



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วารสาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 63 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2564 • Vol. 63 No. 3 July - September 2021

ว.กรบว.ภย พ 63 (3) ก.ค. - ก.ย. 2564 Bull Dept Med Sci 63 (3) July - September 2021



ISSN 0125-684X

E-ISSN 2697-4525

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข	
ปรึกษาด้านบริหาร	นพ.ศุภกิจ ศิริลักษณ์ นพ.พิเชฐ บุญยัติ นพ.บัลลังก์ อุปพงษ์ นพ.ปิยะ ศิริลักษณ์	
ที่ปรึกษาด้านวิชาการ	นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท ดร.ปนัดดา ชิลวา ดร.บุษราวรรณ ศรีวรรณะ	ดร.สุมล ปิตรานนท์ ดร.เดือนถนอม พรหมชาติแก้ว
บรรณาธิการ	ดร.อภิวัฏ ธวัชสิน	
รองบรรณาธิการ	ดร.ประไพ วงศ์สินคงมั่น นางสิริภากร แสงกิจพร	ดร.เบญจวรรณ เพชรสุขศิริ
คณะบรรณาธิการ	ศ.เกียรติคุณ ดร.พิไลพันธ์ พุฒวัฒนะ ศ.ดร.นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล ดร.दनัย ทิวาเวช ภญ.สุวรรณา จารุณช ดร.สลักจิต ชูติพงษ์วิเวท ศ.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร ศ.ดร.พรพิมล กองทิพย์ รศ.ดร.ศรีสุรางค์ ตันติมาวานิช ดร.สุณี ศิริวิชัยกุล รศ.ดร.นวลฉวี เวชประสิทธิ์ รศ.ดร.พญ.ชนิตรา ธวัจจิตต์ รศ.ดร.พญ.พิณทิพย์ พงษ์เพชร ดร.อุษาวดี ถาวรระ นายสุธน วงษ์ชัย นางวิษชุดา จริยะพันธุ์ ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา ดร.วันทนา ปวีณกิตติพร ดร.ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์	มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยรามคำแหง มหาวิทยาลัยมหิดล นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ฝ่ายจัดการ	นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ นางสาวประสาน จุลวงษ์ นางสาวอภิมน จิรพงศ์ธร นายนาวิ ศรีวรรณย์ นางสาวภาวิณี สุขเจริญ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
สำนักงานวารสาร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 88/7 ซอยติวานนท์ 14 ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000 โทร. 0-2951-0000 โทรสาร 0-2951-1297	
พิมพ์ที่	บริษัท ธนอรุณการพิมพ์ จำกัด 457/6-7 ถนนพระสุเมรุ แขวงบวรนิเวศ เขตพระนคร กรุงเทพฯ 10200 โทร. 0-2282-6033-4	

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 63 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2564

Vol. 63 No. 3 July - September 2021

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดช่อดอกกัญชาพันธุ์ไทยต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง 456
ศรายุธ ระดาพงษ์ พรราว ศุภจริยาวัตร ตัญญาณี สาหัด ณัฐภัทร หาญกิจ กัญชริญา ภารเชจร
ปฏิกาน พรหมพราย ศิริวรรณ ชัยสมบุญพันธ์ พิเชฐ บัญญัติ พรชัย สันเจริญโกโดย
และ Kenneth J Ritchie
- การศึกษาฤทธิ์สมานแผลของสารสกัดช่อดอกกัญชาเพศเมียพันธุ์ไทยต่อเซลล์ปอดเพาะเลี้ยง 467
พรชัย สันเจริญโกโดย ตัญญาณี สาหัด พรราว ศุภจริยาวัตร ศรายุธ ระดาพงษ์ เสกรชตกร บัวเบา
พิเชฐ บัญญัติ ศิริวรรณ ชัยสมบุญพันธ์ และณัฐภัทร หาญกิจ
- การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทยต่อเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ 478
พรราว ศุภจริยาวัตร ศรายุธ ระดาพงษ์ ตัญญาณี สาหัด ณัฐภัทร หาญกิจ กัญชริญา ภารเชจร
ปฏิกาน พรหมพราย พิเชฐ บัญญัติ ศิริวรรณ ชัยสมบุญพันธ์ ณัฐพงษ์ วิชัย
และพรชัย สันเจริญโกโดย
- การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากช่อดอกกัญชาพันธุ์ไทย 490
พรราว ศุภจริยาวัตร สุจิตต์ อุ่นกาศ วิจิตรา สุดห้วง ปิทยา ศิรินันท์ธนานนท์ เสกรชตกร บัวเบา
ศรายุธ ระดาพงษ์ พิเชฐ บัญญัติ ศิริวรรณ ชัยสมบุญพันธ์ แพรว ศุภจริยาวัตร
และพรชัย สันเจริญโกโดย
- การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบินอยด์ในใบกัญชาด้วยวิธี Ultra High Performance Liquid Chromatography 505
ธนวัฒน์ ทองจีน สรเพชร มาสุต พีรธรรม เทียมเทียบรัตน์ สายัณห์ เรืองเชตร ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง
พิเชฐ บัญญัติ ศิริวรรณ ชัยสมบุญพันธ์ และอัครชัย ช่วยพรหม
- ปริมาณสารแคนนาบินอยด์ในระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันของใบกัญชาพันธุ์ไทย 524
สรเพชร มาสุต ธนวัฒน์ ทองจีน กรวิชญ์ สมคิด ภาณุวิชญ์ พูลทรัพย์ ปภาวดี สุนันทบุตร
กชพร โชติมนธรรม ทิพวรรณ ปรีกมานนท์ ราตรี พระนคร วรรณวิภา พินธะ พิเชฐ บัญญัติ
และศิริวรรณ ชัยสมบุญพันธ์

การพัฒนาตัวอย่างทดสอบความชำนาญการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช และโลหะหนักในพืชกัญชา	541
วิชาดา จงมีวาสนา พนาวัลย์ กลิ่งกลางดอน วีรุฒิ วิทยานันท์ สุพัฒน์ แสงสวຍ ธรรณิศร์ ไชยมงคล และกรรกริรมย์ เลิศบำรุงชัย	
การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ ในน้ำมะพร้าวโดยเทคนิค LC-MS/MS	556
สกุลรัตน์ สมสันติสุข อัจฉริ อินแก้ว เสาวนีย์ วาจาสิทธิ์ สุวิมล หมวดหมี กัญญารัตน์ เชื้อกุลชาติ วิทวัส วั่งแก้วหิรัญ และทองสุข ปายะนันท์	
การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในธัญพืชและถั่วเมล็ดแห้ง โดย GC-MS/MS	571
ธรรณิศร์ ไชยมงคล และวีรุฒิ วิทยานันท์	
ข้อมูลกลุ่มควบคุมที่มาจากการทดสอบความเป็นพิษระยะกึ่งเรื้อรังทางปากของ หนูแรทสายพันธุ์ Wistar (Mlac:WR)	595
ภัสสรภรณ์ ศรีมังกรแก้ว กฤติกาญจน์ สุวรรณสโรช ภคมณ ยศทวารัตน์ และอัญชลี สิริมนตาภรณ์	
ระบาดวิทยาโรคติดเชื้อไวรัสซิกาในประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2559-2563	607
สุมาลี ชะนะมา ภัทร วงษ์เจริญ ศิริรัตน์ แนนขุนทด ลัดดาวัลย์ มีแผนดี อริสรา โปษณเจริญ พงศ์ศิริ ตาลทอง สุสนิยะห์ วาเต๊ะ สาริณี ชำนาญรักษา วรารัตน์ แจ่มฟ้า และอารีรัตน์ สง่าแสง	
การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเลือดจระเข้ในการยับยั้ง เซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมนุษย์	618
รัศมีเพ็ญ โพธิ์นาเงิน กาญจนา อัครศุภฤกษ์ และธนกร ระวังชื่อ	
การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเรื้อรังทางปาก ของงูเห่าสีทอง (<i>Cordyceps militaris</i>) ในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar	628
กฤติกาญจน์ สุวรรณสโรช ภัสสรภรณ์ ศรีมังกรแก้ว ภคมณ ยศทวารัตน์ และอัญชลี สิริมนตาภรณ์	
การพัฒนาชุดทดสอบพาราควอตแบบขั้นตอนเดียว	648
จินตนา กรดเต็ม ศรีนยา ฤทธิเนียม ธรรมวุฒิ ชูมาก และลักขิกา ทองเรืองศรี	
การวิเคราะห์ปริมาณรังสีกระเจิงและการป้องกันอันตรายจากรังสี เมื่อถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่	660
วสัน บุตรพา	

การประเมินสถานะด้านความรู้ ความเข้าใจ ความตระหนัก และการใช้ระบบคุณภาพ ในการปฏิบัติงานของบุคลากรสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข วรลักษณ์ เลิศสุรางคกุล ดวงกมล อัครุตมางกูร ธันวาท แก้วเกษ กมลพรรณ ครีมนานาง และอาชวินทร์ ไรจนวิวัฒน์	675
--	-----

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

การประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภคและภาชนะสัมผัสอาหาร ในร้านอาหารสวัสดิการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ณัฐกานต์ ตียศิริพร กมลวรรณ กันตัง และภัทราภรณ์ ศรีไหม	689
การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สีอิรีโทรซินในอาหารโดยเทคนิค HPLC จันทร์เพ็ญ ไตเวียนนท์ และสุธาทิพย์ วิทย์ชัยวุฒิมังค์	704
การทดสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII ด้วยวิธี Chromogenic Assay โสมมริสา พวงพรศรี จูฑาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์ และ ไพศาล พังจันทน์	721
คุณภาพชาสมุนไพรจากการประเมินด้านสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็กน้ำหนักเบา ชั้นทอง เพ็ชรนอก และก่อเกียรติ ศาสตรินทร์	732

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 63 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2564

Vol. 63 No. 3 July - September 2021

CONTENTS

Page

Original Articles

- Investigation of the Cytotoxicity of Thai Cannabis Extracts
on Various Cancer Cell Lines** 456

*Sarayut Radapong Praw Suppajariyawat Tiyanee Sahad Nathaphat Harnkit
Kanchariya Phankhajon Phatipan Primprai Phichet Banyati
Siriwan Chaisomboonpan Pornchai Sincharoenpokai and Kenneth J Ritchie*

- Wound Healing Effect of Thai Cannabis Female Inflorescence
Extracts on Lung Cell Lines** 467

*Pornchai Sincharoenpokai Tiyanee Sahad Praw Suppajariyawat
Sarayut Radapong Sekrachatakorn Buabao Phichet Banyati
Siriwan Chaisomboonphan and Nathaphat Harnkit*

- Cytotoxicity of Thai *Cannabis sativa* L. Extract on Various Types
of Normal Cells** 478

*Praw Suppajariyawat Sarayut Radapong Tiyanee Sahad Nathaphat Harnkit
kanchariya Phankhajon Phatipan Primprai Phichet Banyati Siriwan
Chaisomboonpan Nuttapong Wichai and Pornchai Sincharoenpokai*

- Investigation of Mutagenic Activity of Thai Cultiva,
Cannabis sativa L. Extract** 490

*Praw Suppajariyawat Sutjarit Aunkat Wijittra Sudhong Padtaya Sirinantananon
Sekrachatakorn Buabao Sarayut Radapong Phichet Banyati
Siriwan Chaisomboonphan Praew Suppajariyawat and Pornchai Sincharoenpokai*

- Development and Method Validation of Cannabinoid Contents
in *Cannabis sativa* L. Leaves by Ultra High Performance Liquid
Chromatography** 505

*Thanawat Thongchin Sorrapetch marsud Peradhama Thiemthieprat
Sayan Ruengkhet Sakwichai Ontong Phichet Banyati Siriwan Chaisomboonpan
and Aussavashai Shuayprom*

	Page
The Cannabinoid Contents in Different Growth Stages of Thai <i>Cannabis sativa</i> L. Leaves	524
<i>Sorrapecth Marsud Thanawat Thongchin Korravit Somkid Phanuwit Poolsab Paparvadee Suchantaboot Kotchaporn Chotmanotham Tipawan Phrugmanon Ratree Pranakhon Wanwipa Pinta Phichet Banyati and Siriwan Chaisomboonpan</i>	
Development of Cannabis Proficiency Test Sample for Pesticide Residue and Heavy Metal Analysis	541
<i>Wischada Jongmevasna Panawan Kluengklangdon Weerawut Wittayanan Supat Sangsuay Thoranit Chaimongkol and Kanpirom Lertbumroongchai</i>	
The Development and Validation of Analysis Method for Cannabinoids in Coconut Juice using LC-MS/MS	556
<i>Sakulrat Somsuntisuk Atcharee Inkaew Saovanee Wajasit Suwimol Muadmah Kanyarat Chuakunchat Witthawat Wangkaewhiran and Thongsuk Payanan</i>	
Method Development for Pesticide Residue Analysis in Cereal Grains and Pulses Using GC-MS/MS	571
<i>Thoranit Chaimongkol and Weerawut Wittayanan</i>	
Historical Control Data from Repeated Dose 90-days Oral Toxicity Studies of Wistar Rats (Mlac:WR)	595
<i>Passaraporn Srimangkornkaew, Kittigan Suwannasaroj, Pakamon Yottharat and Aunchalee Sirimontaporn</i>	
Epidemiology of Zika Virus Disease in Thailand, during 2016-2020	607
<i>Sumalee Chanama Pattara Wongjaroen Sirirat Naemkhunthot Laddawan Meephaendee Arisara Posanacharoen Pongsiri Tanthong Husneeyah Vateh Sarinee Chumnanraksa Wararat Jamfa and Areerat Sa-ngasang</i>	
Comparison of Efficacy of Crocodile Blood Extract against Inhibition of Cell Viability in Hepatocellular Carcinoma and Human Cholangiocarcinoma Cell Lines	618
<i>Rassameepen Phonarknguen Kanjana Assawasuparerk and Thanakorn Rawangchue</i>	

The Acute and Sub-Chronic Oral Toxicity Testing of <i>Cordyceps militaris</i> in Wistar Rats	628
<i>Kittigan Suwannasaroj, Passaraporn Srimangkornkaew, Pakamon Yottharat and Aunchalee Sirimontaporn</i>	
Development of One-Step Paraquat Test Kit	648
<i>Jintana Krodtem Sarinya Rittinium Thammawut Chumark and Laksika Thongruangsri</i>	
Analysis of the Scattered Radiation and Protection Practice from Mobile X-ray Units	660
<i>Wasan Buthpa</i>	
Assessment of Knowledge, Understanding, Awareness and Practice on Quality System among Personnel of the National Institute of Health, Thailand	675
<i>Waralak Lertsupangkakul Daungkamon Asawutmangkul Thunwa Kaewket Kamolpan Khruemyanang and Archawin Rojanawiwat</i>	
Laboratory Findings	
Evaluation of the Microbiological Quality of Ready-to-eat Foods and Food Contact Articles in Welfare Restaurants of the Department of Medical Sciences	689
<i>Nutthakan Tiyasiwaporn Kamonwan Kantaeng and Patraporn Srimai</i>	
Method Validation for Determination of Erythrosine in Food by HPLC Technique	704
<i>Janpen Towiyanon and Suthatip Vitchaivutivong</i>	
Method Verification of Factor VIII Potency Test by Chromogenic Assay	721
<i>Soammarisa Paungpornsri, Titaporn Pootipinyowat and Paisan Pangjunan</i>	
Quality of Herbal Tea from Light Filth Assessment	732
<i>Kuntong Pednog and Kokeiat Sarttarin</i>	



บรรณาธิการแถลง



วารสารกรรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 63 ฉบับที่ 3 เดือนกรกฎาคม - กันยายน 2564 ได้มีการเผยแพร่บทความวิชาการซึ่งเป็นผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษากัญชาในด้านต่างๆ จำนวน 8 เรื่อง เช่น เรื่อง การทดสอบฤทธิ์และความเป็นพิษของสารสกัดจากกัญชาต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ รวมทั้งเซลล์มะเร็ง การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในกัญชาและในน้ำมะพร้าว การตรวจปริมาณสารแคนนาบินอยด์ในระยะต่างๆ ของการเจริญเติบโตของใบกัญชา การพัฒนาตัวอย่างทดสอบความชำนาญพิษกัญชาเพื่อใช้ประเมินความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังมีบทความวิจัยอื่นๆ อีก เช่น การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเลือดจระเข้ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมนุษย์ การทดสอบความเป็นพิษของถั่งเช่าสีทองในหนูแรท การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในอาหาร การพัฒนาชุดทดสอบพาราควอตแบบขั้นตอนเดียว ระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อไวรัสซิกาในประเทศไทย การวิเคราะห์ปริมาณรังสีกระเจิงและการป้องกันอันตรายจากจากรังสีเมื่อถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่

กองบรรณาธิการวารสารกรรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ขอขอบคุณผู้สนับสนุนทุกท่านที่ส่งบทความมาให้พิจารณาตีพิมพ์เผยแพร่องค์ความรู้ใหม่จากงานวิจัย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปฏิบัติงานด้านการพัฒนาวิทยาศาสตร์การแพทย์และสาธารณสุขของประเทศ ขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านในการพิจารณาบทความ (Peer reviews) และให้ข้อเสนอแนะในการปรับปรุงแก้ไขบทความวิจัยต่างๆ ให้มีความถูกต้องทางวิชาการและเข้าใจง่ายขึ้น และขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนในการจัดทำวารสารฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี กองบรรณาธิการหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวารสารฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้อ่านทุกท่าน และโปรดติดตามวารสารกรรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ฉบับที่ 4 เดือนตุลาคม - ธันวาคม 2564 ต่อไป

ดร.อภิวัฏ ธวัชสิน

บรรณาธิการวารสารกรรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดช่อดอกกัญชา พันธุ์ไทยต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง

ศรายุทธ ระดาพงษ์¹ พราว ศุภจริยาวัตร¹ ตัญญาณี สาหิต¹ ณัฐภัทร หาญกิจ¹ กัญชริญา ภารเชษฐ¹ ปฏิภาณ พรหมพราย¹
พิเชฐ บัญญัติ¹ ศิริวรรณ ชัยสมบุญพันธ์¹ พรชัย สันเจริญโกโคย¹ และ Kenneth J Ritchie²

¹กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

²มหาวิทยาลัย Liverpool John Moores, Byrom Street, ลิเวอร์พูล, สหราชอาณาจักร

บทคัดย่อ กัญชา (*Cannabis sativa* L.) จัดเป็นพืชเสพติดที่มีหลายสายพันธุ์ (strains) ปัจจุบันในประเทศไทยได้รับอนุญาตให้ใช้ประโยชน์ของกัญชาในทางการแพทย์และการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สารสำคัญหลักที่พบมากในกัญชาเป็นแคนนาบินอยด์ที่พบมีสองชนิด คือ Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) และ cannabidiol (CBD) ซึ่งรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงของสารสกัดช่อดอกกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ ได้แก่ PTC0601 (THC และ CBD โกล้เคียงกัน), PTC0602 (THC สูง) และ PTC0729 (CBD สูง) สกัดด้วยวิธีของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical Fluid Extraction) วิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี HPLC และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดกัญชาทั้ง 3 ชนิด แสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 7 ชนิด โดย PTC0729 ซึ่งมีสัดส่วน THC : CBD เท่ากับ 1 : 6 มีความจำเพาะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญและเป็นพิษสูงสุดต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งไต (A-498) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.81 ± 0.85 , 5.48 ± 0.27 และ 7.65 ± 0.49 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน PTC0602 ซึ่งมีสัดส่วน THC: CBD เท่ากับ 10 : 1 แสดงความเป็นพิษจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งปอด (A-549) เซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) เซลล์มะเร็งสมอง (A-172) และมะเร็งตับอ่อน (PANC-1) ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 10.92 ± 1.05 , 14.65 ± 2.05 , 15.11 ± 2.52 และ 19.19 ± 1.79 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ PTC0601 มีสัดส่วน THC: CBD เท่ากับ 2 : 1 มีพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ไม่จำเพาะกับเซลล์ใด จะเห็นได้ว่าสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทยสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงได้และอาจพัฒนาไปเป็นยาต้านมะเร็งหรือยาร่วมกับยาต้านมะเร็งได้

คำสำคัญ: กัญชาพันธุ์ไทย, พิษต่อเซลล์, เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), Cannabidiol (CBD)

Corresponding author E-mail: sarayut.r@dmsc.mail.go.th

Received: 12 July 2021

Revised: 24 August 2021

Accepted: 31 August 2021

บทนำ

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตสาเหตุหนึ่งทั่วโลก องค์การอนามัยโลก หรือ World Health Organization (WHO) รายงานตัวเลขผู้เสียชีวิตกว่า 10 ล้านคน ในปี 2563 ซึ่งเสียชีวิตจากมะเร็ง 5 อันดับแรก ได้แก่ มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ มะเร็งตับ มะเร็งกระเพาะอาหาร และมะเร็งเต้านม สำหรับผู้ป่วยรายใหม่ในปี 2561 พบ 18.1 ล้านราย โดยผู้ชายมักพบมะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งปอด และมะเร็งลำไส้ ในขณะที่ผู้หญิงมักพบมะเร็งเต้านม มะเร็งปอด และมะเร็งลำไส้ มีการคาดการณ์ในประมาณปี 2584 จะพบผู้ป่วยรายใหม่กว่า 30 ล้านราย และมีผู้เสียชีวิตกว่า 20 ล้านราย มะเร็งก่อให้เกิดผลกระทบอย่างมากต่อชีวิต จิตใจ และผลกระทบทางด้านเศรษฐกิจ จากรายงานค่าใช้จ่ายในการดูแลผู้ป่วยมะเร็งในสหรัฐอเมริกามีค่าใช้จ่ายสูงถึง 137.4 พันล้านดอลลาร์สหรัฐหรือประมาณ 4 ล้านล้านบาท ในปี 2553 และมีอัตราเพิ่มขึ้นในทุก ๆ ปี รวมถึงค่ายาหรือวิธีการรักษาซึ่งมีผลข้างเคียงและราคาแพง⁽¹⁾ ในประเทศไทยโรคมะเร็งพบมากเป็นอันดับต้น ๆ เมื่อเทียบกับสาเหตุการตายอื่น ๆ ซึ่งการรักษาด้วยการใช้ยาเคมีบำบัดเป็นทางเลือกที่นิยมใช้ในการรักษาเนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง แต่พบว่าผู้ป่วยจำนวนมากได้รับผลข้างเคียงจากการใช้ยา ทำให้วงการแพทย์ไทยพยายามคิดค้นหาแนวทางรักษาและยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยการนำเอาสมุนไพรไทยมาพัฒนาและใช้ร่วมกับการแพทย์แผนปัจจุบันในการบำบัดรักษาโรคมะเร็ง มีแนวโน้มว่าจะสามารถนำสารที่สกัดหรือสารสำคัญมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคได้ เนื่องจากพืชและสมุนไพรไทยหลายชนิดถูกใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาโรคต่าง ๆ มาแต่โบราณ การศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดสมุนไพรเพื่อพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งจึงเป็นที่น่าสนใจและมีความเป็นไปได้สูง และพืชสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่มีความน่าสนใจจากประชาชนและได้รับการสนับสนุนจากรัฐบาลเพื่อนำมาใช้ทางการแพทย์อย่างถูกกฎหมายคือพืชสมุนไพรกัญชา

กัญชา (Cannabis, marijuana หรือ *Cannabis sativa* L.) เป็นพืชเสพติดที่มีการอนุญาตให้ใช้ทางการแพทย์หรือเพื่อสันทนาการอย่างถูกกฎหมายในหลายประเทศ ปัจจุบันในประเทศไทยได้มีความพยายามจากรัฐบาลในการผลักดันให้มีการใช้ประโยชน์จากพืชกัญชาอย่างถูกกฎหมาย โดยเฉพาะใช้ในทางการแพทย์ การศึกษาวิจัยผลิตภัณฑ์สุขภาพ เครื่องสำอางและอาหาร มีประกาศพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ (ฉบับที่ 7) พ.ศ. 2562 อนุญาตให้สามารถนำกัญชามาใช้ในกรณีจำเป็นเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ การรักษาผู้ป่วย หรือการศึกษาวิจัยและพัฒนาการศึกษาวิจัยทางการแพทย์ได้⁽²⁾ นอกจากนี้ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ซึ่งลงประกาศในราชกิจจานุเบกษาแล้ว และมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 15 ธันวาคม 2563 เป็นต้นไป ระบุว่าสามารถใช้ประโยชน์จากส่วนของกัญชา กัญชง ที่ไม่จัดเป็นยาเสพติด ได้แก่ ใบที่ไม่ติดกับช่อดอก กิ่ง ก้าน ลำต้น เปลือก ราก ของกัญชา และเมล็ดของกัญชง รวมถึงกากที่เหลือจากการสกัดกัญชาและกัญชง ต้องมีปริมาณ THC ไม่เกิน 0.2% เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ การศึกษาวิจัย และการผลิตผลิตภัณฑ์สุขภาพ แต่ส่วนของช่อดอก ใบที่ติดกับช่อดอก และเมล็ดของกัญชา และช่อดอกของกัญชงยังคงจัดเป็นยาเสพติด⁽³⁾ ปัจจุบันได้มีประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติด้านสมุนไพร พ.ศ. 2564 ให้นำน้ำมันสารสกัดกัญชาในรูปแบบยาหยดในช่องปาก (Oromucosal drops) จำนวน 5 รายการ เป็นรายการยาเพื่อใช้ในการป้องกันหรือแก้ไขปัญหสุขภาพในสถานพยาบาลหรือหน่วยงานของรัฐที่ได้รับอนุญาต ถือได้ว่าเป็นการขับเคลื่อนและส่งเสริมการใช้กัญชาอย่างเป็นรูปธรรม ทำให้เกิดความมั่นคงระบบยาของประเทศ ลดค่าใช้จ่ายในการนำเข้ายา สามารถสร้างมูลค่าและเพิ่มรายได้ให้เกิดขึ้นในประเทศ ประเทศไทยถือเป็นประเทศแรกในอาเซียนที่อนุญาตให้ใช้กัญชาอย่างถูกกฎหมายเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์และการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ จากรายงานของเครือข่ายพัฒนาประเทศไทยแบบเปิด (Open development Thailand) คาดว่ามูลค่าอุตสาหกรรมกัญชาทั่วโลกจะเติบโตอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง โดยอุตสาหกรรมกัญชาของประเทศไทยจะมีมูลค่าทางตลาดกว่า 21,000 ล้านบาท ภายในปี 2567⁽⁴⁾ นอกจากนี้ปัจจุบันเริ่มมีผู้ประกอบการกลุ่มอาหารและเครื่องดื่มรวมทั้งผลิตภัณฑ์สุขภาพ สนใจที่จะใช้สารสกัดจากกัญชาเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์กลุ่มดังกล่าว ส่งผลให้คาดว่ามูลค่าตลาดกัญชาโลกจะเติบโตและกระจายไปในหลายธุรกิจมากขึ้น

กัญชาเป็นพืชในวงศ์ Cannabaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Cannabis sativa* L. subsp. *indica* (Lam.)⁽⁵⁾ ในประเทศไทยยังพบกัญชง หรือ เฮมพ์ (Hemp) ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Cannabis sativa* L. subsp. *sativa* มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คล้ายคลึงกัน แต่มีความแตกต่างกันของปริมาณสารสำคัญหลักในกลุ่มแคนนาบินอยด์ 2 ชนิด ได้แก่ $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol (THC) และ cannabidiol (CBD) ซึ่งใช้ประกอบในการจำแนกระหว่างกัญชาและกัญชง ในปัจจุบันพืชทั้งสองยังคงถูกจัดให้เป็นชนิด (species) เดียวกัน แต่มีความแตกต่างในระดับ sub-species หรือ variety เท่านั้น^(5, 6) สารสำคัญในกัญชาถูกพบมากกว่า 545 ชนิด ในจำนวนนี้สารกว่า 100 ชนิด ที่ถูกระบุว่าเป็นไฟโตแคนนาบินอยด์ (phytocannabinoids) ซึ่งเป็นสารกลุ่มหลักที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา⁽⁷⁾ โครงสร้างทางเคมีของแคนนาบินอยด์ประกอบด้วยส่วนที่เป็นไขมัน (lipid) อัลคิลเรสอร์ซินอล (alkylresorcinol) และเทอร์ปีน (terpenes) สารแคนนาบินอยด์ที่พบในกัญชาส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ carboxylic acid เมื่อโดนแสงหรือความร้อนจะทำให้ถูก decarboxylated ให้อยู่ในรูปของ reduced form โดยสารสำคัญแคนนาบินอยด์ที่พบได้มาก คือ $\Delta 9$ -THC และ CBD ส่วนสารสำคัญแคนนาบินอยด์ที่พบได้น้อยกว่า เช่น $\Delta 8$ -THC, cannabinol (CBN) นอกจากสารกลุ่มแคนนาบินอยด์แล้ว ยังพบสารอื่น ๆ อีกมากกว่า 400 ชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ อัลคาลอยด์ สเตียรอยด์ อัลเคน กรดไขมัน และน้ำตาล เป็นต้น^(8, 9) จากการทบทวนรายงานวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกัญชาโดยเน้นฤทธิ์ของสารสำคัญ ได้แก่ THC และ CBD พบว่า THC และอนุพันธ์ มีฤทธิ์แก้ปวด โดยเฉพาะอาการปวดจากโรคทางระบบประสาท กระตุ้นความอยากอาหารและลดอาการคลื่นไส้จากการใช้เคมีบำบัด ช่วยปกป้องและกระตุ้นการสร้างเซลล์สมอง ส่วน CBD มีฤทธิ์บรรเทาอาการลมชัก ลดอาการวิตกกังวลทั้งในเด็กกลุ่มอาการออทิสติกหรือในผู้ป่วยที่มีประวัติการเสพยา⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้ยังพบว่า THC CBD และอนุพันธ์แคนนาบินอยด์ เช่น cannabichromene, cannabigerol รวมถึงสารฟลาโวนอยด์ เช่น apigenin, chrysoeriol, kaempferol, luteolin, quercetin, vitexin และ cannflavins เป็นต้น มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม (breast cancer cells) มะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer) มะเร็งตับ (hepatocarcinoma) มะเร็งปอด (lung cancer) มะเร็งเม็ดเลือดขาว (lymphocyte leukemia cells) มะเร็งตับอ่อน (pancreatic cells) และ มะเร็งผิวหนัง (melanoma cells)^(8, 11) รายงานรวบรวมฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งของ CBD ในเซลล์เพาะเลี้ยงหรือในสัตว์ทดลองพบว่ามีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7 and MDA-MB-231) เซลล์มะเร็งสมอง (U87-MG, U373, primary 3832 และ 387) เซลล์มะเร็งปอด (NSCLC, A549) เซลล์มะเร็งลำไส้ (HT29) เซลล์มะเร็งตับอ่อน เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (PC-3, DU-145, 22RV1, LNCaP) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด (Leukaemia/Lymphoma, Multiple myeloma) โดยกลไกหลักในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ (proliferation) และเป็นแบบไม่อาศัยตัวรับ (receptor-independent manner) ผ่าน 3 เส้นทางหลัก (pathways) ได้แก่ extracellular-signal-regulated kinase (ERK), Reactive oxygen species (ROS) และ phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) ซึ่งควบคุมการเจริญและการโตของเซลล์ (growth, proliferation) การสร้างและสลายสาร (metabolism) การอยู่รอดของเซลล์ และกระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis)⁽¹²⁾

การทดสอบในสัตว์ทดลองยังแสดงให้เห็นว่าสารสำคัญในกัญชาทั้งแคนนาบินอยด์และสารอื่นที่ไม่ใช่แคนนาบินอยด์ (non-cannabinoids) สามารถยับยั้ง cell proliferation กระตุ้นโปรแกรมเซลล์ตาย (apoptosis) ชัดขวาง angiogenesis และการแพร่กระจายของมะเร็ง (tumor invasion/metastasis)^(8, 13, 14) ปัจจุบันองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (The US Food and Drug Administration, FDA) อนุญาตให้มีการใช้ยา Dronabinol (Marinol[®]) และ Nabilone (Cesamet[®]) ซึ่งมี THC เป็นส่วนประกอบหลัก ให้ใช้ในผู้ป่วยมะเร็งที่มีอาการวิงเวียน คลื่นไส้อาเจียนและเบื่ออาหารจากการใช้ยาเคมีบำบัด ส่วน Nabiximols (Sativex[®]) ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบกัญชา (มี THC : CBD = 1 : 1) ใช้ในรูปแบบสเปรย์พ่นในช่องปาก (Oromucosal spray) ใช้บรรเทาอาการปวดที่เกิดจากมะเร็ง อยู่ระหว่างการทดสอบทางคลินิกในสหรัฐอเมริกา ยานี้ได้รับการขึ้นทะเบียนรับรองแล้วในแคนาดา เม็กซิโก และบางประเทศในแถบยุโรป⁽¹⁵⁾ การใช้สารสกัดหรือสารสำคัญในกัญชาเพื่อใช้รักษาหรือฆ่าเซลล์มะเร็งโดยตรงนั้น

ยังต้องการองค์ความรู้ใหม่จากการวิจัยเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งหรือลดความเสี่ยงจากผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้

กัญชาพันธุ์ไทยที่ได้รับยกย่องว่าเป็นพันธุ์ที่ดีที่สุดในโลกพันธุ์หนึ่ง คือ พันธุ์ทางกระรอก (Thai Stick) แต่มีแนวโน้มที่มีปริมาณ THC สูง⁽¹⁶⁾ อย่างไรก็ตามกัญชาพันธุ์ไทยจากรายงานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่มีการเก็บรวบรวมพันธุ์กัญชาสามารถจำแนกตามปริมาณสารสำคัญ THC และ CBD ที่ตรวจพบ แบ่งเป็น 3 พันธุ์ ได้แก่ กัญชาพันธุ์ที่มีปริมาณ THC สูง (รหัสตัวอย่าง PTC0602) พันธุ์กัญชาที่ให้ค่า THC และ CBD สัดส่วนใกล้เคียงกัน (รหัสตัวอย่าง PTC0601) และ พันธุ์กัญชาที่ให้ CBD สูง (รหัสตัวอย่าง PTC0729) ขณะนี้กัญชาทั้ง 3 พันธุ์ อยู่ระหว่างขอรับรองพันธุ์พืชกับกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์⁽¹⁷⁾ งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย PTC0601 PTC0602 และ PTC0729 ต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนากัญชาพันธุ์ไทยเป็นยาต้านมะเร็งหรือยาใช้ในผู้ป่วยมะเร็งต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารละลาย

Sodium bicarbonate, Sodium chloride, Potassium chloride, Potassium dihydrogen phosphate, Di-sodium hydrogen phosphate dodecahydrate และ EDTA Disodium Salt, Dihydrate (MERCK, Darmstadt, Germany), 0.25% Trypsin (Gibco, New York, USA), Trypan Blue (Sigma-Aldrich, Oregon, USA), Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (Invitrogen, Oregon, USA), Doxorubicin (MERCK, St. Louis, USA), Fetal Bovine Serum (Gibco, Paisley, UK), Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) และ Eagle's minimal essential medium (EMEM) (Gibco, New York, USA).

