA; 1971.
3. IAEA-TECDOC-1585. Measurement uncertainty: a practical guide for secondary standards dosimetry laboratories. Vienna: IAEA; May 2008.

Establishment of Known Radiation Fields for Calibration of Survey Meter

Prachern Chettasingh Ronnayut Phaisan

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

ABSTRACT The reference radiation fields for calibration of survey meter of the Secondary Standard Dosimetry Laboratory (SSDL) is gamma ray from Cesium-137 radioactive source with an ambient dose equivalent rate ($H^*(10)$) of 1849.82 $\mu\text{Sv/h}$. It is necessary to establish other dose rate to cover measurable ranges of survey meters. These measurable ranges are as follow, 3000, 2000, 1000, 500, 300, 200, 100, 50, 30, 20, 10 and 5 $\mu\text{Sv/h}$. A new shielding box made of lead was designed with a special window. The window could be shielded by different lead thickness. Thus, dose from the window could be controlled. The appropriate dose measured by survey meter is said to be about 30% to 70 % of full scale. This approximation gave rise to thicknesses of lead sheet in a series as follow, 2, 6, 12, 18, 22, 26, 32, 40, 44, 48, 54 and 60 millimeter. The doses were measured by working standard instrument. The results of $H^*(10)$ were found to be 1435.89, 947.21, 496.96, 239.11, 166.71, 99.93, 53.32, 22.99, 14.40, 10.64, 5.43 and 3.44 $\mu\text{Sv/h}$ respectively. A measurement uncertainty for calibration was estimated to be 2.0% at confident level of 95%. It is found that gamma radiation fields are appropriate except the 5 $\mu\text{Sv/h}$ range.

Keywords: Survey meter, gamma, Cesium, $H^*(10)$

ผลของความหนาต่อค่าความดันและปริมาตร

ขณะแตกของถุงยางอนามัย

วันเพ็ญ ดวงสว่าง และสุภาวรรณ จงธรรมวัฒน์

สำนักวิจัยและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ศึกษาผลของความหนาของถุงยางอนามัยต่อคุณภาพความทนทานและความยืดตัวของถุงยางอนามัย โดยพิจารณาจากค่าความดันขณะแตก (กิโลพาสคัล) และค่าปริมาตรขณะแตก (ลูกบาศก์เดซิเมตร) ของตัวอย่างถุงยางอนามัยที่ทำจากน้ำยางธรรมชาติขนาด 52 มิลลิเมตร และขนาด 52.5 มิลลิเมตร จำนวน 30 ตัวอย่าง วิเคราะห์ทดสอบตามมาตรฐาน มอก. 625 – 2554 แต่ละตัวอย่างทดสอบความหนาจำนวน 13 ชิ้น ด้วยวิธีซึ่ง ทดสอบความดันขณะแตกและปริมาตรขณะแตกจำนวน 125 ชิ้น ด้วยเครื่องทดสอบความทนความดันขณะแตกของถุงยางอนามัย ผลการศึกษาพบว่าค่าความดันขณะแตกสูงขึ้นเมื่อถุงยางอนามัยหนาขึ้น แต่พบว่าค่าปริมาตรขณะแตกไม่ได้แตกต่างกันนักเมื่อถุงยางอนามัยมีค่าความหนา ต่าง ๆ กัน อนึ่ง พบว่าตัวอย่างถุงยางอนามัยที่ศึกษาทั้งหมดมีค่าความดันขณะแตกและปริมาตรขณะแตกผ่านเกณฑ์การยอมรับตามข้อกำหนดของมาตรฐาน ในทางการค้าจึงเกิดการแข่งขันการผลิตถุงยางอนามัยที่บางเบาให้ความรู้สึกแบบธรรมชาติแต่ยังคงคุณภาพตามมาตรฐาน

บทนำ

ถุงยางอนามัยเป็นอุปกรณ์สำคัญที่ช่วยป้องกันการตั้งครรภ์เพื่อการคุมกำเนิด และลดความเสี่ยงจากการติดเชื้อเอชไอวี (เอดส์) และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์อื่นๆ เช่น หนองใน ซิฟิลิส เป็นต้น ถุงยางอนามัยต้องมีคุณภาพมาตรฐานตามข้อกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก.625 - 2554⁽¹⁾ ซึ่งเป็นมาตรฐานที่สอดคล้องกับมาตรฐานสากล ISO 4074 : 2002/Cor.1 : 2003/Cor.2 : 2008⁽²⁾ คุณลักษณะทางฟิสิกส์ที่ทดสอบ ได้แก่ มิติด้านความกว้าง ความยาว คุณสมบัติของเนื้อยางด้านความทนทานและความยืดตัว โดยดูค่าความดันขณะแตกและปริมาตรขณะแตก ความปลอดภัยรั่ว ข้อบกพร่องที่มองเห็น ความสมบูรณ์ของการปิดผนึกของยอย การบรรจุเครื่องหมายและฉลาก คุณลักษณะข้างต้นต้องเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด อนึ่ง มาตรฐานมีวิธีการทดสอบความหนาของถุงยางอนามัยแต่ไม่มีเกณฑ์กำหนด ค่าความหนาขึ้นอยู่กับผู้ผลิต กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จะทดสอบความหนาในกรณีที่ถูกคำร้องขอหรือผู้ผลิตระบุว่าเป็นถุงยางอนามัยแบบบางหรือบางพิเศษ ทั้งนี้องค์การอนามัยโลก (WHO) มีกำหนดค่าความหนาของถุงยางอนามัยเป็น $(0.065 + 0.015, - 0.020)$ มิลลิเมตร หรือ 0.045 ถึง 0.080 มิลลิเมตร⁽³⁾

เนื่องจากถุงยางอนามัยที่หนามากจะทำให้ผู้ใช้รู้สึกไม่เป็นธรรมชาติ ทำให้ไม่ยากใช้ถุงยางอนามัย จะเป็นผลร้ายในการไม่ป้องกันโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์หรือการคุมกำเนิด เกิดปัญหาสังคมมากมาย ดังนั้น การผลิตถุงยางอนามัยจึงมีการแข่งขันพัฒนารูปแบบถุงยางอนามัยให้มีความหนาน้อย เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้ใช้ที่ต้องการความรู้สึกเป็นธรรมชาติขณะมีเพศสัมพันธ์ แต่ทั้งนี้ผู้ใช้ก็อาจรู้สึกกังวลว่าถุงยางอนามัยที่บางจะแตกง่ายหรือไม่ จะมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์น้อยลงหรือไม่ และถุงยางอนามัยที่หนามากจะมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์มากกว่าถุงยางอนามัยที่บางกว่าหรือไม่ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญที่จะศึกษาให้ทราบว่าความหนาของถุงยางอนามัยมีผลต่อคุณภาพถุงยางอนามัยอย่างไร โดยเลือกใช้ตัวอย่างถุงยางอนามัยที่ทำจากน้ำยางธรรมชาติ ขนาด 52 มิลลิเมตร และขนาด 52.5 มิลลิเมตร เพื่อควบคุมเกณฑ์กำหนดค่าปริมาตรขณะแตกให้เหมือนกัน และเป็นขนาดที่จำหน่ายมากที่สุดในท้องตลาด ทั้งนี้เลือกตัวอย่างทั้งแบบผิวเรียบและผิวไม่เรียบ ครอบคลุมถุงยางอนามัยหลากหลายยี่ห้อจากทุกบริษัทที่ผลิตในประเทศไทย 6 แห่ง และนำเข้า 2 แห่ง เพื่อทดสอบหาค่าความหนาของถุงยางอนามัย ความดันขณะแตกและปริมาตรขณะแตกของถุงยางอนามัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาว่าค่าความหนาต่าง ๆ ของถุงยางอนามัยมีผลต่อคุณภาพถุงยางอนามัยอย่างไร โดยพิจารณาจากค่าความดันขณะแตกและปริมาตรขณะแตกของถุงยางอนามัย และประเมินความเสี่ยงต่อความปลอดภัยของผู้ใช้ถุงยางอนามัย

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

ถุงยางอนามัยที่ทำจากน้ำยางธรรมชาติ แบบมีสารหล่อลื่น ความกว้างระบุขนาด 52 มิลลิเมตร จำนวน 27 ตัวอย่าง และขนาด 52.5 มิลลิเมตร จำนวน 3 ตัวอย่าง รวม 30 ตัวอย่าง ๆ ละ 144 ชิ้น เพื่อควบคุมเกณฑ์กำหนดค่าปริมาตรขณะแตกให้เหมือนกัน และเป็นขนาดที่จำหน่ายมากที่สุดในท้องตลาด ทั้งแบบผิวเรียบและผิวไม่เรียบ เป็นถุงยางอนามัยที่ผลิตในประเทศไทยจาก 6 แห่ง จำนวน 28 ตัวอย่าง นำเข้าจากประเทศญี่ปุ่น 1 ตัวอย่าง และนำเข้าจากประเทศมาเลเซีย 1 ตัวอย่าง

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องตัดยาง ยี่ห้อ DUMBBELL รุ่น SDAP 100 N พร้อมใบมีดคู่ขนาน ความกว้างใบมีด 20 มิลลิเมตร ความยาวใบมีดไม่น้อยกว่า 70 มิลลิเมตร

2. เครื่องชั่งไฟฟ้า ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น XS205DU ความละเอียด 0.0001 มิลลิกรัม
3. บรรทัดเหล็ก ขนาด (0 – 300) มิลลิเมตร ความละเอียด 0.5 มิลลิเมตร
4. แมนเดรล แท่งสเกลวัดความยาว ช่วงสเกล (20 – 250) มิลลิเมตร ความละเอียด 1 มิลลิเมตร
5. แป้งข้าวโพด
6. กระดาษซับมัน
7. ไอโซโพรพานอล (iso propanal)
8. บีกเกอร์แก้วขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมแท่งคน
9. อ่างน้ำความถี่สูง (ultrasonic bath)
10. กล่องพลาสติกมีฝาปิดแบ่งเป็นช่อง ๆ 2×7 แถว เขียนเลขกำกับ 1 – 13 ช่องที่ 14 สุดท้ายสำหรับใส่ป้ายตัวอย่าง
11. อุปกรณ์สำหรับแขวนชิ้นทดสอบถุงยางอนามัย แยกเป็น 3 แถว เขียนกำกับ A, B, C
12. เครื่องทดสอบความทนความดันของถุงยางอนามัย (Condom Inflation Tester) ยี่ห้อ ENERSOL ประเทศออสเตรเลีย มี 4 หัวทดสอบ ต่อกับเครื่องอัดอากาศแบบ ไม่น้ำมัน กำหนดอัตราการไหลของอากาศ (24 – 30) ลิตรต่อนาที หรือ (0.4 – 0.5) ลิตรต่อวินาที