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ A-549 (เซลล์มะเร็งปอด), HepG2 (เซลล์มะเร็งตับ), A-498 (เซลล์มะเร็งไต), A-172 (เซลล์มะเร็งสมอง), PANC-1 (เซลล์มะเร็งตับอ่อน), Caco-2 (เซลล์มะเร็งลำไส้) และ MCF-7 (เซลล์มะเร็งเต้านม) ซื้อมาจากบริษัท CLS Cell line service GmbH, Eppelheim, ประเทศเยอรมนี เซลล์ A-549 และ A-172 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ส่วนเซลล์ HepG2 A-498 Caco-2 PANC-1 และ MCF-7 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด EMEM ที่มี 2mM L-Glutamine, 0.1 mM Non-essential amino acid, 1 mM Sodium pyruvate และ Fetal bovine serum ร้อยละ 10 บ่มในตู้บเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 °C

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องซัง 4 ตำแหน่ง, Biological Safety Cabinet (BSC Class II), Circulating water bath, ตู้บเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์, เครื่อง Elisa microplate reader, เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge), เครื่อง Sonicator, 96 well plate, Micropipette ขนาด 10-100, 20-200, 100-1000, 5000 และ 10000 ไมโครลิตร, Micropipette tip ขนาด 20, 200, 1,000, 5,000 และ 10,000 ไมโครลิตร, Multi-channel pipette ขนาด 300 ไมโครลิตร, หลอด centrifuge tube ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร, ซ้อนตักสาร, กระดาษซังสาร, Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, กล่องแช่แข็งเซลล์ (Cool box), เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ, กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted Microscope), เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer)

วัตถุดิบดอกกัญชา

ตัวอย่างสมุนไพรช่อดอกเพศเมียกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ โดยให้รหัสตัวอย่าง PTC0601 รหัสตัวอย่าง PTC0602 (พันธุ์ที่ให้ THC สูง) และรหัสตัวอย่าง PTC0729 (พันธุ์ที่ให้ CBD สูง) เก็บมาจากแหล่งเพาะปลูกกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หนังสือสำคัญยาเสพติดประเภท 5 อนุญาตปลูกเลขที่ 90/2564 (ปลูก)

ขั้นตอนการสกัดกัญชา

นำตัวอย่างช่อดอกเพศเมีย PTC0601, จำนวน 132 กรัม, PTC0602 และ PTC0729 ปริมาณ 132, 126 และ 100 กรัมตามลำดับ บดหยาบ สกัดด้วยวิธีของไหลวิกฤตยิ่งยวดโดยใช้เครื่องสกัดรุ่น Spe-ed SFE บริษัท Applied Separations ประเทศสหรัฐอเมริกา และใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวทำละลาย แรงดัน 250 bar อุณหภูมิของตู้อบ (oven) 40 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณสารสกัด 10.92 กรัม, 8.95 กรัม และ 7.07 กรัม ตามลำดับ วิเคราะห์ปริมาณ THC และ CBD ในสารสกัด ด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC, model LC-40D, Shimadzu, Japan) มีตัวตรวจวัด UV-Vis ความยาวคลื่น 220 ± 4 nm คอลัมน์ 150×3.0 mm C18 InfinityLab Poroshell packed with 2.7 micron particles เฟสเคลื่อนที่ใช้ (A) 0.085% H_3PO_4 in Water และ (B) 0.085% H_3PO_4 in Acetonitrile รันแบบ isocratic 30%(A) : 70%(B) เตรียมตัวอย่างโดยนำสารสกัด 20 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วย methanol : chloroform 9:1 ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร ด้วย methanol ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร กรองด้วย nylon syringe filter 0.45 micron

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT

เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงในเพลทเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ $37^\circ C$ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง เตรียมสารสกัดกัญชาความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ระดับความเข้มข้นต่ำซึ่งไม่มีผลทำลายเซลล์จนถึงระดับความเข้มข้นสูงซึ่งมีผลทำลายเซลล์มากกว่าร้อยละ 90 จำนวน 8 ระดับความเข้มข้น โดยการเจือจางแบบ 2-fold serial dilution ความเข้มข้นสูงสุดของสารทดสอบเท่ากับ 5,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ (0.5% v/v DMSO) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ($n = 3$) เมื่อครบเวลาบ่มเลี้ยงเซลล์ ดูดสารละลายอาหารออกจากเพลท จากนั้นปิเปตสารละลายทั้ง 8 ระดับความเข้มข้นที่เตรียมไว้แล้ว ลงในเพลทที่มีเซลล์ โดยเติมหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเพลทที่อุณหภูมิ $37^\circ C$ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ล้างด้วย 1X PBS 2 ครั้ง เติม MTT ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มเพลทในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ปิเปตสารละลาย MTT ออก ให้เหลือเฉพาะผลึก Formazan เติม DMSO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมเพื่อละลายผลึก Formazan เขย่าเพลทประมาณ 1 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) โดยเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่เติมสารทดสอบ) ในการทดสอบใช้ Doxorubicin เป็น positive control

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ค่า IC_{50} โดยใช้ความสัมพันธ์แบบ non-linear regression ระหว่าง %viability และความเข้มข้นที่ทดสอบ ส่วนการเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างในเซลล์แต่ละชนิด ใช้สถิติ One-way ANOVA วิธี Tukey's multiple comparisons test โดยโปรแกรม GraphPad Prism version 9.0.0 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผล

ปริมาณสารสกัดกัญชาและแคนนาบินอยด์

สารสกัดช่อดอกเพศเมียของกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ ได้สารสกัดที่มีสีกึ่งแข็งกึ่งเหลวสีเหลืองน้ำตาล การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในกลุ่ม cannabinoids ได้ปริมาณ THC และ CBD ดังแสดงในตารางที่ 1 PTC0601 PTC0602 และ PTC0729 ให้ค่า yield ใกล้เคียงกันเท่ากับ 8.27, 7.10 และ 7.07% ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยวิธี HPLC THC มีปริมาณเท่ากับ 20.08, 38.03 และ 4.28% ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณ CBD มีค่าเท่ากับ 12.18, 3.55 และ 25.89 % ตามลำดับ เมื่อเทียบสัดส่วนระหว่าง THC : CBD พบว่า PTC0602 ให้ค่า THC ในสัดส่วน 10 : 1 ในขณะที่ PTC0729 ให้ค่า CBD ในสัดส่วนสูงกว่าพันธุ์อื่นมีค่า 1 : 6 ส่วนตัวอย่าง PTC0601 มีค่าสัดส่วนของสารที่ใกล้เคียงกันประมาณ 2 : 1

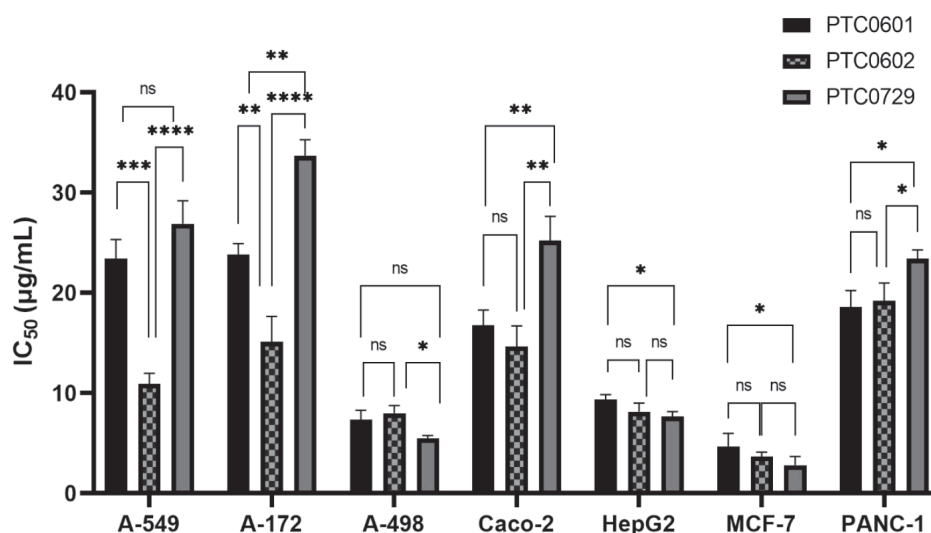
ตารางที่ 1 ปริมาณสารสกัด (% yield) THC และ CBD ในตัวอย่างกัญชา

รหัสตัวอย่างสารสกัด	Yield (%)	Total THC (%)	Total CBD (%)	THC: CBD
PTC0601	8.27	20.08	12.18	2: 1
PTC0602	7.10	38.03	3.55	10: 1
PTC0729	7.07	4.28	25.89	1: 6

ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT assay

สารสกัดกัญชาพันธุ์ไทยทั้ง 3 พันธุ์ สามารถยับยั้งหรือฆ่าเซลล์มะเร็งได้โดยมีค่าความเข้มข้นสูงสุดของตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด ที่ฆ่าเซลล์มะเร็งทั้ง 7 ชนิด ได้มากกว่า 90% เทียบกับกลุ่มเซลล์ควบคุมที่มีค่าต่ำกว่า 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยค่าความเข้มข้นของตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด จะอยู่ในช่วง 0.78-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อนำค่าร้อยละการมีชีวิตและความเข้มข้นของสาร วิเคราะห์แบบ non-linear regression คำนวณค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงทั้ง 7 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2 ยา doxorubicin ซึ่งเป็น positive control ให้ค่า IC_{50} ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ อยู่ในช่วง 0.10-1.43 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ค่า IC_{50} ของ PTC0601 PTC0602 และ PTC0729 ต่อเซลล์ MCF-7 ซึ่งมีค่าต่ำสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อื่นๆ เท่ากับ 4.67 ± 1.31 , 3.66 ± 0.43 และ 2.81 ± 0.85 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในเซลล์ A-498 ให้ค่า 7.35 ± 0.92 , 7.97 ± 0.79 และ 5.48 ± 0.27 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าในเซลล์ HepG2 เล็กน้อย ให้ค่าเท่ากับ 9.36 ± 0.48 , 8.13 ± 0.86 และ 7.65 ± 0.49 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในเซลล์ Caco-2 และ PANC-1 ให้ค่า IC_{50} ของสาร PTC0601 PTC0602 และ PTC0729 ใกล้เคียงกัน โดยในเซลล์ Caco-2 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 16.7 ± 1.50 , 14.65 ± 2.05 และ 25.21 ± 2.41 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนในเซลล์ PANC-1 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 18.58 ± 1.65 , 19.19 ± 1.79 และ 23.40 ± 0.88 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในเซลล์ A-549 และ A-172 มีแนวโน้มที่จะถูกยับยั้งด้วยตัวอย่างสารสกัดที่มี THC สูงในเซลล์ A-549 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 23.41 ± 1.91 , 10.92 ± 1.05 และ 26.90 ± 2.27 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนในเซลล์ A-172 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 23.81 ± 1.10 , 15.11 ± 2.52 และ 33.68 ± 1.59 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความเป็นพิษของสารสกัดทั้ง 3 พันธุ์โดยใช้สถิติ One-way ANOVA และ Tukey's multiple comparisons test ดังแสดงในภาพที่ 1 สารสกัดกัญชาทั้ง 3 ชนิด มีพิษต่อเซลล์ MCF-7 สูงสุด (ให้ค่า IC_{50} ต่ำสุด) ซึ่งมีความแตกต่างของค่า IC_{50} อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ระหว่างตัวอย่าง PTC0729 และ PTC0601 และระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสารสกัดทั้ง 3 พันธุ์ ยังมีความเหมือนกันในเซลล์ HepG2 ($p < 0.05$ ระหว่างตัวอย่าง PTC0729 และ PTC0601) ส่วนในเซลล์ A-549 A-172 และ Caco-2 สารสกัด PTC0602 ให้ค่า IC_{50} ต่ำสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดสองชนิด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$ และ $p < 0.005$) เมื่อเทียบกับสารสกัด PTC0729



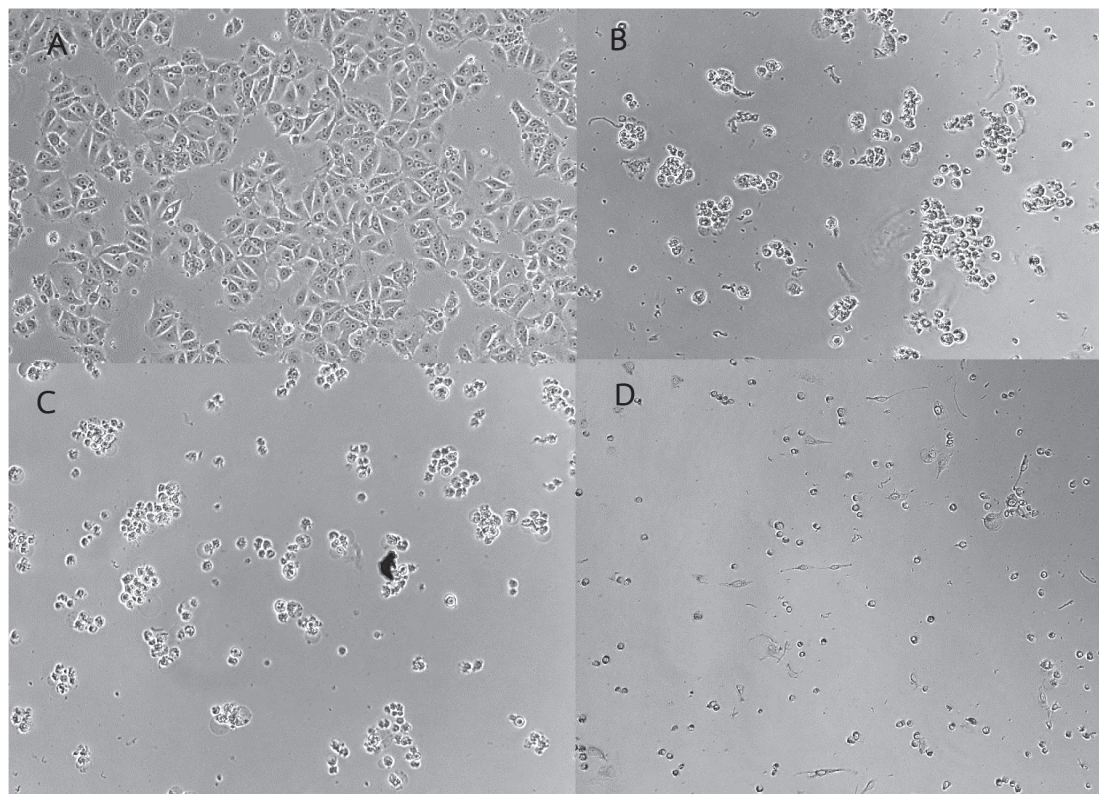
ภาพที่ 1 ผลของสารสกัดกัญชาไทย PTC0601 PTC0602 และ PTC0729 ต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง 7 ชนิด ค่า IC₅₀ แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสารในเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดโดยใช้สถิติ One-way ANOVA และ Tukey's multiple comparisons test (ns = not significant, *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.0005 และ ****p < 0.0001)

การเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์มะเร็ง MCF-7 กลุ่มควบคุมและหลังการบ่มในสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง จากนั้นส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted Microscope) กำลังขยาย 20 เท่า จะเห็นความแตกต่างระหว่างกลุ่มเซลล์ควบคุมซึ่งไม่เติมสารทดสอบเซลล์มีรูปร่างปกติแบบเซลล์เยื่อ (epithelial-like) มีหัวท้าย รูปเหลี่ยม สามารถสังเกตเห็นขอบเขตเซลล์และนิวเคลียส มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณร้อยละ 75-80 ของพื้นที่ ส่วนเซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดกัญชาทั้ง 3 พันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้นสูงจะทำให้เซลล์ตาย (เซลล์ตายประมาณร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะทำให้เซลล์หดตัว ลักษณะกลมผิวขรุขระ เกาะกลุ่มหรือเป็นเซลล์เดี่ยวทั้งบนผิวขวดเลี้ยงเซลล์และในอาหารเลี้ยง โดยในสารสกัด PTC0601 และ PTC0602 เซลล์ที่ตรวจพบจะมีลักษณะคล้ายกันเป็นกลุ่มเซลล์หดตัว กระจายบนพื้นผิวขวดน้อยกว่าร้อยละ 50 ของพื้นที่ ส่วนสารสกัด PTC0729 จะเห็นเซลล์หดตัวกลม ส่วนใหญ่เป็นเซลล์เดี่ยว กระจายตัวน้อยกว่าร้อยละ 20 ของพื้นที่ ดังแสดงในภาพที่ 2

ตารางที่ 2 ค่า IC₅₀ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของสารสกัดกัญชา PTC0601 PTC0602 PTC0729 และยา Doxorubicin ต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง 7 ชนิด

Cell lines	IC ₅₀ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)*			
	PTC0601	PTC0602	PTC0729	Doxorubicin
A-549	23.41 ± 1.91	10.92 ± 1.05	26.90 ± 2.27	0.18 ± 0.04
A-172	23.8 ± 1.10	15.11 ± 2.52	33.68 ± 1.59	0.44 ± 0.15
A-498	7.35 ± 0.92	7.97 ± 0.79	5.48 ± 0.27	0.16 ± 0.01
Caco-2	16.77 ± 1.50	14.65 ± 2.05	25.21 ± 2.41	1.43 ± 0.02
HepG2	9.36 ± 0.48	8.13 ± 0.86	7.65 ± 0.49	0.15 ± 0.03
MCF-7	4.67 ± 1.31	3.66 ± 0.43	2.81 ± 0.85	0.10 ± 0.01
PANC-1	18.58 ± 1.65	19.19 ± 1.79	23.40 ± 0.88	0.31 ± 0.01

*ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์มะเร็ง MCF-7 กลุ่มควบคุมและหลังการบ่มกับสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง จากนั้นส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted Microscope) กำลังขยาย 20 เท่า (A) ภาพเซลล์กลุ่มควบคุม (B) ภาพเซลล์ที่ทดสอบกับสาร PTC0601 (C) ภาพเซลล์ที่ทดสอบกับสาร PTC0602 และ (D) ภาพเซลล์ที่ทดสอบกับสาร PTC0729

วิจารณ์

สารสกัดกัญชาพันธุ์ไทยทั้ง 3 ตัวอย่าง สกัดได้จากกัญชาที่มีปริมาณสารแคนนาบินอยด์ THC และ CBD แตกต่างกันด้วยวิธี HPLC สารสกัด PTC0602 มีปริมาณ THC สูงกว่า (THC: CBD = 10:1) ส่วน PTC0729 มีปริมาณ CBD สูงกว่า (THC: CBD = 1:6) และ PTC0601 เป็นพันธุ์ THC และ CBD ใกล้เคียงกัน (THC: CBD = 2:1) จากการผลทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าสารสกัดกัญชาสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 7 ชนิดได้ดี โดยมีประสิทธิภาพสูงสุด 3 อันดับแรก ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งไต (A-498) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) สารสกัด PTC0729 ซึ่งเป็นตัวอย่างกัญชาที่มีปริมาณ CBD สูง มีความจำเพาะและเป็นพิษสูงสุดให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.81 ± 0.85 , 5.48 ± 0.27 และ 7.65 ± 0.49 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ PTC0601 หรือ PTC0602 พบว่ามีปริมาณ CBD ต่ำกว่า สอดคล้องกับรายงานการทดสอบ CBD สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด ErbB2-positive โดยการกระตุ้นการแสดงออกของ cannabinoid receptor 2 (CB2), ELK1, Tyrosine kinase C-Src TRPV1 ยับยั้งการเจริญของเซลล์⁽¹⁸⁾ อย่างไรก็ดีตามมีการรวบรวมงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่า CBD ยับยั้งเซลล์มะเร็งสมอง (U87-MG, T98G, SF126, U251MG) อย่างได้ผล โดยยับยั้งการเจริญและการรุกราน (invasion) ของเซลล์⁽¹¹⁾ ส่วนสารสกัด PTC0602 ซึ่งมีปริมาณ THC สูง จะมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งปอด (A-549) เซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) เซลล์มะเร็งสมอง (A-172) และมะเร็งตับอ่อน (PANC-1) ให้ค่า IC_{50} ต่ำกว่า PTC0601 และ PTC0729 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลอง

จะสังเกตได้ว่าสารสกัด PTC0601 ซึ่งมีสัดส่วนของ THC และ CBD ใกล้เคียงกันไม่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งชนิดใดเลย หากกลไกในการต้านมะเร็งของสารสกัดกัญชาผ่านการแสดงออกของ CB1 และ CB2 เป็นหลัก CBD ซึ่งปกติกลไกการออกฤทธิ์จะไม่ได้เข้าจับกับ CB1 โดยตรง แต่จะทำตัวเป็น competitor ขัดขวาง THC ในการจับกับเซลล์ตัวรับ⁽¹⁹⁾ ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลดลง อย่างไรก็ตามในสารสกัดกัญชายังมีสารอื่นๆ นอกจากสารในกลุ่มแคนนาบินอยด์ เช่น ฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ และอัลคาลอยด์ ซึ่งอาจมีผลต่อเซลล์มะเร็ง จากฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนายาต้านมะเร็งต่อไปได้ รวมถึงควรมีการศึกษาพิษวิทยาในสัตว์ทดลองเพื่อให้เกิดความปลอดภัย น่าเชื่อถือ เพื่อนำข้อมูลไปใช้ในการศึกษาวิจัยหรือพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป

สรุป

สารสกัดช่อดอกของกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ ได้แก่ PTC0601 (THC : CBD=2 : 1), PTC0602 (THC: CBD=10 : 1) และ PTC0729 (THC : CBD=1: 6) แสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 7 ชนิด โดย PTC0729 ซึ่งมีปริมาณ CBD สูง มีความจำเพาะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและเป็นพิษสูงสุดต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งไต (A-498) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.81 ± 0.85 , 5.48 ± 0.27 และ 7.65 ± 0.49 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ ส่วน PTC0602 ซึ่งมีปริมาณ THC สูง แสดงความเป็นพิษจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งปอด (A-549) เซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) เซลล์มะเร็งสมอง (A-172) และมะเร็งตับอ่อน (PANC-1) ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 10.92 ± 1.05 , 14.65 ± 2.05 , 15.11 ± 2.52 และ 19.19 ± 1.79 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ ในขณะที่ PTC0601 มีพิษต่อเซลล์เฉพาะเล็งแต่ไม่จำเพาะกับเซลล์ใด จะเห็นได้ว่าสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทยสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเฉพาะเล็งได้ เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิจัยในช่อดอกกัญชา ซึ่งยังจัดเป็นยาเสพติด ดังนั้นผลการทดลองไม่ได้สะท้อนไปถึงการใช้ส่วนอื่นๆ ของกัญชา ซึ่งผู้วิจัยจะมีการศึกษาส่วนต่างๆ ของกัญชา เช่น ใบ กิ่ง ก้าน ลำต้น ราก ของกัญชาและเมล็ดต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและห้องปฏิบัติการจีโนมิกส์พืชในการจัดหาตัวอย่างกัญชาพันธุ์ไทยทั้ง 3 ตัวอย่าง ภก. เสกสรรค์ บัวเบา เจ้าหน้าที่ศูนย์ตรวจสอบและรับรองคุณภาพสมุนไพรในการวิเคราะห์ปริมาณสารทางเคมี เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. National Cancer Institute. Cancer statistics. [online]. 2020; [cited 2021 Jun 30]; [4 screens]. Available from : URL : <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>.
2. พระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ ฉบับที่ 7 (พ.ศ. 2562). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 136 ตอนที่ 19 ก (วันที่ 18 กุมภาพันธ์ 2562). หน้า 1.
3. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 (พ.ศ. 2563). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 290 ง (วันที่ 14 ธันวาคม 2563). หน้า 33.
4. Bangkok Post. Thai cannabis market worth B21bn by 2024. [online]. 2019; [cited 2021 Jun 30]; [2 screens]. Available from : URL : <https://www.bangkokpost.com/business/1674900/thai-cannabis-market-worth-b21bn-by-2024>.

5. Small E, Cronquist A. A practical and natural taxonomy for Cannabis. Taxon 1976; 25(4) : 405-35.
6. Piomelli D, Russo EB. The Cannabis sativa versus Cannabis indica debate : an interview with Ethan Russo, MD. Cannabis Cannabinoid Res 2016; 1(1) : 44-6.
7. Hanus LO, Meyer SM, Munoz E, Tagliatalata-Scafati O, Appendino G. Phytocannabinoids : a unified critical inventory. Nat Prod Rep 2016; 33(12) : 1357-92.
8. Moreau M, Ibeh U, Decosmo K, Bih N, Yasmin-Karim S, Toyang N, et al. Flavonoid derivative of Cannabis demonstrates therapeutic potential in preclinical models of metastatic pancreatic cancer. Front Oncol 2019; 9 : 660. (9 pages).
9. Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccarinelli G, Memo M, et al. Cannabis sativa : a comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. J Ethnopharmacol 2018; 227 : 300-15.
10. ศรายุทธ รัตตพงษ์, พรราว ศุภจริยาวัตร, เมธิณ ผดุงกิจ.ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของกัญชา. ว กรมวิทย์ พ 2564; 63(1) : 219-32.
11. Daris B, Verboten MT, Knez Z, Ferk P. Cannabinoids in cancer treatment : therapeutic potential and legislation. Bosn J Basic Med Sci 2019; 19(1) : 14-23.
12. Zhelyazkova M, Kirilov B, Momkov G. The pharmacological basis for application of cannabidiol in cancer chemotherapy. Pharmacia 2020; 67(4) : 239-52.
13. Chakravarti B, Ravi J, Ganju RK. Cannabinoids as therapeutic agents in cancer : current status and future implications. Oncotarget 2014; 5(15) : 5852-72.
14. Velasco G, Sánchez C, Guzmán M. Endocannabinoids and cancer. Handb Exp Pharmacol 2015; 231 : 449-72.
15. American Cancer Society. Marijuana and cancer. [online]. 2020; [cited 2021 Jun 30]; [9 screens]. Available from : URL : <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/complementary-and-alternative-medicine/marijuana-and-cancer.html>.
16. ส. สุทธิพันธ์. กัญชา สรรพยาแห่งความหวัง. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 5 พ.ย. 2563]; [23 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : https://www.satapornbooks.co.th/imgadmins/product_pdf/201910_01_Kaancha.pdf.
17. กัญชากัญชา.COM. รวบรวมทะเบียน “กัญชาพันธุ์ไทย” อีก 4 พันธุ์ พร้อมใช้ประโยชน์ทางการแพทย์. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 30 มิ.ย. 2564]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : <https://www.xn--12carlcod7zem.com/31/599/>.
18. Caffarel MM, Andradas C, Mira E, Pérez-Gómez E, Cerutti C, Moreno-Bueno G, et al. Cannabinoids reduce ErbB2-driven breast cancer progression through Akt inhibition. Mol Cancer 2010; 9:196. (11 pages).
19. Lu HC, Mackie K. An introduction to the endogenous cannabinoid system. Biol Psychiatry 2016; 79(7) : 516-25.

Investigation of the Cytotoxicity of Thai Cannabis Extracts on Various Cancer Cell Lines

Sarayut Radapong¹ Praw Suppajariyawat¹ Tiyanee Sahad¹ Nathaphat Harnkit¹
Kanchariya Phankhajon¹ Phatipan Primprai¹ Phichet Banyati¹ Siriwan Chaisomboonpan¹
Pornchai Sincharoenpokai¹ and Kenneth J Ritchie²

¹Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Muang, Nonthaburi 11000, Thailand

²Liverpool John Moores University, Byrom Street, Liverpool L3 3AF, United Kingdom

ABSTRACT Cannabis (*Cannabis sativa* L.) is an addictive plant. Currently, in Thailand, the plant is legalized for medical use and scientific research. It consists of two main active cannabinoids; Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD), both of which report a wide range of pharmacological effects. This research aims to study the toxicity of Thai cannabis female inflorescence extracts on seven cancer cell lines. The three cannabis strains, namely PTC0601, PTC0602 (THC dominant) and PTC0729 (CBD dominant), were extracted using supercritical fluid extraction and then quantitatively analyzed using HPLC. Cytotoxicity was investigated by MTT assay. The results showed that all three extracts posed toxicity to all seven cancerous cell lines. PTC0729; (THC: CBD=1:6), demonstrated significantly different toxicity and specificity to breast cancer cell lines (MCF-7), renal carcinoma (A-498) and hepatocellular carcinoma (HepG2) with IC_{50} values of 2.81 ± 0.85 , 5.48 ± 0.27 and 7.65 ± 0.49 $\mu\text{g/mL}$, respectively. PTC0602; (THC: CBD=10:1), showed specific toxicity against lung cancer cells (A-549), colon cancer cells (Caco-2), brain cancer cells (A-172) and pancreatic cancer (PANC-1) with IC_{50} values of 10.92 ± 1.05 , 14.65 ± 2.05 , 15.11 ± 2.52 and 19.19 ± 1.79 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Whereas, PTC0601 (THC: CBD=2:1) was cytotoxic but not specific to any cell lines. In conclusion, the three Thai cannabis extracts exhibited cytotoxicity towards several cancer cell lines and may have the potential to be developed as anti-cancer drugs.

Keywords: Thai cannabis, Cytotoxicity, Cancer cells, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), Cannabidiol (CBD)

การศึกษาฤทธิ์สมานแผลของสารสกัดช่อดอกกัญชา เพศเมียพันธุ์ไทยต่อเซลล์ปอดเพาะเลี้ยง

พรชัย ลินเจริญโกโคย ตีญานี สาหัด พรราว ศุภจริยาวัตร ศรายุธ ระดาพงษ์ เสกรชตกร บัวเบา พิเชฐ บุญญิต
ศิริวรรณ ชัยสมบุญพันธ์ และณัฐภัทร หาญกิจ
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การติดเชื้อที่ระบบทางเดินหายใจส่วนบนเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่พบได้บ่อย รวมถึงการติดเชื้อด้วยไวรัสโคโรนา 2019 ซึ่งผู้ติดเชื้ออาจเกิดภาวะแทรกซ้อนในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างนำไปสู่การเกิดปอดอักเสบ ส่งผลต่อความเสียหายของเซลล์ปอดได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์สมานแผลของสารสกัดช่อดอกกัญชาเพศเมียพันธุ์ไทยต่อเซลล์ปอดเพาะเลี้ยง (SV-80) ด้วย scratch assay ในหลอดทดลอง ผลการทดลองพบว่า สารสกัดกัญชา PTC0601 มีคุณสมบัติที่มีประสิทธิภาพในการสมานแผล เพิ่มการกระตุ้นเซลล์ การแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และการเคลื่อนที่ของเซลล์ SV-80 ที่ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิตร ส่วนสารสกัดกัญชา PTC0729 ไม่สามารถเหนี่ยวนำเซลล์ SV-80 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นข้อมูลเบื้องต้นนี้ แสดงให้เห็นว่ากัญชาไทยมีประสิทธิภาพการสมานแผลในเซลล์ปอดเพาะเลี้ยงได้ สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพเพื่อใช้ในการดูแลสุขภาพผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสระบบทางเดินหายใจ อย่างไรก็ตามการนำสารสกัดกัญชาไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพควรคำนึงถึงสัดส่วนขององค์ประกอบสารสำคัญ นอกจากนี้การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพควรทดสอบกลไกการสมานแผลเพิ่มเติมในเซลล์ปอดเพาะเลี้ยงชนิดเซลล์เยื่อบุ รวมถึงการศึกษาฤทธิ์การต้านอักเสบ และการศึกษาด้านความปลอดภัยของสารสกัดจากช่อดอกกัญชาเพศเมีย เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพต่อไป

คำสำคัญ: สารสกัดช่อดอกกัญชาเพศเมียพันธุ์ไทย, เซลล์ปอดเพาะเลี้ยง, การสมานแผล

Corresponding author E-mail: pornchai.s@dmsc.mail.go.th

Received: 15 July 2021

Revised: 25 August 2021

Accepted: 30 August 2021

บทนำ

การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน (upper respiratory tract infection, URI) เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่พบบ่อย สาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อไวรัส เช่น rhinoviruses, influenza viruses, parainfluenza viruses และ adenovirus ผู้ป่วยที่ติดเชื้อจะมีการคัดจมูก น้ำมูกขึ้นหรือหืด และอาจมีไข้ในช่วงแรก จากนั้นอาการจะค่อย ๆ ดีขึ้น ใช้เวลานาน 7-10 วัน ภาวะแทรกซ้อนที่พบบ่อย เช่น หูชั้นกลางอักเสบ ไซนัสอักเสบ ปอดอักเสบ จากเชื้อแบคทีเรีย⁽¹⁾ ในปัจจุบันพบโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบนด้วยเชื้อไวรัสพันธุ์ใหม่ที่เรียกว่าโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) เกิดจากการติดเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ผู้ป่วยที่เป็นโรคจะมีการทางระบบทางเดินหายใจ มีไข้ อ่อนเพลีย ไอ หายใจหอบเหนื่อย หายใจลำบาก เนื่องจากเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะเกาะกันเป็นกลุ่มก้อน (cytopathic effect) และทำให้เซลล์ตายจึงทำให้เกิดพยาธิสภาพ (สภาพของโรคที่เกิดกับร่างกาย) ในปอด ผู้ป่วยที่มีอาการของโรคที่ไม่รุนแรงพยาธิสภาพในปอดที่เกิดขึ้นจะสามารถฟื้นคืนกลับมาได้หากได้รับการดูแลรักษาอย่างต่อเนื่องซึ่งอาจจะใช้ระยะเวลาดื้อนาน ในกรณีที่อาการรุนแรงมาก อาจทำให้เกิดภาวะติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง (lower respiratory tract infection, LRI) ได้แก่ ปอดบวม ปอดอักเสบ หรือภาวะแทรกซ้อนอื่น เช่น ไตวาย หรืออาจเสียชีวิตได้^(2, 3) การแพร่ระบาดของ COVID-19 ส่งผลกระทบอย่างมหาศาลต่อประชากรและเศรษฐกิจทั่วโลก รัฐบาลจึงออกนโยบายและมาตรการต่าง ๆ เพื่อช่วยเหลือ บรรเทาความเดือดร้อนให้กับผู้ป่วย บุคลากรทางการแพทย์และประชาชนที่ได้รับผลกระทบ โดยปกติการรักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจจะเป็นการรักษาตามอาการ หรือการใช้ยาต้านไวรัสซึ่งอาจพบผลข้างเคียงเมื่อผู้ป่วยได้รับยารักษา การใช้สมุนไพรหรือสารสกัดจากธรรมชาติในการรักษาหรือฟื้นฟูสุขภาพร่างกายของผู้ป่วยจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อลดความรุนแรงของโรคและลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วย รวมถึงช่วยสนับสนุนการใช้สมุนไพรท้องถิ่นและเป็นการเพิ่มมูลค่าของสมุนไพร

กัญชาเป็นพืชที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. ในวงศ์ Cannabaceae⁽⁴⁾ มีการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์มายาวนาน จากฤทธิ์ต่อจิตประสาทที่เกิดขึ้น ในปัจจุบันมีข้อมูลที่กล่าวถึงการใช้กัญชาอย่างหลากหลาย เช่น การรักษามะเร็ง เป็นยาแก้ปวด ลดอาการปวด และใช้ในโรคเอดส์^(5, 6, 7, 8, 9) ส่งผลทำให้กัญชากลายเป็นกระแสในสังคมไทยอย่างมาก ในทางการแพทย์แผนไทย พืชกัญชามีส่วนที่ใช้เป็นตัวยาในตำรับยาเกือบทุกส่วน เช่น ราก ก้านใบ ใบ และเรณูยอดช่อดอกตัวเมีย (ซึ่งมีฤทธิ์แรงที่สุด) ตำราสรรพคุณยาไทยระบุว่า กัญชามีรสเมาเบื่อ มีสรรพคุณแตกต่างกันตามส่วนที่ใช้ เช่น ใบมีสรรพคุณแก้หอบหืด เจริญอาหาร ชูกำลัง แต่ทำให้จิตใจขาดกลัว ตาลาย ประสาทหลอน ดอกมีสรรพคุณแก้โรคประสาท ทำให้นอนหลับ เจริญอาหาร ละลายเสมหะในลำคอ เป็นต้น^(10, 11) องค์ประกอบสารเคมีในกัญชาที่สำคัญ ได้แก่ สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ (cannabinoids) เช่น Δ -9-tetrahydrocannabinol (Δ -9-THC) cannabidiol (CBD) cannabinol (CBN) cannabigerol (CBG) cannabichromene (CBC) และสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ สาร Δ -9-THC เป็นสารที่พบในปริมาณสูงสุดในกลุ่มแคนนาบินอยด์ โดยอาจพบได้ถึงร้อยละ 17.3 รองลงมาได้แก่ สาร CBG ซึ่งพบได้ร้อยละ 16.3 สาร CBN พบร้อยละ 9.6 สาร CBD และ CBC พบในปริมาณใกล้เคียงกันร้อยละ 7.7⁽¹²⁾ สาร Δ -9-THC มีฤทธิ์กระตุ้นตัวรับแคนนาบินอยด์ (cannabinoid receptors) แบบ partial agonist ทั้ง 2 ชนิด คือ ชนิด CB1 และ CB2 ทำให้เกิดการกระตุ้นระบบประสาท (psychotropic effect) นอกจากนี้สาร Δ -9-THC ยังทำปฏิกิริยากับตัวรับอื่นๆ ได้อีกหลายชนิด จึงออกฤทธิ์ได้หลากหลาย เช่น ด้านอาเจียน แก้ปวด ด้านมะเร็ง ลดความดันในลูกตา ทำให้เจริญอาหาร อย่างไรก็ตาม พบว่าสาร Δ -9-THC อาจทำให้เกิดการติด (addiction) และความวิตกกังวล (anxiety) ได้^(12, 13, 14, 15) ส่วนสาร CBD สามารถออกฤทธิ์ผ่านตัวรับอีกหลายชนิด ทำให้ CBD สามารถออกฤทธิ์ด้านการอักเสบ แก้ปวด คลายกังวล ด้านมะเร็ง ด้านการคลื่นไส้อาเจียน และด้านการชักได้^(12, 13, 14, 15) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ากัญชามีสรรพคุณทางยาแผนไทยในการรักษาการอักเสบได้ซึ่งเป็นกระบวนการตอบสนองของร่างกายต่อเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายเพื่อซ่อมแซมตัวเองภายหลังได้รับบาดเจ็บ⁽¹⁶⁾ กระบวนการซ่อมแซมหรือการสมานแผล (wound healing) สามารถแบ่งได้ 3 ระยะ ซึ่งแต่ละระยะมีการทำงานต่อเนื่องและทับซ้อนกัน

ได้แก่ ระยะที่ 1 ระยะการห้ามเลือด (hemostasis) และระยะที่มีการอักเสบ (inflammatory phase) ระยะที่ 2 ระยะงอกขยาย (proliferative phase หรือ fibroplasia) และระยะที่ 3 ระยะปรับตัวเข้าสู่ภาวะปกติ (maturation หรือ remodeling phase) ซึ่งการสมานแผลที่เกิดขึ้นทั้งหมดนี้จะช่วยให้เนื้อเยื่อกลับคืนสู่สภาพและทำหน้าที่ได้ใกล้เคียงปกติมากที่สุด⁽¹⁷⁾ การศึกษาฤทธิ์สมานแผลด้วยเทคนิค *in vitro* scratch assay เป็นเทคนิคมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาจำลองการสมานแผลของเซลล์ที่ได้รับความเสียหาย มีข้อดีในด้านที่สามารถทำการศึกษาโดยใช้ระยะเวลาทดลองสั้น สามารถเลียนแบบพฤติกรรมในการเคลื่อนย้ายของเซลล์⁽¹⁸⁾ ทดแทนการศึกษาในสัตว์ทดลองซึ่งจะช่วยลดความทุกข์ทรมานของสัตว์ทดลอง โดยพบว่ามีสมุนไพรหรือยาหลายชนิดที่ใช้เทคนิคนี้ในการศึกษาวิจัย เช่น การทดสอบฤทธิ์สมานแผลของสารสกัดจากใบพลูต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ L929 ด้วยวิธี *in vitro* scratch assay ซึ่งพบว่าส่วนสกัดใบพลูด้วยไดคลอโรมีเทนสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์และการเคลื่อนย้ายของเซลล์ได้⁽¹⁹⁾ นอกจากนี้ เทคนิคดังกล่าวยังสามารถใช้ศึกษาฤทธิ์ของยา pulvomycin ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 human TNBC cells พบว่า ยา pulvomycin สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนย้ายของเซลล์มะเร็งเต้านมดังกล่าวได้⁽²⁰⁾ เนื่องจากสรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลายของกัญชาทั้งในด้านของการแก้หอบหืด ละลายเสมหะในลำคอ และต้านอักเสบ จึงเป็นพืชที่น่าจะมีศักยภาพในการนำมาศึกษาวิจัยเพื่อใช้ในการฟื้นฟูเซลล์ปอดที่ได้รับความเสียหายจากการติดเชื้อไวรัสให้คืนกลับสู่สภาพปกติ เป็นการลดความรุนแรงของโรคและเพิ่มคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยทำให้ผู้ป่วยสามารถกลับมาใช้ชีวิตได้ตามปกติ ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากช่อดอกกัญชาเพศเมียพันธุ์ไทยในการสมานแผลต่อเซลล์ปอดเพาะเลี้ยง โดยใช้เทคนิค *in vitro* scratch assay

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมวัตถุดิบ

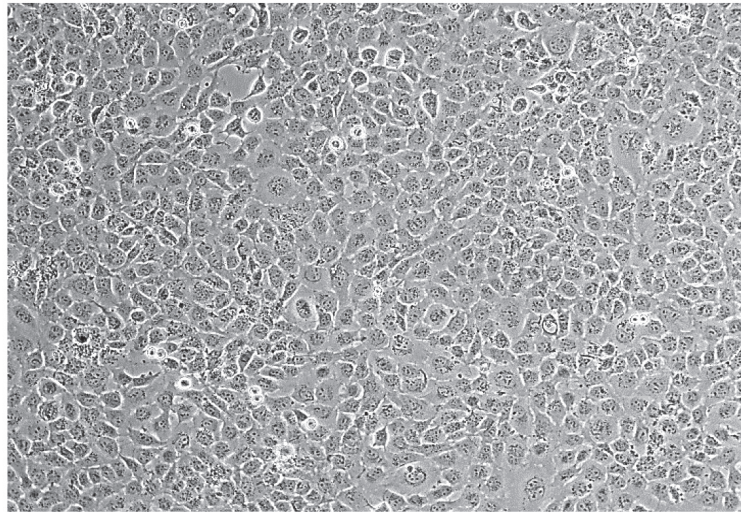
ตัวอย่างสมุนไพรกัญชาช่อดอกเพศเมียพันธุ์ไทยจำนวน 2 พันธุ์ เก็บจากโรงเรือนปลูกแบบ Green house ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หนังสือสำคัญผลิตซึ่งยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ที่ 90/2564 (ปลูก) โดยให้รหัสตัวอย่าง PTC0601 (พันธุ์ที่มี THC : CBD เท่ากับ 2 : 1) และรหัสตัวอย่าง PTC0729 (พันธุ์ที่มี THC : CBD เท่ากับ 1 : 6)

การสกัดช่อดอกกัญชา

นำตัวอย่างช่อดอกเพศเมียพันธุ์ไทย PTC0601 จำนวน 132 กรัม และ PTC0729 100 กรัม มาบดหยาบแล้วสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical Fluid Extraction) โดยใช้เครื่องสกัดรุ่น Spe-ed SFE บริษัท Applied Separations ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้แรงดัน 250 bar ที่อุณหภูมิของตู้อบร้อน (hot air oven) 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารสกัดที่ได้วิเคราะห์หาปริมาณ THC และ CBD ในสารสกัด ด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC, model LC-40D, Shimadzu, Japan) มีตัวตรวจวัด UV-Vis ความยาวคลื่น 220 ± 4 nm คอลัมน์ 150×3.0 mm C18 InfinityLab Poroshell packed with 2.7 micron particles เฟสเคลื่อนที่ใช้ (A) 0.085% H_3PO_4 in water และ (B) 0.085% H_3PO_4 in acetonitrile รันแบบ isocratic 30%(A) : 70%(B) โดยนำสารสกัด 20 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วย methanol : chloroform ด้วยอัตราส่วน 9 : 1 ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้น pipette 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร ด้วย methanol ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร นำมากรองด้วย nylon syringe filter ขนาด 0.45 micron แล้วจึงนำสารละลายตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เซลล์เพาะเลี้ยงและอาหารเลี้ยงเซลล์

นำเซลล์ปอดเพาะเลี้ยงชนิดปกติ Human fibroblast (SV40-transformed) cell line (SV-80) ดังแสดงในภาพที่ 1 ซื้อจากบริษัท CLS Cell line service GmbH ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ประกอบด้วย 2mM L-Glutamine, 0.1 mM Non-essential amino acid, 1 mM Sodium pyruvate และ 10% Fetal bovine serum (FBS) เลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร บ่มในตู้อบเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 90 ± 10 และความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5.0 ± 1.0 เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 1 ลักษณะรูปร่างของเซลล์ปอดชนิดปกติ (SV-80) จากกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (กำลังขยาย 10X)

การศึกษาฤทธิ์สมานแผลต่อเซลล์ปอดเพาะเลี้ยงด้วยวิธี *in vitro scratch assay*⁽²¹⁾

เตรียมเซลล์ SV-80 ให้ได้ปริมาณของเซลล์เท่ากับ 4.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อหลุม ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ บ่มในตู้อบเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนเซลล์เจริญและเกาะเต็มบนผิวภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยง (monolayer) เปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ใช้ SPL Scar™ Scratcher (SPL Life Sciences, Pocheon, Korea) ขีดตรงกลางของแต่ละหลุม และล้างเซลล์ที่หลุดออกด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี FBS เติมน้ำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมโดยขังสารสกัดข้อดอกเพศเมียพันธุ์ไทย ปริมาณ 50 มิลลิกรัม ทำละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดเริ่มต้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางสารสกัดตัวอย่างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น ต่าง ๆ ที่ได้ทำการคัดเลือก ด้วยเกณฑ์การคัดเลือกความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างต้องเป็นความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง (สารสกัด PTC0601 ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0.63, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร; สารสกัด PTC0729 ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0.94, 1.88, 3.75, 7.50 และ 15.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลุมละ 1,000 ไมโครลิตร กลุ่มควบคุมทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์แทนสารละลายตัวอย่าง หลุมละ 1,000 ไมโครลิตร ถ่ายภาพรอยขีดตรงกลางของแต่ละหลุมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ Nikon ECLIPSE i2-E (Nikon, Tokyo, Japan) ที่สามารถควบคุมแก๊ส ความชื้น และอุณหภูมิ ถ่ายภาพที่เวลา 0, 5, 10, 15, 25 และ 35 ชั่วโมง ภาพที่ถูกถ่ายนำมาหาพื้นที่ช่องว่างที่เปลี่ยนแปลงไปในระยะเวลาต่างๆ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NIS Elements AR Analysis และคำนวณหาค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ (relative migration) ดังนี้

$$\text{ร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์} = \frac{(\text{พื้นที่ระยะห่างของเซลล์ } T_0 - \text{พื้นที่ระยะห่างของเซลล์ } T_n)}{\text{พื้นที่ระยะห่างของเซลล์ } T_0} \times 100$$

T_0 = ระยะเวลาเริ่มต้นการทดสอบ

T_n = ระยะเวลาที่กำหนด

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลการศึกษาฤทธิ์สมานแผลต่อเซลล์ پوستด้วยวิธี *in vitro scratch assay* จากการทดลอง 3 ซ้ำ แบบ Biological replicates ($n = 3$) มาคำนวณและเปรียบเทียบความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดกับกลุ่มควบคุม โดยใช้สถิติ One-way ANOVA วิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยโปรแกรม SPSS/PC version 19.0 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผล

การสกัดช่อดอกกัญชา

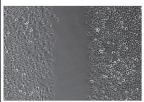
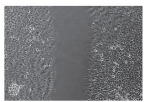
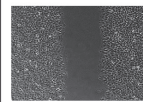
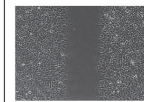
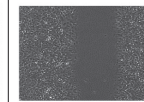
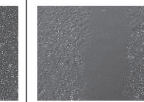
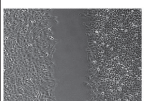
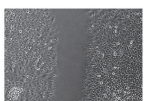
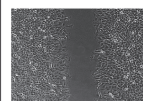
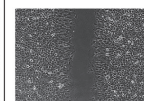
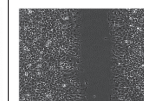
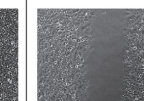
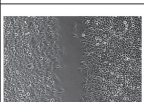
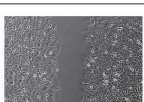
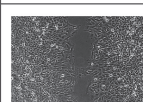
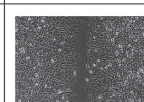
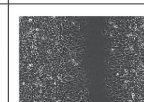
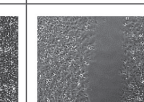
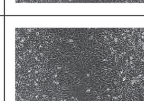
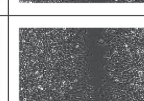
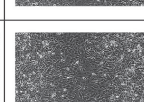
ช่อดอกกัญชาเพศเมีย PTC0601 และ PTC0729 เมื่อสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical Fluid Extraction) ได้ปริมาณสารสกัด 10.92 และ 7.07 กรัม คิดเป็นร้อยละของผลผลิต (%yield) เท่ากับ 8.27 และ 7.07 เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณ THC และ CBD ในสารสกัด พบว่า สารสกัด PTC0601 และ PTC0729 มีปริมาณ THC และ CBD ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณสาร THC และ CBD ในช่อดอกกัญชาเพศเมียพันธุ์ไทย PTC0601 และ PTC0729

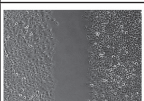
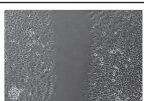
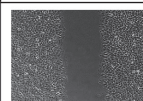
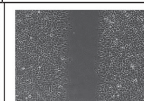
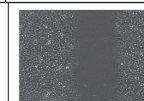
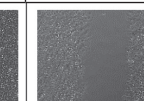
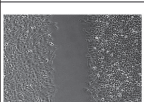
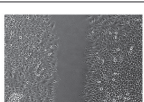
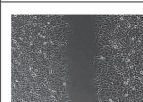
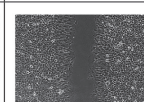
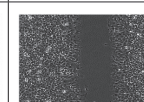
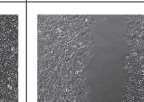
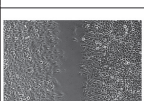
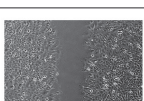
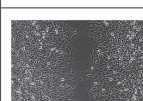
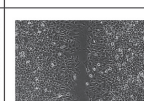
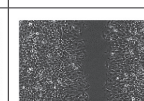
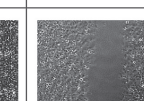
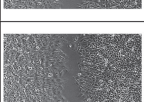
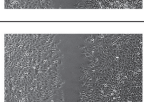
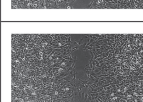
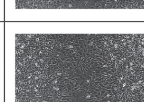
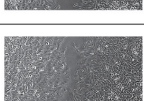
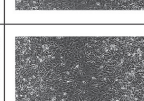
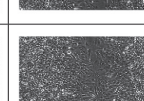
รหัสตัวอย่างสารสกัดกัญชา	THC:CBD	Total THC (%)	Total CBD (%)
PTC0601	2:1	20.08	12.18
PTC0729	1:6	4.28	25.89

การศึกษาฤทธิ์สมานแผลต่อเซลล์ پوستด้วยวิธี *in vitro scratch assay*

การศึกษาฤทธิ์สมานแผลต่อเซลล์ پوستเฉพาะเลี้ยงด้วยวิธี *in vitro scratch assay* ดังแสดงในภาพที่ 2 และ 3 พบว่า สารสกัดกัญชา PTC0601 ที่ความเข้มข้น 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้มีการเคลื่อนที่ของเซลล์เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่เวลา 5, 15 และ 25 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยพบว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์มากกว่ากลุ่มควบคุมทุกช่วงเวลา ยกเว้นเวลาที่ 35 ชั่วโมง และพบว่าที่ความเข้มข้น 10.00, 1.25 และ 0.63 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีผลทำให้ประสิทธิภาพการเคลื่อนที่ของเซลล์ลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่เวลา 15 และ 25 ชั่วโมง สำหรับสารสกัดกัญชา PTC0729 พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเคลื่อนที่ของเซลล์เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่เวลา 5 ชั่วโมง เท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 3 ส่วนเวลาอื่นๆ สารสกัดกัญชา PTC0729 ทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ پوست SV-80 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)					
	0	10.00	5.00	2.50	1.25	0.63
0						
5						
15						
25						
35						

ภาพที่ 2 ผลของสารสกัดกัญชา PTC0601 ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ปอดเพาะเลี้ยง SV-80 ที่ถูกขีดให้เป็นแผลจำลอง ด้วย SPLScar™ Scratcher และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ที่ระยะเวลาก่อนการทดสอบ (เวลาที่ 0 ชั่วโมง) และระหว่างการทดสอบ (เวลาที่ 5, 15, 25 และ 35 ชั่วโมง) ภาพที่ถูกถ่ายนำมาหาพื้นที่ช่องว่างที่เปลี่ยนแปลงไปในระยะเวลาต่างๆ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NIS Elements AR Analysis

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)					
	0	15.00	7.50	3.75	1.88	0.94
0						
5						
15						
25						
35						

ภาพที่ 3 ผลของสารสกัดกัญชา PTC0729 ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ปอดเพาะเลี้ยง SV-80 ที่ถูกขีดให้เป็นแผลจำลอง ด้วย SPLScar™ Scratcher และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ที่ระยะเวลาก่อนการทดสอบ (เวลาที่ 0 ชั่วโมง) และระหว่างการทดสอบ (เวลาที่ 5, 15, 25 และ 35 ชั่วโมง) ภาพที่ถูกถ่ายนำมาหาพื้นที่ช่องว่างที่เปลี่ยนแปลงไปในระยะเวลาต่างๆ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NIS Elements AR Analysis

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดช่อดอกกัญชาเพศเมียพันธุ์ไทย PTC0601 ต่อการเหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของเซลล์ پوستเพาะเลี้ยง SV-80 ที่ถูกขีดให้เป็นแผลจำลอง

ความเข้มข้นของ สารสกัด (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	ร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ پوستเพาะเลี้ยงตามช่วงเวลา (ชั่วโมง)*				
	0	5	15	25	35
0	0	21.48 ± 3.44 ^{bc}	52.19 ± 3.59 ^b	73.24 ± 4.38 ^b	95.75 ± 5.62 ^a
10.00	0	11.75 ± 3.89 ^{bd}	33.75 ± 1.54 ^c	56.79 ± 10.25 ^c	83.88 ± 17.18 ^a
5.00	0	24.59 ± 4.94 ^{ab}	60.00 ± 4.46 ^{ab}	86.62 ± 9.43 ^{ab}	93.90 ± 10.14 ^a
2.50	0	32.15 ± 2.20 ^a	72.75 ± 9.63 ^a	93.08 ± 4.58 ^a	99.17 ± 1.44 ^a
1.25	0	18.48 ± 4.49 ^{bcd}	33.25 ± 13.35 ^c	56.35 ± 12.92 ^c	76.34 ± 23.15 ^a
0.63	0	14.94 ± 6.67 ^{cd}	27.50 ± 3.28 ^c	38.74 ± 5.26 ^d	50.99 ± 1.98 ^b

หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดช่อดอกกัญชาสายพันธุ์ไทย PTC0729 ต่อการเหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของเซลล์ پوستเพาะเลี้ยง SV-80 ที่ถูกขีดให้เป็นแผลจำลอง

ความเข้มข้นของ สารสกัด (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	ร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ پوستเพาะเลี้ยงตามช่วงเวลา (ชั่วโมง)*				
	0	5	15	25	35
0	0	21.48 ± 3.44 ^{bc}	52.19 ± 3.59 ^a	73.24 ± 4.38 ^a	95.75 ± 5.62 ^a
15.00	0	17.07 ± 0.21 ^c	40.83 ± 20.51 ^a	58.97 ± 35.00 ^a	63.40 ± 31.46 ^a
7.50	0	21.43 ± 0.75 ^{bc}	57.27 ± 15.42 ^a	78.33 ± 20.36 ^a	89.30 ± 16.29 ^a
3.75	0	24.93 ± 6.01 ^b	54.73 ± 23.06 ^a	78.50 ± 28.80 ^a	84.93 ± 25.92 ^a
1.88	0	32.27 ± 4.46 ^a	58.23 ± 15.72 ^a	75.40 ± 22.17 ^a	85.50 ± 17.42 ^a
0.94	0	19.03 ± 2.75 ^{bc}	52.20 ± 12.87 ^a	78.63 ± 25.71 ^a	84.50 ± 22.32 ^a

หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05)

วิจารณ์

ในประเทศไทยกัญชาจัดเป็นพืชเสพติดตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 จึงทำให้ขาดข้อมูลงานวิจัยด้านกัญชาในประเทศไทยมากกว่า 40 ปี ปัจจุบันตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ (ฉบับที่ 7) พ.ศ. 2562 ได้อนุญาตให้สามารถนำกัญชามาใช้ในกรณีเพื่อประโยชน์ของทางราชการ การแพทย์ การรักษาผู้ป่วย หรือการศึกษาวิจัยและพัฒนาได้⁽²²⁾ ซึ่งจากข้อมูลงานวิจัยกัญชาพบว่า องค์ประกอบสารเคมีในกัญชาที่สำคัญ ได้แก่ สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ (cannabinoids) เช่น Δ9-tetrahydrocannabinol (Δ9-THC) cannabidiol (CBD) cannabinol (CBN) cannabigerol (CBG) cannabichromene (CBC) และสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์⁽¹²⁾ จากการศึกษาการตอบสนอง

ทางภูมิคุ้มกันเมื่อให้สาร THC พบว่าสาร THC สามารถทำให้กลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันลดลงทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง โดยเฉพาะในส่วนของกลไกระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ (cell-mediated immunity) ซึ่งเป็นส่วนที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและการสมานแผล⁽²³⁾ ดังนั้น การศึกษาฤทธิ์สมานแผลในเซลล์ปอดของกัญชาจึงเป็นที่น่าสนใจในสถานการณ์แพร่ระบาดของเชื้อไวรัสที่มีการติดเชื้อระบบทางเดินหายใจและมีการทำลายเนื้อเยื่อของเซลล์ปอด จากข้อมูลการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดกัญชา PTC0601 ที่มีปริมาณสัดส่วนของ THC : CBD ประมาณ 2 : 1 มีศักยภาพในการเหนี่ยวนำให้สมานแผลจำลองเซลล์ปอดเพาะเลี้ยงชนิดปกติสามารถฟื้นฟูกลับมาได้รวดเร็วกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนสารสกัดกัญชา PTC0729 ที่มีปริมาณสัดส่วนของ THC : CBD ประมาณ 1 : 6 ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ปอดเพาะเลี้ยงชนิดปกติฟื้นฟูได้แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่ากัญชาที่มีปริมาณสาร CBD สูงไม่ได้ส่งผลต่อความไวในการสมานบาดแผลเซลล์ปอดเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง สอดคล้องกับรายงานของ Klein และคณะ (2018) ซึ่งได้ศึกษาผลของ CBD ต่อการรักษาแผลในช่องปากสัตว์ทดลอง พบว่า การรักษาด้วยการฉีด CBD ในช่องท้องไม่ได้ส่งผลต่อการสมานของบาดแผลในช่องปาก แต่พบว่าภายหลังจากการให้สาร CBD เป็นระยะเวลา 3 วัน สาร CBD ช่วยทำให้บาดแผลมีการอักเสบลดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างดังกล่าวในวันที่ 7 บ่งชี้ให้เห็นว่า CBD มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบระยะแรกของกระบวนการสมานแผล⁽²⁴⁾ จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ากัญชาเป็นพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการสมานแผลต่อเซลล์ปอดเพาะเลี้ยงได้เร็วขึ้นเหมาะในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพเพื่อใช้ในการดูแลสุขภาพผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสระบบทางเดินหายใจ ซึ่งอาจจะมีส่วนช่วยดูแลให้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อในเซลล์ปอดและเนื้อเยื่อเซลล์ปอดถูกทำลายสามารถฟื้นคืนกลับสู่สภาพปกติได้เร็วขึ้น แต่ทั้งนี้การนำสารสกัดกัญชาไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพควรคำนึงถึงขนาดของสารสกัด สัดส่วนและปริมาณสารสำคัญในกัญชาทั้งปริมาณสาร THC และ CBD ที่จะนำไปใช้ เนื่องจากขนาดของสารสกัดกัญชาและสัดส่วนปริมาณของสารเคมีทั้ง THC และ CBD มีผลต่อการออกฤทธิ์สมานเซลล์ปอดเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์การต้านอักเสบและสมานแผลเป็นการออกฤทธิ์แบบ synergistic effect⁽²³⁾ ข้อด้อยกัญชาเป็นพืชที่จัดเป็นยาเสพติด หากจะนำไปใช้หรือพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ต้องได้รับการอนุญาตจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และปฏิบัติตามกฎหมายที่เกี่ยวข้อง นอกจากนี้การนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพควรทดสอบกลไกการสมานแผลเพิ่มเติมต่อเซลล์ปอดเพาะเลี้ยงชนิดเซลล์เยื่อ รวมถึงการศึกษาฤทธิ์การต้านอักเสบ และการศึกษาด้านความปลอดภัยของสารสกัดจากช่อดอกกัญชา เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพต่อไป

สรุป

การเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์ปอดเพาะเลี้ยง SV-80 เป็นหนึ่งในขั้นตอนการรักษาบาดแผลโดยการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นทดแทนเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บหรือสูญเสีย ซึ่งการทดสอบด้วยวิธี *in vitro scratch assay* เป็นการจำลองศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์เมื่อเกิดความเสียหายที่เซลล์ปอด จากนั้นตรวจสอบการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์ปอดเพาะเลี้ยง SV-80 เพื่อสมานแผล โดยจะประเมินผลก่อนการทดสอบด้วยตัวอย่าง (เวลาชั่วโมงที่ 0 ชั่วโมง) และระหว่างการทดสอบ (เวลาชั่วโมงที่ 5, 15, 25 และ 35 ชั่วโมง) โดยผลการศึกษาคุณสมบัติการสมานแผลต่อเซลล์ปอดเพาะเลี้ยงเป็นส่วนหนึ่งของการทดสอบในหลอดทดลองเพื่อศึกษาฤทธิ์ที่ทำให้เนื้อเยื่อที่เกิดบาดแผลสามารถสมานปิดของสารสกัดช่อดอกกัญชาพันธุ์ไทย PTC0601 และ PTC0729 พบว่าสารสกัดช่อดอกกัญชาพันธุ์ไทย PTC0601 มีคุณสมบัติในการสมานแผลที่ดี ช่วยเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์ปอดเพาะเลี้ยง SV-80 ในขนาดความเข้มข้นที่ 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดช่อดอกกัญชาพันธุ์ไทย PTC0729 พบว่า สารสกัดความเข้มข้นที่ทดสอบทุกระดับไม่ส่งผลเหนี่ยวนำให้เซลล์ปอดเพาะเลี้ยง SV-80 มีประสิทธิภาพการเคลื่อนที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลเบื้องต้น และเป็นการศึกษาจากช่อดอกของกัญชาพันธุ์ไทย ซึ่งผลที่ได้ไม่สามารถ

ใช้อ้างอิงส่วนต่างๆ เช่น ใบ ราก ลำต้น และส่วนอื่นๆ ของกัญชาได้ หากผู้ที่จะนำมาใช้ ต้องได้รับคำแนะนำจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ เนื่องจากยังต้องมีการศึกษาข้อมูลเชิงลึกเรื่องความปลอดภัยของสารสกัดกัญชาเพิ่มเติมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ภายใต้รหัสโครงการที่ 47700 โครงการการศึกษาพิษวิทยาของกัญชา และได้รับการสนับสนุนครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์สำหรับการวิจัยจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และห้องปฏิบัติการจีโนมิกส์พืชในการปลูกเก็บตัวอย่างพืชกัญชา และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพิษวิทยา สถาบันวิจัยสมุนไพร ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. ปารยะ อาศนะเสน. เป็นหวัดหรือมีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน...ต้องกินยาแก้ไอเสมหะไหม. [ออนไลน์]. 2557; [สืบค้น 16 มิ.ย. 2564]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.si.mahidol.ac.th/siriraj_online/thai_version/Health_detail.asp?id=1137.
2. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 Coronavirus disease 2019 (COVID-19). [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 16 มิ.ย. 2564]; [42 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://ddc.moph.go.th/viral-pneumonia/file/g_km/handout001_12032020.pdf.
3. Liu P, Xu M, Cao L, Su L, Lu L, Dong N, et al. Impact of COVID-19 pandemic on the prevalence of respiratory viruses in children with lower respiratory tract infections in China. Virol J 2021; 18: 159. (7 pages).
4. Cannabis sativa L. In: The Plant List. Version 1.1. published on the internet. [online]. 2013; [cited 2021 Jun 16]; [3 screens]. Available from: URL: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2696480>.
5. Moreau M, Ibeh U, Decosmo K, Bih N, Yasmin-Karim S, Toyang N, et al. Flavonoid derivative of Cannabis demonstrates therapeutic potential in preclinical models of metastatic pancreatic cancer. Front Oncol 2019; 9: 660. (9 pages).
6. Daris B, Verboten MT, Knez Z, Ferk P. Cannabinoids in cancer treatment: therapeutic potential and legislation. Bosn J Basic Med Sci 2019; 19(1): 14-23.
7. Chakravarti B, Ravi J, Ganju RK. Cannabinoids as therapeutic agents in cancer: current status and future implications. Oncotarget 2014; 5(15): 5852-72.
8. Velasco G, Sanchez C, Guzman M. Endocannabinoids and cancer. Handb Exp Pharmacol 2015; 231: 449-72.
9. Russo EB. Cannabis therapeutics and the future of neurology. Front Integr Neurosci 2018; 12: 51. (11 pages).
10. เสี่ยง พงษ์บุรุษอด. ไม้เทศเมืองไทย สรรพคุณของยาเทศและยาไทย. กรุงเทพฯ: เกษมบรรณกิจ; 2522.
11. วุฒิ วุฒิธรรมเวช. ย่อเภสัชกรรมไทยและสรรพคุณสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: ศิลป์สยามบรรณภัณฑ์และการพิมพ์; 2552.