แผนการชักตัวอย่างและเกณฑ์กำหนด

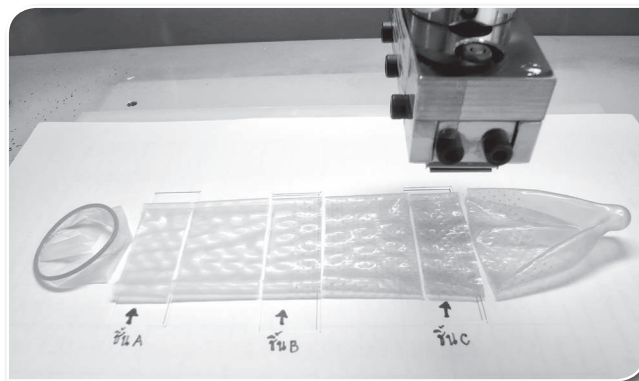
1. ชักตัวอย่างถุงยางอนามัยตามมาตรฐาน มอก. 465 เล่ม 1-2554 (หรือ ISO 2859-1 : 1999) จะได้ขนาดตัวอย่าง จำนวนชิ้นบกพร่องที่ยอมรับ จำนวนชิ้นบกพร่องที่ไม่ยอมรับ กรณีศึกษาถุงยางอนามัย 1 ตัวอย่าง 144 ชิ้น ใช้ทดสอบความดันขณะแตกและปริมาตรขณะแตก 125 ชิ้น ยอมให้มีชิ้นบกพร่อง (ชิ้นถุงยางอนามัยที่ไม่เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด) ไม่เกิน 5 ชิ้น^(4, 5) และทดสอบความหนา 13 ชิ้น
2. เกณฑ์กำหนดความหนาของถุงยางอนามัย ตามองค์การอนามัยโลก (WHO)
 - แบบบาง คือถุงยางอนามัยที่มีความหนาน้อยกว่า 0.060 มิลลิเมตร
 - แบบหนาปกติ คือถุงยางอนามัยที่มีความหนาตั้งแต่ 0.060 ถึง 0.080 มิลลิเมตร
 - แบบหนา คือถุงยางอนามัยที่มีความหนามากกว่า 0.080 มิลลิเมตร
3. เกณฑ์กำหนดของถุงยางอนามัย ตาม มอก.625 – 2554
 - ค่าความดันขณะแตก ต้องไม่น้อยกว่า 1.0 กิโลพาสคัล
 - ค่าปริมาตรขณะแตก ต้องไม่น้อยกว่า 18.0 ลูกบาศก์เดซิเมตร (ลิตร) สำหรับถุงยางอนามัยความกว้างตั้งแต่ 50.0 มิลลิเมตร จนถึงน้อยกว่า 56.0 มิลลิเมตร
 - ไม่มีเกณฑ์กำหนดสำหรับค่าความหนาของถุงยางอนามัย

วิธีการ

ใช้วิธีทดสอบตาม มอก.625 – 2554 ดังนี้

1. การวัดความหนาของถุงยางอนามัยด้วยวิธีชั่ง (ตัวอย่างละ 13 ชิ้น)
 - 1.1 คลี่ถุงยางอนามัยออก โรยแป้งข้าวโพดเล็กน้อย เพื่อไม่ให้ยางเกาะติดกัน
 - 1.2 ทำเครื่องหมายตำแหน่ง A ที่ระยะ (30 ± 5) มิลลิเมตร จากปากถุงด้วยบรรทัดเหล็ก ตำแหน่ง C ที่ระยะ (30 ± 5) มิลลิเมตร จากกันถุงไม่รวมกระเปาะ ด้วย แมนเดรล และตำแหน่ง B ที่ระยะกึ่งกลางระหว่างตำแหน่ง A และ C

- 1.3 ตัดถุงยางอนามัยตามตำแหน่งที่ได้ทำเครื่องหมายไว้แล้วด้วยเครื่องตัดยาง จะได้ชั้นทดสอบ A ชั้นทดสอบ B และชั้นทดสอบ C วางชั้นทดสอบใส่กล่องพลาสติกที่แยกกล่องติดป้าย A, B, C วางชั้นทดสอบเรียงตามหมายเลขที่กำหนด
- 1.4 ตัดชั้นทดสอบที่เป็นวงแหวนออก ใช้บรรทัดเหล็กวัดความยาวของขอบด้านหนึ่งให้ได้ค่าละเอียด 0.5 มิลลิเมตร ถ้าถุงยางอนามัยผืนไม่ขนาดกันให้วัดความยาวของขอบทั้ง 2 ด้าน คำนวณค่าเฉลี่ยความยาว
- 1.5 เช็ดสารหล่อลื่นออกด้วยกระดาษซับมัน ล้างชั้นทดสอบด้วยไอโซโพรพานอลโดยใช้อ่างน้ำ ความถี่สูง และผึ่งให้แห้งหนึ่งคืน



ภาพที่ 1 การตัดถุงยางอนามัยเป็น 3 ชั้นทดสอบด้วยเครื่องตัดยาง

- 1.6 ชั่งชั้นทดสอบ บันทึกค่าละเอียดถึง 0.0001 กรัม
- 1.7 คำนวณค่าความหนาชั้นเดียวของชั้นทดสอบ A ชั้นทดสอบ B และชั้นทดสอบ C จากสูตร

$$t = \frac{1}{p} * \frac{1}{A} * m * 1,000$$

โดย	t	คือ	ความหนาชั้นเดียวของชั้นทดสอบ (มิลลิเมตร)
	p	คือ	ความหนาแน่นของยาง = 0.933 (กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)
	A	คือ	พื้นที่ของชั้นทดสอบ (ตารางมิลลิเมตร) = ความยาวที่วัดได้ x 20
	m	คือ	น้ำหนักของชั้นทดสอบ (กรัม)

- 1.12 คำนวณค่าความหนาเฉลี่ยของถุงยางอนามัยแต่ละชิ้น
2. การหาค่าความดันขณะแตกและปริมาตรขณะแตกของถุงยางอนามัย (ตัวอย่างละ 125 ชิ้น)



ภาพที่ 2 เครื่องทดสอบความดันขณะแตกของถุงยางอนามัย (Air Inflation Tester)

- 2.1 เตรียมเครื่องอัดอากาศ เครื่องทดสอบความทนความดันขณะแตกของถุงยางอนามัย และโปรแกรมการทดสอบในคอมพิวเตอร์
- 2.2 สวมถุงยางอนามัยบนหัวทดสอบ จับยึดถุงยางอนามัยไม่ให้หลุดด้วยตัวครอบ
- 2.3 อัดอากาศเข้าถุงยางอนามัยด้วยอัตราการไหลที่คงที่ 24 ถึง 30 ลิตรต่อนาที (หรือ 0.4 ถึง 0.5 ลิตรต่อวินาที) จนถุงยางอนามัยแตก โปรแกรมการทดสอบจะบันทึกค่าความดันขณะแตก ปริมาตรขณะแตกของแต่ละชิ้นทดสอบ ทำการทดสอบถุงยางอนามัยชิ้นต่อ ๆ ไป จนครบ 125 ชิ้นต่อตัวอย่าง

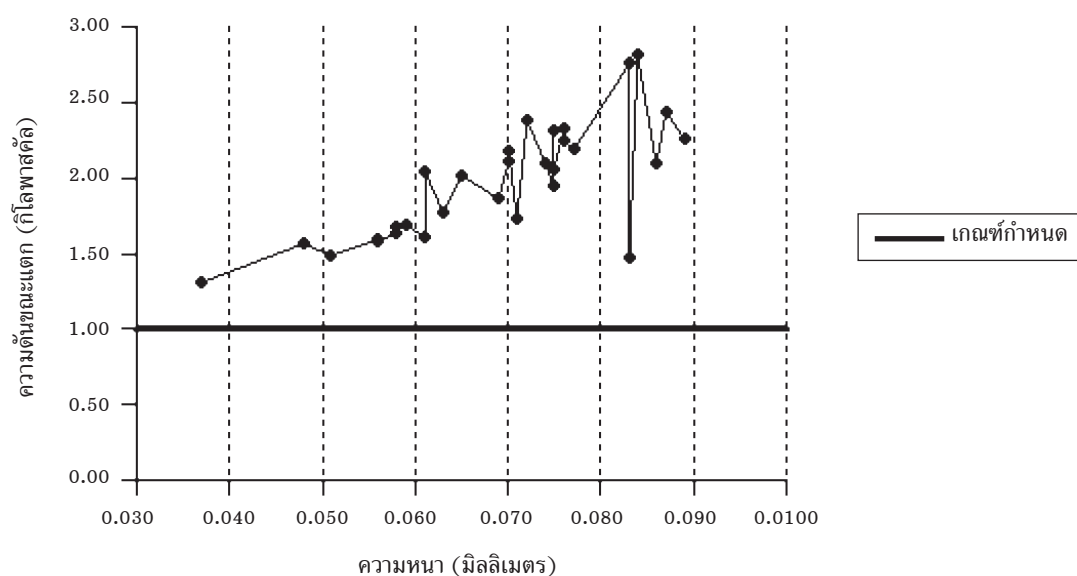
การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ค่าความหนาของถุงยางอนามัย ค่าความดันขณะแตกและค่าปริมาตรขณะแตกของถุงยางอนามัย และนับจำนวนชิ้นบกพร่องที่ตรวจพบ อีกทั้งนำข้อมูลจากการทดสอบมาสร้างกราฟเพื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหนากับค่าความดันขณะแตก และค่าความหนากับค่าปริมาตรขณะแตกของถุงยางอนามัยทั้ง 30 ตัวอย่าง

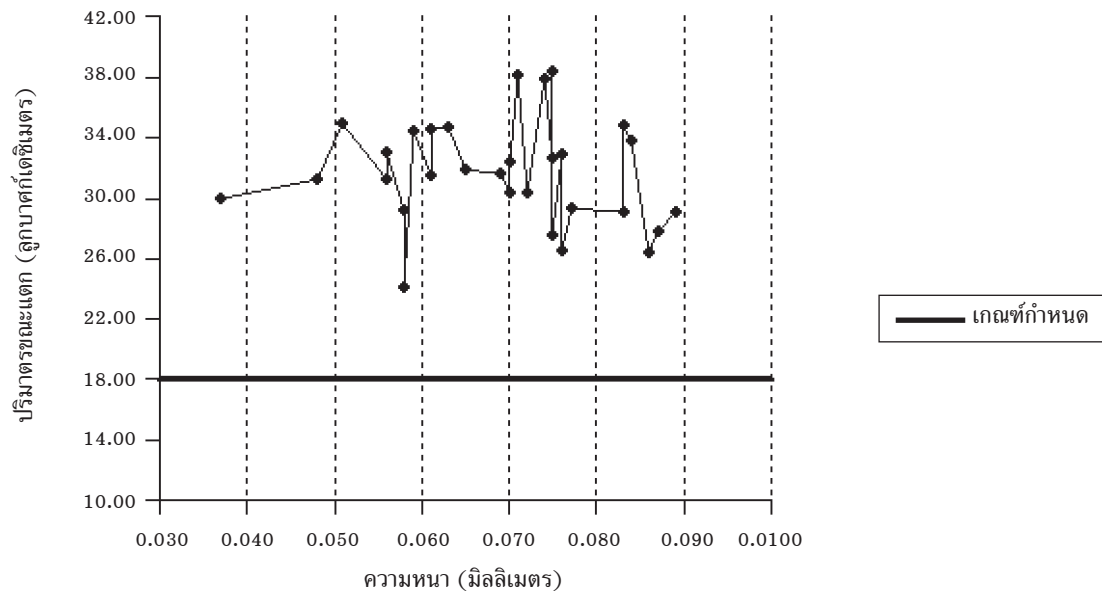
ผล

จากการทดสอบความหนาของถุงยางอนามัย ความดันขณะแตกและปริมาตรขณะแตกของถุงยางอนามัย จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าถุงยางอนามัยมีค่าความหนาตั้งแต่ 0.037 ถึง 0.089 มิลลิเมตร ความหนาเฉลี่ยเท่ากับ 0.069 มิลลิเมตร ค่าความดันขณะแตกตั้งแต่ 1.31 ถึง 2.81 กิโลพาสคัล ค่าเฉลี่ยความดันขณะแตกเท่ากับ 1.97 กิโลพาสคัล และค่าปริมาตรขณะแตกตั้งแต่ 24.10 ถึง 38.32 ลูกบาศก์เดซิเมตร ค่าเฉลี่ยปริมาตรขณะแตกเท่ากับ 31.63 ลูกบาศก์เดซิเมตร

พิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหนากับค่าความดันขณะแตกและค่าความหนากับค่าปริมาตรขณะแตกของถุงยางอนามัย พบว่าค่าความดันขณะแตกมีความสัมพันธ์กับค่าความหนาของถุงยางอนามัย โดยค่าความดันขณะแตกสูงขึ้น เมื่อถุงยางอนามัยหนาขึ้น ยกเว้น 1 ตัวอย่าง ที่ค่าความดันขณะแตกไม่สูง แม้ว่าจะมีความหนา 0.083 มิลลิเมตร สำหรับค่าปริมาตรขณะแตก พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับค่าความหนาของถุงยางอนามัย (ภาพที่ 3 และ 4)



ภาพที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยความหนาของถุงยางอนามัยจำนวน 13 ชิ้น กับค่าเฉลี่ยความดันขณะแตกของถุงยางอนามัย จำนวน 125 ชิ้น ของแต่ละตัวอย่าง รวม 30 ตัวอย่าง