12. Kinghorn AD, Falk H, Gibbons S, Kobayashi J, editors. Phytocannabinoids: unraveling the complex chemistry and pharmacology of *Cannabis sativa*, volume 103. Cham, Switzerland: Springer International Publishing; 2017.
13. Chandra S, Lata H, ElSohly MA, editors. *Cannabis sativa* L. – botany and biotechnology. Cham, Switzerland: Springer International Publishing; 2017.
14. Andre CM, Hausman JF, Guerriero G. *Cannabis sativa*: the plant of the thousand and one molecules. Front Plant Sci 2016; 7: 19. (17 pages).
15. Pertwee RG. The diverse CB₁ and CB₂ receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. Br J Pharmacol 2008; 153(2): 199–215.
16. Nguyen DT, Orgill DP, Murphy GF. The pathophysiologic basis for wound healing and cutaneous regeneration. In: Orgill D, Blanco C, editors. Biomaterial for treating skin loss. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2009. p. 25–57.
17. กมลวรรณ เจนวิถีสุข. กระบวนการหายของแผลและหลักการรักษา. ศรีนครินทร์เวชสาร 2556; 28(4): 10–17.
18. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. Nat Protoc 2007; 2(2): 329–33.
19. กนกอร สมบัติ, อีรทัตน์ สุดสาย.ฤทธิ์สมานแผลของสารสกัดจากใบพลู. ใน: เอกสารการประชุมนำเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 12 ปีการศึกษา 2560. วันที่ 17 สิงหาคม 2560. ปทุมธานี: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยรังสิต; 2560. หน้า 1612–1621.
20. Byun WS, Bae ES, Cui J, Park HJ, Oh DC, Lee SK. Antitumor activity of pulvomycin via targeting activated-STAT3 signaling in docetaxel-Resistant triple-negative breast cancer cells. Biomedicines 2021; 9(4): 436. (16 pages).
21. Balekar N, Katkam NG, Nakpheng T, Jehtae K, Srichana T. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. J Ethnopharmacol 2012; 141(3): 817– 24.
22. พระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ ฉบับที่ 7 (พ.ศ. 2562). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 136 ตอนที่ 19 ก (วันที่ 18 กุมภาพันธ์ 2562). หน้า 1.
23. Miller HP, Bonawitz SC, Ostrovsky O. The effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) on inflammation: a review. Cell Immunol 2020; 352. 104111. (3 pages).
24. Klein M, de Quadros De Bortoli J, Guimarães FS, Salum FG, Cherubini K, de Figueiredo MAZ. Effects of cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, on oral wound healing process in rats: clinical and histological evaluation. Phytother Res 2018; 32(11): 2275–81.

Wound Healing Effect of Thai Cannabis Female Inflorescence Extracts on Lung Cell Lines

**Pornchai Sincharoenpokai Tiyanee Sahad Praw Suppajariyawat Sarayut Radapong
Sekrachatakorn Buabao Phichet Banyati Siriwan Chaisomboonphan and Nathaphat Harnkit**
Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Upper respiratory tract infections are common public health problems. These include the infection from the coronavirus 2019 (COVID-19). These patients may develop complications in the lower respiratory tract leading to pneumonia resulting in lung cell damage. The aim of this research was to study the healing effect of Thai strain cannabis (*Cannabis sativa* L.) female inflorescence extracts in lung cell lines (SV-80) by *in vitro* scratch assay. The results showed that the extract PTC0601 exhibited potent wound healing properties, increasing the stimulation activities, cell proliferation and migration at a concentration of 2.5 µg/ml. The extract PTC0729 did not induce SV-80 cells at various concentrations when compared to control group. Therefore, it was preliminarily information for Thai cannabis that has potential to heal wounds in lung cell lines. This herb can be developed as a health product for patients with respiratory viral infections. However, the use of cannabis extracts to develop health products should take consideration proportion of active ingredients. In addition, the development of a health product should further be tested the wound healing in epithelial lung cells including the study of anti-inflammatory activity and safety studies of cannabis female inflorescence extracts as information to support development of further health products.

Keywords: Thai strain cannabis (*Cannabis sativa* L.) female inflorescence extracts, Lung cell lines (SV-80), Wound healing

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ

พราว ศุภจริยาวัตร¹ ศราวุธ ระดาพงษ์¹ ตัญญาณี สาหิต¹ ณัฐภัทร หาญกิจ¹ กัญชริญา ภารเชอร์¹ ปฎิภาณ พรหมพราย¹
พิเชฐ บัญญัติ¹ ศิริวรรณ ชัยสมบุญพันธ์¹ ณัฐพงษ์ วิชัย² และพรชัย สินเจริญโกโคย¹

¹กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

²มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

บทคัดย่อ กัญชา (*Cannabis sativa* L.) เป็นพืชที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากทั้งในทางการแพทย์และทางเศรษฐกิจ เนื่องจากมีการกล่าวถึงสรรพคุณในการรักษาโรค และสามารถผลักดันเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยได้ ในปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์ของกัญชาในทางการแพทย์โดยที่ไม่ทราบข้อมูลเกี่ยวกับประสิทธิภาพและผลข้างเคียงทั้งระยะสั้นและระยะยาว รวมถึงข้อมูลด้านพิษวิทยาและความปลอดภัยมีอยู่น้อย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพิษของสารสกัดช่อดอกกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ ได้แก่ PTC0601 (THC:CBD=2:1), PTC0602 (THC:CBD=10:1) และ PTC0729 (THC:CBD=1:6) ที่สกัดด้วยวิธีของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical Fluid Extraction) วิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี HPLC ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดปกติ ได้แก่ เซลล์ปอด (SV-80), เซลล์ตับ (Chang-liver) และเซลล์ไต (HEK-293) โดยใช้วิธี MTT assay และเซลล์เอ็มบริโอหนู (BALB/c 3T3) โดยใช้วิธี Neutral red uptake assay เพื่อกำหนดขนาดและนำเริ่มต้นสำหรับทดสอบพิษเฉียบพลัน ผลการทดลองพบว่าสารสกัดช่อดอกกัญชาไทย 3 พันธุ์ มีค่ายับยั้งการเจริญเติบโตร้อยละ 50 (IC_{50}) ต่อเซลล์ไต (HEK-293) ต่ำที่สุด (มีความเป็นพิษสูงที่สุด) รองลงมาเซลล์ตับ และเซลล์ปอด ส่วนในเซลล์เอ็มบริโอหนู พบว่าสารสกัดกัญชาพันธุ์ PTC0602 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ BALB/c 3T3 สูงที่สุด รองลงมาคือ PTC0601 และ PTC0729 ขนาดและนำเริ่มต้นสำหรับทดสอบพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง เท่ากับ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม งานวิจัยนี้ใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเตือนภัยผู้ป่วยที่ใช้ช่อดอกของกัญชาในการรักษาทางการแพทย์ ดังนั้นควรมีการศึกษาในเรื่องความปลอดภัยต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดอื่นๆ หรือในสัตว์ทดลอง และการนำกัญชาไปใช้เพิ่มเติมต่อไป

คำสำคัญ: สารสกัดกัญชา, พิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง, กัญชาพันธุ์ไทย, วิธี MTT, วิธี Neutral red uptake

Corresponding author E-mail: praw.s@dmssc.mail.go.th

Received: 15 July 2021

Revised: 23 August 2021

Accepted: 27 August 2021

บทนำ

กัญชา เป็นพืชเสพติดผิดกฎหมายในหลายประเทศและใช้ประโยชน์ในด้านสันตินาการเป็นหลัก แต่ในประเทศไทย ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ลงราชกิจจานุเบกษา มีผลบังคับใช้ตั้งแต่ 15 ธันวาคม 2563 ประชาชนสามารถใช้ประโยชน์จากส่วนของกัญชา กัญชงที่ไม่จัดเป็นยาเสพติด ได้แก่ เมล็ดกัญชง น้ำมันและสารสกัดจากเมล็ดกัญชง ใบที่ไม่ติดกับช่อดอก กิ่ง ก้าน ลำต้น เปลือก ราก รวมถึงสารสกัด CBD และกากที่เหลือจากการสกัดซึ่งต้องมีปริมาณ THC ไม่เกิน 0.2%⁽¹⁾ จากประกาศดังกล่าวเปรียบเสมือนเป็นการปลดล็อกพืชกัญชาบางส่วนออกจากบัญชียาเสพติดให้โทษ ทำให้เป็นที่สนใจของประชาชน ผู้ประกอบการ ส่งผลให้เกิดเป็น “ตลาดกัญชา” จากข้อมูลรายงานพบว่า ตลาดกัญชาที่ถูกกฎหมายมีมูลค่ากว่า 1.75 หมื่นล้านดอลลาร์สหรัฐ หรือ 5 แสนล้านบาท และเติบโตมากกว่า 17% โดยกัญชาในอุตสาหกรรมทางการแพทย์และสุขภาพสร้างรายได้สูงกว่า 70% ของมูลค่าทั้งหมด ขณะที่รายงานของ The Global Cannabis Report โดย Prohibition Partners คาดการณ์ว่า มูลค่าตลาดกัญชาทั่วโลกในปี 2567 จะมีแนวโน้มเติบโตอย่างต่อเนื่องหรือคิดเป็นมูลค่ากว่า 1.03 แสนล้านดอลลาร์สหรัฐ แบ่งเป็น ตลาดกัญชาเพื่อการแพทย์ 60% และอีก 40% เป็นตลาดกัญชาเพื่อการสันตินาการ สำหรับประเทศไทย คาดการณ์ว่าตลาดกัญชาจะเติบโตเป็น 661 ล้านดอลลาร์สหรัฐ หรือกว่า 2.1 หมื่นล้านบาท ภายในปี 2567 ซึ่งขณะนี้รัฐบาลได้มีนโยบายส่งเสริมและผลักดันให้กัญชาและกัญชงเป็น Product Champion ได้แก่ ยาแผนไทยผลิตภัณฑ์สุขภาพ และการท่องเที่ยวเชิงสุขภาพ ที่สามารถสร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจได้⁽²⁾ ในส่วนของผู้ที่สามารถนำส่วนของกัญชาไปใช้ประโยชน์ได้นั้น ไม่ได้มีเพียงผู้ประกอบการเท่านั้นที่สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ แต่ประชาชนทั่วไปก็สามารถใช้ประโยชน์ได้ เช่น การนำไปประกอบอาหารในครัวเรือน หรือประกอบอาหารและเครื่องดื่มเพื่อขายในร้านอาหาร แต่ต้องเป็นผลผลิตจากผู้ที่ได้รับอนุญาตปลูกที่ถูกต้องตามกฎหมาย สามารถระบุที่มาของส่วนกัญชาได้ การนำกัญชาหรือส่วนของกัญชามาใช้ประโยชน์ จึงต้องมีข้อมูลด้านสรรพคุณและความปลอดภัยมารองรับเพื่อให้ประชาชนใช้พืชชนิดนี้ได้อย่างมั่นใจ

กัญชาเป็นพืชในวงศ์ Cannabaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Cannabis sativa* L. Subsp. indica (Lam.)⁽³⁾ มีชื่อเรียกอื่นว่า กัญชาจีน (ทั่วไป), ปาง (เงี้ยว-แม่ฮ่องสอน), ยานอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน), คุณเช่า คุณเช่า (จีน), ตำหมา (จีนกลาง) เป็นต้น ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นกัญชา มีดังนี้ กัญชาเป็นไม้ล้มลุกปีเดียว ลำต้นตั้งตรง สูง 0.9-1.5 เมตร มีขนสีเขียวอมเทาและไม่ค่อยแตกสาขา ใบเดี่ยว รูปฝ่ามือ เรียงสลับ ขอบใบเว้าลึกจนถึงจุดโคนใบเป็น 5-7 แฉก แต่ละแฉกรูปยาวรี กว้าง 0.3-1.5 เซนติเมตร ยาว 6-10 เซนติเมตร โคนและปลายสอบ (oblanceolate leaf) ขอบจักฟันเลื่อย แผ่นใบด้านบนสีเขียวเข้มกว่าด้านล่าง ดอกแยกเพศต่างต้น ออกเป็นช่อกระจุกตามง่ามใบและปลายกิ่ง ช่อดอกและใบของต้นเพศผู้เรียงตัวกันห่าง ๆ ต่างจากต้นเพศเมียที่เรียงชิดกัน เกสรเพศผู้ 5 อัน ดอกเล็ก ดอกเพศเมียมีกลีบเลี้ยงหุ้ม ไม่มีกลีบดอก รังไข่อยู่เหนือวงกลีบ มี 1 ช่อ มีออวูล (ovule) 1 เม็ด ผลแบบผลแห้งเมล็ดล่อน เล็ก เรียบ สีน้ำตาล ยอดของต้นเพศเมียที่กำลังออกดอกเรียก กะหลี่กัญชา เมื่อดอกให้แห้งแล้วนิยมนำมาใช้สูบ^(4, 5) ปัจจุบันสารสำคัญในกัญชาถูกพบมากกว่า 545 ชนิด และในจำนวนนี้สารกว่า 100 ชนิด ที่ถูกระบุว่าเป็นไฟโตแคนนาบินอยด์ (phytocannabinoids) ซึ่งเป็นสารกลุ่มหลัก มีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายคลึงกันและเป็นสารออกฤทธิ์ที่พบในกัญชา⁽⁶⁾ สารสำคัญในกัญชาปัจจุบันแบ่งออกเป็นได้ 3 กลุ่มหลัก ๆ คือ สารแคนนาบินอยด์ (Cannabinoids) ซึ่งสารที่มีการกล่าวถึงค่อนข้างมาก คือ Tetrahydrocannabinol (THC) และ Cannabidiol (CBD) สารเทอร์ปีน (Terpenes) เป็นสารประกอบอะโรมาติก (Aromatic) เป็นสารที่ทำให้มีกลิ่นเฉพาะตัว ทำให้เราสามารถแยกพันธุ์กัญชาได้จากกลิ่น ซึ่งกลิ่นเหล่านี้ทำให้กัญชาแต่ละพันธุ์มีความโดดเด่น สารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ปัจจุบันมีการค้นพบ สารสำคัญในกัญชา ที่เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มากถึง 20 ชนิด เช่น Apigenin, Luteolin, Quercetin, Kaempferol, Cann-f lavin A, Cann-f lavin B และ β -sitosterol เป็นต้น⁽⁷⁾ และปัจจุบันสารกลุ่ม terpenes ได้รับความสนใจจากนักวิจัยเป็นอย่างมาก มีการศึกษาถึงสรรพคุณของสารกลุ่มนี้กันอย่างแพร่หลาย การออกฤทธิ์ที่มีผลของสาร

Terpenes ใด ๆ ที่อาจมีการเปลี่ยนแปลงการเข้าร่วมของสารประกอบอื่น ๆ ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า อองทูราจ เอฟเฟกต์ (entourage effect) หมายถึงการที่สารทั้งหมดในกัญชาซึ่งไม่ได้มีเพียงแค่สาร THC และ CBD สามารถส่งเสริมให้กัญชาออกฤทธิ์มีผลช่วยบำบัดรักษาโรคต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อทำความเข้าใจถึงผลกระทบของสาร terpenes ในแต่ละครั้งเมื่อใช้ร่วมกับสารอื่น⁽⁸⁾ เนื่องจากกลุ่มสาร terpenes เป็นสื่อกลางในการทำงานร่วมกันระหว่างร่างกายกับสาร cannabinoids ในการรักษา

การทดสอบความเป็นพิษโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์ปอด (SV-80) เซลล์ตับ (Chang-liver) เซลล์ไต (HEK-293) โดยใช้วิธีการทดสอบ MTT assay เป็นการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) โดยวัดความสามารถของ mitochondrial enzyme ที่เปลี่ยน tetrazolium salt (3-(4, 5-dimethyldiazol-2-yl)-2, 5 diphenyl tetrazolium bromide, MTT) ซึ่งมีสีเหลือง เปลี่ยนไปเป็น formazan product ที่มีสีม่วงจากระดับของสีจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ และเซลล์เอมบริโอหนูเมาส์ (BALB/c 3T3) ใช้วิธีทดสอบ Neutral red uptake assay เป็นการวัดความมีชีวิตของเซลล์ด้วยการแตกเซลล์ จากสีแดงของ Neutral red ซึ่งซึมผ่านเข้าไปใน lysosome โดย lysosome ของเซลล์มีชีวิตมีสถานะเป็นกรด ทำให้เกิด pH gradient ที่ให้ Neutral red ซึมผ่านเข้าไป และสะสมอยู่ใน lysosome ขณะที่เซลล์ตายจะไม่เกิดกิจกรรมนี้⁽⁹⁾ ซึ่งการศึกษาพิษของสมุนไพรในเซลล์เพาะเลี้ยงนับว่าเป็นการศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลความปลอดภัยของสมุนไพรเบื้องต้นที่สามารถนำไปใช้คุ้มครองผู้บริโภคและสามารถนำไปวางแผนการวิจัยพิษวิทยาในสัตว์ทดลองเพื่อให้สอดคล้องกับหลัก 3Rs นอกจากนี้วิธีการทดสอบดังที่กล่าวข้างต้น ดำเนินการทดสอบตาม test guideline ที่เป็นมาตรฐาน ซึ่งยกระดับผลงานให้มีความน่าเชื่อถือทางวิชาการ อีกทั้งผลการทดสอบยังเป็นที่ยอมรับทั้งในและต่างประเทศ เป็นการลดการกีดกันทางการค้าได้ด้วย ในปัจจุบันพบว่ารายงานข้อมูลการศึกษาทางพิษวิทยาของกัญชาพันธุ์ไทยยังไม่ชัดเจนและยังไม่สามารถสรุปได้ว่ากัญชามีความปลอดภัยจริงหรือไม่ ประกอบกับข้อมูลการศึกษาพิษวิทยาของกัญชาในปัจจุบันเป็นข้อมูลของกัญชาที่มีพันธุ์เจริญเติบโตในต่างประเทศ ส่วนกัญชาพันธุ์ไทยมีข้อมูลไม่เพียงพอ จึงมีความจำเป็นต้องมีการศึกษาข้อมูลทางพิษวิทยาของพันธุ์กัญชาในประเทศไทยเพื่อสนับสนุนการพัฒนาเป็นยารักษาโรคหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพอื่น ๆ ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ

ตัวอย่างสมุนไพรช่อดอกเพศเมียกัญชาไทย 3 พันธุ์ เก็บจากโรงเรือนปลูกของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หนังสือสำคัญผลิตซึ่งยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ที่ 90/2564 (ปลูก) โดยให้รหัสตัวอย่าง PTC0601 (พันธุ์ที่มี THC:CBD เท่ากับ 2:1) รหัสตัวอย่าง PTC0602 (พันธุ์ที่มี THC:CBD เท่ากับ 10:1) และรหัสตัวอย่าง PTC0729 (พันธุ์ที่มี THC:CBD เท่ากับ 1:6)

ขั้นตอนการสกัดช่อดอกกัญชา

นำตัวอย่างช่อดอกเพศเมีย PTC0601 จำนวน 132 กรัม, PTC0602 126 กรัม และ PTC0729 100 กรัม บดหยาบ ได้ปริมาณสารสกัด 10.92 กรัม, 8.95 กรัม และ 7.07 กรัม คิดเป็น %yield เท่ากับ 8.27, 7.10 และ 7.07% ตามลำดับ สกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical Fluid Extraction) โดยใช้เครื่องสกัดรุ่น Spe-ed SFE ของบริษัท Applied Separations ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้แรงดัน 250 bar อุณหภูมิของตู้อบ (oven) 40 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ปริมาณ THC และ CBD ในสารสกัด ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น LC-40D ยี่ห้อ Shimadzu Japan โดยนำสารสกัด 20 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วย methanol : chloroform 9:1 ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้น ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร กรองด้วย nylon syringe filter 0.45 micron

เซลล์เพาะเลี้ยงและอาหารเลี้ยงเซลล์

เซลล์ปอด (SV-80), เซลล์ตับ (Chang-liver, Hela derivative) และ เซลล์ไต (HEK-293) ซื้อจาก บริษัท CLS Cell line service GmbH ประเทศเยอรมนี เซลล์ SV-80 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ส่วนเซลล์ Chang-liver และ HEK-293 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Eagle's minimal essential medium (EMEM) ที่มี 2mM L-Glutamine, 0.1 mM Non-essential amino acid, 1 mM Sodium pyruvate และ Fetal bovine serum ร้อยละ 10 เซลล์เอ็มบริโอหนูไมซ์ (BALB/c 3T3 clone A31) ซื้อจาก European Collection of Cell Cultures ประเทศ สหราชอาณาจักร เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) และร้อยละ 10 New born calf serum บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 90 ± 10 และความเข้มข้นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5.0 ± 1.0

ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง SV-80, Chang-liver และ HEK-293 ด้วยวิธี MTT assay

เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม โดยใช้เซลล์เริ่มต้น 5,000 เซลล์ต่อหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารสกัดกัญชาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ระดับความเข้มข้นต่ำซึ่งไม่มีผลทำลายเซลล์จนถึงระดับความเข้มข้นสูงซึ่งมีผลทำลายเซลล์มากกว่าร้อยละ 90 จำนวน 8 ระดับความเข้มข้น (0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.50, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เมื่อครบเวลาบ่มเลี้ยงเซลล์เปิดอาหารออกจากงานเพาะเลี้ยง จากนั้นเปิดสารสกัดกัญชาทั้ง 8 ระดับความเข้มข้นที่เตรียมไว้แล้ว ลงในงานเพาะเลี้ยงที่มีเซลล์ โดยเติมหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ล้างด้วย Phosphate Buffered Saline (PBS) จำนวน 1 ครั้ง เติมน้ำ MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มงานเพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ปิดเตาสารละลาย MTT ออกให้เหลือเฉพาะผลึก Formazan (ผลึกสีม่วง) เติมน้ำ DMSO (Dimethyl sulfoxide) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมเพื่อละลายผลึก Formazan เขย่างานเพาะเลี้ยงแนวระนาบประมาณ 1 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร คำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมอาหารเลี้ยงเซลล์เจือจางสารทดสอบ (Vehicle control)

ศึกษาความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด BALB/c 3T3 ด้วยวิธี Neutral red uptake อ้างอิงวิธีตาม OECD Test Guideline 129⁽¹⁰⁾

เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม โดยใช้เซลล์เริ่มต้น 5,000 เซลล์ต่อหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารสกัดกัญชาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ระดับความเข้มข้นต่ำซึ่งไม่มีผลทำลายเซลล์จนถึงระดับความเข้มข้นสูงซึ่งมีผลทำลายเซลล์มากกว่าร้อยละ 90 จำนวน 8 ระดับความเข้มข้น (0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.50, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เมื่อครบเวลาบ่มเลี้ยงเซลล์เปิดอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากงานเพาะเลี้ยง จากนั้นเปิดสารสกัดกัญชาทั้ง 8 ระดับความเข้มข้นที่เตรียมไว้แล้ว ลงในงานเพาะเลี้ยงที่มีเซลล์ โดยเติมหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มเปิดเตาสารละลายออกจากทุกหลุม ล้างด้วย $1 \times$ PBS 1 ครั้ง เติมน้ำละลาย Neutral red ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มต่อเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ปิดเตาสารละลาย Neutral red ออกจากทุกหลุมและล้างสีด้วยสารละลาย $1 \times$ PBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมน้ำ Neutral red destain solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม เขย่า

งานเพาะเลี้ยงแวนระนาบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) กับกลุ่มควบคุมอาหารเลี้ยงเซลล์เจือจางสารทดสอบ (Vehicle control) คำนวณหาค่า LD₅₀ (50% lethal dose) หมายถึง ปริมาณของสารเคมี/ตัวอย่างที่ให้กับสัตว์ทดลองทั้งหมดเพียงครั้งเดียว แล้วทำให้กลุ่มของสัตว์ทดลองร้อยละ 50 (ครึ่งหนึ่ง) ตายลง LD₅₀ พิจารณาปริมาณที่ใช้ในสัตว์ทดลอง จากความสัมพันธ์ IC₅₀-LD₅₀ relationship ด้วยสมการ $\log LD_{50} \text{ (mg/kg)} = 0.372 \log IC_{50} \text{ (}\mu\text{g/mL)} + 2.024$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดช่อดอกเพศเมียกัญชาไทย 3 พันธุ์ ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง 4 ชนิด ด้วยวิธี MTT assay และวิธี Neutral red uptake assay โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n = 3) ใช้สถิติ One-way ANOVA วิธี Tukey's multiple comparisons test โดยโปรแกรม GraphPad Prism version 9.0.0 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผล

ผลการสกัดช่อดอกกัญชา

สารสกัดจากช่อดอกเพศเมียของกัญชาด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical Fluid Extraction) ของกัญชาไทย 3 พันธุ์ ได้สารสกัดที่มีลักษณะเป็นของกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semisolid) สีเหลืองน้ำตาล จากการวิเคราะห์ตัวอย่างปริมาณกลุ่ม cannabinoids ได้ปริมาณสารสำคัญ THC และ CBD ดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงสัดส่วนปริมาณ THC และ CBD ในพันธุ์กัญชาไทย

รหัสตัวอย่างสารสกัดกัญชา	THC:CBD	Total THC (%)	Total CBD (%)
PTC0601	2:1	20.08	12.18
PTC0602	10:1	38.03	3.55
PTC0729	1:6	4.28	25.89

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง SV-80, Chang-liver และ HEK-293 ด้วยวิธี MTT assay

สารสกัดช่อดอกกัญชาไทย 3 พันธุ์ ได้แก่ PTC0601 PTC0602 และ PTC0729 มีค่ายับยั้งการเจริญเติบโต ร้อยละ 50 (IC₅₀) ต่อเซลล์โต (HEK-293) ต่ำที่สุด (มีความเป็นพิษสูงที่สุด) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อื่นๆ เท่ากับ 6.72 ± 0.72 , 7.47 ± 0.96 และ 6.63 ± 0.69 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในเซลล์ตับ (Chang-liver) ให้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 9.69 ± 1.47 , 9.04 ± 0.80 และ 9.47 ± 0.37 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งค่าสูงกว่าเซลล์โตเล็กน้อย ส่วนในเซลล์ปอด (SV-80) ให้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 20.08 ± 0.70 , 12.78 ± 0.61 และ 24.98 ± 3.58 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองเมื่อคำนวณผลโดยใช้สถิติ one-way ANOVA แสดงให้เห็นว่า สารสกัดกัญชาไทย 3 พันธุ์ PTC0601, PTC0602 และ PTC 06729 มีความเป็นพิษต่อเซลล์โต (HEK-293) สูงที่สุด รองลงมาคือเซลล์ตับและเซลล์ปอดตามลำดับ

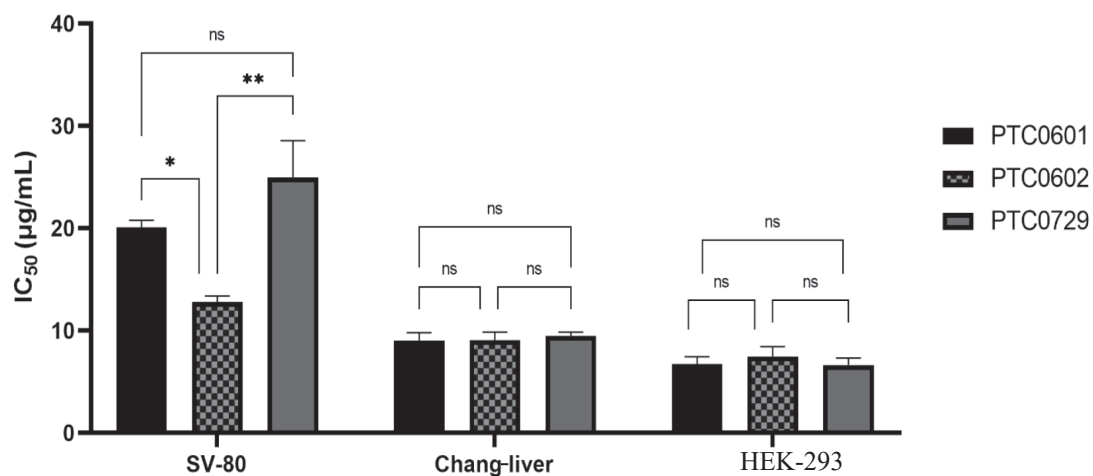
เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความเป็นพิษของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด โดยใช้สถิติ One-way ANOVA และ Tukey's multiple comparisons test แสดงในภาพที่ 1 สารสกัดกัญชาทั้ง 3 ชนิดมีพิษต่อเซลล์โต (HEK-293) สูงสุด (ให้ค่า IC₅₀ ต่ำสุด) และทั้ง 3 พันธุ์ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ในเซลล์โตและเซลล์ตับ (Chang-

liver) ส่วนในเซลล์ปอด (SV-80) มีความแตกต่างของค่า IC_{50} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างพันธุ์ PTC0601 และ PTC0602 และระหว่างพันธุ์ PTC0602 และ PTC0729 มีความแตกต่างของค่า IC_{50} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.005$) ภาพที่ 3A, 3B และ 3C แสดงถึงลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง SV-80, Chang-liver และ HEK-293 ตามลำดับ ทำการส่องดูลักษณะของเซลล์และถ่ายภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted Microscope) กำลังขยาย 20 เท่า