ภาพที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยความหนาของถุงยางอนามัยจำนวน 13 ชิ้น กับค่าเฉลี่ยปริมาตรขณะแตกของถุงยางอนามัย จำนวน 125 ชิ้น ของแต่ละตัวอย่าง รวม 30 ตัวอย่าง

วิเคราะห์จำนวนชิ้นบกพร่องที่ตรวจพบของแต่ละตัวอย่าง จำนวน 30 ตัวอย่าง จากการทดสอบความดันขณะแตกและปริมาตรขณะแตกของถุงยางอนามัย ตัวอย่างละ 125 ชิ้น ยอมให้มีชิ้นบกพร่องไม่เกิน 5 ชิ้น พบว่าการทดสอบความดันขณะแตกของถุงยางอนามัย พบจำนวนชิ้นบกพร่องมากที่สุด 3 ชิ้น เป็นจำนวนชิ้นบกพร่องที่พบในตัวอย่างถุงยางอนามัยที่มีความหนาน้อยที่สุดคือ 0.037 มิลลิเมตร และการทดสอบปริมาตรขณะแตกของถุงยางอนามัย พบจำนวนชิ้นบกพร่องมากที่สุด 4 ชิ้น เป็นจำนวนชิ้นบกพร่องที่พบในตัวอย่างถุงยางอนามัยที่มีความหนา 0.086 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตามถุงยางอนามัยทั้ง 30 ตัวอย่าง ผ่านมาตรฐานตามเกณฑ์กำหนดของค่าความดันขณะแตกที่ต้องไม่น้อยกว่า 1.0 กิโลพาสคัล และเกณฑ์กำหนดค่าปริมาตรขณะแตกที่ต้องไม่น้อยกว่า 18.0 ลูกบาศก์เดซิเมตร

วิจารณ์

จากข้อมูลการทดสอบความหนาของถุงยางอนามัยกับคุณภาพความทนทานและความยืดตัวของถุงยางอนามัย โดยพิจารณาจากค่าความดันขณะแตกและค่าปริมาตรขณะแตกของถุงยางอนามัย จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าถุงยางอนามัยในท้องตลาดมีความหนาตั้งแต่ 0.037 มิลลิเมตร ถึง 0.089 มิลลิเมตร เมื่อถุงยางอนามัยมีความหนาเพิ่มขึ้น มีแนวโน้มทำให้ค่าความดันขณะแตกเพิ่ม ขึ้นด้วย ยกเว้นถุงยางอนามัย 1 ตัวอย่าง ที่พบว่าค่าความดันขณะแตกไม่สูง ถึงแม้ว่าจะมีความหนามาก ซึ่งอาจเกิดจากสูตรการผลิต อนึ่ง พบว่าค่าความหนาของถุงยางอนามัยไม่มีความสัมพันธ์กับค่าปริมาตรขณะแตก ผลการศึกษานี้แม้ว่าถุงยางอนามัยจะผ่านมาตรฐานทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตามควรระมัดระวังการใช้ถุงยางอนามัยที่บางมาก ด้วยถุงยางอนามัยที่บางจะมีความทนทานน้อย เสี่ยงขาดง่าย

องค์การอนามัยโลกให้ข้อคิดเห็นเกี่ยวกับความหนาของถุงยางอนามัยที่ควรจะมีทั้งแบบบางมากและแบบหนามาก เนื่องจากถุงยางอนามัยที่บางมากอาจจะไม่ผ่านเกณฑ์กำหนดการทดสอบความดันขณะแตกและปริมาตรขณะแตก ในขณะที่ถุงยางอนามัยที่หนามากไม่มีหลักฐานว่าจะทำให้ประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ผู้ใช้ไม่นิยมใช้ถุงยางอนามัยที่หนามาก⁽³⁾ ทั้งนี้มีการอ้างอิงงานวิจัยจากต่างประเทศที่มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาค้นคว้านี้ ที่พบว่าถุงยางอนามัยที่หนามากมีคุณภาพไม่แตกต่างกับถุงยางอนามัยที่หนาน้อย⁽⁵⁾ คณะผู้วิจัยจะทำการสำรวจค่าความหนาของถุงยางอนามัยที่จำหน่ายในประเทศไทยต่อไปให้ครอบคลุมทุกขนาดทุกยี่ห้อ

สรุป

จากการศึกษาผลของความหนาต่อคุณภาพของถุงยางอนามัย จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าค่าความดันขณะแตกมีความสัมพันธ์กับค่าความหนาของถุงยางอนามัย โดยเมื่อถุงยางอนามัยหนาขึ้น ค่าความดันขณะแตกจะสูงขึ้น สำหรับค่าปริมาตรขณะแตก พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับค่าความหนาของถุงยางอนามัย และถุงยางอนามัยทั้ง 30 ตัวอย่าง ผ่านมาตรฐาน มอก.625 - 2554 ตามเกณฑ์กำหนดของค่าความดันขณะแตกที่ต้องไม่น้อยกว่า 1.0 กิโลพาสคัล และเกณฑ์กำหนดค่าปริมาตรขณะแตกที่ต้องไม่น้อยกว่า 18.0 ลูกบาศก์เดซิเมตร โดยมีค่าเฉลี่ยความดันขณะแตกเท่ากับ 1.97 กิโลพาสคัล และค่าเฉลี่ยปริมาตรขณะแตกเท่ากับ 31.63 ลูกบาศก์เดซิเมตร ดังนั้น การผลิตถุงยางอนามัยให้บางแต่ยังคงคุณภาพมาตรฐานเป็นสิ่งสำคัญ สำหรับการเลือกซื้อถุงยางอนามัยผู้ใช้สามารถสังเกตได้ หากเป็นถุงยางอนามัยแบบบางจะมีข้อความหรือชื่อรุ่นหรือมีตัวเลข 002 หรือ 003 ที่สื่อความหมายว่าเป็นแบบบาง หากเป็นถุงยางอนามัยแบบหนาจะมีข้อความ เช่น extra strong ดังนั้นผู้ใช้ถุงยางอนามัยสามารถสังเกตจากชื่อหรือสอบถามผู้ขายเพื่อความมั่นใจ และหากต้องการใช้ถุงยางอนามัยแบบบาง ควรระมัดระวังการไ้เสียบยาวเพราะเสียบอาจทำให้ถุงยางอนามัยฉีกขาดได้ ควรเลือกซื้อถุงยางอนามัยที่มีเลขใบอนุญาตเครื่องมือแพทย์จากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ไม่ใช่ถุงยางอนามัยที่หมดอายุ และไม่ใช้ซ้ำ

เอกสารอ้างอิง

1. ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 4390 (พ.ศ. 2554) ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511 ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 129 ตอนพิเศษ 93 ง (ลงวันที่ 13 มิถุนายน 2555)
2. International Organization for Standardization. ISO 4074:2002/Cor 1:2003, Natural latex rubber condoms – Requirements and test methods. Geneva: ISO; 2003.
3. International Organization for Standardization. ISO 4074:2002/Cor 2:2008, Natural latex rubber condoms – Requirements and test methods. Geneva: ISO 2008.
4. World Health Organization. Male latex condom: specification, prequalification and guidelines for procurement, 2010. USA.: WHO; 2013. p. 32, 127.
5. ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 4398 (พ.ศ. 2555) ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511 ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 129 ตอนพิเศษ 97 ง (ลงวันที่ 20 มิถุนายน 2555)
6. International Organization for Standardization. ISO 2859-1:1999, Sampling procedures for inspection by attributes – Part 1: sampling schemes indexed by acceptance quality limit (AQL) for lot-by-lot inspection. Geneva: ISO; 1999.
7. Golombok S, Harding R, Sheldon J. An evaluation of a thicker versus a standard condom with gay men. AIDS 2001; 15(2): 245–50.

The Result of Thickness to Bursting Pressure and Bursting Volume of Natural Latex Rubber Condoms

Wanpen Duangsawang and Supawan Chongthamawat

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

ABSTRACT The study of thickness of natural latex rubber condoms to rubber strength and elongation was carried out by determination of bursting pressure and bursting volume. A total of 30 samples (nominal width 52 millimetres and 52.5 millimetres) were tested to confirm compliance with the requirements of Thai Industrial Standard (TIS) 625 B.E. 2554. Each sample was determined the thickness by the mass method and determined bursting pressure and bursting volume by Air Inflation Tester. The results showed that the bursting pressure was increased when thickness of condom increased, but thickness of condoms did not effect to bursting volume. However bursting pressure and bursting volume of all samples were accepted and complied with the standard. Condoms are developing to thinner condoms but safety with quality.

Keywords : condoms, thickness, bursting pressure, bursting volume

การศึกษาพฤติกรรมการบริโภคอาหารเพื่อ การประเมินความเสี่ยงด้านจุลชีววิทยา

ปราณี นาคประสิทธิ์ สันตกิจ นิลอุดมศักดิ์ และอุบลวรรณ รอดประดิษฐ์

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ พฤติกรรมการบริโภคอาหารเป็นปัจจัยสำคัญในการประเมินความเสี่ยงด้านจุลชีววิทยา ในปี พ.ศ. 2551 สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารได้จัดทำแบบสอบถามเพื่อใช้เป็นเครื่องมือศึกษาพฤติกรรมการบริโภค นมผงดัดแปลงสำหรับทารก ทำให้ได้ข้อมูลมาใช้คำนวณการได้รับสัมผัสเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และสามารถอธิบายอันตรายที่อาจเกิดขึ้นได้ ซึ่งแบบสอบถามที่ได้รับตอบกลับจากผู้เลี้ยงดูทารกจำนวน 1,000 ราย พบว่าทารกมีความน่าจะเป็น (probability) ในการบริโภคนมผงอย่างเดียว และนมผงบวกนมแม่ เท่ากับ 0.4570 และ 0.2320 ตามลำดับ โดยมีความถี่ในการบริโภคมากที่สุดคือ 4 ครั้ง 5 ครั้ง และ 8 ครั้งต่อวัน คิดเป็นร้อยละ 20.45, 17.49 และ 16.78 ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาพิจารณาร่วมกับอัตราการเกิดของทารก ข้อมูลการปนเปื้อนของ *Bacillus cereus* ในนมผงดัดแปลงสำหรับทารกและการศึกษาอื่นๆ ของจุลินทรีย์ชนิดนี้ เช่น อัตราการเจริญและการอยู่รอดในสภาวะต่างๆ ปริมาณน้ำอิสระในอาหาร (A_w) ทำให้สามารถประเมินความเสี่ยงหรือพยากรณ์การเจ็บป่วยของทารกในการบริโภคนมผงดัดแปลงสำหรับทารก ซึ่งเกิดจาก *B. cereus* ที่มีปริมาณมากกว่า 100 cfu ต่อกรัม เท่ากับ 427 ครั้ง ต่อประชากร 100,000 คน แสดงว่าแบบสอบถามที่สร้างขึ้นใช้ประเมินความเสี่ยงครั้งนี้ได้ และใช้เป็นแนวทางในการประเมินความเสี่ยงด้านจุลชีววิทยาในอาหารชนิดอื่นๆ ได้

บทนำ

การประเมินความเสี่ยงทางจุลชีววิทยา (Microbiological Risk Assessment) คือ การอธิบายลักษณะเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เพื่อประมาณโอกาสที่ประชากรจะเกิดการเจ็บป่วยเนื่องจากการได้รับสัมผัส เป็นการดำเนินการบนพื้นฐานกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ที่ต้องอาศัยความร่วมมือระหว่างบุคลากรวิชาชีพต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง การประเมินความเสี่ยงมี 4 ขั้นตอน คือ

1) การระบุอันตราย (Hazard identification) คือการระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค หรือสารพิษที่เชื้อจุลินทรีย์สร้างขึ้นและทำให้เกิดพยาธิสภาพแก่มนุษย์

2) การประเมินการได้รับสัมผัส (Exposure assessment) การหาปริมาณและโอกาสที่ประชากรสัมผัสอันตราย เส้นทาง จำนวน ระยะเวลาของการสัมผัส

3) การอธิบายอันตราย (Hazard characterization) ทางจุลชีววิทยาที่มีผลต่อมนุษย์ เป็นการอธิบายถึงผลกระทบที่อาจเกิดจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค หรือสารพิษที่เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคสร้างขึ้น ทั้งแบบเฉียบพลันหรือแบบเรื้อรัง รวมถึงความเป็นพิษที่อาจนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็ง

4) การอธิบายลักษณะของความเสี่ยง (Risk characterization) เป็นกระบวนการนำข้อมูลที่ได้จาก 3 ขั้นตอนดังกล่าวมาผสมผสานเพื่อนำมาพยากรณ์ความเสี่ยง ซึ่งหมายถึงการพยากรณ์โอกาสและความรุนแรงของโรค โดยเชื่อมโยงกับความไม่แน่นอนต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นกับกลุ่มประชากรที่ศึกษา^(1, 2, 3, 4) ดังนั้นนอกจากจะต้องประเมินว่าในอาหารที่รับประทานมีเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคปนเปื้อนหรือไม่ เป็นเชื้อชนิดใด ไวหรือทนต่อความร้อน มีปริมาณมากหรือน้อย สามารถสร้างสารพิษในอาหารได้หรือไม่ สารพิษที่สร้างไวหรือทนต่อความร้อน เชื้อโรคที่มีอยู่ในอาหารมีโอกาสเพิ่มจำนวนจนถึงระดับที่ก่อให้เกิดอันตราย หรือลดจำนวนลงจนถึงระดับที่ไม่เป็นอันตรายในขณะรับประทานอาหาร ซึ่งสิ่งเหล่านี้ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับพฤติกรรมกรรมการบริโภค เช่น รับประทานอาหารชนิดนี้บ่อยแค่ไหน (ความถี่ในการรับประทานอาหารชนิดนั้น) ปริมาณที่รับประทานมากหรือน้อยเพียงใด การบริโภคในขณะอาหารร้อนหรือปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น เป็นต้น ฉะนั้นในปี พ.ศ. 2551 สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ซึ่งมีหน้าที่ตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัยอาหารที่จำหน่ายในประเทศ รวมถึงอาหารที่นำเข้าจากต่างประเทศ⁽⁵⁾ ได้ร่วมกันสร้างแบบสอบถามสำหรับเป็นเครื่องมือสำรวจพฤติกรรมกรรมการบริโภคอาหารของประชากรกลุ่มเป้าหมาย เพื่อนำไปประกอบการประเมินการได้รับสัมผัสและการอธิบายอันตรายของเชื้อ *Bacillus cereus* ในนมผงดัดแปลงสำหรับทารก โดยมีวัตถุประสงค์คือ

1) นำผลไปประเมินเพื่อพยากรณ์ระดับความเจ็บป่วยของทารกเนื่องจากเชื้อ *B. cereus* ที่ปนเปื้อนในนมผงดัดแปลงสำหรับทารก

2) ใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบสำรวจพฤติกรรมกรรมการบริโภคอาหารชนิดต่างๆ ที่อาจมีการปนเปื้อนของเชื้อโรคชนิดนี้และชนิดอื่นๆ ที่สามารถนำไปประเมินความเสี่ยงหรือพยากรณ์การเจ็บป่วยของกลุ่มประชากรที่ต้องการศึกษา

3) เป็นข้อมูลให้ผู้จัดการความเสี่ยงนำไปกำหนดและใช้เป็นเครื่องมือวัดประสิทธิภาพของการลดอัตราการเจ็บป่วยจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารดังกล่าวได้

วัสดุและวิธีการ

แบบสอบถาม

เนื่องจากพฤติกรรมการบริโภคอาหารของประชากรกลุ่มเป้าหมายเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ต้องนำมาประกอบการประเมินความเสี่ยงของการเกิดโรคจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีอยู่หลายชนิด การสร้างแบบสอบถามต้องคำนึงถึงชนิดและกลไกการก่อโรคของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการศึกษาด้วย ดังนั้น คำถามเกี่ยวกับพฤติกรรมการบริโภคอาหารจึงต้องสัมพันธ์กับคุณสมบัติของเชื้อ และกลไกการก่อโรคของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคนั้นๆ ด้วย ประกอบกับอาหารที่มีความเสี่ยงบางชนิดที่ไม่พบข้อมูลการบริโภคในหนังสือข้อมูลการบริโภคอาหารของประเทศไทย หรือเป็นอาหารที่ถูกคำนวณปริมาณการบริโภคร่วมกับอาหารชนิดอื่น⁽⁶⁾ จำเป็นต้องศึกษาปริมาณการบริโภคที่แท้จริงเฉพาะอาหารที่มีความเสี่ยงนั้นสำหรับคนไทย

การสำรวจ

สำนักวิจัยเอแบคโพล มหาวิทยาลัยอัสสัมชัญ ดำเนินการโดยนำแบบสอบถามที่สร้างขึ้น (ภาคผนวก) ไปสำรวจประชากรกลุ่มเป้าหมายที่ต้องการศึกษาคือ พ่อ แม่ หรือผู้เลี้ยงเด็ก ตามศูนย์รับเลี้ยงเด็กในเขตกรุงเทพมหานคร และปริมณฑลที่อยู่ในความดูแลของกรมอนามัย และสำนักอนามัยกรุงเทพฯ โดยกำหนดกลุ่มเป้าหมาย และยอมรับความคลาดเคลื่อนที่ร้อยละ 5 ($e = 0.05$) ซึ่งคำนวณได้จำนวน 400 ราย ซึ่งจากการสำรวจได้รับการตอบกลับจำนวน 1,000 ราย

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

รวบรวมข้อมูลที่ได้จากการสำรวจกลุ่มประชากรเป้าหมายเกี่ยวกับปริมาณความถี่ และรูปแบบของการบริโภค รายงานในรูปสถิติอย่างง่าย เช่น ค่าเฉลี่ย ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด ร้อยละ และโอกาสหรือความน่าจะเป็น (probability) ซึ่งเท่ากับร้อยละของการรับประทานอาหารแต่ละประเภทหารด้วยผลรวมของการบริโภค เป็นต้น โดยนำเสนอในรูปแบบของตาราง

ผล

การศึกษาพฤติกรรมการบริโภคอาหารของทารกที่มีโอกาสเสี่ยงจากการปนเปื้อน *B. cereus* ในนมผงดัดแปลงสำหรับทารก พบทารกบริโภคนมแม่อย่างเดียว นมผงอย่างเดียว นมแม่บวกนมผง และอื่นๆ ร้อยละ 30.5, 45.7, 23.2 และ 0.6 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งคิดเป็นทารกมีโอกาส (probability) บริโภคนมผง และนมแม่บวกนมผงเท่ากับ 0.4570 และ 0.2320 ตามลำดับ โดยมีการบริโภคสูงสุด 8 ขวด (ครั้ง) ต่อวัน (ตารางที่ 2) น้ำที่ใช้ชงคือ น้ำร้อน น้ำอุ่น น้ำต้มสุกและน้ำประปา (ตารางที่ 3) เมื่อชงนมแล้วดื่มทันทีร้อยละ 84.13 ชงและเก็บไว้ยังไม่ดื่มร้อยละ 15.87 (ตารางที่ 4) การเก็บส่วนใหญ่เก็บที่อุณหภูมิห้องร้อยละ 73.51 และเก็บในตู้เย็นร้อยละ 15.38 (ตารางที่ 5) โดยการเก็บที่อุณหภูมิห้องจะเก็บไว้นานเฉลี่ย 2 ชั่วโมง 55 นาที ส่วนกรณีมีการเก็บในตู้เย็นก่อนที่จะนำมาให้ทารกดื่มจะมีการอุ่นร้อยละ 51.72 ไม่ได้อุ่นร้อยละ 48.28 (ตารางที่ 6) สำหรับนมที่ชงแล้วดื่มไม่หมดส่วนใหญ่จะทิ้งร้อยละ 60.76 หรือวางที่อุณหภูมิห้องร้อยละ 26.58 (ตารางที่ 7) ซึ่งหลังจากดื่มแล้วพบว่าล้างขวดนมทันทีร้อยละ 57.10 และไม่ล้างขวดนมทันทีร้อยละ 42.90 (ตารางที่ 8) การล้างขวดนมส่วนใหญ่จะใช้น้ำยาล้างร้อยละ 95.2 (ตารางที่ 9) ซึ่งหลังจากการล้างทำความสะอาดขวดนมแล้วมีการใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อในขวดนม ร้อยละ 83.64 และวางไว้ให้แห้งโดยไม่ใช้ความร้อนร้อยละ 3.17 (ตารางที่ 10) ขณะที่ในรอบปีที่ผ่านมาทารกไม่มีอาการท้องเสียหรือท้องร่วงร้อยละ 78.83 โดยมีอาการท้องเสียมากที่สุด 1, 2 และ 3 ครั้ง คิดเป็นร้อยละ 12.16, 3.69 และ 2.93 ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 1 ร้อยละของตัวอย่างจำแนกตามชนิดของนมในการเลี้ยงเด็ก/ทารก

ลำดับที่	ชนิดของนม	จำนวน (ชุด)	ร้อยละ
1	นมแม่	305	30.5
2	นมผง	457	45.7
3	นมแม่และนมผง	232	23.2
4	อื่นๆ	6	0.6
รวมทั้งสิ้น		1,000	100.0

ตารางที่ 2 ร้อยละของตัวอย่างจำแนกตามความถี่ในการบริโภคนม

ลำดับที่	จำนวนครั้ง (ขวดนมขนาด 4 ออนซ์) ที่ชงนมต่อวัน	จำนวน (ชุด)	ร้อยละ
1	1 ครั้ง	13	1.83
2	2 ครั้ง	49	6.92
3	3 ครั้ง	100	14.10
4	4 ครั้ง	145	20.45
5	5 ครั้ง	124	17.49
6	6 ครั้ง	113	15.94
7	7 ครั้ง	46	6.49
8	8 ครั้ง	119	16.78
รวมทั้งสิ้น		709	100.0

ตารางที่ 3 ร้อยละของตัวอย่างจำแนกตามน้ำที่ใช้ในการชงนม

ลำดับที่	น้ำที่ใช้ในการชงนม	จำนวน (ชุด)	ร้อยละ
1	น้ำร้อน (จากกระติกน้ำร้อน)	120	13.42
2	น้ำอุ่น	398	44.52
3	น้ำต้มสุกที่เย็นแล้ว	168	18.80
4	น้ำร้อนผสมน้ำต้มสุกที่เย็นแล้ว	207	23.15
5	น้ำดื่มบรรจุขวด	0	0
6	น้ำประปา	1	0.11
รวมทั้งสิ้น		894	100.0

ตารางที่ 4 ร้อยละของตัวอย่างจำแนกตามวิธีการเตรียมนมสำหรับเด็ก/ทารก

ลำดับที่	วิธีการเตรียมนมสำหรับเด็ก/ทารก	จำนวน (ชุด)	ร้อยละ
1	ชงและให้ดื่มทันที	578	84.13
2	ชงที่สะอาดแล้วเก็บไว้	105	15.29
3	ชงที่สะอาดหลาย ๆ ชุดแล้วเก็บไว้	4	0.58
รวมทั้งสิ้น		687	100.0

ตารางที่ 5 ร้อยละของตัวอย่างจำแนกตามสถานที่เก็บนมที่ชงไว้

ลำดับที่	สถานที่เก็บนมที่ชงไว้	จำนวน (ชุด)	ร้อยละ
1	ใส่ตู้เย็น	18	15.38
2	วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง	86	73.51
3	ใส่ในเครื่องอุ่นนม	2	1.71
4	ใส่ในกระเป๋ารักษาอุณหภูมิ	4	3.42
5	อื่นๆ	7	5.98
รวมทั้งสิ้น		117	100.0

ตารางที่ 6 แสดงค่าร้อยละของตัวอย่างจำแนกตามการอุ่นนมให้เด็ก/ทารกดื่มภายหลังจากนำออกจากตู้เย็น