ตารางที่ 1 ค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของสารสกัดช่อดอกกัญชา PTC0601 และ PTC0729 และ Doxorubicin ในเซลล์ SV-80, Chang-liver และ HEK-293

ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง	IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)			
	PTC0601	PTC0602	PTC0729	Doxorubicin
SV-80	20.08 ± 0.70	12.78 ± 0.61	24.98 ± 3.58	0.44 ± 0.08
Chang-liver	9.69 ± 1.47	9.04 ± 0.80	9.47 ± 0.37	0.45 ± 0.01
HEK-293	6.72 ± 0.72	7.47 ± 0.96	6.63 ± 0.69	0.054 ± 0.03

ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 1 แสดงผลของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย PTC0601, PTC0602 และ PTC0729 ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง 3 ชนิด ค่า IC_{50} แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสารในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละชนิดโดยใช้สถิติ One-way ANOVA และ Tukey's multiple comparisons test (ns = not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$)

ศึกษาความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด BALB/c 3T3 ด้วยวิธี NRU assay ตาม OECD Test Guideline 129

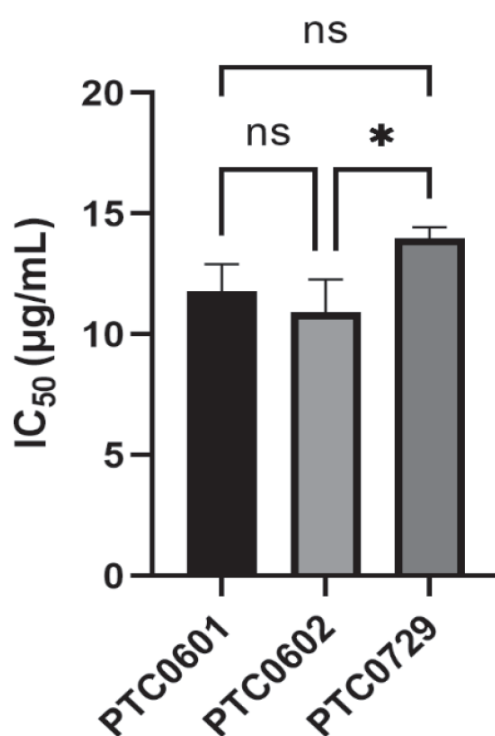
สารสกัดช่อดอกกัญชาไทย 3 พันธุ์ ได้แก่ PTC0601 PTC0602 และ PTC0729 มีค่ายับยั้งการเจริญเติบโต ร้อยละ 50 (IC_{50}) ในเซลล์ BALB/c 3T3 เท่ากับ 11.79 ± 1.12 , 10.90 ± 1.38 และ 13.99 ± 0.45 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ นำค่าที่ได้คำนวณหาค่าประมาณของค่า LD_{50} ได้เท่ากับ 256.68 ± 12.37 , 264.39 ± 9.46 และ 281.96 ± 3.39 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า สารสกัดกัญชาพันธุ์ PTC0602 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ BALB/c 3T3 สูงที่สุด รองลงมาคือ PTC0601 และ PTC0729 ตามลำดับ และขนาดแนะนำเริ่มต้นสำหรับทดสอบพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง เท่ากับ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความเป็นพิษของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด โดยใช้สถิติ One-way ANOVA และ Tukey's multiple comparisons test แสดงในภาพที่ 2 สารสกัดกัญชา PTC0601 และ PTC0602 ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) รวมถึง PTC0601 และ PTC0729 ก็ไม่แตกต่างกันเช่นเดียวกัน แต่ PTC0602 และ PTC0729 มีความแตกต่างของค่า IC_{50} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ภาพที่ 3D แสดงถึงลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง BALB/c 3T3 ทำการส่องดูลักษณะของเซลล์และถ่ายภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted Microscope) กำลังขยาย 20 เท่า

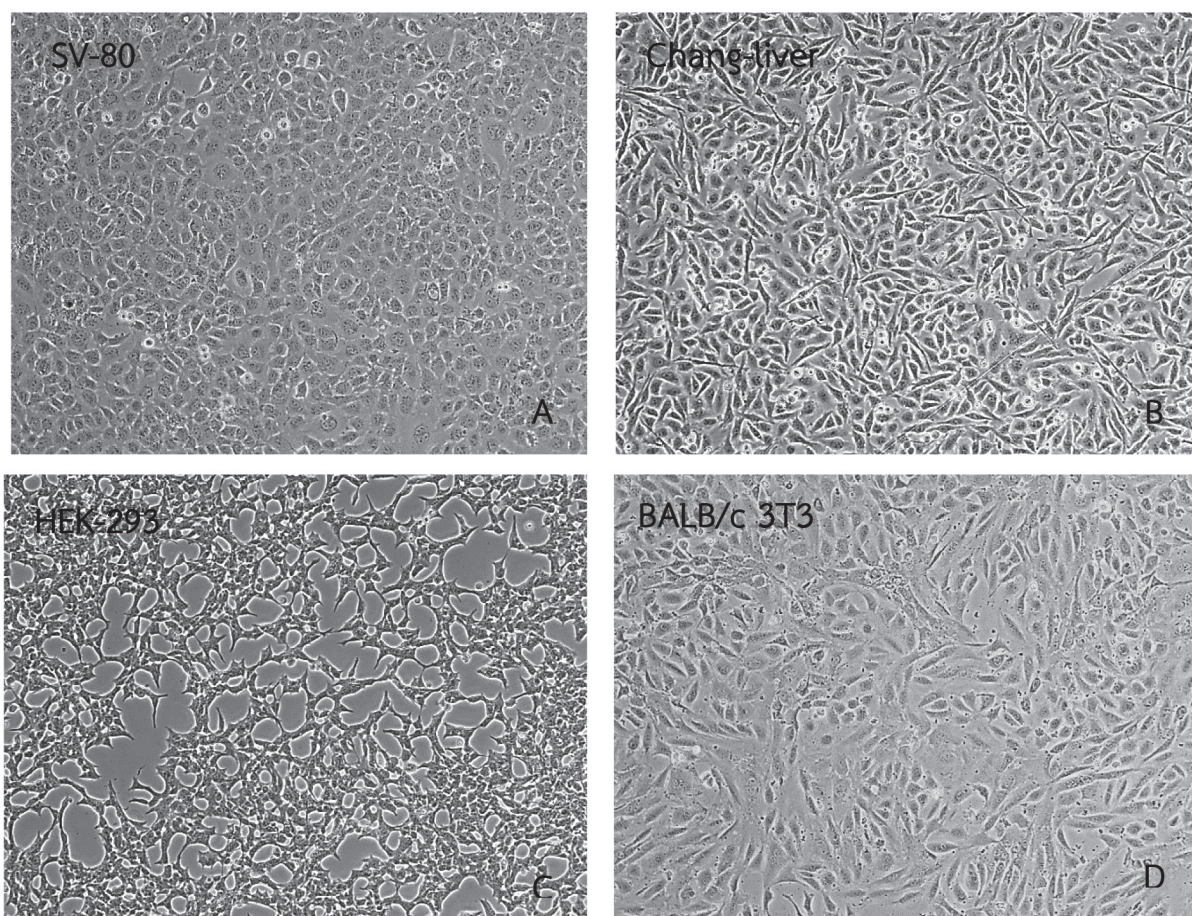
ตารางที่ 2 ค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร), LD_{50} (มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และขนาดเริ่มต้นทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดกัญชาไทย 3 พันธุ์

สารทดสอบ	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	LD_{50} (mg/kg)	ขนาดแนะนำเริ่มต้นสำหรับทดสอบพิษเฉียบพลัน (mg/kg)
PTC0601	11.79 ± 1.12	256.68 ± 12.37	300
PTC0602	10.90 ± 1.38	264.39 ± 9.46	300
PTC0729	13.99 ± 0.45	281.96 ± 3.39	300
Doxorubicin	0.16 ± 0.04		

ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 2 ผลของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย PTC0601, PTC0602 และ PTC0729 ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด BALB/c 3T3 ค่า IC_{50} แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสารในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด BALB/c 3T3 โดยใช้สถิติ One-way ANOVA และ Tukey's multiple comparisons test (ns = not significant, $*p < 0.05$)



ภาพที่ 3 ลักษณะเซลล์ SV-80(A), Chang-liver(B), HEK-293(C), และ BALB/c 3T3(D) ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับกำลังขยาย 20 เท่า

วิจารณ์

ปัจจุบันหลายประเทศมีการใช้พืชกัญชาอย่างเสรี สำหรับประเทศไทยมีการปลดล็อกส่วนประกอบพืชกัญชาเพียงบางส่วน ออกจากการเป็นยาเสพติดให้โทษ อย่างไรก็ตามการปลดล็อกดังกล่าวยังต้องมีการขออนุญาตจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และต้องปฏิบัติตามกฎระเบียบของกฎหมายของประเทศในการนำไปใช้ประโยชน์ เมื่อมีการเปิดเสรีกัญชา ทำให้เกิดความต้องการในการใช้กัญชามากยิ่งขึ้น จึงมีความกังวลเรื่องความปลอดภัยหรือผลข้างเคียงในการใช้กัญชา กัญชาเป็นพืชที่มีสารออกฤทธิ์ต่อร่างกายหลายชนิด ที่สำคัญคือสารแคนนาบินอยด์ ซึ่งส่งผลต่อร่างกายมนุษย์ในหลายด้าน โดยมีการนำมาใช้มากขึ้นแต่ยังขาดข้อมูลการศึกษาทางวิชาการที่น่าเชื่อถือ ที่สามารถนำมาใช้เพื่อการศึกษาวิจัยและเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ได้ จากการใช้กัญชาทางการแพทย์โดยที่ไม่ทราบประสิทธิภาพและผลข้างเคียงทั้งระยะสั้นและระยะยาว งานวิจัยเรื่องความปลอดภัยของกัญชาจึงเป็นงานเร่งด่วนที่ต้องดำเนินการ จากผลการทดลองพบว่า กัญชาไทย 3 พันธุ์ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ได้มากที่สุด ซึ่งมีข้อมูลจากหน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยกล่าวว่า ในร่างกายของมนุษย์ มีตัวรับสารเคมีซึ่งลักษณะโครงสร้างคล้ายสารออกฤทธิ์จากกัญชา เรียกว่า ตัวรับสารแคนนาบินอยด์ ตัวรับสารเหล่านี้พบมากในสมอง เส้นประสาท ทำให้เมื่อได้รับกัญชาเข้าไป มีฤทธิ์เด่นในการกดประสาท แต่ในขณะเดียวกันก็พบในอวัยวะอื่น ๆ รวมถึงไต ดังนั้นการได้รับสารเคมีจากกัญชา อาจส่งผลถึงไตได้ มีการศึกษาผลของสารเคมีจากกัญชาต่อการทำงานของไตพบว่ามีความเกี่ยวข้องกันทำให้เกิดการอักเสบและเกิดพังผืดในไต⁽¹¹⁾ โดยยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด ซึ่งเมื่อสังเกตค่ายับยั้งการเจริญเติบโตร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดกัญชาทั้ง 3 พันธุ์ต่อเซลล์ตับ พบว่าค่า IC_{50} ไม่ได้แตกต่างจากเซลล์ไตมากนัก

นั่นคือก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อตับได้ มีข้อมูลพบว่าสาร CBD ส่งผลให้ค่าเอนไซม์ตับสูงขึ้น⁽¹²⁾ สำหรับการศึกษาความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด BALB/c ด้วยวิธี NRU assay ตาม OECD Test Guideline 129 พบว่าขนาดแนะนำเริ่มต้นสำหรับทดสอบพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง เท่ากับ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งงานวิจัยของ Won Hyung Choi และคณะศึกษาพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดไฟโบรบลาสต์เอ็มบริโอหนู (NIH3T3) ของสาร CBD ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 40.78 ± 4.21 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร⁽¹³⁾ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่สารสกัดกัญชาไทย 3 พันธุ์ ให้ค่า IC_{50} ต่ำกว่า 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเมื่อพิจารณาขนาดของการเริ่มต้นที่จะทดสอบในสัตว์ทดลองถือว่าค่าค่อนข้างต่ำมาก ฉะนั้น ผลการทดสอบพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดปกติ ได้แก่ เซลล์ปอด เซลล์ตับ เซลล์ไต และเซลล์เอ็มบริโอหนู ของสารสกัดกัญชาไทย 3 พันธุ์ ซึ่งมีสัดส่วนของ THC และ CBD แตกต่างกัน ให้ผลความเป็นพิษกับเซลล์ทั้ง 4 ชนิด และจะสังเกตว่าปริมาณ THC และ CBD มีผลในการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง และอาจจะมีสารอื่นๆ ในกัญชาที่ออกฤทธิ์ร่วมอยู่ด้วย งานวิจัยของ Aranya และคณะ ศึกษาพิษของสารสกัดใบและเมล็ดกัญชง (เฮมพ์) ที่เก็บจาก จ.เชียงใหม่ จ.เชียงราย และ จ.ตาก ของประเทศไทย ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง human skin fibroblasts ด้วยวิธี SRB ผลการทดลองพบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นสูงขึ้นตั้งแต่ 0.0625–5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ค่า % cell viability จะลดลง ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ค่า %cell viability ของใบกัญชง (เฮมพ์) เท่ากับ 57.66 ± 6.49 และเมล็ดกัญชง (เฮมพ์) เท่ากับ 32.37 ± 4.30 ซึ่งจากงานวิจัยระบุว่าค่าความเข้มข้นที่ 0.0625–1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งดูจากค่า %viability มากกว่า 70% ซึ่งค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจะแตกต่างกันเนื่องมาจากองค์ประกอบของสารในสารสกัด⁽¹⁴⁾ งานวิจัยของ Martyna และคณะ ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัด *Cannabis sativa* L. ที่มี CBD สูงกว่า THC ต่อเซลล์ keratinocyte (HaCaT) และ fibroblast (Bj) ซึ่งทั้งสองชนิดเป็นเซลล์ผิวหนังชนิดปกติ ด้วยวิธี Alamar Blue, Neutral red uptake และ Lactate dehydrogenase (LDH) ผลการทดลองพบว่าไม่เกิดพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงกับทั้ง 2 เซลล์ที่ความเข้มข้น 1–1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจากการทดสอบต่อเซลล์ผิวหนังทั้ง 2 งานวิจัย จะพบว่าสารสกัด *Cannabis sativa* L. จะไม่เกิดพิษต่อเซลล์ผิวหนังในความเข้มข้นที่ทดสอบ⁽¹⁵⁾ แต่งานทดสอบของผู้วิจัยจะทดสอบที่เซลล์อวัยวะเป้าหมาย 3 เซลล์คือเซลล์ปอด เซลล์ตับ และเซลล์ไต เป็นการศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยงคนละชนิด ซึ่งกัญชาแต่ละพันธุ์ มีการเก็บในพื้นที่หรือในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน จะให้สารสำคัญและองค์ประกอบทางเคมีในพืชที่แตกต่างกัน งานวิจัยการทดสอบพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดปกติจะไม่นักวิจัยศึกษามากนัก ส่วนใหญ่มีการศึกษาในเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตาม หากจะนำสมุนไพรมาพัฒนาเป็นยาหรือมีการศึกษาในมนุษย์ จะต้องคำนึงถึงว่าสมุนไพรนั้นหากมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งแล้ว จะส่งผลต่อเซลล์ปกติในร่างกายมนุษย์ควบคู่กันไป ฉะนั้นข้อควรระมัดระวัง การนำกัญชาไปใช้ ผู้บริโภคที่มีโรคประจำตัวหรือมีการรับประทานยาแผนปัจจุบันหรือยาอื่นๆ ควรใช้กัญชาภายใต้คำแนะนำของแพทย์ ถึงแม้ว่าปัจจุบันยังไม่พบหลักฐานที่กล่าวถึงการใช้กัญชาสัมพันธ์กับการเกิดโรคไตวายเรื้อรัง โรคตับ โรคปอด ก็ควรเฝ้าระวังภาวะแทรกซ้อนจากการใช้กัญชา และงานวิจัยนี้ใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น สามารถนำผลไปอ้างอิงและใช้ในการวิจัยเชิงลึก เช่น การศึกษาพิษเรื้อรังในสัตว์ทดลอง การศึกษากลไกต่างๆ ในสัตว์ทดลอง รวมถึงเป็นข้อมูลในการเตือนภัยผู้ป่วยที่ใช้ช่อดอกของกัญชาในการรักษาทางการแพทย์ต่อไป

สรุป

การศึกษความเป็นพิษของสารสกัดกัญชาไทย 3 พันธุ์ ได้แก่ PTC0601 (THC:CBD โกล้เคียงกัน) PTC0602 (THC เด่น) และ PTC0729 (CBD เด่น) ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดปกติ 4 เซลล์ ได้แก่ เซลล์ปอด (SV-80), เซลล์ตับ (Chang-liver, Hela derivative) และ เซลล์ไต (HEK-293) พบว่า สารสกัดช่อดอกกัญชาไทย 3 พันธุ์ มีค่ายับยั้งการเจริญเติบโตร้อยละ 50 (IC_{50}) ต่อเซลล์ไต (HEK-293) ต่ำที่สุด นับว่ามีความเป็นพิษสูงที่สุด รองลงมาเซลล์ตับ และเซลล์ปอด ส่วนในเซลล์ BALB/c 3T3 พบว่าสารสกัดกัญชาพันธุ์ PTC0602 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ BALB/c 3T3 สูงที่สุด รองลงมาคือ PTC0601 และ PTC0729 ขนาดแนะนำเริ่มต้นสำหรับทดสอบ

พิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง เท่ากับ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งเมื่อพิจารณาจากผลการทดลอง การใช้กัญชาที่มีความเป็นพิษเกิดขึ้นใน 3 เซลล์หลักคือ เซลล์ปอด เซลล์ตับ เซลล์ไต ฉะนั้นหากมีการนำกัญชาไปใช้ประโยชน์ ควรมีการศึกษาในเรื่องความปลอดภัยต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดอื่นๆ การทดสอบในสัตว์ทดลอง และการนำไปใช้เพิ่มเติมเพื่อค้นหาประโยชน์และผลข้างเคียงจากการใช้กัญชาในอนาคต และหากมีการนำไปใช้เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ ต้องอยู่ภายใต้คำแนะนำและคำปรึกษาของแพทย์เท่านั้น เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิจัยในช่อดอกกัญชา ซึ่งยังจัดเป็นยาเสพติด ดังนั้นผลการทดลองไม่ได้สะท้อนไปถึงการใช้ส่วนอื่นๆของกัญชา ซึ่งผู้วิจัยจะมีการศึกษาส่วนต่างๆของกัญชา เช่น ใบ ราก ฯลฯ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และห้องปฏิบัติการจีโนมิกส์พืช ในการเก็บตัวอย่างสมุนไพรกัญชา ภก. เสกสรรค์ บัวเบา ศูนย์ตรวจสอบและรับรองคุณภาพสมุนไพรในการควบคุมคุณภาพทางเคมีและแยกปริมาณสารสำคัญ THC และ CBD ของตัวอย่างกัญชา และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 (พ.ศ. 2563). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ ๒๕๐ ง (วันที่ 14 ธันวาคม 2563). หน้า 33.
2. กรุงเทพธุรกิจ. เตรียมลุย! เส้นทางกัญชาทางการแพทย์เพิ่มมูลค่าตลาดกัญชา. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 10 ก.ค. 2564]; [6 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.bangkokbiznews.com/news/detail/932483>.
3. Small E, Cronquist A. A practical and natural taxonomy for Cannabis. Taxon 1976; 25(4): 405–35.
4. ราชบัณฑิตยสถาน. หนังสืออนุกรมวิธานพืช อักษร ก. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: หจก. อรุณการพิมพ์; 2547.
5. Anderson LC. Leaf variation among Cannabis species from a controlled garden. Bot Mus Leaf Harv Univ 1980; 28(1): 61–9.
6. Hanus LO, Meyer SM, Munoz E, Taglialatela-Scafati O, Appendino G. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. Nat Prod Rep 2016; 33(12): 1357–92.
7. กัญชายาเสพติดหรือยารักษาโรค “สารสำคัญในกัญชามีอะไร”. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 10 ก.ค. 2564]; [13 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://masakigarden.com/สารสำคัญในกัญชา>.
8. องค์ความรู้เรื่องกัญชาเพื่อสุขภาพ. อะไรคือ“เทอร์ปีน (Terpene)” ในกัญชา. [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 7 ก.ค. 2564]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.cannhealth.org/content/4894/terpene>.
9. Ehara M, Noguchi T, Ueda K. Uptake of neutral red by the vacuoles of a green alga, *Micras-trias pinnatifida*. Plant Cell Physiol 1996; 37(6): 734–41.
10. OECD Series on Testing and Assessment No. 129. Guidance document on using the cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development; 2010.

11. ขนิษฐา เขียรกานนท์, ณัฐวุฒิ โตวนำชัย. แพทย์แนะไม่ให้ใช้ “กัญชา” ชะลอความเสื่อมของไต. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 13 ก.ค. 2564]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.bangkokbiznews.com/news/detail/930407>.
12. สมาคมประสาทวิทยาแห่งประเทศไทย. ความคิดเห็นต่อการนำกัญชามาใช้ประกอบการรักษาในโรกระบบประสาทสำหรับบุคลากรทางการแพทย์. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 13 ก.ค. 2564]; [5 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://neurothai.org/images/journal/2020/vol36_no2/07%20Various%20topics.pdf.
13. ChoiPark WHD, Baek SH, Chu JP, Kang MH, Mi YJ. Cannabidiol induces cytotoxicity and cell death via apoptotic pathway in cancer cell lines. *Biomolecules Therapeut* 2008; 16(2): 87-94.
14. Manosroi A, Chankhampan C, Kietthanakorn B, Ruksiriwanich W, Chaikul P, Boonpisuttinant K, et al. Pharmaceutical and cosmeceutical biological activities of hemp (*Cannabis sativa* L var. *sativa*) leaf and seed extracts. *Chiang Mai J Sci* 2019; 42(2): 180-95.
15. Zagórska-Dziok M, Bujak T, Ziemlewska A, Nizioł-Łukaszewska Z. Positive effect of *Cannabis sativa* L. herb extracts on skin cells and assessment of cannabinoid-based hydrogels properties. *Molecules* 2021; 26(4): 802. (20 pages).

Cytotoxicity of Thai *Cannabis sativa* L. Extract on Various Types of Normal Cells

Praw Suppajariyawat¹ Sarayut Radapong¹ Tiyanee Sahad¹ Nathaphat Harnkit¹
Kanchariya Phankhajan¹ Phatipan Primprai¹ Phichet Banyati¹ Siriwan Chaisomboonpan¹
Nuttapong Wichai² and Pornchai Sincharoenpokai¹

¹Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Mueang, Nonthaburi 11000

²Maharakham University, Amphoe Kantarawichai, Maharakham, 44150 Thailand

Abstract *Cannabis sativa* L. is an addictive plant that has been gained dramatic attention in Thailand. According to its medical and recreational properties, this plant can be developed as a drug or commercial product and boost the country medically and economically. However, the toxicity and safety data are still limited. This research aims to study the toxicity of female inflorescence extracts of Thai cannabis to normal cell lines. The three cannabis extracts, namely PTC0601 (THC: CBD=2:1), PTC0602 (THC: CBD=10:1) and PTC0729 (THC: CBD=1:6), were extracted using Supercritical Fluid Extraction and then quantitatively analyzed using HPLC. Cytotoxicity was investigated in normal cells, including lung (SV-80), liver (Chang-liver, Hela derivative) and kidney (HEK-293) cell lines using MTT assay. The in vitro dose estimation for acute toxicity using mouse embryo, BALB/c 3T3 cells, was also investigated using a neutral red uptake assay. The results showed that the extracts exhibited the highest cytotoxicity to kidney cells, followed by liver cells and lung cells, respectively. Neutral red uptake assay was found that PTC0602 posed the highest cytotoxicity, followed by PTC0601 and PTC0729, respectively. Which was 300 mg/kg, recommended as the initial dose for acute toxicity testing in animals. In conclusion, the three extracts exhibited toxicity to certain extents to normal cell lines and recommended at 300 mg/kg as the starting dose for in vivo acute toxicity testing. This finding could be used as preliminary toxicity and safety data. Moreover, more comprehensive research on other cultured cells or animal models should be investigated for Thai cannabis.

Keywords: *Cannabis sativa* extract, Cytotoxicity, Thai *Cannabis sativa*, MTT assay, Neutral red uptake assay

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัด จากช่อดอกกัญชาพันธุ์ไทย

พราว ศุภจริยาวัตร¹ สุจิต อุ่นกาศ¹ วิจิตรา สุดห่วง¹ ปิยา ศิริพันธ์ธนันท์¹ เสกชดกร บัวเบา¹ ศรายุทธ ระดาพงษ์¹
พิเชฐ บัญญัติ¹ ศิริวรรณ ชัยสมบุรณ์พันธ์¹ แพรว ศุภจริยาวัตร² และพรชัย สันเจริญโกโคย¹

¹กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

²กระทรวงยุติธรรม ถนนประชาธิปไตย บางซื่อ กรุงเทพมหานคร 10800

บทคัดย่อ กัญชา (*Cannabis sativa* L.) เป็นพืชเสพติดที่มีการอนุญาตให้ใช้ทางการแพทย์ และได้รับความสนใจจากภาครัฐและภาคเอกชน โดยมีการดำเนินการศึกษาวิจัยพัฒนาผลิตภัณฑ์ และการนำมาศึกษาในผู้ป่วยอย่างกว้างขวาง การนำกัญชามาใช้ในการรักษาควรคำนึงถึงขนาดและปริมาณของสารออกฤทธิ์ชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่ในสมุนไพร ซึ่งต้องมีคุณภาพและปริมาณเพียงพอต่อการรักษาโรค ตลอดจนการประเมินความปลอดภัยของสมุนไพรชนิดนั้น ปัจจุบันประเทศไทยได้มีประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ประชาชนสามารถใช้ประโยชน์จากส่วนของกัญชา กัญชงที่ไม่จัดเป็นยาเสพติด ยกเว้นช่อดอกซึ่งยังเป็นยาเสพติด ทำให้มีการผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพรกัญชามาใช้และบริโภคกันอย่างแพร่หลาย แต่ข้อมูลด้านพิษวิทยาและความปลอดภัยมีอยู่น้อย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดช่อดอกกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ ได้แก่ PTC0601, PTC0602 และ PTC0729 ที่สกัดด้วย Supercritical Fluid Extraction อ้างอิงจาก OECD test guideline 471 ใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* 4 สายพันธุ์ (TA98, TA100, TA1535, TA1537) และ *Escherichia coli* WP2 ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับ (50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท) ในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ผลการทดลองพบว่าสารสกัดช่อดอกกัญชาไทยทั้ง 3 พันธุ์ทุกขนาดทดสอบทุกสายพันธุ์ ทั้งในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ อย่างไรก็ตามควรมีการทดสอบยืนยันด้านความปลอดภัยในสัตว์ทดลองหรือกลไกเชิงลึกเพิ่มเติม เพื่อให้เกิดความมั่นใจในการนำมาบริโภคหรือทำผลิตภัณฑ์ต่อไป

คำสำคัญ: สารสกัดกัญชา, ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์, กัญชาพันธุ์ไทย

Corresponding author E-mail: praw.s@dmsc.mail.go.th

Received: 19 March 2021

Revised: 22 June 2021

Accepted: 15 July 2021

บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยมีการกล่าวถึงการนำพืชกัญชามาใช้ประโยชน์กันหลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นทางการแพทย์ และเชิงพาณิชย์ ซึ่งล่าสุดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ลงราชกิจจานุเบกษา มีผลบังคับใช้ตั้งแต่ 15 ธันวาคม 2563 ประชาชนสามารถใช้ประโยชน์จากส่วนของกัญชา กัญชงที่ไม่จัดเป็นยาเสพติด ได้แก่ เมล็ดกัญชง น้ำมันและสารสกัดจากเมล็ดกัญชง ใบที่ไม่ติดกับช่อดอก กิ่ง ก้าน ลำต้น เปลือก ราก รวมถึง สารสกัด Cannabidiol (CBD) และกากที่เหลือจากการสกัดซึ่งต้องมีปริมาณ Tetrahydrocannabinol (THC) ไม่เกิน 0.2%⁽¹⁾ เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ การศึกษาวิจัย และการผลิตผลิตภัณฑ์สุขภาพ จึงทำให้มีผู้ประกอบการจำนวนมากที่สนใจจะนำกัญชามาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ เครื่องสำอาง หรือทำเป็นอาหารเพื่อจำหน่ายและในปัจจุบัน มีการนำกัญชามาประกอบอาหารเพื่อจำหน่ายมากยิ่งขึ้น จึงได้มีประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 424 ซึ่ง นายอนุทิน ชาญวีรกูล รองนายกรัฐมนตรีและรัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุขลงนามเมื่อวันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2564 โดยมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2564 เป็นต้นไป ในเรื่องการนำใบกัญชามาทำอาหาร⁽²⁾ ส่วนเรื่องปริมาณ ของจำนวนใบยังไม่มีมีการกล่าวถึง ทางสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาจะมีคู่มือถึงข้อแนะนำในปริมาณ การใช้ต่อไป จะเห็นได้ว่าประเทศไทยพยายามผลักดันพืชกัญชาเป็นอย่างมาก สำหรับประเทศไทยถือเป็นประเทศแรก ในอาเซียนที่อนุญาตให้ใช้กัญชาอย่างถูกกฎหมายเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์และการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ จากรายงาน The Global Cannabis Report คาดว่ามูลค่าตลาดกัญชาทั่วโลกจะมีแนวโน้มเติบโตต่อเนื่องหรือคิดเป็น มูลค่ากว่า 103.9 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ⁽³⁾ และในปี 2567 จะมีตลาดกัญชาเพื่อการแพทย์มีสัดส่วนราวร้อยละ 60 ของมูลค่าตลาดกัญชาทั้งหมด⁽³⁾ นอกจากนี้ปัจจุบันเริ่มมีผู้ประกอบการกลุ่มอาหารและเครื่องดื่มรวมทั้งผลิตภัณฑ์ สุขภาพ สนใจที่จะใช้สารสกัดจากกัญชาเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์กลุ่มดังกล่าว ส่งผลให้คาดว่ามูลค่าตลาดกัญชาโลก จะเติบโตและกระจายไปในหลายธุรกิจมากขึ้น