ลำดับที่	การจัดการนมภายหลังจากนำออกจากตู้เย็น	จำนวน (ชุด)	ร้อยละ
1	อุ่น	15	51.72
2	ไม่ได้อุ่น	14	48.28
รวมทั้งสิ้น		29	100.0

ตารางที่ 7 ร้อยละของตัวอย่างจำแนกตามการจัดการนมชงที่ทานไม่หมด

ลำดับที่	การจัดการนมชงที่ทานไม่หมด	จำนวน (ชุด)	ร้อยละ
1	ทิ้งไป	48	60.76
2	เก็บใส่ตู้เย็น	7	8.86
3	วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง	21	26.58
4	ใส่ในเครื่องอุ่นนม	2	2.53
5	ใส่กระเป๋ารักษาอุณหภูมิ	1	1.27
รวมทั้งสิ้น		79	100.0

ตารางที่ 8 ร้อยละของตัวอย่างจำแนกตามการล้างชวตนมหลังจากให้นมเด็ก/ทารก

ลำดับที่	การล้างชวตนมหลังจากให้นมเด็ก/ทารก	จำนวน (ชุด)	ร้อยละ
1	ล้างทันที	398	57.10
2	ยังไม่ล้างทันที	299	42.90
รวมทั้งสิ้น		697	100.0

ตารางที่ 9 ร้อยละของตัวอย่างจำแนกตามวิธีการล้างชวตนม

ลำดับที่	วิธีการล้างชวตนม	จำนวน (ชุด)	ร้อยละ
1	ล้างด้วยน้ำยาล้างจานทั่วไป	13	1.92
2	ล้างด้วยน้ำยาล้างชวตนมเด็ก	636	93.80
3	อื่นๆ (น้ำเปล่า)	29	4.28
รวมทั้งสิ้น		678	100.0

ตารางที่ 10 ร้อยละของตัวอย่างจำแนกตามการให้ความร้อนฆ่าเชื้อหลังจากล้างชวตนม

ลำดับที่	วิธีการให้ความร้อนฆ่าเชื้อโรคหลังจากล้างชวตนม	จำนวน (ชุด)	ร้อยละ
1	ใช้น้ำร้อนลวก	456	67.86
2	นึ่งในลังถึง	54	8.04
3	ใส่เครื่องนึ่งชวตนม	52	7.74
4	วางทิ้งไว้ให้แห้ง	26	3.87
5	อื่นๆ	84	12.50
รวมทั้งสิ้น		672	100.0

ตารางที่ 11 ร้อยละของตัวอย่างจำแนกตามจำนวนครั้งของการเจ็บป่วยเนื่องจากท้องเสียหรือท้องร่วงของเด็ก/ทารกที่ผ่านมามีในรอบปี

ลำดับที่	จำนวนครั้งของการเจ็บป่วยเนื่องจากท้องเสีย/ท้องร่วง	จำนวน (ชุด)	ร้อยละ
1	1 ครั้ง	112	12.16
2	2 ครั้ง	34	3.69
3	3 ครั้ง	27	2.93
4	4 ครั้ง	7	0.76
5	5 ครั้ง	3	0.32
6	6 ครั้ง	1	0.11
7	7 ครั้ง	1	0.11
8	8 ครั้ง	10	1.09
9	ไม่มีอาการท้องเสีย/ท้องร่วง	726	78.83
รวมทั้งสิ้น		921	100.0

วิจารณ์

ความเสี่ยงจากการได้รับสัมผัสเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมกรรมการบริโภค ว่าอาหารมีโอกาสปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคน้อยเพียงใด (ความชุกของเชื้อโรคในอาหาร) การรับประทานบ่อยแค่ไหน (ความถี่ในการบริโภค) ปริมาณของอาหารที่รับประทานแต่ละครั้งมากหรือน้อย (ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ร่างกายได้รับ) และลักษณะเฉพาะของรูปแบบการบริโภคอาหาร เช่น ชอบบริโภคอาหารร้อนๆ บริโภคทันทีที่ปรุงประกอบเสร็จ หรือชอบปล่อยให้เย็นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ถึง 3 ชั่วโมงจึงรับประทาน มีการอุ่นอาหารให้ร้อนก่อนหรือไม่ ซึ่งลักษณะเฉพาะที่ต้องการทราบเหล่านี้ จะต้องสัมพันธ์กับชนิดและกลไกการก่อให้เกิดโรคของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ต้องการศึกษา เพราะเป็นส่วนสำคัญที่จะทำให้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหรือสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นเพิ่มหรือลดจำนวนจนถึงระดับที่เป็นอันตรายหรือไม่เป็นอันตรายในขณะบริโภค ดังนั้นข้อมูลจากผู้ประเมินต้องการทราบพฤติกรรมกรรมการบริโภคอาหาร จะต้องออกแบบให้ครอบคลุมสิ่งเหล่านี้ด้วย เพื่อจะได้นำไปประเมินความเสี่ยงหรือพยากรณ์การเกิดโรคได้อย่างถูกต้อง จากการศึกษาพฤติกรรมกรรมการบริโภคนมผงสำหรับทารก พบทารกดื่มนมผงอย่างเดียวและนมผงบวกนมแม่ ร้อยละ 45.7 และ 23.2 เท่ากับทารกมีความน่าจะเป็น (probability) ที่จะรับประทานนมผงและนมผงบวกนมแม่ เท่ากับ 0.4570 และ 0.2320 ตามลำดับ โดยมีการบริโภคต่อวันสูงสุด 8 ครั้ง ดังนั้นทารกกลุ่มนี้จึงมีความเสี่ยงสูงสุดที่จะได้รับเชื้อ *B. cereus* ที่อาจปนเปื้อนในนมผงดัดแปลงสำหรับทารก ประเทศไทยมีการนำเข้านมผงสำหรับทารกจากต่างประเทศ โดยมีมาตรการควบคุมตามข้อกำหนดและเกณฑ์การยอมรับของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข โดยระบุประเภทอาหาร นมดัดแปลงสำหรับทารก/อาหารทารกชนิดผง ข้อกำหนดปริมาณ *Bacillus cereus* ไม่เกิน 100 cfu/ใน 1 กรัม⁽⁸⁾ และจากการตรวจวิเคราะห์นมผงดัดแปลงสำหรับทารกของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ในปี 2551 ถึง 2552 จำนวน 400 ตัวอย่างพบการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* มากกว่า 100 cfu ต่อกรัม 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.0 หรือเท่ากับความชุกของการปนเปื้อน 0.01 (จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ/จำนวนตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์) โดยมีจำนวนเชื้อที่พบสูงสุดเท่ากับ 550 cfu ต่อกรัม จากข้อมูลนี้ได้มีการนำไปประกอบการประเมินความเสี่ยงหรือพยากรณ์การเกิดโรค พบทารกที่มีอายุ 6 เดือนแรก มีโอกาสเจ็บป่วยเนื่องจากเชื้อ *B. cereus* ที่ปนเปื้อนในนมผงดัดแปลงสำหรับทารก มากกว่า 100 cfu ต่อกรัม จำนวน 427 คนต่อประชากร 100,000 คน⁽⁹⁾ แต่จากข้อเท็จจริงมีรายงานว่าเชื้อนี้ที่จำนวน 10^5 cfu ต่อกรัม หรือมากกว่าจึงจะสามารถก่อให้เกิดโรคได้⁽¹⁰⁾ ดังนั้นลำพังปริมาณเชื้อที่พบสูงสุดในนมผง ยังไม่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ ต้องมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อให้ถึงระดับดังกล่าว จึงต้องอาศัยพฤติกรรมอื่นๆ ในการบริโภคนมผงดัดแปลงสำหรับทารก เช่น ชนิดของน้ำที่ใช้ชงนม ชงแล้วดื่มทันทีหรือไม่ ถ้าไม่ดื่มทันทีเก็บไว้อย่างไร เก็บนานแค่ไหน มีการอุ่นอีกครั้งก่อนบริโภคหรือไม่ ถ้าดื่มไม่หมดจัดการกับนมที่เหลืออย่างไร และมีกรรมวิธีในการทำความสะอาดขวดนมอย่างไร พฤติกรรมเหล่านี้มีส่วนทำให้เชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อนได้มากขึ้น (ปนเปื้อนจากน้ำ หรือขวดนมที่ล้างไม่สะอาด) หรือเพิ่มจำนวนได้มากขึ้น (ชงนมแล้วไม่ดื่มทันทีหรือดื่มไม่หมดและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน) จนถึงระดับที่เป็นอันตรายต่อทารก และจากการศึกษาพฤติกรรมพบข้อมูลการเจ็บป่วยเนื่องจากท้องเสียหรือท้องร่วงของทารกในรอบปีที่ผ่านมา ว่าไม่มีอาการท้องเสียร้อยละ 78.83 สอดคล้องกับพฤติกรรมส่วนใหญ่คือวิธีการเตรียมนมจะชงและให้ดื่มทันที (ร้อยละ 84.13) เมื่อดื่มไม่หมดจะเทนมที่เหลือทิ้งไป (ร้อยละ 60.76) มีการล้างขวดนมทันทีหลังจากให้นมเด็ก (ร้อยละ 57.10) ใช้น้ำยาล้างขวดนม (ร้อยละ 93.80) และมีการใช้น้ำร้อนลวกขวดนมหลังจากการล้าง (ร้อยละ 67.86)

สรุป

แบบสอบถามที่สร้างขึ้นเพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการสำรวจพฤติกรรมการบริโภคอาหาร ของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร สามารถนำข้อมูลไปประกอบการประเมิน หรือพยากรณ์ความเสี่ยงของการเกิดโรคได้ แต่ควรศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องระยะเวลาที่ใช้การเจริญเพิ่มจำนวนของเชื้อ *B. cereus* ในน้ำมันขงที่วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จะต้องทิ้งไว้นานเท่าไรเชื้อจึงจะเพิ่มจำนวนจนถึงระดับ 10^5 cfu ต่อกรัม เพื่อทำให้การประเมินความเสี่ยงของการเกิดโรคถูกต้องมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณนางสาวจันทร์ฉาย แจ้งสว่าง อดีตผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ได้ให้คำแนะนำและสนับสนุนการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบพระคุณนางเพ็ญศรี รอดมา ผู้ทรงคุณวุฒิด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นายปรีชา จิงสมานกุล นักวิทยาศาสตร์การแพทย์เชี่ยวชาญ ที่ให้คำปรึกษาเรื่องการประเมินความเสี่ยง และขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มพัฒนาคุณภาพและวิชาการที่ให้ความร่วมมือในการตรวจวิเคราะห์ความถูกต้องของข้อมูล ทำให้การดำเนินงานศึกษาครั้งนี้บรรลุสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment, CAC/GL-30 (1999). Geneva: FAO/WHO; 1999.
2. Hazard characterization for pathogens in food and water: guidelines, Microbiological risk assessment series 3. Geneva: FAO/WHO; 2003.
3. Exposure assessment of microbiological hazards in food: guidelines, Microbiological risk assessment series 7. Geneva: FAO/WHO; 2008.
4. Risk characterization of microbiological hazards in food: guidelines, Microbiological risk assessment series 17. Geneva: FAO/WHO; 2009.
5. กฎกระทรวงแบ่งส่วนราชการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (พ.ศ. 2552) ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 126 ตอนที่ 98 ก (วันที่ 28 ธันวาคม 2552)
6. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. ข้อมูลการบริโภคอาหารของประเทศไทย. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2549.
7. Yamane T. Statistics: An introductory analysis. 3rd ed. New York: Harper & Row; 1973.
8. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 364 (พ.ศ. 2556) เรื่องมาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 130 ตอนพิเศษ 148 ง. (วันที่ 31 ตุลาคม 2556)
9. เพ็ญศรี รอดมา, อรุณี ศรีพรหม, นิตยา สุนทรชื่น. การประเมินปริมาณการได้รับสัมผัสเชื้อ *Bacillus cereus* ในนมผงดัดแปลง สำหรับทารก. ว กรมวิทย์ พ 2552; 51(1): 64-75.
10. Jay MJ. Modern food microbiology. 6th ed. Maryland: Aspen Publishers; 2000. p. 477-84.

Study on Food Consumption Behavior for Microbiological Risk Assessment

Pranee Nakprasit Santakit Ninudomsak and Ubonwan Rodpradit

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

ABSTRACT The food consumption behavior is an important factor for microbiological risk assessment. The questionnaire for the study on feeding behavior of infant formula milk powder was designed in 2008 by the Bureau of Quality and Safety of Food. Data from 1,000 infant caregivers, were used for the calculation of pathogenic exposure and could be explained for hazard identification. The results showed that the probability for the feeding of milk powder only and milk powder with breast milk were 0.4570 and 0.2320, respectively. The frequency of feeding per day is 4, 5 and 8 times (20.45%, 17.49% and 16.48%), respectively. The consumption behavior data, infant's birth rate, the contamination of *Bacillus cereus* in infant formula milk powder were studied with other information such as the condition of growth and survival of *B. cereus*, water activity (Aw). Risk assessment or predication of illness from *B. cereus* infection, more than 100 colony forming unit per gram, was 427 infants per 100,000 capita. Accordingly, the questionnaire can be used for this risk assessment as well as be a model for other microbial risk assessment.

Key words: Food consumption behavior, Microbiological risk assessment, infant formula milk powder, *Bacillus cereus*

คุณภาพยาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูลในประเทศไทย

วิภาพรรณ ไสยสมบัติ สุภาณี ดวงธีรปรีชา และประสิทธิ์ โอภาส

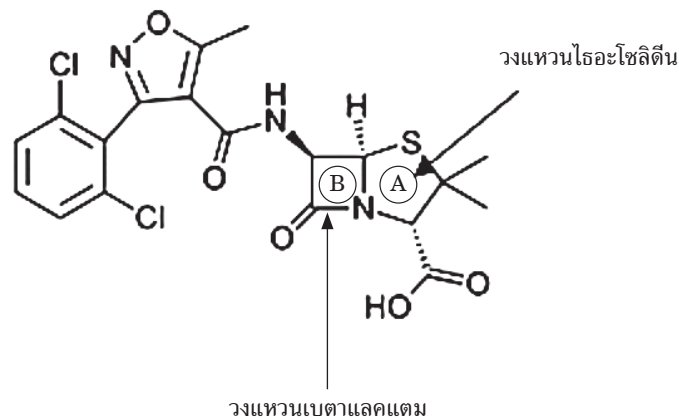
สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ยาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม เป็นยาที่อยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติในกลุ่มเพนนิซิลลิน ในปีงบประมาณ 2553 ได้มีการศึกษาคุณภาพยาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูล โดยสุ่มตัวอย่างจากโรงพยาบาลตามโครงการสร้างหลักประกันคุณภาพและมาตรฐานบริการด้านยา จำนวน 51 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่า มีตัวอย่างที่เข้ามาตรฐานจำนวน 33 ตัวอย่าง (ร้อยละ 64.7) และผิดมาตรฐานถึง 18 ตัวอย่าง (ร้อยละ 35.3) ดังนั้นในปีงบประมาณ 2555 สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้คัดเลือกยาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูล เพื่อดำเนินการศึกษาคูณภาพผลิตภัณฑ์ยา ดังกล่าวอีก โดยสุ่มตัวอย่างจากโรงพยาบาลทั่วประเทศ จำนวน 44 ตัวอย่าง และร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา สุ่มตัวอย่างจากโรงงานผลิตยาภายในประเทศ จำนวน 50 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 94 ตัวอย่าง จากผู้ผลิตภายในประเทศ 26 ราย รวม 48 ทะเบียนตำรับยา แบ่งเป็นขนาดความแรง 250 มิลลิกรัม จำนวน 57 ตัวอย่าง และขนาดความแรง 500 มิลลิกรัม จำนวน 37 ตัวอย่าง ตรวจวิเคราะห์โดยวิธีและมาตรฐานตามตำรายาของประเทศสหรัฐอเมริกา (USP 34) ที่ได้ดำเนินการทวนสอบวิธีก่อนทำการวิเคราะห์ และตรวจวิเคราะห์ในหัวข้อปริมาณตัวยาสสำคัญ ความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย ปริมาณน้ำและการละลายของตัวยา พบว่า ผลการตรวจวิเคราะห์ยาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูล เข้ามาตรฐานทุกหัวข้อวิเคราะห์ จำนวน 88 ตัวอย่าง (ร้อยละ 93.6) และผิดมาตรฐาน 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 6.4) โดยผิดมาตรฐานหัวข้อปริมาณตัวยาสสำคัญ ความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย และปริมาณน้ำ ส่วนหัวข้อการละลายของตัวยาเข้ามาตรฐานทุกตัวอย่าง จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่ายาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูล ที่มีใช้ในประเทศไทยส่วนใหญ่มีคุณภาพเป็นที่น่าพอใจ

Accepted for publication, 25 November 2013

บทนำ

ไดคลอกซาซิลลิน เป็นยาเพนนิซิลลินกึ่งสังเคราะห์ ในกลุ่มของ Penicillinase-resistance Penicillins ซึ่งมีความทนทานต่อกรดในกระเพาะอาหารและเอนไซม์เพนนิซิลลิเนส และถูกดูดซึมได้ดีจากกระเพาะอาหารและลำไส้ นิยมใช้เป็นอันดับต้นในการรักษาโรคติดเชื้อ เนื่องจากได้ผลทางการรักษา มีอัตราความปลอดภัยสูง และราคาถูก ยาอยู่ในรูปของเกลือโซเดียม จึงละลายน้ำได้ดี ลักษณะเป็นผลึกสีขาว⁽¹⁾ มีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในภาพที่ 1⁽²⁾



ภาพที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของไดคลอกซาซิลลิน

ส่วนนิวเคลียสของยาเพนนิซิลลิน เป็นส่วนที่สำคัญในการออกฤทธิ์ของยา ประกอบไปด้วยโครงสร้างสำคัญ 2 ส่วน คือ วงแหวนไธอะโซลิดีน และวงแหวนเบตาแลคแตม หากส่วนนิวเคลียสในโมเลกุลของยาถูกทำลายไป ฤทธิ์ของยาที่มีต่อจุลชีพจะสูญเสียไป ส่วนของวงแหวนเบตาแลคแตม เป็นส่วนที่ถูกทำลายได้ง่ายโดยกรดและโดยเอนไซม์เพนนิซิลลิเนส ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยเฉพาะแบคทีเรียที่เรียกลุ่ม Staphylococcus⁽³⁾

กลไกการออกฤทธิ์⁽⁴⁾ คือ ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยจะไปขัดขวางการสร้างชั้นเปปทิโดไกลัยแคนของผนังเซลล์ โดยไปยับยั้งการทำหน้าที่ของเอนไซม์กลุ่ม Transpeptidase ที่ช่วยในปฏิกิริยาเชื่อมข้ามสายเปปทิโดไกลัยแคน ในขั้นตอนการสร้างผนังหุ้มเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์ไม่แข็งแรง จนถึงจุดที่ไม่สามารถป้องกันเยื่อหุ้มไซโทพลาสซึมได้ และแรงดันออสโมติกภายในทำให้เซลล์แตก

โดยทั่วไปแล้วเกลือของเพนนิซิลลินที่เป็นผงจะคงสภาพเป็นเวลาหลายเดือน แต่สลายตัวได้เร็วเมื่ออยู่ในรูปสารละลาย การเสื่อมสลายของเพนนิซิลลิน เกิดจากการไฮโดรไลซิส⁽⁵⁾

ยาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูล เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในโรงพยาบาลของรัฐและเอกชน มีทั้งที่ผลิตในประเทศ และสั่งจากต่างประเทศ รูปแบบของยามีทั้งขนาด 250 และ 500 มิลลิกรัม ในปีงบประมาณ 2553 ได้มีการศึกษาคุณภาพยาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูล โดยสุ่มตัวอย่างจากโรงพยาบาลตามโครงการสร้างหลักประกันคุณภาพและมาตรฐานบริการด้านยา จำนวน 51 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่า มีตัวอย่างที่เข้ามาตรฐานจำนวน 33 ตัวอย่าง (ร้อยละ 64.7) และผิดมาตรฐานถึง 18 ตัวอย่าง (ร้อยละ 35.3) เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคให้ได้รับยาที่มีคุณภาพ และเป็นการสร้างความเชื่อมั่นในคุณภาพยาแก่ผู้บริโภค ตลอดจนโรงพยาบาลของรัฐสามารถนำข้อมูลไปพิจารณาจัดซื้อผลิตภัณฑ์ยาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูล ที่มีคุณภาพ สำนักงานและวัตถุประสงค์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้คัดเลือกยาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูล เพื่อดำเนินการศึกษาคูณภาพในปีงบประมาณ 2555 โดยสุ่มตัวอย่างจากโรงพยาบาลทั่วประเทศ และร่วมกับสำนักงาน

คณะกรรมการอาหารและยา สุ่มตัวอย่างจากโรงงานผลิตยาภายในประเทศ มาตรวจวิเคราะห์คุณภาพยาในหัวข้อ ปริมาณตัวยาคัญ ความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย ปริมาณน้ำและการละลายของตัวยา โดยใช้วิธีและมาตรฐานตามตำรายาของประเทศสหรัฐอเมริกา (USP 34)⁽⁶⁾ ที่ได้ดำเนินการทวนสอบวิธีก่อนทำการวิเคราะห์ นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังได้ทำการเปรียบเทียบผลการละลายของตัวยาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูล ระหว่างวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และวิธี Spectrophotometry เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์ให้เหมาะสม ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้พิจารณาการขึ้นทะเบียนตำรับยา ผู้ผลิตยา ตลอดจนผู้มีหน้าที่รับผิดชอบในการเลือกวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม ซึ่งจะเป็นการยกระดับมาตรฐานคุณภาพยาในประเทศต่อไป

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ผลิตภัณฑ์ของ Waters, USA
2. คอลัมน์ XTerra RP18 ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, particle size $5 \mu\text{m}$ ผลิตภัณฑ์ของ Waters, USA
3. Analytical balance, Model AT261DR ผลิตภัณฑ์ของ Mettler Toledo, Switzerland
4. Spectrophotometer, Model Lambda 12 ผลิตภัณฑ์ของ Perkin Elmer, USA
5. Spectrophotometer, Model UV-1800 ผลิตภัณฑ์ของ Shimadzu, Japan
6. Dissolution Apparatus, Model VK 7000 ผลิตภัณฑ์ของ Vankel, USA
7. Karl Fischer Titrator, Model 720 ผลิตภัณฑ์ของ Metrohm, Switzerland
8. pH Meter, Model SevenEasy ผลิตภัณฑ์ของ Mettler Toledo, Switzerland
9. เครื่องแก้ว class A
10. Nylon Syringe Filter, pore size 0.45 ไมครอน

สารมาตรฐานและสารเคมี

1. Acetonitrile (HPLC grade) ผลิตภัณฑ์ของ Mallinckrodt, USA
2. Monobasic potassium phosphate (AR grade) ผลิตภัณฑ์ของ Carlo Erba, Switzerland
3. Potassium hydroxide (AR grade) ผลิตภัณฑ์ของ Carlo Erba, Switzerland
4. Water (Ultra pure)
5. Dicloxacillin sodium DMS Reference Standard, Control No. 08A53039

ตัวอย่าง

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ยาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ที่อยู่ในรูปแบบยาแคปซูล ขนาด 250 และ 500 มิลลิกรัม สุ่มจากโรงพยาบาลทั่วประเทศจำนวน 44 ตัวอย่าง และโรงงานผลิตยาภายในประเทศจำนวน 50 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 94 ตัวอย่าง จากผู้ผลิตภายในประเทศ 26 ราย

วิธีการทดสอบ

1. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณตัวยาคัญ (Content of active ingredient)

หาปริมาณตัวยาคัญในยาแคปซูลตามวิธีที่ระบุใน ตำรายาประเทศสหรัฐอเมริกา (USP 34) ที่ได้ดำเนินการทวนสอบวิธีก่อนทำการวิเคราะห์ โดยใช้ HPLC ที่สภาวะการทดสอบดังนี้