กัญชาเป็นพืชในวงศ์ Cannabaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Cannabis sativa* L. Subsp. indica (Lam.)⁽⁴⁾ มีชื่อเรียกอื่นๆ กัญชาจีน (ทั่วไป), ปาง (เงี้ยว-แม่ฮ่องสอน), ยานอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน), คุณเช่า คุณเช่า (จีน), ตำหมา (จีนกลาง) เป็นต้น ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นกัญชามีดังนี้ กัญชาเป็นไม้ล้มลุกปีเดียว ลำต้นตั้งตรง สูง 0.9-1.5 เมตร มีขนสีเขียวอมเทาและไม่ค่อยแตกสาขา ใบเดี่ยว รูปฝ่ามือ เรียงสลับ ขอบใบเว้าลึกจนถึงจุดโคนใบ เป็น 5-7 แฉก แต่ละแฉกรูปยาวรี กว้าง 0.3-1.5 เซนติเมตร ยาว 6-10 เซนติเมตร โคนและปลายสอบ (oblanceolate leaf) ขอบจักฟันเลื่อย แผ่นใบด้านบนสีเขียวเข้มกว่าด้านล่าง ดอกแยกเพศต่างต้น ออกเป็นช่อกระจุกตามง่ามใบและปลายกิ่ง ช่อดอกและใบของต้นเพศผู้เรียงตัวกันห่างๆ ต่างจากต้นเพศเมียที่เรียงชิดกัน เกสรเพศผู้ 5 อัน ดอกเล็ก ดอกเพศเมีย มีกลีบเลี้ยงหุ้ม ไม่มีกลีบดอก รังไข่อยู่เหนือวงกลีบ มี 1 ช่อง มีออวุล 1 เม็ด ผลแบบผลแห้งเมล็ดล่อน เล็ก เรียบ สีน้ำตาล ยอดของต้นเพศเมียที่กำลังออกดอกเรียก กะหล่ำกัญชา เมื่อตากให้แห้งแล้วนิยมนำมาใช้สูบ^(5, 6) ปัจจุบัน สารสำคัญในกัญชาถูกพบมากกว่า 545 ชนิด และในจำนวนนี้สารกว่า 100 ชนิด ที่ถูกระบุว่าเป็นไฟโตแคนนาบินอยด์ (phytocannabinoids) ซึ่งเป็นสารกลุ่มหลัก มีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายคลึงกันและเป็นสารออกฤทธิ์ที่พบในกัญชา⁽⁷⁾ โครงสร้างทางเคมีของแคนนาบินอยด์ประกอบด้วยส่วนที่เป็นไขมัน (lipid) แอลคิลเรซอร์ซินอล (alkylresorcinol) เทอร์ปีน (terpene) และโมโนเทอร์ปีน (monoterpene)⁽⁸⁾ ซึ่งสารสำคัญของกัญชา 2 ชนิด ที่มีการกล่าวถึงค่อนข้างมาก คือ THC และ CBD

กัญชามีการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์มาอย่างยาวนาน จากฤทธิ์ต่อจิตประสาทที่เกิดขึ้น ในปัจจุบันมีข้อมูล ที่กล่าวถึงการใช้ประโยชน์จากกัญชาอย่างหลากหลาย เช่น รักษาเมะเร็ง⁽⁹⁾ เป็นยากันชัก⁽¹⁰⁾ ลดการปวด⁽¹¹⁾ ทั้งหมดเหล่านี้ ทำให้กัญชาเป็นกระแสในสังคมไทยเป็นอย่างมาก สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในกัญชาอาจยังมีประโยชน์ทางการแพทย์ อื่น ๆ เช่น ช่วยให้อาหาร เพื่อเพิ่มน้ำหนักในผู้ป่วย HIV/AIDS ลดความดันในลูกตาสำหรับโรคต้อหิน บำบัด ผู้ป่วยกลุ่มโรคระบบประสาท เช่น การช่วยให้นอนหลับ โรคพาร์กินสัน ความจำเสื่อม⁽¹²⁾ การนำกัญชามาใช้ในการ

รักษาควรต้องคำนึงถึงขนาดและปริมาณของสารออกฤทธิ์ชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่ในสมุนไพร ซึ่งต้องมีคุณภาพและปริมาณเพียงพอต่อการรักษาโรค ตลอดจนการประเมินความปลอดภัยของสมุนไพรชนิดนั้น และต้องมีงานวิจัยที่ได้รับการยอมรับในเรื่องของพิษวิทยา เพื่อความมั่นใจในการใช้สมุนไพรมากยิ่งขึ้น ซึ่งในปัจจุบันพบว่ารายงานข้อมูลการศึกษาทางพิษวิทยาของกัญชาไทยยังมีความไม่ชัดเจนและยังไม่สามารถสรุปได้ว่ากัญชามีความปลอดภัยจริงหรือไม่ ประกอบกับข้อมูลการศึกษาพิษวิทยาของกัญชาในปัจจุบันเป็นข้อมูลของกัญชาที่มีพันธุ์เจริญเติบโตในต่างประเทศ สำหรับกัญชาพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตและเพาะปลูกในประเทศไทยนั้นไม่มีข้อมูลการใช้เพื่อเป็นยารักษาโรคมานานกว่า 40 ปี จึงมีความจำเป็นต้องมีการศึกษาข้อมูลทางพิษวิทยาของพันธุ์กัญชาในประเทศไทยเพื่อสนับสนุนการพัฒนาเป็นยารักษาโรคหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพอื่น ๆ ต่อไป

การทดสอบการก่อกลายพันธุ์โดยใช้แบคทีเรีย อ้างอิงวิธีจากองค์การเพื่อความร่วมมือและการพัฒนาทางเศรษฐกิจ (The Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) หรือเรียกว่าวิธีทดสอบแอมส์ (Ames test) เป็นการทดสอบในหลอดทดลองเพื่อหาการก่อกลายพันธุ์ของสารเคมี สารสมุนไพร เครื่องมือทางการแพทย์ ฯลฯ โดยจะพิจารณาความผิดปกติในระดับ DNA หากตัวอย่างสามารถทำตัวเสมือนสารก่อกลายพันธุ์ (Mutagen) จะชี้ให้เห็นว่าตัวอย่างนั้นๆ อาจจะไม่ปลอดภัยที่จะใช้ในการบริโภค และมีแนวโน้มในการก่อโรคที่ผิดปกติทางพันธุกรรม หรือโรคมะเร็งได้⁽¹³⁾ การทดสอบแอมส์ เป็นหนึ่งการทดสอบในความต้องการของผู้ประกอบการที่จะขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร รวมถึงสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาที่เป็นหน่วยขึ้นทะเบียน ที่ต้องใช้ข้อมูลด้านความปลอดภัยในการประเมินผลิตภัณฑ์สุขภาพต่างๆ ดังนั้นผู้วิจัยจึงดำเนินการทดสอบนี้ตาม test guideline ที่เป็นมาตรฐาน เพื่อยกระดับให้ผลงานมีความน่าเชื่อถือทางวิชาการ อีกทั้งผลการทดสอบยังเป็นที่ยอมรับทั้งในและต่างประเทศ เป็นการลดการกีดกันทางการค้าได้ด้วย

วัสดุและวิธีการ

ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ

ตัวอย่างสมุนไพรช่อดอกเพศเมียกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ โดยให้รหัสตัวอย่าง PTC0601 (พันธุ์ที่มี THC : CBD เท่ากับ 2 : 1) รหัสตัวอย่าง PTC0602 (พันธุ์ที่มี THC : CBD เท่ากับ 10 : 1) และรหัสตัวอย่าง PTC0729 (พันธุ์ที่มี THC : CBD เท่ากับ 1 : 6)

ขั้นตอนการสกัดกัญชา

นำตัวอย่างช่อดอกเพศเมีย PTC0601 จำนวน 132 กรัม PTC0602 126 กรัม และ PTC0729 100 กรัม บดหยาบ ได้ปริมาณสารสกัด 10.92 กรัม 8.95 กรัม และ 7.07 กรัม คิดเป็น %yield เท่ากับ 8.27, 7.10 และ 7.07% ตามลำดับ สกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical Fluid Extraction) โดยใช้เครื่องสกัดรุ่น Speed SFE บริษัท Applied Separations ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้แรงดัน 250 bar อุณหภูมิของตูบ (oven) 40 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ปริมาณ THC และ CBD ในสารสกัด ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยนำสารสกัด 20 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วย methanol:chloroform 9:1 ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้น ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร กรองด้วย nylon syringe filter 0.45 micron

ขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติเชื้อ

ความต้องการการกระดามีโนฮิสทีดินสำหรับเชื้อ *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537

เตรียม Minimal Glucose Agar plate (MGA) เคลือบผิววุ้นด้วย 0.1 M L-histidine และ 1 mM D-biotin ดังนี้ เพลทที่ 1 ไม่เคลือบผิววุ้น เพลทที่ 2 เคลือบผิววุ้นด้วย 1 mM D-biotin ปริมาณ 100 ไมโครลิตร

เพลทที่ 3 เคลือบผิวด้วย 0.1 M L-histidine ปริมาณ 100 ไมโครลิตร เพลทที่ 4 เคลือบผิวด้วย 0.1 M L-histidine ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และเคลือบ 1 mM D-biotin ปริมาณ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำ single colony จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง ไปขีดลงบนวุ้น นำเพลทบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบคทีเรียที่มีการเจริญมากที่สุดคือ เพลทที่ 4 ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการทดลองเพื่อทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ได้

ความต้องการกรดอะมิโนทริปโตเฟนสำหรับเชื้อ *E. coli* WP2

เตรียม MGA ที่ผสม 0.05 mM tryptophan นำ single colony ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง ไปขีดลงบนวุ้น นำเพลทบ่มที่ตู้บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดสอบแบคทีเรียต้องการเจริญบนผิววุ้น ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการทดลองเพื่อทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ได้

การตรวจ rfa mutation และ R-factor

เตรียม MGA plate ผสม 0.1 M L-histidine ปริมาณ 100 ไมโครลิตร สำหรับเชื้อ *S. typhimurium* ส่วนเชื้อ *E. coli* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MGA ผสม 0.05 mM tryptophan และ bacterial culture ปริมาณ 300 ไมโครลิตร ลงใน top agar ที่มีส่วนผสมของ 0.5 mM histidine + 0.5 mM biotin ปริมาณ 2,000 ไมโครลิตร ส่วน *E. coli* 0.5 mM tryptophan ผสมเข้าไป จากนั้นเทส่วนผสมลงบน MGA plate ในการทดสอบ rfa mutation ทำได้โดย จุ่ม blank paper disc ที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงใน 0.1% crystal violet วางลงบน MGA เพลทที่หน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง และในการทดสอบ R-factor ทำได้โดยจุ่ม blank paper disc ใน 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ampicillin วางไว้ก้านหนึ่งของเพลท นำเพลทบ่มที่ตู้บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูผลการทดสอบโดยสังเกตรอบๆ paper disc ที่จุ่ม 0.1% crystal violet ถ้าเป็นเชื้อที่มี rfa จะเห็นโซนใส (clear zone) คือ ไม่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ประมาณ 12-14 มิลลิเมตร ส่วนผลการทดสอบ R-factor ในพันธุ์ TA98 และ TA100 มี R-factor ทำให้แบคทีเรียต้าน ampicillin ส่วนพันธุ์อื่นจะเกิด clear zone รอบๆ disc ampicillin

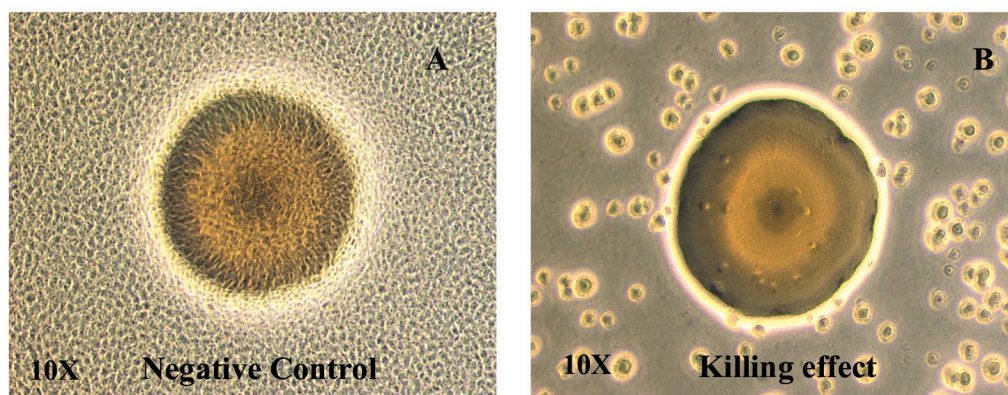
การตรวจความผิดปกติ *uvr* โดยใช้ mitomycin C

นำ mitomycin C ที่ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัม/disc วางลงใน MGA plate ที่ผสม histidine และ biotin สำหรับเชื้อ *S. typhimurium* และผสม tryptophan สำหรับเชื้อ *E. coli* ดูผลการทดสอบโดยสังเกตรอบๆ paper disc จะเห็นโซนใส (clear zone)

ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดช่อดอกกัญชาไทย 3 พันธุ์ (อ้างอิงวิธีจาก OECD TG471, 2020)⁽¹³⁾

การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ใช้วิธี plate incorporation method ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ นำสารสกัดช่อดอกกัญชา ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับความเข้มข้น 50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ผสมกับเชื้อที่ใช้ทดสอบ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (เชื้อที่ใช้คือ *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 และ *E. coli* WP2 บ่ม 8-12 ชั่วโมง และในกรณีที่มีการทดลองอยู่ในระบบไม่มีเอนไซม์กระตุ้น จะใช้ 0.1M Na₂PO₄-KCl buffer ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แทน S9 เอนไซม์ และสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ความเข้มข้นลงในแต่ละหลอด จากนั้นเติม top agar และเทลง MGA plate และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนการทดสอบ *E. coli* WP2 จะเติม tryptophan ลงไปแทน histidine/biotin เมื่อครบเวลา นำเพลทมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ inverted microscope ว่าเกิด killing effect บน background lawn หรือไม่ ดังแสดงในภาพที่ 1 นำเพลทมานับจำนวน

revertant colony การแปลผลคือ ถ้าสารที่ทดสอบมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์จะพบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสมุนไพรรที่ทดสอบกับจำนวน revertant colony เพิ่มขึ้นด้วย และพบว่ามียาอย่างน้อย 2 ความเข้มข้น ที่ให้จำนวนแบคทีเรียกลายพันธุ์มีจำนวนมากกว่าจำนวนที่กลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (negative control) ในขณะเดียวกันต้องมียาอย่างน้อย 1 ความเข้มข้นจุดหนึ่ง สามารถทำให้จำนวนแบคทีเรียกลายพันธุ์สูงเกิน 2 เท่า ของการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ จึงนับว่าสารที่นำมาทดสอบนี้เป็นสารก่อกลายพันธุ์



ภาพที่ 1 Background lawn ของเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA100 โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับที่กำลังขยาย 10X ภาพ 1A แสดง background lawn ที่ปกติจะเห็นภาพพื้นหลังเต็มไม่มีการตายของเชื้อ ภาพ 1B แสดงการเกิด Killing effect background lawn จะพบลักษณะของช่องว่างที่พื้นหลัง แสดงถึงการตายของเชื้อ

ผล

ผลการสกัดกัญชา

สารสกัดช่อดอกเพศเมียของกัญชาด้วย Supercritical Fluid Extraction ของกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ ได้สารสกัดที่มีลักษณะเป็นของกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semisolid) สีเหลืองน้ำตาล จากการวิเคราะห์ตัวอย่างปริมาณกลุ่ม cannabinoids ได้ปริมาณสารสำคัญ THC และ CBD ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงสัดส่วนปริมาณ THC และ CBD ในพันธุ์กัญชาไทย 3 พันธุ์

รหัสตัวอย่างสารสกัดกัญชา	THC : CBD	Total THC (%)	Total CBD (%)
PTC0601	2 : 1	20.08	12.18
PTC0602	10 : 1	38.03	3.55
PTC0729	1 : 6	4.28	25.89

ผลการทดสอบคุณสมบัติเชื้อ

ผลการตรวจคุณสมบัติเชื้อก่อนทำการทดสอบเอนม์พบว่า เชื้อ *S. typhimurium* 4 พันธุ์ และ *E. coli* 1 พันธุ์ มีคุณสมบัติครบถ้วนทุกการทดสอบ คือ ความต้องการกรดอะมิโนฮิสทีดีน/ทริปโตเฟน rfa mutation R-factor และความผิดปกติ *uvr* mutation โดยใช้ mitomycin C ดังแสดงในตารางที่ 2

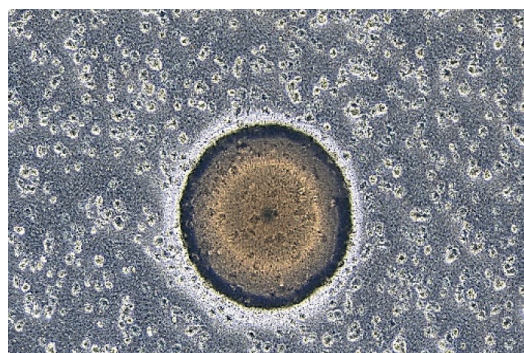
ตารางที่ 2 คุณสมบัติการทดสอบของ *S. typhimurium* และ *E. coli* ทั้ง 5 พันธุ์

สายพันธุ์	คุณสมบัติที่ทดสอบของ <i>S. typhimurium/E. coli</i>					<i>rfa</i> mutation	R-factor	<i>uvr</i> mutation
	ความต้องการกรดอะมิโนฮิสทีดิน/ทริปโตเฟน							
	Neg	His	Bi	His+bi	Tryp			
TA98	-	++	-	+++	N/A	เกิด clear zone	ไม่เกิด clear zone	เกิด clear zone
TA100	-	++	-	+++	N/A	เกิด clear zone	ไม่เกิด clear zone	เกิด clear zone
TA1535	-	++	-	+++	N/A	เกิด clear zone	เกิด clear zone	เกิด clear zone
TA1537	-	++	-	+++	N/A	เกิด clear zone	เกิด clear zone	เกิด clear zone
WP2	-	N/A	N/A	N/A	+++	เกิด clear zone	เกิด clear zone	เกิด clear zone

หมายเหตุ: เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อ
 เครื่องหมาย ++ หมายถึง เชื้อมีการเจริญแต่ไม่เท่ากับ +++
 เครื่องหมาย +++ หมายถึง เชื้อมีการเจริญมากที่สุด
 N/A หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดกล้วยาพันธุ์ไทย PTC0601 ในระบบไม่มีเอนไซม์ S9 (Without S9 enzyme)

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกล้วยาที่สกัดด้วย Supercritical Fluid Extraction ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ (*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 และ *E. coli* WP2) ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับ (50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท) ในระบบที่ไม่มีเอนไซม์ S9 ผลการทดลองพบว่าทุกพันธุ์และทุกขนาดทดสอบไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ โดยดูจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ไม่ได้มีจำนวนเพิ่มเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับ negative control แต่พบความผิดปกติของ background lawn ที่พันธุ์ TA1537 ที่ขนาดทดสอบ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ดังแสดงในภาพที่ 2 ส่วนพันธุ์อื่นๆ และทุกขนาดทดสอบ background lawn ปกติ ดังแสดงในตารางที่ 3



TA1537 5,000 µg/plate (-S9), 10x

ภาพที่ 2 Background lawn ของเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA 1537 ที่ขนาดทดสอบ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ในระบบไม่มีเอนไซม์ S9 ที่กำลังขยาย 10X โดยจะเห็นการเกิด Killing effect background lawn จะพบลักษณะของช่องว่างที่พื้นหลัง แสดงถึงการตายของเชื้อ

ตารางที่ 3 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Revertant colony) ของสารสกัดกัญชาพันธุ์ PTC0601 ต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ ในระบบไม่มีเอนไซม์ S9 (Without S9 enzyme)

สารสกัด	ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	โคโลนีกลายพันธุ์ (mean $\pm$ S.D.)									
		TA98	BL	TA100	BL	TA1535	BL	TA1537	BL	WP2	BL
สารสกัดกัญชา (PTC0601) (-S9)	Negative	24.6 $\pm$ 6.11	N	153.33 $\pm$ 10.07	N	9.00 $\pm$ 0.00	N	7.33 $\pm$ 4.93	N	52.33 $\pm$ 9.07	N
	5,000	25.67 $\pm$ 3.06	N	121.33 $\pm$ 15.57	N	7.33 $\pm$ 6.11	N	2.33 $\pm$ 0.58	K	32.33 $\pm$ 4.93	N
	1,500	20.00 $\pm$ 2.65	N	139.00 $\pm$ 11.53	N	7.33 $\pm$ 1.53	N	5.00 $\pm$ 2.00	N	49.00 $\pm$ 8.72	N
	500	17.33 $\pm$ 5.13	N	146.33 $\pm$ 5.03	N	9.00 $\pm$ 3.00	N	4.33 $\pm$ 2.52	N	50.67 $\pm$ 9.29	N
	150	21.33 $\pm$ 1.33	N	173.67 $\pm$ 6.11	N	10.00 $\pm$ 4.36	N	5.67 $\pm$ 2.31	N	59.33 $\pm$ 14.22	N
	50	20.67 $\pm$ 3.79	N	162.67 $\pm$ 10.26	N	7.00 $\pm$ 3.61	N	5.33 $\pm$ 1.53	N	46.33 $\pm$ 8.08	N

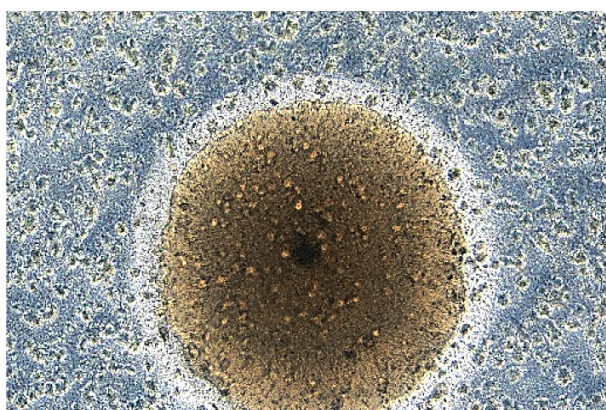
หมายเหตุ: BL หมายถึง Background lawn

N หมายถึง Normal background lawn

K หมายถึง Killing effect background lawn

ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย PTC0601 ในระบบมีเอนไซม์ กระตุ้น (With S9 enzyme)

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกัญชาที่สกัดด้วย Supercritical Fluid Extraction ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ (*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537) และ *E. coli* WP2 ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับ (50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท) ในระบบที่มีเอนไซม์ S9 ผลการทดลองพบว่าทุกพันธุ์และทุกขนาดทดสอบไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ โดยดูจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ไม่ได้มีจำนวนเพิ่มเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับ negative control แต่พบความผิดปกติของ background lawn ที่พันธุ์ TA1537 ที่ขนาดทดสอบ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ดังแสดงในภาพที่ 3 ส่วนพันธุ์อื่นๆ และทุกขนาดทดสอบ background lawn ปกติ ดังแสดงในตารางที่ 4



TA1537 5,000 ug/plate (+S9), 10x

ภาพที่ 3 Background lawn ของเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA 1537 ที่ขนาดทดสอบ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ในระบบที่มีเอนไซม์ S9 ที่กำลังขยาย 10X โดยจะเห็นการเกิด Killing effect background lawn จะพบลักษณะของช่องว่างที่พื้นหลัง แสดงถึงการตายของเชื้อ

ตารางที่ 4 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Revertant colony) ของสารสกัดกัญชาต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ ในระบบมีเอนไซม์ S9 (With S9 enzyme)

สารสกัด	ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	โคโลนีกลายพันธุ์ (mean $\pm$ S.D.)									
		TA98	BL	TA100	BL	TA1535	BL	TA1537	BL	WP2	BL
สารสกัดกัญชา (PTC0601) (+S9)	Negative	21.00 $\pm$ 6.00	N	159.00 $\pm$ 8.72	N	11.00 $\pm$ 1.00	N	10.00 $\pm$ 1.73	N	50.33 $\pm$ 5.77	N
	5,000	24.33 $\pm$ 7.09	N	158.00 $\pm$ 9.17	N	12.00 $\pm$ 2.65	N	9.00 $\pm$ 3.61	K	42.33 $\pm$ 4.73	N
	1,500	32.33 $\pm$ 1.15	N	163.00 $\pm$ 11.53	N	8.00 $\pm$ 3.00	N	7.33 $\pm$ 3.21	N	52.00 $\pm$ 5.00	N
	500	24.00 $\pm$ 2.65	N	170.33 $\pm$ 22.72	N	11.67 $\pm$ 4.04	N	5.67 $\pm$ 3.21	N	46.67 $\pm$ 3.51	N
	150	36.33 $\pm$ 1.15	N	158.00 $\pm$ 18.03	N	8.67 $\pm$ 0.58	N	11.33 $\pm$ 3.06	N	62.67 $\pm$ 7.77	N
	50	30.33 $\pm$ 8.50	N	153.00 $\pm$ 14.73	N	11.33 $\pm$ 4.04	N	12.67 $\pm$ 4.51	N	45.67 $\pm$ 7.64	N

หมายเหตุ: BL หมายถึง Background lawn
N หมายถึง Normal background lawn
K หมายถึง Killing effect background lawn

ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย PTC0602 ในระบบไม่มีเอนไซม์ S9 (Without S9 enzyme)

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกัญชาที่สกัดด้วย Supercritical Fluid Extraction ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ (*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537) และ *E. coli* WP2 ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับ (50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 ไมโครกรัม/เพลต) ในระบบที่ไม่มีเอนไซม์ S9 ผลการทดลองพบว่าทุกพันธุ์และทุกขนาดทดสอบไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ โดยดูจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ไม่ได้มีจำนวนเพิ่มเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับ negative control และไม่พบความผิดปกติของ background lawn ในทุกพันธุ์และทุกขนาดทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Revertant colony) ของสารสกัดกัญชาพันธุ์ PTC0602 ต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ ในระบบไม่มีเอนไซม์ S9 (Without S9 enzyme)

สารสกัด	ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	โคโลนีกลายพันธุ์ (mean $\pm$ S.D.)									
		TA98	BL	TA100	BL	TA1535	BL	TA1537	BL	WP2	BL
สารสกัดกัญชา (PTC0602) (-S9)	Negative	24.00 $\pm$ 1.73	N	153.67 $\pm$ 17.01	N	6.33 $\pm$ 2.52	N	3.67 $\pm$ 1.15	N	41.00 $\pm$ 13.11	N
	5,000	20.00 $\pm$ 5.00	N	140.00 $\pm$ 8.66	N	7.33 $\pm$ 4.04	N	5.00 $\pm$ 1.73	N	34.33 $\pm$ 5.03	N
	1,500	27.00 $\pm$ 1.73	N	132.00 $\pm$ 7.94	N	6.67 $\pm$ 3.79	N	2.33 $\pm$ 2.52	N	40.00 $\pm$ 1.00	N
	500	17.67 $\pm$ 1.53	N	152.00 $\pm$ 12.53	N	5.00 $\pm$ 2.52	N	5.67 $\pm$ 2.52	N	41.33 $\pm$ 9.49	N
	150	16.67 $\pm$ 5.77	N	161.67 $\pm$ 21.03	N	7.00 $\pm$ 3.81	N	3.00 $\pm$ 2.00	N	45.00 $\pm$ 7.21	N
	50	20.67 $\pm$ 3.06	N	170.67 $\pm$ 18.50	N	5.20 $\pm$ 1.73	N	4.00 $\pm$ 1.73	N	46.67 $\pm$ 5.86	N

หมายเหตุ: BL หมายถึง Background lawn
N หมายถึง Normal background lawn
K หมายถึง Killing effect background lawn

ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย PTC0602 ในระบบมีเอนไซม์ S9 (With S9 enzyme)

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกัญชาที่สกัดด้วย Supercritical Fluid Extraction ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ (*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537) และ *E. coli* WP2 ที่ขนาดทดสอบ

5 ระดับ (50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท) ในระบบที่ไม่มีเอนไซม์ S9 ผลการทดลองพบว่า ทุกพันธุ์และทุกขนาดทดสอบไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ โดยดูจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ไม่ได้มีจำนวนเพิ่มเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับ negative control และไม่พบความผิดปกติของ background lawn ในทุกพันธุ์และทุกขนาดทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Revertant colony) ของสารสกัดกัญชาพันธุ์ PTC0602 ต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ในระบบมีเอนไซม์ S9 (With S9 enzyme)

สารสกัด	ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	โคโลนีกลายพันธุ์ (mean $\pm$ S.D.)									
		TA98	BL	TA100	BL	TA1535	BL	TA1537	BL	WP2	BL
สารสกัดกัญชา (PTC0602) (+S9)	Negative	31.00 $\pm$ 6.08	N	18.00 $\pm$ 22.30	N	14.67 $\pm$ 2.02	N	10.00 $\pm$ 1.73	N	43.33 $\pm$ 10.69	N
	5,000	25.00 $\pm$ 3.61	N	164.00 $\pm$ 9.17	N	10.33 $\pm$ 1.43	N	11.67 $\pm$ 1.76	N	34.67 $\pm$ 6.43	N
	1,500	21.33 $\pm$ 4.16	N	175.67 $\pm$ 11.68	N	9.67 $\pm$ 4.07	N	5.00 $\pm$ 2.52	N	35.00 $\pm$ 1.00	N
	500	18.33 $\pm$ 4.73	N	136.33 $\pm$ 29.02	N	12.00 $\pm$ 4.00	N	6.33 $\pm$ 1.00	N	23.00 $\pm$ 2.65	N
	150	30.67 $\pm$ 8.74	N	180.67 $\pm$ 10.02	N	7.33 $\pm$ 1.59	N	10.00 $\pm$ 2.58	N	47.67 $\pm$ 7.37	N
	50	27.67 $\pm$ 9.50	N	169.67 $\pm$ 22.37	N	7.00 $\pm$ 1.53	N	6.00 $\pm$ 2.31	N	39.33 $\pm$ 3.06	N

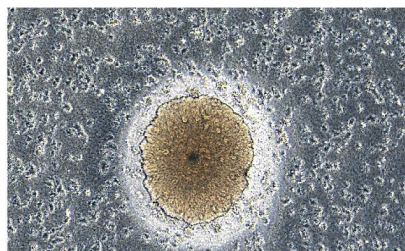
หมายเหตุ: BL หมายถึง Background lawn

N หมายถึง Normal background lawn

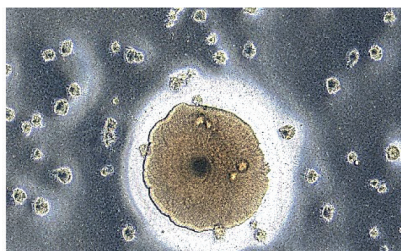
K หมายถึง Killing effect background lawn

ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย PTC0729 ในระบบไม่มีเอนไซม์ S9 (Without S9 enzyme)

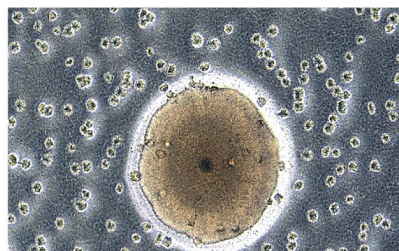
การศึกษากิจกรรมก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกัญชาที่สกัดด้วย Supercritical Fluid Extraction ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ (*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537) และ *E. coli* WP2 ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับ (50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท) ในระบบที่ไม่มีเอนไซม์ S9 ผลการทดลองพบว่า ทุกพันธุ์และทุกขนาดทดสอบไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ โดยดูจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ไม่ได้มีจำนวนเพิ่มเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับ negative control แต่พบความผิดปกติของ background lawn ที่พันธุ์ TA98, TA100 และ TA 1537 ที่ขนาดทดสอบ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ดังแสดงในภาพที่ 4 ส่วนพันธุ์อื่นๆ และทุกความเข้มข้น background lawn ปกติ ดังแสดงในตารางที่ 7



TA98 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (-S9), 10x



TA100 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (-S9), 10x



TA1537 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (-S9), 10x

ภาพที่ 4 แสดง Background lawn ของเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98, TA100 และ TA1537 ที่ขนาดทดสอบ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ในระบบไม่มีเอนไซม์ S9 ที่กำลังขยาย 10X โดยจะเห็นการเกิด Killing effect background lawn จะพบลักษณะของช่องว่างที่พื้นหลัง แสดงถึงการตายของเชื้อ

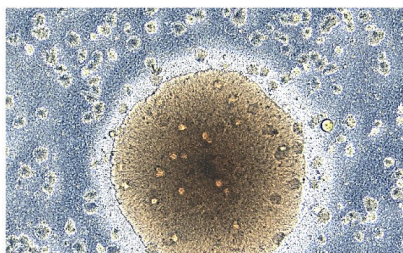
ตารางที่ 7 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Revertant colony) ของสารสกัดกัญชา PTC0729 ต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ ในระบบที่ไม่มีเอนไซม์ S9 (With S9 enzyme)

สารสกัด	ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	โคโลนีกลายพันธุ์ (mean $\pm$ S.D.)									
		TA98	BL	TA100	BL	TA1535	BL	TA1537	BL	WP2	BL
สารสกัดกัญชา (PTC0729) (-S9)	Negative	12.33 $\pm$ 3.79	N	142.00 $\pm$ 13.08	N	11.00 $\pm$ 5.57	N	6.00 $\pm$ 1.00	N	39.33 $\pm$ 9.02	N
	5,000	6.67 $\pm$ 1.15	K	34.67 $\pm$ 2.52	K	9.00 $\pm$ 2.00	N	2.67 $\pm$ 0.58	K	43.33 $\pm$ 11.00	N
	1,500	11.67 $\pm$ 1.15	N	99.33 $\pm$ 3.51	N	6.00 $\pm$ 1.00	N	5.67 $\pm$ 1.53	N	43.00 $\pm$ 7.55	N
	500	11.67 $\pm$ 4.04	N	129.00 $\pm$ 6.24	N	6.33 $\pm$ 0.58	N	6.33 $\pm$ 2.52	N	38.67 $\pm$ 7.57	N
	150	9.00 $\pm$ 5.20	N	144.33 $\pm$ 15.31	N	11.00 $\pm$ 3.61	N	6.67 $\pm$ 1.31	N	41.67 $\pm$ 7.23	N
	50	13.33 $\pm$ 5.51	N	171.67 $\pm$ 22.23	N	7.67 $\pm$ 4.04	N	6.33 $\pm$ 1.15	N	48.33 $\pm$ 12.31	N

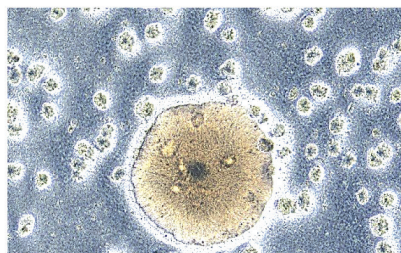
หมายเหตุ: BL หมายถึง Background lawn
 N หมายถึง Normal background lawn
 K หมายถึง Killing effect background lawn

ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย PTC0729 ในระบบมีเอนไซม์ S9 (With S9 enzyme)

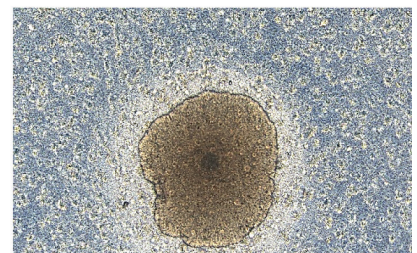
การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกัญชาที่สกัดด้วย Supercritical Fluid Extraction ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ (*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537) และ *E. coli* WP2 ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับ (50, 150, 500, 1,500 และ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท) ในระบบที่มีเอนไซม์ S9 ผลการทดลองพบว่าทุกพันธุ์และทุกขนาดทดสอบไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ โดยดูจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ไม่ได้มีจำนวนเพิ่มเป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับ negative control และเมื่อสังเกตจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ที่ขนาดทดสอบ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท จะพบว่าโคโลนีลดลงประมาณ 2 เท่า เมื่อเทียบกับ negative control นอกจากนั้นพบความผิดปกติของ background lawn ที่พันธุ์ TA98, TA100 และ TA 1537 ที่ขนาดทดสอบ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ดังแสดงในภาพที่ 5 ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนโคโลนีที่ลดลง ส่วนพันธุ์อื่นๆ และทุกขนาดทดสอบ background lawn ปกติ ดังแสดงในตารางที่ 8



TA98 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (+S9), 10x



TA100 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (+S9), 10x



TA1537 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (+S9), 10x

ภาพที่ 5 Background lawn ของเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 TA100 และ TA1537 ที่ขนาดทดสอบ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ในระบบมีเอนไซม์ S9 ที่กำลังขยาย 10X โดยจะเห็นการเกิด Killing effect background lawn จะพบลักษณะของช่องว่างที่พื้นหลัง แสดงถึงการตายของเชื้อ

ตารางที่ 8 จำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ (Revertant colony) ของสารสกัดกัญชา PTC0729 ต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ ในระบบมีเอนไซม์ S9 (With S9 enzyme)

สารสกัด	ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	โคโลนีกลายพันธุ์ (mean $\pm$ S.D.)									
		TA98	BL	TA100	BL	TA1535	BL	TA1537	BL	WP2	BL
สารสกัดกัญชา (PTC0729) (+S9)	Negative	23.00 $\pm$ 1.41	N	178.00 $\pm$ 19.31	N	7.67 $\pm$ 1.53	N	12.00 $\pm$ 1.73	N	42.33 $\pm$ 10.50	N
	5,000	16.33 $\pm$ 3.79	K	69.67 $\pm$ 7.37	K	11.67 $\pm$ 3.51	N	6.00 $\pm$ 2.00	K	39.33 $\pm$ 9.29	N
	1,500	26.67 $\pm$ 8.02	N	120.67 $\pm$ 11.37	N	10.00 $\pm$ 1.73	N	11.67 $\pm$ 2.08	N	58.33 $\pm$ 7.64	N
	500	32.00 $\pm$ 5.29	N	177.33 $\pm$ 13.58	N	13.33 $\pm$ 5.77	N	14.67 $\pm$ 5.86	N	52.67 $\pm$ 6.43	N
	150	33.67 $\pm$ 11.37	N	188.00 $\pm$ 9.17	N	13.00 $\pm$ 0.00	N	16.33 $\pm$ 3.21	N	56.67 $\pm$ 10.07	N
	50	27.33 $\pm$ 11.93	N	214.33 $\pm$ 30.01	N	13.00 $\pm$ 1.73	N	14.67 $\pm$ 8.33	N	37.33 $\pm$ 1.15	N

หมายเหตุ: BL หมายถึง Background lawn

N หมายถึง Normal background lawn

K หมายถึง Killing effect background lawn

วิจารณ์

กัญชาเป็นพืชที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากมีการใช้กันอย่างยาวนานโดยใช้เป็นเครื่องประกอบอาหารและยารักษาโรค รวมถึงเป็นยาตำรับแผนไทยที่มีกัญชาเป็นส่วนผสม 16 ตำรับ แต่อย่างไรก็ตามกัญชาก็มีความเสี่ยงอันตรายต่อสุขภาพ หากมีการนำมาใช้ในทางที่ไม่เหมาะสม ซึ่งเป็นเหตุผลที่ทำให้หลายประเทศมีการกำหนดมาตรการควบคุมที่เข้มงวด รัดกุม จึงทำให้การพัฒนางานวิจัยของพืชกัญชาเกิดความล่าช้า ดังนั้น การสร้างความเชื่อมั่นด้านความปลอดภัยด้านการรักษาโรค หรือผลข้างเคียงที่อาจจะเกิดขึ้นจากการใช้พืชกัญชา จึงเป็นประเด็นสำคัญและเร่งด่วนที่ต้องดำเนินการสำหรับประเทศไทยในปัจจุบันหลายหน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนได้ดำเนินการศึกษาวิจัยเพื่อนำมาใช้ทางการแพทย์ภายใต้พระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษฉบับใหม่ (ฉบับที่ 7) พ.ศ. 2562 และได้มีการอนุญาตส่วนของพืชกัญชาเพื่อสวดกในการศึกษาวิจัยและเชิงพาณิชย์ งานวิจัยในส่วนของความปลอดภัย หรืองานด้านพิษวิทยามีความสำคัญและความจำเป็นเร่งด่วนในการศึกษาวิจัย เพื่อประโยชน์และความปลอดภัยของผู้บริโภค การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์แบบย้อนกลับโดยใช้แบคทีเรีย ซึ่งอ้างอิงวิธีจาก OECD test guideline 471 เป็นการทดสอบพิษวิทยา ในส่วนของ genotoxicity เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานก่อนจะทำการศึกษาในวิธีเชิงลึก เช่น ในสัตว์ทดลอง ทำให้ได้ข้อสรุปที่แน่นอนในด้านความปลอดภัยของสารที่นำไปทดสอบต่อไป ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในเชื้อแบคทีเรีย เป็นการทดสอบสารเคมี สารสมุนไพร และผลิตภัณฑ์สุขภาพ เพื่อหาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างพันธุกรรมในเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสารเคมีที่ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ต่อเซลล์ร่างกายเมื่อมีการบริโภคสิ่งเหี้ยมฉุนทำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์นั้น ๆ อาจทำให้เซลล์ถูกพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งหรือก่อให้เกิดโรคความผิดปกติทางพันธุกรรมได้ ผลการทดลองในการวิจัยครั้งนี้พบว่าสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ ที่สกัดด้วย Supercritical Fluid Extraction ทดสอบในเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 พันธุ์ (*S. typhimurium* พันธุ์ TA98, TA100, TA1535, TA1537 และ *E. coli* WP2) ทุกขนาดทดสอบไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ ทั้งในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น โดยดูจากจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ไม่ได้มีจำนวนเพิ่มเป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับ negative control แต่พบความผิดปกติของ background lawn ในสารสกัดกัญชารหัสตัวอย่าง PTC0601 ของเชื้อแบคทีเรียพันธุ์ TA1537 ขนาดทดสอบที่ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท และรหัสตัวอย่าง PTC0729 ของเชื้อแบคทีเรียพันธุ์ TA98 TA100 และ TA1537 ระดับขนาดทดสอบที่ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ซึ่งจะพบว่าเกิด Killing effect background lawn จะพบลักษณะของช่องว่างที่พื้นหลัง แสดงถึงการตายของเชื้อ ซึ่งในการทดสอบจะต้องทำการส่องดู background lawn ภายใต้กล้อง inverted microscope เนื่องจากลักษณะของ background lawn เป็นเกณฑ์หนึ่งของ guideline ที่ใช้ในการตัดสินใจว่าสารตัวอย่างมีการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

ที่ใช้ทดสอบหรือไม่ ซึ่งการเกิด killing effect จะเป็นการเตือนภัยผู้บริโภคในส่วนของขนาดทดสอบที่เหมาะสมในการนำไปใช้ รายงานการวิจัยของ Tennille และคณะ (2018)⁽¹⁴⁾ ได้ทดสอบประเมินความปลอดภัยของสารสกัดกัญชาที่มีสาร CBD ประมาณ 96% และ THC น้อยกว่า 1% สกัดด้วย Supercritical Fluid Extraction โดยใช้วิธี bacterial Reverse Mutation ตาม OECD Guideline No.471 ที่ขนาดทดสอบ 5,000, 1,600, 500, 160, 50, 16, 5 ไมโครกรัม/เพลท ผลการทดลองพบว่าทุกพันธุ์และทุกขนาดทดสอบไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ ทั้งในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์ และรายงานการวิจัยของ Margitta และคณะ (2020)⁽¹⁵⁾ ซึ่งดำเนินการเหมือนกันกับของ Tennille และผลการทดลองก็สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Jungae Jeun และคณะ (2011)⁽¹⁶⁾ ทดสอบฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์และฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดเมล็ดกัญชาที่สกัดด้วยเฮกเซนโดยวิธีเอ็มเอส ต่อเชื้อแบคทีเรียพันธุ์ TA98 และ TA100 ทั้งในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์ S9 ที่ขนาดทดสอบ 25,000, 12,500, 6,250 และ 3,125 ไมโครกรัม/เพลท ผลการทดลองพบว่าไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และมีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ รายงานการวิจัยของ พรวา และคณะ (2563)⁽¹⁷⁾ ศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกัญชาของกลางที่สกัดด้วยวิธีของไหลวิกฤตยิ่งยวด (supercritical fluid extraction) โดยใช้วิธีอ้างอิงจาก OECD test guideline 471 ในเชื้อแบคทีเรีย 5 พันธุ์ ที่ขนาดทดสอบ 5 ระดับ (1,250, 2,500, 5,000, 10,000 และ 20,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ผลการทดลองพบว่าสารสกัดกัญชาของกลางที่มีปริมาณ THC สูง ทุกขนาดทดสอบทุกพันธุ์ ทั้งในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของผู้วิจัยและคณะ พบว่าสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทยทั้ง 3 พันธุ์ ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์เช่นเดียวกัน ซึ่งกัญชาพันธุ์ไทยเป็นพันธุ์ที่แตกต่างจากของต่างประเทศ เพราะพันธุ์ต่างประเทศจะมีปริมาณสารสำคัญ CBD สูงมาก และ THC น้อยมาก แต่พบว่าผลการทดลองให้ผลที่เหมือนกัน คือ ทุกพันธุ์ทุกขนาดทดสอบไม่ก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ที่ขนาดทดสอบ ทั้งในระบบที่มีและไม่มีเอนไซม์ S9 ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิจัยในช่อดอกกัญชาซึ่งยังจัดเป็นยาเสพติด ดังนั้นผลการทดลองที่ไม่ได้กล่าวถึงการใช้ส่วนอื่น ๆ ของกัญชา ซึ่งผู้วิจัยจะมีการศึกษาส่วนต่างๆ ของกัญชา เช่น ใบ ราก ฯลฯ ต่อไป ข้อควรระมัดระวัง การนำกัญชาไปใช้ ผู้บริโภคที่มีโรคประจำตัวหรือมีการรับประทานยาแผนปัจจุบันหรือยาอื่นๆ ควรใช้กัญชาภายใต้คำปรึกษาของแพทย์เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลการศึกษาถึงผลของอันตรกิริยาระหว่างสมุนไพรกัญชาและยาแผนปัจจุบัน รวมถึงยังมีการทดสอบด้าน genotoxicity อื่นๆ เพื่อเป็นการยืนยันผลให้มีความมั่นใจมากยิ่งขึ้น อาจต้องระมัดระวังในการใช้สมุนไพรชนิดนี้ ซึ่งผลการทดลองนี้สามารถนำผลไปอ้างอิงและใช้ในการวิจัยเชิงลึก เช่น การศึกษาพิษเรื้อรังในสัตว์ทดลอง การศึกษากลไกต่างๆ ในสัตว์ทดลองต่อไป

สรุป

การทดสอบการก่อกลายพันธุ์ในครั้งนี้เป็นการทดสอบหนึ่งใน mutagenicity scope ซึ่งยังต้องมีการศึกษาในการทดสอบอื่นๆ เช่น *In vitro* chromosome aberration assay, Mouse Lymphoma assay, *In vitro* และ *In vivo* micronucleus เป็นต้น เพื่อยืนยันผลการก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติม เนื่องจากสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย PTC0601 และ PTC0729 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ขนาดทดสอบ 5,000 ไมโครกรัม/เพลท ซึ่งเกณฑ์ของวิธีทดสอบระบุว่าหากมีการยับยั้งของเชื้อจะต้องไม่นำขนาดทดสอบที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาวิเคราะห์ผล และจะพิจารณาเฉพาะขนาดทดสอบที่ไม่เกิดการยับยั้งของเชื้อ ซึ่งในการทดสอบ ผู้วิจัยได้ทำการเจือจางความเข้มข้นเริ่มที่ 5,000, 1,500, 500, 150 และ 50 ไมโครกรัม/เพลท ดังนั้นผู้ที่นำกัญชาพันธุ์ไทยมาใช้จะต้องคำนึงถึงขนาดความปลอดภัย ซึ่งจากผลการทดสอบควรระมัดระวังในขนาดที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1,500 ไมโครกรัม/เพลท การทดสอบนี้เป็นข้อมูลด้านความปลอดภัยของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย เพื่อใช้คุ้มครองผู้บริโภคและเตือนภัยประชาชนให้มีความมั่นใจในการใช้สมุนไพรไทยอย่างปลอดภัยมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินจากงบประมาณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบพระคุณ นายสรเพชร มาสุด และนายกรวิชัย สมคิด พร้อมด้วยทีมงานห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและห้องปฏิบัติการ จีโนมิกส์พืชจากสถาบันวิจัยสมุนไพร สำนักงานสาธารณสุขจังหวัด องค์การบริหารส่วนตำบล โรงพยาบาล และ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่เกี่ยวข้อง ในการเก็บตัวอย่างสมุนไพรกัญชา ศูนย์ตรวจสอบและรับรองคุณภาพสมุนไพร ในการควบคุมคุณภาพทางเคมีและแยกปริมาณสารสำคัญ THC และ CBD ของตัวอย่างกัญชา และเจ้าหน้าที่ ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 (พ.ศ. 2563). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ ๒๙๐ ง (วันที่ 14 ธันวาคม 2563). หน้า 33.
2. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 424 (พ.ศ. 2564) เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 138 ตอนพิเศษ 45 ง (วันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2564). หน้า 32.
3. ศูนย์วิจัยกสิกรไทย. “กัญชา” จะกลายเป็นพืชเศรษฐกิจไทย ได้หรือไม่? [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 14 ม.ค. 2563]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : <https://kasikornresearch.com/th/analysis/k-social-media/Pages/FB-Cannabis-14-01-20.aspx>.
4. Small E, Cronquist A. A practical and natural taxonomy for Cannabis. Taxon 1976; 25(4) : 405-35.
5. ราชบัณฑิตยสถาน. อนุกรมวิธานพืช อักษร ก. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : ราชบัณฑิตยสถาน; 2547.
6. Anderson LC. Leaf variation among Cannabis species from a controlled garden. Bot Mus Leaflet 1980; 28(1) : 61-9.
7. Hanus LO, Meyer SM, Munoz E, Tagliabue S, Scafati O, Appendino G. Phytocannabinoids : a unified critical inventory. Nat Prod Rep 2016; 33(12) : 1357-92.
8. Hill AJ, Williams CM, Whalley BJ, Stephens GJ. Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. Pharmacol Ther 2012; 133(1) : 79-97.
9. Daris B, Tancer Verboten M, Knez Z, Ferk P. Cannabinoids in cancer treatment : therapeutic potential and legislation. Bosn J Basic Med Sci 2019; 19(1) : 14-23.
10. Szaflarski JP, Bebin EM, Cutter G, DeWolfe J, Dure LS, Gaston TE, et al. Cannabidiol improves frequency and severity of seizures and reduces adverse events in an open-label add-on prospective study. Epilepsy Behav 2018; 87 : 131-6.
11. Vuckovic S, Srebro D, Vujovic KS, Vucetic C, Prostran M. Cannabinoids and pain : new insights from old molecules. Front Pharmacol 2018; 9 : 1259. (19 pages).
12. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Health and Medicine Division; Board on Population Health and Public Health Practice; Committee on the Health Effects of Marijuana : An Evidence Review and Research Agenda. The health effects of cannabis and cannabinoids : the current state of evidence and recommendations for research. Washington, DC : National Academies Press; 2017.

13. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Test No. 471 : bacterial reverse mutation test. [online]. 2020; [cited 2020 Jun 28]; [11 screens]. Available from : URL : https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-471-bacterial-reverse-mutation-test_9789264071247-en.
14. Marx TK, Reddeman R, Clewell AE, Endres JR, Béres E, Vértési A, et al. An assessment of the genotoxicity and subchronic toxicity of a supercritical fluid extract of the aerial parts of hemp. J Toxicol 2018; 2018 : 8143582. (26 pages).
15. Dziwenka M, Coppock R, Alexander M, Palumbo E, Ramirez C, Lerner S. Safety assessment of a hemp extract using genotoxicity and oral repeat-dose toxicity studies in Sprague-Dawley rats. Toxicol Rep 2020; 7 : 376-85.
16. Jeun JA, Cho HJ, Jun HJ, Lee JH, Jia YY, Cho KS, et al. Mutagenic and antimutagenic effects of hemp seed oil evaluated by Ames Salmonella testing. Korean J Food Sci Tech 2011; 43(3) : 396-400.
17. พรวา ศุภจริยาวัตร. การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดกัญชาที่สกัดด้วยวิธีของไหลวิกฤตยิ่งยวด. ใน : เอกสารการประชุมวิชาการพิษวิทยาแห่งชาติครั้งที่ 10. วันที่ 28-29 ตุลาคม 2563. กรุงเทพฯ : สมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย; 2563. หน้า 41-53.

Investigation of Mutagenic Activity of Thai *Cannabis sativa* L. Extract

Praw Suppajariyawat¹ Sutjarit Aunkat¹ Wijittra Sudhong¹ Padtaya Sirinantananon¹
Sekrachatakorn Buabao¹ Sarayut Radapong¹ Phichet Banyati¹ Siriwan Chaisomboonphan¹
Praew Suppajariyawat² and Pornchai Sincharoenpokai¹

¹Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000

²Ministry of Justice, Prachachuen Road, Bang-sue, Bangkok 10800, Thailand

ABSTRACT *Cannabis sativa* L. is an addictive plant, which has been allowed for medical use in Thailand. This species has been recently drawn attention by the public conducting studies, research and development, and producing herbal products for medical purpose. The amount of active ingredients, the efficacy of the treatment and the safety for consumers should be taken into serious consideration. This herb has been legalized for medical purpose and daily consumption. The notification is enacted in the ministerial regulation regarding the names of narcotics in category 5, people can take advantage of any parts of cannabis and hemp (except trichomes of cannabis), which are not classified as a drug. However, toxicity and safety data are still limited. This study, therefore, aimed to investigate the mutagenic activity of the female Inflorescence extracts from three of Thai cannabis, including PTC0601, PTC0602 and PTC0729 extracted using supercritical fluid extraction and then investigated the mutagenic activity using method complied with OECD GLP test guideline 471. The four strains of *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) and *Escherichia coli* (WP2) were treated with five different doses of the extracts at 50, 150, 500, 1,500 and 5,000 µg/plate with and without metabolic activation enzymes. The results showed that the three trichrome extracts did not produce significant revertant colonies in all strains of bacteria and all concentrations of the extracts (both non- and enzymatic activation). However, in-depth testing or mechanisms for safety in animal model should be confirmed in order to ensure that the Thai cannabis extracts can be consumed or continue to make products.

Keywords: *Cannabis sativa* L. extract, Mutagenic activity, Thai *Cannabis sativa* L.

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบินอยด์ ในใบกัญชาด้วยวิธี Ultra High Performance Liquid Chromatography

ธนวัฒน์ ทองจีน สรเพชร มาสุต พีรธรรม เทียมเทียบรัตน์ สายัณห์ เรืองเชตร ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง พิเชฐ บัญญัติ
ศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์ และอัครชัย ช่วยพรหม
สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ กัญชา (*Cannabis sativa* L.) ได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคตั้งแต่สมัยโบราณ สารสำคัญที่พบในกัญชา คือ Tetrahydrocannabinol (THC) ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท และสารที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท เช่น Cannabidiol (CBD) และ Cannabinol (CBN) สาร THC มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวด ลดภาวะคลื่นไส้ อาเจียนจากเคมีบำบัด และรักษาภาวะกล้ามเนื้อหดเกร็ง สาร CBD มีฤทธิ์บรรเทาอาการลมชัก แก้ปวด ลดอาการโรคพาร์กินสัน ต้านการอักเสบ ส่วนสาร CBN มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด ปัจจุบันกัญชาถูกนำมาใช้เป็นองค์ประกอบทางยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพที่หลากหลาย อย่างไรก็ตามยังไม่มีวิธีการควบคุมคุณภาพสารที่พบในกัญชา การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบินอยด์ (CBD, CBN และ THC) ในใบกัญชาด้วยวิธี Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) โดยการสกัดตัวอย่างใบกัญชาใน ethanol ด้วยวิธี reflux กรองและนำสารสกัดมาระเหยแห้ง จากนั้นละลายกลับและปรับปริมาตรด้วย methanol แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่า calibration curve ของ CBD, CBN และ THC มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.07-106.89, 1.00-99.60 และ 1.00-99.90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.999, ค่า %recovery อยู่ในช่วง 96.83-100.89%, ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.30-1.96, limit of detection (LOD) ของ CBD, CBN และ THC มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.006, 0.009 และ 0.003 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ในขณะที่ limit of quantitation (LOQ) มีค่าเท่ากับ ร้อยละ 0.020, 0.032 และ 0.011 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ซึ่งวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในวัตถุดิบและสารสกัดกัญชาได้

คำสำคัญ : กัญชา, CBD, CBN, THC, UHPLC

Corresponding author E-mail: thanawat.t@dmsc.mail.go.th

Received: 13 August 2021

Revised: 7 September 2021

Accepted: 13 September 2021

บทนำ

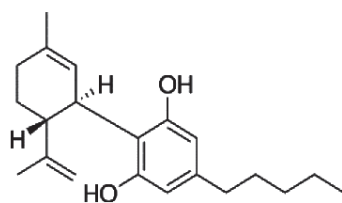
กัญชา มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. จัดอยู่ในวงศ์ Cannabidaceae มีชื่อเรียกอื่น เช่น กัญชาจีน, คุนเช่า, ปาง, ยานอ, Hashish, Hemp, Indian hemp, Marijuana เป็นต้น จัดเป็นไม้ล้มลุก ต้นตั้งตรง ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียแยกกันอยู่คนละต้น มีขนที่มีสารเหนียวๆ ทั่วไป ลำต้นเป็นเหลี่ยมเล็กน้อย ใบที่อยู่ใกล้โคนต้นออกเป็นคู่ตรงข้ามกัน ใบที่อยู่ไกลยอดเรียงแบบบันไดเวียน มีหูใบ 2 อัน เป็นรูปเส้นด้ายติดอยู่โคน ก้านใบยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ตั้งตรง ไม่ร่วงง่าย แผ่นใบเป็นแฉก 5-7 แฉก แต่ละแฉกเป็นรูปหอก ปลายแฉกแหลมเป็นติ่ง โคนแฉกแหลม ขอบหยัก ก้านใบมีขน ดังแสดงในภาพที่ 1 ดอกตัวผู้ออกเป็นช่อตามง่ามใบและยอด ดอกมีกลีบเพียงชั้นเดียว จำนวน 5 กลีบ ไม่ติดกัน กลีบรูปขอบขนาน ดอกตัวเมีย ออกเดี่ยวๆ ตามง่ามใบและยอด แต่ละดอกมีใบประดับสีเขียวเข้ม คล้ายกาบและมีขนเป็นต่อมหุ้มอยู่ ไม่มีกลีบดอก ผลรูปไข่หรือรูปรี เกสรตัวผู้ มีใบประดับหุ้มอยู่ 2 ใบ สรรพคุณของกัญชามีดังนี้ คือ ใบเป็นยาชูกำลัง แก้อ่อนเพลีย เจริญอาหาร กระตุ้นประสาท ทำให้อ่อนหลับ ช่อดอกตัวเมียช่วยบำรุงประสาท แก้ปวดประสาท ทำให้เคลิ้มฝัน มีฤทธิ์เป็นยาระงับปวด เมล็ดเป็นยาชูกำลัง ทำให้ประจำเดือนมาปกติ ส่วนลำต้นมีสรรพคุณบำรุงประสาท⁽¹⁾ กัญชามีส่วนประกอบของสารเคมีมากกว่า 450 ชนิด โดยมากกว่า 60 ชนิดเป็นสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ (cannabinoids) มีองค์ประกอบหลักคือ Tetrahydrocannabinol (THC) และสารชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกัน เช่น Cannabinol (CBN), Cannabidiol (CBD), Cannabichromene (CBC), Cannabigerol (CBG) เป็นต้น^(2, 3) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 424 (พ.ศ. 2564) เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย ลงวันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2564 ได้ยกเลิกกัญชา-กัญชง จากบัญชียาเสพติดให้โทษ รวมถึงการอนุญาตให้นำใบซึ่งไม่มียอดหรือช่อดอกติดมาด้วย กิ่ง ก้าน ราก เปลือก ลำต้น เส้นใย ที่ไม่จัดเป็นยาเสพติดประเภทที่ 5 มาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ การศึกษาวิจัย ผลิตภัณฑ์สุขภาพ รวมทั้งให้ประชาชนสามารถใช้ส่วนต่างๆ ของกัญชา-กัญชง ไปประกอบอาหาร ทำยาโรคได้⁽⁴⁾ ปัจจุบันสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้ออกใบอนุญาตกัญชาสำหรับองค์กรต่าง ๆ ไปแล้วจำนวน 2,210 ราย มีผู้ปลูกกัญชาทั้งพันธุ์ต่างประเทศและพันธุ์ไทย อย่างไรก็ตามกัญชาไทยยังไม่มีข้อมูลชัดเจนในเรื่องของพันธุ์ โดยทางสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ร่วมกับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร ได้ทำการศึกษากัญชาพันธุ์ไทยจำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ทางกระรอกภูพานเอสที 1 (ST1) ทางเสือสกลนครทีที1 (TT1) ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิลยูเอ 1 (WA1) และตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี 1 (RD1) โดยทำการศึกษาทั้งลักษณะฟีโนไทป์ จีโนไทป์ และเคมีไทป์ในส่วนของช่อดอก ซึ่งได้ขึ้นทะเบียนพันธุ์กับกรมวิชาการเกษตร พบว่ากัญชาพันธุ์ไทย 4 พันธุ์ มีลักษณะเด่นถึง 3 แบบ แบบที่ 1 เป็นกัญชาที่ให้สาร THC สูง ได้แก่ พันธุ์ WA1 และ TT1 แบบที่ 2 เป็นกัญชาที่ให้สาร THC และ CBD ในอัตราส่วนที่เท่ากัน (THC : CBD = 1 : 1) ได้แก่ พันธุ์ ST1 และกัญชาแบบที่ 3 ที่ให้สาร CBD สูง ได้แก่ พันธุ์ RD1 เมื่อได้พันธุ์ที่ถูกต้องแล้วจะสามารถนำไปส่งเสริมให้กับเกษตรกร วิสาหกิจชุมชนต่างๆ นำไปปลูกได้และนำส่วนต่างๆ ของกัญชา (ยกเว้นช่อดอกและเมล็ด) ไปใช้ประโยชน์ได้โดยเฉพาะใบ

ใบกัญชาเป็นส่วนประกอบหนึ่งของกัญชาที่มีสารสำคัญในกลุ่ม Cannabinoids อยู่ โดยสารที่เป็นที่รู้จักกันดีนั้นคือ CBD, CBN และ THC ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ กระตุ้นระบบประสาท สมอง และภูมิคุ้มกันต่างๆ ในการใช้ประโยชน์ของใบกัญชามักจะนำมาใช้ในการประกอบอาหารเพื่อให้ได้รสชาติที่ดีขึ้นและนำมาเป็นส่วนประกอบการผลิตเป็นยาแผนโบราณในหลายตำรับ เช่น ยาอัคคินิวคณะ ยาสุขไสยาสน์ ยาแก้สัณห์ฆาต ยาแก้โรคจิต ยาอัมฤตโอสถ ยาไพสาลี ยาโกลยาสาลี ยาทำลายพระสุเมรุ ยาทัพยาคูณ⁽⁵⁾ สาร CBD และสาร CBN มีลักษณะเป็นผงสีขาว สาร THC มีลักษณะเป็นของเหลวใส สาร CBD มีฤทธิ์บรรเทาอาการลมชัก ลดอาการวิตกกังวลทั้งในเด็กกลุ่มอาการออทิสติก หรือในผู้ป่วยที่มีประวัติการเสพยาเสพติด สาร CBN มีฤทธิ์ด้านการอักเสบและลดความเจ็บปวด ส่วนสาร THC มีฤทธิ์แก้ปวด กระตุ้นความอยากอาหารและลดอาการคลื่นไส้จากการใช้เคมีบำบัด ช่วยปกป้องและกระตุ้นการสร้างเซลล์สมอง⁽⁶⁾ สูตรโครงสร้างของ CBD, CBN และ THC ดังแสดงในภาพที่ 2

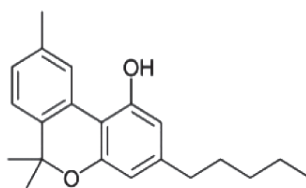
ปัจจุบัน การพัฒนาพืชสมุนไพรกัญชาเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ จำเป็นต้องมีการศึกษาการพัฒนาสารสกัด การแยกสารบริสุทธิ์และผลิตภัณฑ์จากกัญชา เพื่อให้เป็นพืชที่สามารถใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างเหมาะสม และในการนำใบกัญชามาประกอบอาหารและเป็นองค์ประกอบในการปรุงตำรับยา ยังไม่มีข้อมูลปริมาณสารสำคัญ ในปี 2555 มีรายงานการหาปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในกัญชาด้วยวิธี HPLC/UV⁽⁷⁾ แต่เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่ม Cannabinoids ในกัญชาด้วยวิธี HPLC/UV นั้น ใช้เวลานาน คือ 22 นาที ทำให้สิ้นเปลือง วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) และต่อมาในปี 2561 มีรายงานการหาปริมาณสาร Cannabinoids ในกัญชาด้วยวิธี HPLC-DAD⁽⁸⁾ และการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่ม Cannabinoids ในกัญชาด้วยวิธี HPLC-DAD นี้ ใช้เวลานาน ถึง 50 นาที และก็เป็นสาเหตุของการสิ้นเปลืองสารเคมีด้วยเช่นกัน การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ CBD, CBN และ THC ในใบกัญชา และทดสอบความถูกต้องของวิธีเพื่อให้ได้วิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ ที่มีความถูกต้องแม่นยำ สะดวก รวดเร็ว และประหยัดสารเคมี เพื่อใช้ในการประเมินคุณภาพของกัญชาพันธุ์ไทย 4 พันธุ์ และวัตถุดิบของใบกัญชาที่ปลูกในประเทศไทย รวมทั้งการหาปริมาณสารสำคัญที่อยู่ในใบและสามารถนำใบกัญชา พันธุ์ไทยของแต่ละพันธุ์ให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างเหมาะสม นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการวิจัย และพัฒนาตำรับยาและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่มีกัญชาเป็นส่วนผสม รวมถึงเป็นข้อมูลในการพัฒนาพันธุ์กัญชา เพื่อเพิ่มมูลค่าของใบกัญชาทางเศรษฐกิจต่อไป