คอลัมน์	: XTerra RP18 5 μ m ขนาด 4.6 $\times$ 150 มิลลิเมตร
สารละลายตัวพา	: Diluent : Acetonitrile = 74 : 26
ตัวทำละลาย (Diluent)	: ละลาย monobasic potassium phosphate 5.44 กรัม ในน้ำกลั่น 2,000 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ของสารละลายเป็น 5.0 $\pm$ 0.1 ด้วย 8 N Potassium hydroxide
อัตราการไหล	: 2 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	: 225 นาโนเมตร
อุณหภูมิของคอลัมน์	: อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)
ปริมาตรที่ฉีด	: 10 ไมโครลิตร

ก่อนทำการวิเคราะห์ต้องมีการทดสอบความเหมาะสมของระบบ (System suitability) โดยฉีดสารละลายมาตรฐานไดคลอกซาซิลลิน 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลาย ซ้ำกัน 5 ครั้ง นำพื้นที่ใต้พีคมาคำนวณค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% Relative Standard Deviation) โดยต้องไม่เกิน 2.0, The capacity factor for Dicloxacillin (k') มีค่าระหว่าง 4-11, The column efficiency ไม่น้อยกว่า 700 และ Tailing factor ไม่เกิน 2.0

2. ความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย (Weight Variation)

สุ่มตัวอย่างมาตำรับละ 30 แคปซูล ซึ่งหาน้ำหนักผงยาเฉลี่ยในแต่ละแคปซูล จำนวน 10 แคปซูล นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณตัวยาสำคัญในแต่ละแคปซูลในรูปเปอร์เซ็นต์ของปริมาณที่แจ้ง โดยใช้ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญ (ข้อ 1) และคำนวณค่า Acceptance value และต้องทำการทดสอบซ้ำอีก 20 แคปซูล ในกรณีที่มีการทดสอบครั้งแรกผิดมาตรฐาน

3. การตรวจวิเคราะห์การละลายของตัวยา (Dissolution)

ทำการตรวจหาการละลายของตัวยาจากแคปซูล โดยใช้วิธีและมาตรฐานตาม USP 34 ดังนี้ apparatus 1 ความเร็ว 100 รอบต่อนาที มีตัวกลางในการละลายเป็นน้ำ ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 $\pm$ 0.5 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที กรองสารละลายที่ได้ผ่านหัวกรอง (Nylon Syringe Filter) 0.45 ไมครอน แล้วเจือจางด้วยตัวกลางในการละลาย ให้ได้ความเข้มข้นของ ไดคลอกซาซิลลิน 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญโดยวิธี Spectrophotometry โดยทำการทดสอบครั้งแรก 6 แคปซูล ถ้าการทดสอบครั้งแรกผิดมาตรฐาน ให้ทำการทดสอบครั้งที่สองอีก 6 แคปซูล หากยังคงผิดมาตรฐานอีกให้ทำการทดสอบครั้งที่สามอีก 12 แคปซูล สำหรับเกณฑ์ในการตัดสินผลตามมาตรฐาน USP 34 กำหนดให้การละลายของตัวยาแต่ละแคปซูลจะต้องมีการละลายไม่น้อยกว่า 75% (Q) ของปริมาณที่แจ้ง ภายในเวลา 30 นาที

4. ปริมาณน้ำ (Water)

หาปริมาณน้ำโดยใช้วิธีและมาตรฐานตาม USP 34 โดยชั่งผงยาให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนระหว่าง 200-250 มิลลิกรัม มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำในรูปของ %w/w โดยไทเทรตกับ Karl Fischer Reagent ด้วยเครื่อง Karl Fischer Titrator โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย

5. การเปรียบเทียบการละลายของตัวยา โดยวิธี Spectrophotometry และวิธี HPLC

โดยคัดเลือกตัวอย่างจำนวน 14 ตัวอย่าง ที่มีปริมาณตัวยาสำคัญต่าง ๆ กันตั้งแต่ 80% ของปริมาณที่แจ้ง ขึ้นไป มาเปรียบเทียบผลการละลายของตัวยา

5.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการละลายตัว

ใช้เครื่องมือและวิธีทดสอบการละลายของตัวยา ตามที่กำหนดใน USP 34 นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญต่อไป

5.2 การตรวจวิเคราะห์การละลายของตัวยา โดยวิธี Spectrophotometry

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 5.1 มากรองผ่านหัวกรอง (Nylon Syringe Filter) 0.45 ไมครอน แล้วเจือจางด้วยตัวกลางในการละลาย ให้ได้ความเข้มข้นของไดคลอกซาซิลลิน 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วัดความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 274 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน ไดคลอกซาซิลลิน 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำ โดยใช้น้ำเป็น Blank คำนวณการละลายของตัวยาโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาณที่แจ้ง

5.3 การตรวจวิเคราะห์การละลายของตัวยา โดยวิธี HPLC

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 5.1 มากรองผ่านหัวกรอง (Nylon Syringe Filter) 0.45 ไมครอน และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญ โดยวิธี HPLC (ข้อ 1) แล้วคำนวณการละลายของตัวยาโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาณที่แจ้ง

ผล

ผลการตรวจวิเคราะห์ยาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูล ในหัวข้อปริมาณตัวยาสำคัญ ความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย การละลายของตัวยา และปริมาณน้ำ พบว่าตัวอย่างเข้ามาตรฐานทุกหัวข้อ 88 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 93.6 และผิดมาตรฐาน 6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.4 โดยทุกตัวอย่างที่ผิดมาตรฐานมีขนาดความแรง 250 มิลลิกรัม และผิดมาตรฐานหัวข้อปริมาณตัวยาสำคัญ ความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ยและปริมาณน้ำ ส่วนหัวข้อการละลายของตัวยาเข้ามาตรฐานทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงผลการศึกษาคูณภาพยาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูล จำแนกตามหัวข้อที่ผิดมาตรฐาน

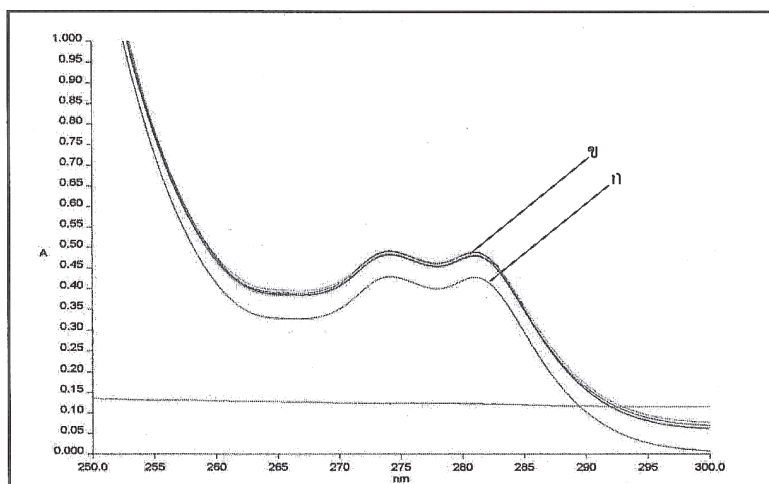
หัวข้อที่ผิดมาตรฐาน	จำนวนตัวอย่างที่ผิดมาตรฐาน
ความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย	1
ปริมาณตัวยาสำคัญและปริมาณน้ำ	1
ปริมาณตัวยาสำคัญ ความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ยและปริมาณน้ำ	4

รายละเอียดแยกตามหัวข้อการตรวจวิเคราะห์ได้ดังนี้

การตรวจวิเคราะห์หัวข้อปริมาณตัวยาสำคัญ ตามมาตรฐาน USP 34 กำหนดให้ ไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูล มีปริมาณตัวยาสำคัญ 90.0–120.0% ของปริมาณที่แจ้ง จากการตรวจวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างที่ผิดมาตรฐาน เป็นตัวอย่างที่มีปริมาณตัวยาสำคัญต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน

ความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย ซึ่งเป็นการตรวจสอบความสม่ำเสมอของน้ำหนักยาหรือปริมาณตัวยาสำคัญในแต่ละหน่วย ตามมาตรฐาน USP 34 กำหนดให้มีค่า Acceptance value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 15.0% พบว่ามีตัวอย่างที่ผิดมาตรฐาน

การละลายของตัวยา เป็นอีกหัวข้อหนึ่งที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพรับประทานในรูปแบบของแข็งที่เป็น Immediate – release dosage forms และ Modified – release dosage forms เนื่องจากการดูดซึมของยาเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ยาออกฤทธิ์และให้ผลในการรักษา สำหรับ USP 34 กำหนดให้มีการทดสอบการละลายของตัวยาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูล โดยวิธี Spectrophotometry จากการตรวจวิเคราะห์พบว่า ไม่มีตัวอย่างที่ผิดมาตรฐาน โดยสเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เดียวกัน (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 (ก) สเปกตรัมของการวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานไดคลอกซาซิลลิน 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

(ข) สเปกตรัมของการวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการละลายตัว

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำซึ่งเป็นอีกหัวข้อหนึ่งที่สำคัญในการควบคุมคุณภาพยา พบว่ามีตัวอย่างที่ผิดมาตรฐาน โดยตามมาตรฐาน USP 34 กำหนดให้มีปริมาณน้ำได้ไม่เกิน 5.0% w/w แสดงให้เห็นว่าปริมาณน้ำมีความสำคัญต่อความคงสภาพของยา

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงบรรจุภัณฑ์ของตัวอย่างยาทั้ง 94 ตัวอย่าง พบว่าเป็นยาที่บรรจุในแผงบลิสเตอร์ ห่อหุ้มด้วยซองอะลูมิเนียมจำนวน 44 ตัวอย่าง แผงบลิสเตอร์ 22 ตัวอย่าง แผงอะลูมิเนียม 4 ตัวอย่าง ขวดแก้ว 10 ตัวอย่าง และขวดพลาสติก 14 ตัวอย่าง พบว่ายาที่บรรจุในแผงบลิสเตอร์ ผิดมาตรฐาน 5 ตัวอย่าง ยาที่บรรจุในขวดแก้ว ผิดมาตรฐาน 1 ตัวอย่าง สำหรับยาที่บรรจุในแผงบลิสเตอร์ห่อหุ้มด้วยซองอะลูมิเนียม ยาที่บรรจุในแผงอะลูมิเนียม และยาที่บรรจุในขวดพลาสติกนั้นเข้ามาตรฐาน

วิจารณ์

จากการตรวจวิเคราะห์การละลายของตัวยา จำนวน 14 ตัวอย่าง ซึ่งมีสีของเปลือกแคปซูลแตกต่างกัน ได้แก่ สีขาว-ฟ้า สีเหลือง-ส้ม สีแดง-ส้ม และสีชมพู-ม่วง โดยวิธี Spectrophotometry เปรียบเทียบกับวิธี HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้หาปริมาณตัวยาสำคัญในตำรายา USP 34 พบว่า วิธี HPLC ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกับผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญ ในขณะที่วิธี Spectrophotometry ให้ผลการตรวจวิเคราะห์การละลายของตัวยาสูงกว่าผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญ โดยผลการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวไม่ขึ้นกับสีของเปลือกแคปซูลไม่ว่าเปลือกแคปซูลจะมีสีอะไร ผลการตรวจวิเคราะห์การละลายของตัวยาโดยวิธี Spectrophotometry ก็ยังคงสูงกว่าวิธี HPLC แต่พบว่าในตัวอย่างยาแคปซูลที่มีปริมาณตัวยาสำคัญประมาณ 99% ขึ้นไป มีแนวโน้มที่ผลการตรวจวิเคราะห์การละลายของตัวยาโดยวิธี Spectrophotometry จะใกล้เคียงกับวิธี HPLC อาจเนื่องมาจากยาที่นำมาวิเคราะห์ไม่มีการสลายตัวแต่ในตัวอย่างที่มีการสลายตัวจะให้ผลแตกต่างกันมาก

โดยทั่วไปวิธี Spectrophotometry จะไม่สามารถแยกสารละลายตัวออกจากตัวยาได้ เนื่องจากสารละลายตัวที่เกิดขึ้นมีสูตรโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับตัวยา ทำให้มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นใกล้เคียงกัน ทำให้วิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญได้สูงทั้งที่ความเป็นจริงแล้วในตัวอย่างนั้นมีการละลายตัวของตัวยาสำคัญ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับโครมาโตแกรมที่ได้จากตัวอย่างยาที่มีสารละลายตัว จะปรากฏพีคของสารละลายตัว ที่เวลา 1.912, 4.398 และ 4.736 นาที แต่ถ้าเป็นตัวอย่างยาที่ไม่มีสารละลายตัว จะไม่ปรากฏพีคของสารละลายตัวที่เวลาดังกล่าว

จากการศึกษาคุณภาพยาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูล พบว่าปัญหาที่ยาผิดมาตรฐานมาจากปริมาณตัวยาสำคัญ ความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย และปริมาณน้ำ ซึ่งสาเหตุของการผิดมาตรฐานหัวข้อปริมาณน้ำมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ ตั้งแต่คุณภาพวัตถุดิบตัวยาสำคัญ กระบวนการผลิต สภาพการเก็บรักษา และการเลือกใช้บรรจุภัณฑ์ที่ไม่เหมาะสม จึงไม่สามารถป้องกันความชื้นได้ ทำให้ยาเสื่อมสลายเร็วขึ้น จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยตัวอย่างที่ผิดมาตรฐานในหัวข้อปริมาณน้ำจะมีปริมาณตัวยาสำคัญต่ำกว่ามาตรฐาน

ยาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูล ตำรายาของประเทศสหรัฐอเมริกาได้แนะนำว่าให้ใช้บรรจุภัณฑ์และการเก็บรักษาแบบ Tight Container ซึ่งคุณสมบัติของ Tight Container⁽⁷⁾ นั้นต้องเป็นบรรจุภัณฑ์ที่สามารถปกป้องยาเตรียมจากการปนเปื้อนโดยของเหลว ของแข็งและก๊าซจากภายนอก สามารถป้องกันการสูญเสียปริมาณสารที่บรรจุอยู่ ป้องกันการเปลี่ยนจากผลึกยาเป็นผงยา (efflorescence) ป้องกันการเสื่อมของยาจากการดูดน้ำ (deliquescence) หรือการระเหยของยา ภายใต้สภาวะปกติของการใช้ การขนส่ง การเก็บรักษาและการจำหน่าย และเมื่อเปิดภาชนะมากกว่าหนึ่งครั้ง ภายหลังการปิดทุกครั้งจะอยู่ในสภาวะที่ไม่ยอมให้อากาศผ่านเข้าไปได้ จะเห็นได้ว่าสภาวะการเก็บรักษายาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูล ต้องให้ความสำคัญมากในเรื่องของความชื้น ดังนั้นตำรายาของสหรัฐอเมริกาจึงได้กำหนดเกณฑ์มาตรฐานของปริมาณน้ำ โดยให้มีได้ไม่เกิน 5.0% w/w จากการศึกษพบว่า ยาที่บรรจุในแผงบลิสเตอร์มีปริมาณน้ำในตัวอย่างเกินเกณฑ์มาตรฐาน ถึงร้อยละ 22.7 แต่ถ้าบรรจุในแผงบลิสเตอร์ที่ห่อหุ้มด้วยซองอะลูมิเนียมอีกชั้นหนึ่ง หรือบรรจุในแผงอะลูมิเนียมหรือบรรจุในขวดพลาสติก ปริมาณน้ำจะอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน แต่ถ้าบรรจุในขวดแก้ว จำนวนตัวอย่างที่มีปริมาณน้ำเกินเกณฑ์มาตรฐานจะน้อยกว่าที่บรรจุในแผงบลิสเตอร์ ซึ่งในปัจจุบันแผงบลิสเตอร์เป็นที่นิยมใช้กันมากในการบรรจุยา เนื่องจากสะดวกในการใช้ตลอดจนสามารถป้องกันยาจากการปนเปื้อนโดยสิ่งแวดล้อมภายนอกได้ดี เมื่อเทียบกับการบรรจุแบบขวด เนื่องจากการเปิดขวดทุกครั้งที่ใช้ จะทำให้ยาที่เหลือภายในขวดต้องสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอก ซึ่งอาจส่งผลต่อคุณภาพของยา สำหรับความสามารถในการป้องกันความชื้นของแผงบลิสเตอร์นั้น ขึ้นกับชนิดของพลาสติกที่นำมาใช้ทำแผงและวัสดุที่นำมาใช้ปิดแผง^(8, 9, 10) โดยพลาสติกที่นิยมใช้กันมากในการทำแผง คือ Polyvinyl Chloride (PVC) นำมาขึ้นรูปให้มีขนาดและรูปร่างคล้ายเม็ดยาหรือแคปซูลที่จะบรรจุ PVC มีความเหนียวและทนทานต่อสารเคมี แต่ยอมให้ความชื้นซึมผ่านได้ ดังนั้นหากต้องการให้ PVC สามารถป้องกันความชื้นได้ดีขึ้น ต้องทำการเคลือบแผ่น PVC ด้วย Polyvinylidene Chloride (PVdC) หรือ Polychlorotrifluoroethylene (PCTFE) หลังจากบรรจุเม็ดยาหรือแคปซูลเสร็จแล้ว จะปิดทับด้วย Aluminium foil ที่เคลือบด้วยกาว สำหรับ Aluminium foil ที่มีความหนาน้อยกว่า 25 μm ไม่ควรนำมาใช้ในการบรรจุยาที่ไวต่อความชื้น เพราะความชื้นสามารถซึมผ่านรูเล็กๆ (pinholes) ซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากได้ ดังนั้นผู้ผลิตควรศึกษารายละเอียดและคัดเลือกบรรจุภัณฑ์ให้เหมาะสมกับเภสัชภัณฑ์ที่จะบรรจุ และทำการทดสอบบรรจุภัณฑ์กับเภสัชภัณฑ์ก่อนนำมาใช้ อย่างไรก็ตามปัจจัยต่างๆ เช่น สูตรตำรับ กระบวนการผลิต การจัดเก็บและการขนส่ง มีผลต่อความคงสภาพของเภสัชภัณฑ์ทั้งสิ้น ดังนั้นผู้ผลิตจำเป็นต้องศึกษาทุกปัจจัยควบคู่กันไป เพื่อกำหนดอายุของยาให้ใกล้เคียงกับความเป็นจริง

สรุป

การศึกษาคุณภาพยาในครั้งนี้ ทำให้ทราบว่ายาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูล ที่จำหน่ายในปัจจุบันยังคงมีปัญหาด้านคุณภาพ โดยสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ยาเสื่อมสภาพคือ ปริมาณน้ำเนื่องจากน้ำเป็นตัวการสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวที่เรียกว่า ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ดังนั้นผู้ผลิตควรเลือกใช้บรรจุภัณฑ์ที่สามารถป้องกันความชื้นได้ หากเลือกใช้บรรจุภัณฑ์ที่ไม่เหมาะสม ไม่สามารถป้องกันความชื้นได้ จะทำให้ผู้บริโภคได้รับยาไม่มีคุณภาพ ซึ่งจะส่งผลต่อการรักษาทำให้การรักษาไม่ได้ผล และทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งกำลังเป็นปัญหาสำคัญในปัจจุบัน เนื่องจากปัญหาดังกล่าวมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น

นอกจากนี้จากการศึกษาความแตกต่างระหว่างวิธีวิเคราะห์การละลายของตัวยาทั้ง 2 วิธี คือ วิธี HPLC และวิธี Spectrophotometry พบว่าทั้ง 2 วิธี ให้ผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน โดยวิธี Spectrophotometry ให้ผลการวิเคราะห์การละลายของตัวยาส่งกว่าวิธี HPLC และสูงกว่าความเป็นจริง ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการพิจารณาการขึ้นทะเบียนตำรับของยาไดคลอกซาซิลลิน โซเดียม ชนิดแคปซูล และเป็นประโยชน์ต่อผู้ผลิตโดยต้องคำนึงถึงวิธีการควบคุมคุณภาพที่ถูกต้อง เพื่อให้ยาที่ผลิตและจำหน่ายมีคุณภาพตลอดอายุการใช้ยา

เอกสารอ้างอิง

1. Budavari S, O'Neil MJ, Smith A. The Merck index: an encyclopedia of chemical, drugs, and biologicals. 11th ed. New Jersey: Merck & Co.; 1989. p.486.
2. Skeletal structure of dicloxacillin. 2008; [cited 2013 Jun 16]; Available from: URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Dicloxacillin.svg>
3. มาลินี ลิ้มโกคา. กลุ่มยาเพนิซิลลิน. ใน: ยาด้านจุลชีพ. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จรัสสินทวงศ์; 2541. หน้า 104-107.
4. อนิชา อุทัยพัฒน์. Penicillins. ใน: อนิชา อุทัยพัฒน์, นงลักษณ์ สุขวานิชย์ศิลป์, บรรณาธิการ. เภสัชวิทยา เล่ม 2. กรุงเทพฯ: นิวไทยมิตรการพิมพ์; 2541. หน้า 26-47.
5. ระวีวรรณ ลิทธิไธสง. สารปฏิชีวนะและสารเคมีบำบัด. ใน: เคมีเภสัช. กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง; 2531. หน้า 186-194.
6. U.S. Pharmacopeia National Formulary 2011: USP 34 NF 29. 34th ed. Rockville, MD.: United States Pharmacopeial Convention; 2011. p. 2549-2550.
7. U.S. Pharmacopeia-National Formulary. General notices preservation, packaging, storage, and labeling. 28th ed. Rockville, MD.: United States Pharmacopeial Convention; 2005. p. 9-11.
8. U.S. Pharmacopeia-National Formulary. <661> Containers plastics. 34th ed. Rockville, MD.: The United States Pharmacopeial Convention; 2011. p. 258-262.
9. จุไรรัตน์ รักวาทิน. การประกันคุณภาพของภาชนะบรรจุยาและการบรรจุยา. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2540. หน้า 11-13.
10. สมพล ประคองพันธ์. ภาชนะบรรจุและความคงสภาพของยา. ใน: ความคงสภาพของยา. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2537. หน้า 109-115.

The Quality of Dicloxacillin Sodium Capsules in Thailand

Wipapan Saiyasombat Supanee Duangteraprecha and Prasit Opas

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

ABSTRACT Dicloxacillin sodium belongs to the penicillin-group antibacterial drugs in the National List of Essential Medicines. In the fiscal year 2010, a study on pharmaceutical quality of dicloxacillin sodium capsules was conducted as a part of the project “Quality Assurance of Medicines under the Universal Health Care Coverage Scheme”. A total of 51 samples were collected from public hospitals nationwide and it was found that only 33 samples (64.7%) complied with the pharmacopeial specification whereas 18 samples (35.3%) did not. In the fiscal year 2012, pharmaceutical quality of dicloxacillin sodium capsules was re-evaluated. Bureau of Drug and Narcotic randomly collected 44 samples from public hospitals, while 50 samples were directly collected from local manufacturers by Thai Food and Drug Administration. A total of 94 samples consisted of 57 samples of 250-mg capsules and 37 samples of 500-mg capsules manufactured by 26 manufacturers with 48 registration numbers. The samples were evaluated according to the United States Pharmacopeia specification (USP 34) for assay, weight variation, water and dissolution. The method was verified prior to sample testing. The results showed that 88 samples (93.6%) complied with pharmacopeial specification. Six samples failed to comply with the quality standard with respect to content of active ingredient, weight variation and water. All samples tested met the requirements of the USP for dissolution. It can be concluded that most of dicloxacillin sodium capsules available in Thailand have satisfactory pharmaceutical characteristics.

Key words : dicloxacillin sodium, quality

THE BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

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

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



มุ่งมั่นพัฒนา คำนึงวิจัย ฉบับบริการ มาตรฐานสากล

www.dmsh.moph.go.th