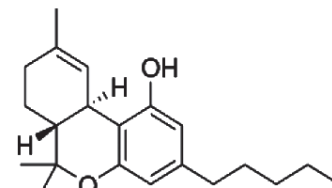
ภาพที่ 1 ใบกัญชา



Cannabidiol (CBD)



Cannabinol (CBN)



Tetrahydrocannabinol (THC)

ภาพที่ 2 สูตรโครงสร้างของ CBD, CBN และ THC

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐาน : Cannabidiol (CBD) ความบริสุทธิ์ $\geq 99.9\%$ (THC Pharm GmbH, Batch : S19-014), Cannabinol (CBN) ความบริสุทธิ์ $\geq 99.6\%$ (THC Pharm GmbH, Batch : DWO180.707-1), Tetrahydrocannabinol (THC) ความบริสุทธิ์ $\geq 98.6\%$ (THC Pharm GmbH, Batch : DWO181.121-1)

สารเคมี: methanol (HPLC grade), acetonitrile (HPLC grade), ethanol (AR grade), hexane (AR grade) และน้ำปราศจากไอออน (deionized water)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง Ultra High Performance Liquid Chromatography-DAD detector รุ่น 1290 Infinity II ผลิตภัณฑ์ของ Agilent, คอลัมน์ชนิด ARC-18, ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร และ ARC-8, ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 3.0 ไมโครเมตร ผลิตภัณฑ์ของ Restek, ตู้อบร้อนไฟฟ้า รุ่น UL-50 ผลิตภัณฑ์ของ Memmert, เครื่องบดปั่น รุ่น RT 34 ผลิตภัณฑ์ของ ChyunTseh Industrial, เครื่องแรง รุ่น AS 200 Basic ผลิตภัณฑ์ของ Retsch, เครื่องระเหยสุญญากาศ ผลิตภัณฑ์ของ Eyela ประกอบด้วย อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น SB-1000, เครื่อง rotavapor รุ่น N-1000, เครื่อง Aspirator รุ่น A-3S และ เครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน รุ่น CA-101, เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม รุ่น XB 220A ผลิตภัณฑ์ของ Precisa และ Nylon filter syringe ขนาด 0.2 ไมโครเมตร, กระดาษกรองเบอร์ 4 และเครื่องแก้ว

ตัวอย่าง

ใบกัญชาถูกรวบรวมจากโครงการศึกษาการปลูกและขยายพันธุ์ต้นกัญชาภายใต้สภาพโรงเรือนแบบปิดของสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร จำนวน 12 ตัวอย่าง คือ กัญชาไทย จำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ ทางกระรอกภูพานเอสที1 (ST1), ทางเสือสกลนครที่ 1 (TT1), ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิ้ลยูเอ1 (WA1) และตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี1 (RD1)

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในใบกัญชา

การศึกษาหาสภาวะของระบบโครมาโทกราฟี

เตรียมสารละลายมาตรฐาน CBD, CBN และ THC ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC

สกัดตัวอย่างใบกัญชาแห้ง น้ำหนัก 1 กรัม ด้วย ethanol ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยวิธี reflux เป็นเวลา 60 นาที กรองและนำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้ง ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC

การเลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัด

สกัดตัวอย่างใบกัญชาแห้ง น้ำหนัก 1 กรัม โดยใช้ ethanol 40 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ hexane 40 มิลลิลิตร ด้วยวิธี reflux เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารสกัด ethanol และ สารสกัด hexane ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask กรองผ่าน Nylon filter syringe แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสกัดสาร CBD, CBN และ THC จากใบกัญชา

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

สกัดตัวอย่างใบกัญชาแห้ง น้ำหนัก 1 กรัม ด้วย ethanol โดยวิธี reflux เป็นเวลา 30, 60 และ 90 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC เพื่อเปรียบเทียบผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดสาร CBD, CBN และ THC

การเลือกใช้ความยาวคลื่นในการตรวจวิเคราะห์สาร CBD, CBN และ THC

สกัดตัวอย่างใบกัญชาแห้ง น้ำหนัก 1 กรัม ด้วย ethanol โดยวิธี reflux เป็นเวลา 60 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC วัดการดูดกลืนแสง UV ของ CBD, CBN และ THC เพื่อดูความยาวคลื่นที่สารชนิดนี้สามารถดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) และวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างใบกัญชาโดยใช้ DAD เพื่อเลือกความยาวคลื่นสำหรับการตรวจวัด CBD, CBN และ THC โดยที่ไม่พบการซ้อนทับของ peak (co-elute)

วัฏภาคคงที่ (Stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase)

วัฏภาคคงที่ เปรียบเทียบผลของคอลัมน์ชนิดต่างๆ ที่แตกต่างกันในเรื่องชนิดอนุภาคภายในคอลัมน์ (ARC-18 และ ARC-8) ความยาวคอลัมน์ (150 และ 100 มิลลิเมตร) โดยพิจารณาเลือกคอลัมน์ จากลักษณะของ peak shape, peak symmetry และ retention time

วัฏภาคเคลื่อนที่ ศึกษาชนิดและสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยพิจารณาจาก peak shape และ retention time ของ CBD, CBN และ THC ความสามารถในการแยก impurity จาก peak ของ CBD CBN และ THC ในสารละลายตัวอย่างใบกัญชา และความดันของระบบโครมาโทกราฟี

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในใบกัญชาที่พัฒนาขึ้นตามแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข⁽⁹⁾

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน CBD, CBN และ THC

ชั่งสารมาตรฐาน CBD, CBN และ THC น้ำหนัก 10, 25 และ 100 มิลลิกรัม ตามลำดับ ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 10, 25 และ 50 มิลลิลิตร ด้วย volumetric flask ตามลำดับ จะได้ stock solution ของสารละลายมาตรฐาน CBD, CBN และ THC เข้มข้น 1,000, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ปิเปตสารละลายมาตรฐาน CBD, CBN และ THC ปริมาตร 1,000, 1,000 และ 500 ไมโครลิตร ตามลำดับ ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol จากนั้นเจือจางให้ได้ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 1, 10, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ฉีดสารละลายมาตรฐาน CBD, CBN และ THC ที่ 5 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ด้วยเครื่อง UHPLC นำค่า peak area และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน CBD, CBN และ THC ไปสร้าง calibration curve ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)

การทดสอบหาร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) และความเที่ยง (precision)

เตรียม sample blank (sample blank คือ ตัวอย่างใบกัญชาที่นำมาสกัดและตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ CBD, CBN และ THC แล้วมีปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในปริมาณต่ำๆ) โดยชั่งตัวอย่างใบกัญชา 1 กรัม สกัดด้วย ethanol โดยวิธี reflux เป็นเวลา 60 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC จำนวน 6 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean)

เตรียม spiked sample ลงใน sample blank โดยเติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3 ระดับๆ ละ 3 ซ้ำ นิตซ้ำละ 2 ครั้ง โดยเตรียม spiked sample ให้มีความเข้มข้น 50, 100, 150%

เติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ลงใน sample blank แล้ววิเคราะห์ sample blank (unspiked) จำนวน 6 ซ้ำ และวิเคราะห์ spiked sample ระดับละ 3 ซ้ำ จากนั้นคำนวณค่า %recovery

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

เมื่อ C_1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked sample

C_2 คือ ความเข้มข้นของสารใน sample blank

C_3 คือ ความเข้มข้นของสารที่เติม

การทดสอบความเที่ยง (precision)

Repeatability precision วิเคราะห์ปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในตัวอย่างใบกัญชา ซ้ำ 10 ครั้ง ในวันเดียวกัน คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

Intermediate precision, between day วิเคราะห์ปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในตัวอย่างใบกัญชา เป็นเวลา 3 วันๆ ละ 10 ซ้ำ คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD)

คำนวณค่าประมาณของ LOD จาก calibration curve

LOD ($\mu\text{g/ml}$), estimated = $3 \times \text{standard error/slope}$

$$\text{LOD (\%w/w), estimated} = \frac{\text{LOD (\mu g/ml)} \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (ml)} \times \text{ระดับเจือจาง} \times 100}{1,000,000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$$

เตรียมสารละลายตัวอย่างใบกัญชา โดยชั่งตัวอย่างใบกัญชา 1 กรัม สกัดด้วย ethanol โดยวิธี reflux เป็นเวลา 60 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask กรองผ่าน Nylon filter syringe

เตรียมสารละลาย spiked sample ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOD แล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ใน spiked sample 6 ซ้ำ

การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

คำนวณค่าประมาณของ LOQ จาก calibration curve ดังนี้

$$\text{LOQ } (\mu\text{g/ml}), \text{ estimated} = 10 \times \text{standard error/slope}$$

$$\text{LOQ } (\%w/w), \text{ estimated} = \frac{\text{LOQ } (\mu\text{g/ml}) \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (ml)} \times \text{ระดับเจือจาง} \times 100}{1,000,000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$$

เตรียมสารละลาย spiked sample ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOQ แล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณ CBD CBN และ THC ใน spiked sample 6 ซ้ำ คำนวณค่า %RSD และ %recovery

การทดสอบความจำเพาะ (Specificity)

ฉีดสารละลาย mixed working standard solution ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารละลายตัวอย่าง ด้วยเครื่อง UHPLC เพื่อตรวจสอบการแยกสาร CBD, CBN และ THC ออกจากกันและออกจาก การรบกวนของสารอื่น ซึ่งต้องมีค่า retention time แยกจากกันได้

การวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในใบกัญชา

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

สกัดตัวอย่างใบกัญชา น้ำหนัก 1 กรัม ด้วย ethanol ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยวิธี reflux เป็นเวลา 60 นาที กรองและนำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้ง ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC

วิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในตัวอย่างใบกัญชา จำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยที่แต่ละตัวอย่างให้วิเคราะห์ 3 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean)

การคำนวณความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในตัวอย่างใบกัญชา (ร้อยละโดยน้ำหนักตัวอย่างใบกัญชา, %w/w)

$$C_s (\%w/w) = \frac{C_o (\mu\text{g/ml}) \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (ml)} \times \text{ระดับเจือจาง} \times 100}{1,000,000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$$

เมื่อ C_o คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน

C_s คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์เพื่อแปลงเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก

ผล**การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในใบกัญชา**

การศึกษาหาสภาวะของระบบโครมาโทกราฟี หลังจากนำสารละลายมาตรฐานของ CBD, CBN และ THC และสารละลายตัวอย่างใบกัญชาไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC พบว่าได้สภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมในการแยกสาร CBD, CBN และ THC ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่แบบ gradient program จะเริ่มที่เวลา นาทีที่ 0.0 ถึง นาทีที่ 8.5 ใช้ %A : %B (28 : 72), นาทีที่ 8.5 ถึง นาทีที่ 8.6 ใช้ %A : %B (5 : 95), นาทีที่ 8.6 ถึง นาทีที่ 9.5 ใช้ %A : %B (5 : 95), นาทีที่ 9.5 ถึง นาทีที่ 12.1 ใช้ %A : %B (2 : 72) และ นาทีที่ 12.1 ถึง นาทีที่ 15.0 ใช้ %A : %B (28 : 72) ดังแสดงในตารางที่ 2

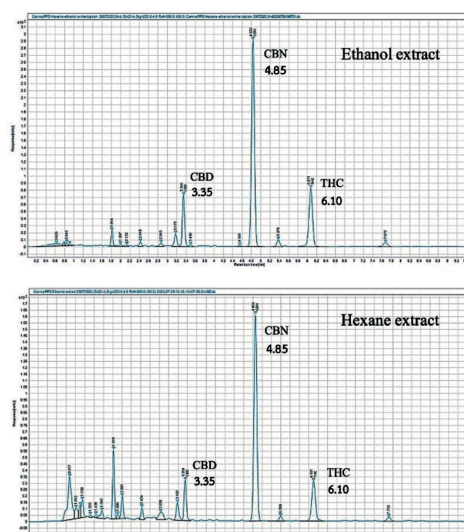
ตารางที่ 1 สภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมในการแยกสาร CBD, CBN และ THC ด้วยระบบ UHPLC

สภาวะที่เหมาะสม	
วัฏภาคคงที่	UHPLC column ชนิด ARC-18, ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร
อุณหภูมิคอลัมน์	40 องศาเซลเซียส
วัฏภาคเคลื่อนที่	Gradient: 0.1% ortho-phosphoric acid ในน้ำ และ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile
อัตราการไหล	1.5 มิลลิลิตร/นาที
การตรวจวัดสาร	DAD ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร
ปริมาตรการฉีด	5 ไมโครลิตร

ตารางที่ 2 วัฏภาคเคลื่อนที่แบบ Gradient program

Time (min)	Flow (ml/min)	0.1% ortho-phosphoric acid in water (%A)	0.1% ortho-phosphoric acid in acetonitrile (%B)
Initial	1.5	28	72
8.5	1.5	28	72
8.6	1.5	5	95
9.5	1.5	5	95
12.1	1.5	28	72
15.0	1.5	28	72

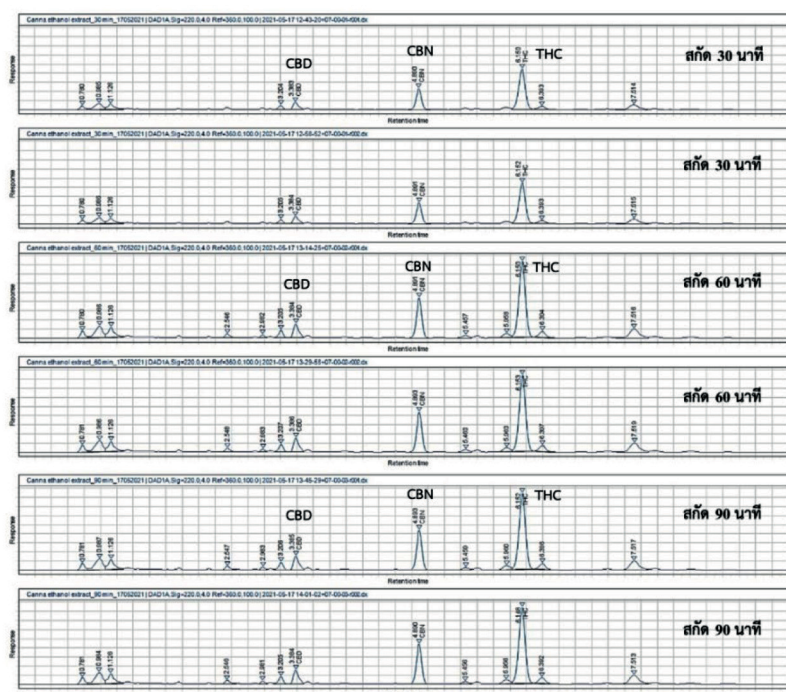
การศึกษานิตของตัวทำละลายในการสกัด ผลการศึกษาพบว่าเมื่อนำสารละลายที่ได้จากการสกัดใบกัญชาด้วย ethanol และ hexane วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ พบว่า พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ยของ peak สาร CBD, CBN และ THC จากการสกัดใบกัญชาด้วย ethanol ที่ retention time 3.35, 4.85 และ 6.10 นาที ตามลำดับ มีค่า 323.89, 1,036.74 และ 2,431.62 ซึ่งมากกว่าใบกัญชาที่สกัดด้วย hexane คือ มีพื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ยเท่ากับ 309.89, 1,006.44 และ 2,141.23 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ผลการสกัด CBD, CBN และ THC ในใบกัญชาด้วย ethanol และ hexane

ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในใบกัญชา จึงเลือกใช้ ethanol เป็นตัวทำละลายในการสกัดใบกัญชา

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด พบว่าสารละลายที่ได้จากการสกัดตัวอย่างใบกัญชา ซึ่งสกัดด้วยวิธีเดียวกันโดยการ reflux กับ ethanol แต่ละระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกัน เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC พบว่า สาร CBD, CBN และ THC ให้ retention time 3.39, 4.89 และ 6.15 นาที ตามลำดับ จากการสกัดด้วยระยะเวลา 30, 60 และ 90 นาที มีค่าดังนี้ คือ ค่าพื้นที่ใต้พีคของสาร CBD, CBN และ THC จากการสกัดด้วยระยะเวลา 30 นาที น้อยกว่าการสกัดด้วยระยะเวลา 60 และ 90 นาที ส่วนค่าพื้นที่ใต้พีคของสาร CBD, CBN และ THC จากการสกัดด้วยระยะเวลา 60 และ 90 นาที ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 4 และตารางที่ 3



ภาพที่ 4 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด CBD, CBN และ THC จากตัวอย่างใบกัญชา

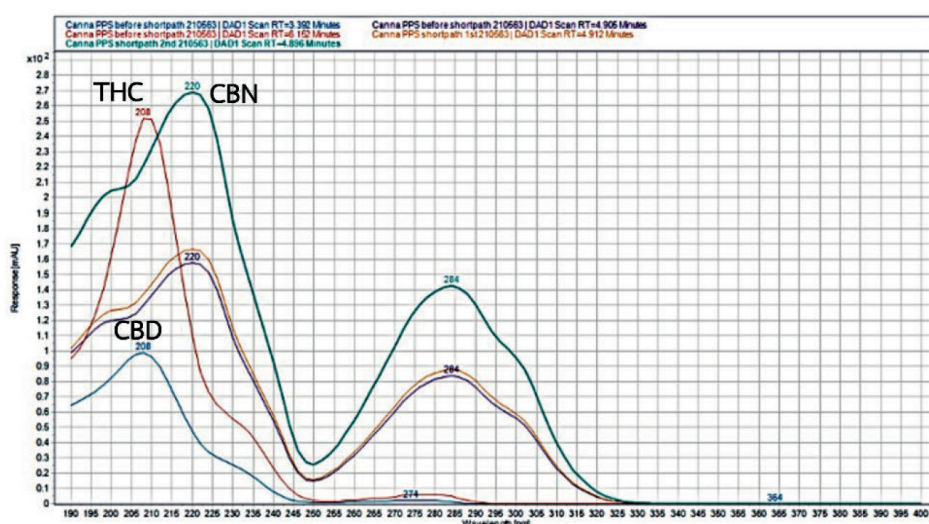
ตารางที่ 3 ค่าพื้นที่ใต้พีคของสาร CBD, CBN และ THC จากการสกัดด้วย ethanol ที่ระยะเวลา 30, 60 และ 90 นาที

ลำดับที่	ตัวอย่าง	ขวดที่	Retention time (นาที)/พื้นที่ใต้พีค		
			CBD	CBN	THC
1	Ethanol extract (30 นาที)	1	3.383/175.134	4.890/528.840	6.150/1243.732
2	Ethanol extract (30 นาที)	2	3.384/175.080	4.891/529.344	6.152/1243.689
3	Ethanol extract (60 นาที)	1	3.384/333.796	4.891/1009.748	6.150/2346.040
4	Ethanol extract (60 นาที)	2	3.386/333.899	4.893/1010.747	6.153/2348.429
5	Ethanol extract (90 นาที)	1	3.385/334.259	4.893/1012.480	6.152/2352.464
6	Ethanol extract (90 นาที)	2	3.384/333.998	4.890/1011.890	6.148/2350.904

ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในใบกัญชาจึงเลือกใช้ ethanol เป็นตัวทำละลายในการสกัดและใช้เวลาในการสกัด 60 นาที

ความยาวคลื่นในการตรวจวัดสาร CBD, CBN และ THC

จากการศึกษาการดูดกลืนแสง UV ของ CBD, CBN และ THC พบว่า $\lambda_{\max}$ ของสาร CBD และ THC มีค่าเท่ากับ 208 และ 274 นาโนเมตร ส่วน $\lambda_{\max}$ ของ CBN มีค่าเท่ากับ 220 และ 284 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 5 และเมื่อวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างกัญชาด้วยเครื่อง UHPLC โดยใช้ DAD เป็นเครื่องตรวจวัด ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร ไม่พบการซ้อนทับของ peak ของสารอื่น



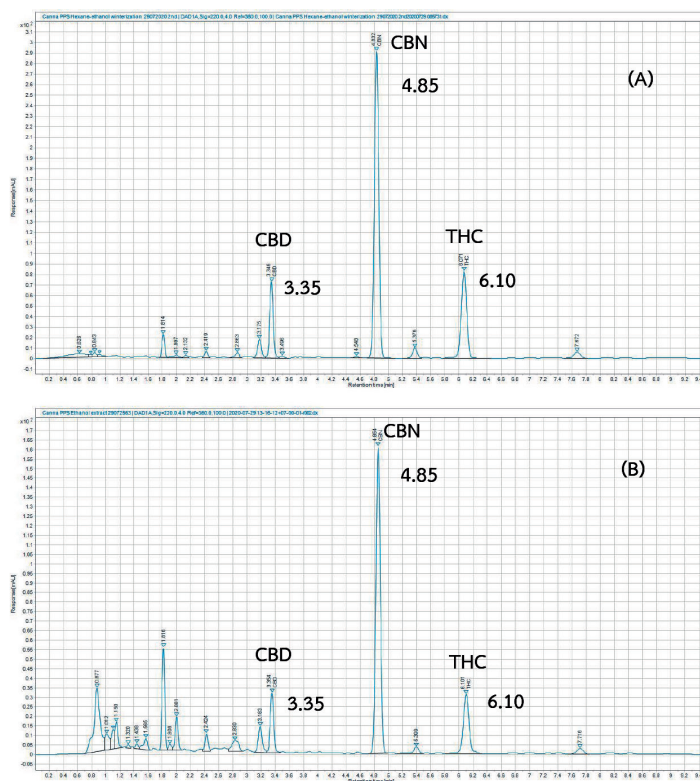
ภาพที่ 5 UV spectrum ของ CBD, CBN และ THC

ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในใบกัญชา จึงเลือกการตรวจวัดการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร

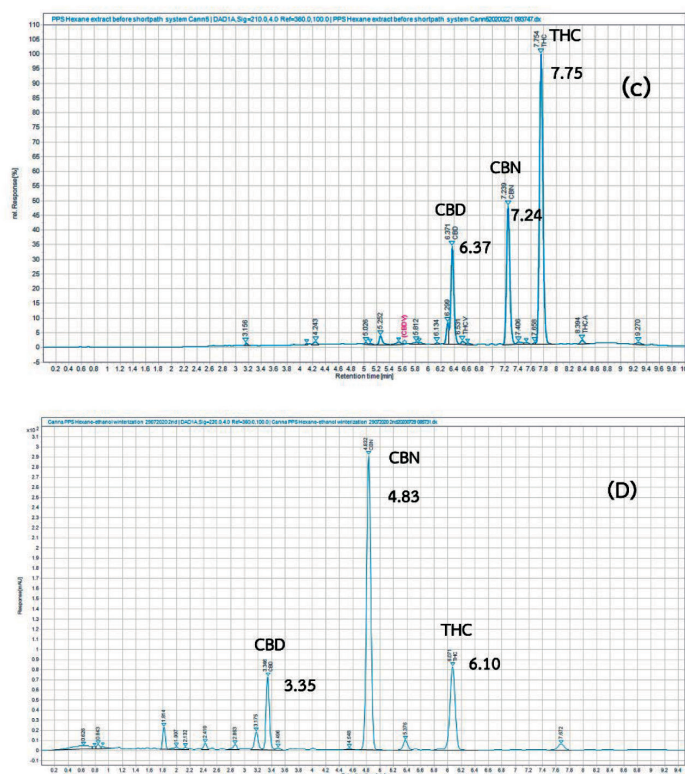
วัฏภาคคงที่ (Stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase)

วัฏภาคคงที่ จากการศึกษา UHPLC chromatographic fingerprint ของสารสกัด ethanol จากใบกัญชาและตรวจวัดด้วย DAD ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร โดยใช้ 0.1% ortho-phosphoric acid ในน้ำ และ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าเมื่อใช้ UHPLC column ชนิด ARC-18 (A), ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร UHPLC chromatogram ที่ได้ให้ peak ของ CBD, CBN และ THC ที่ retention time 3.35, 4.85 และ 6.10 นาที ตามลำดับ ซึ่งมีการแยกจากสิ่งเจือปน (impurity) อื่นอย่างชัดเจน แต่ UHPLC column ชนิด ARC-8 (B), ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 3.0 ไมโครเมตร ให้การแยกสารออกจากสิ่งเจือปนอื่นได้น้อยกว่า column ชนิด ARC-18 ดังแสดงในภาพที่ 6

วัฏภาคเคลื่อนที่ เมื่อปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่จากน้ำและ acetonitrile (C) เป็น 0.1% ortho-phosphoric acid ในน้ำ และ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile (D) พบว่า retention time ของสาร CBD, CBN และ THC เปลี่ยนจาก 6.37, 7.24 และ 7.75 นาที เป็น 3.35, 4.85 และ 6.10 นาที จะได้ peak shape ของ CBD, CBN และ THC ที่ดีขึ้น การแยกดีขึ้น และแยกจาก impurity อื่นอย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 6 Chromatogram ของสารละลายตัวอย่างใบกัญชา เมื่อใช้วัฏภาคคงที่ต่างชนิดกัน โดยที่ (A) คือ คอลัมน์ชนิด ARC-18 และ (B) คือ คอลัมน์ชนิด ARC-8

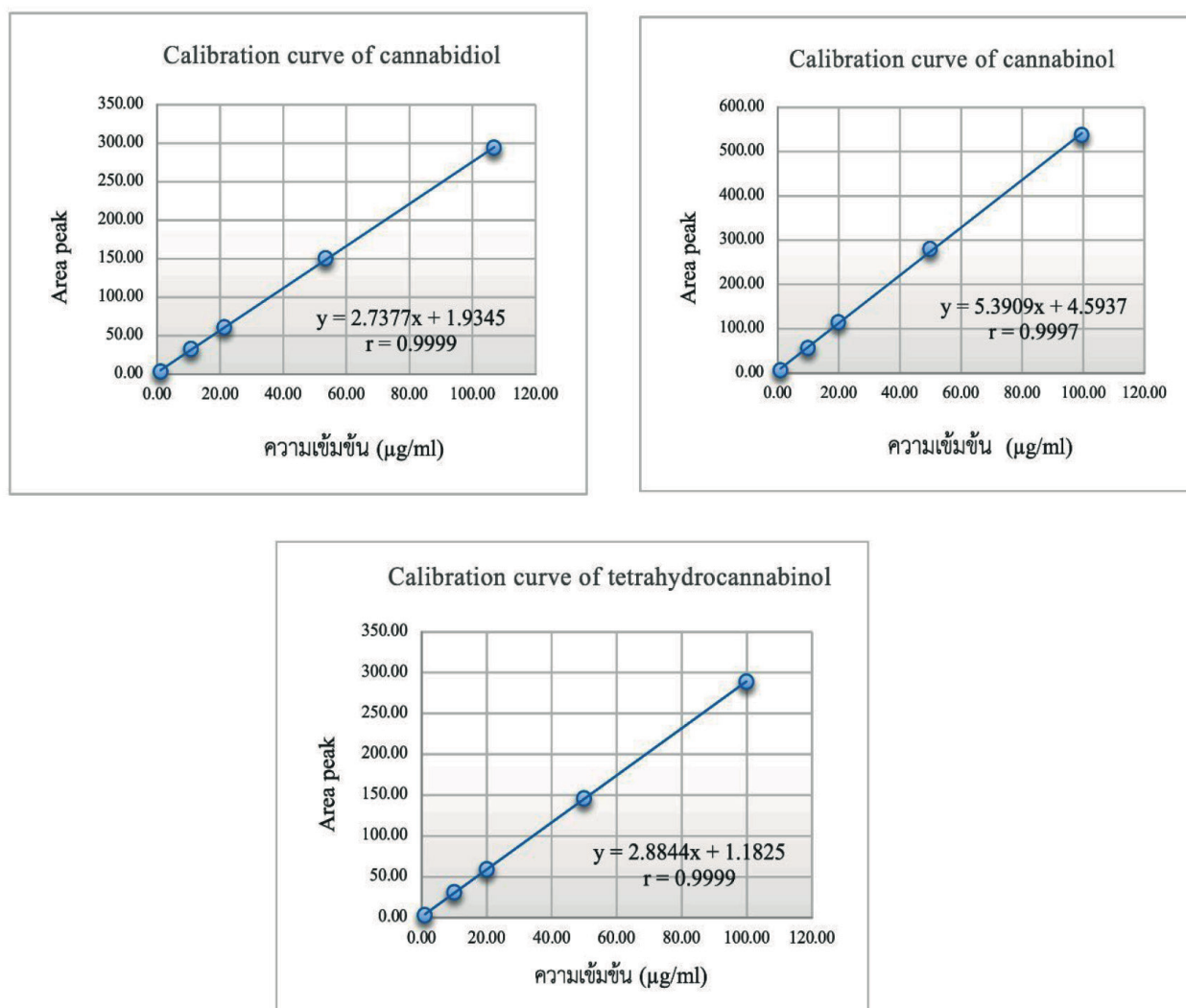


ภาพที่ 7 Chromatogram ของสารละลายตัวอย่างใบกัญชา เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ต่างกัน โดยที่ (C) คือ น้ำ และ acetonitrile ส่วน (D) คือ 0.1% ortho-phosphoric acid ในน้ำ และ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile

ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในกัญชาด้วยเครื่อง UHPLC จึงเลือกใช้ UHPLC column ชนิด ARC-18, ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร ใช้ 0.1% ortho-phosphoric acid ในน้ำ และ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจวัดด้วย DAD ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ความเป็นเส้นตรง (linearity) : จากกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีค พบว่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน CBD, CBN และ THC กับพื้นที่ใต้พีค มีลักษณะเป็นเส้นตรง โดยสารมาตรฐาน CBD มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.07–106.89 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 สารมาตรฐาน CBN มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.00–99.60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9997 และสารมาตรฐาน THC มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.00–99.90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 Calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน CBD, CBN และ THC ในช่วงความเข้มข้น 1.00–100.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

การทดสอบร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) และความเที่ยง (precision) เมื่อเติมสารละลายสารมาตรฐาน CBD, CBN และ THC ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ ลงใน sample blank วิเคราะห์ sample blank จำนวน 6 ซ้ำ และวิเคราะห์ spiked sample ระดับละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำ duplicate ตามลำดับ การเตรียม spiked sample ให้มีความเข้มข้น 50, 100, 150% ความเข้มข้นของ CBD, CBN และ THC ที่คำนวณได้เท่ากับร้อยละ 9.09, 16.67 และ 23.08 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง spiked sample พบว่าร้อยละของการคืนกลับของสาร CBD CBN และ THC อยู่ในช่วงร้อยละ 97.50–99.75, 97.77–100.89 และ 96.83–98.33 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

การทดสอบความเที่ยง (precision)

Repeatability precision เครื่องมือปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในตัวอย่างใบกัญชา พบว่ามีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.89, 0.55 และ 0.33 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5

การทดสอบ Intermediate precision, between-day วิเคราะห์ปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในตัวอย่างใบกัญชา พบว่ามีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.42, 0.51 และ 0.32 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ผลการศึกษา %recovery และ repeatability

สารที่วิเคราะห์	Sample blank		Spiked level		%recovery mean $\pm$ SD	%RSD	HORRAT
	($\mu\text{g/ml}$)	(%w/w)	(%)	(%w/w)			
CBD	14.40	0.07	50	9.09	97.50 $\pm$ 2.50	2.56	1.96
			100	16.67	97.70 $\pm$ 0.49	0.50	0.60
			150	23.08	99.75 $\pm$ 1.17	1.17	1.79
CBN	6.84	0.03	50	9.09	97.94 $\pm$ 1.58	1.62	1.23
			100	16.67	100.89 $\pm$ 0.76	0.75	0.89
			150	23.08	97.77 $\pm$ 0.26	0.27	0.41
THC	13.91	0.07	50	9.09	96.83 $\pm$ 0.38	0.39	0.30
			100	16.67	97.02 $\pm$ 0.74	0.76	0.90
			150	23.08	98.33 $\pm$ 0.96	0.97	1.47

เกณฑ์การยอมรับของ %recovery ตาม AOAC Peer-verified methods program on policies and procedures, Arlington, VA, USA (1998) คือ 95–105% และการยอมรับความเที่ยง ประเมินจาก HORRAT (< 2)

ตารางที่ 5 ผลการศึกษา intermediate precision between-day

สารที่วิเคราะห์ในตัวอย่างใบกัญชา	%RSD ของ Repeatability	%RSD ของ intermediate precision between-day
CBD	0.89	0.42
CBN	0.55	0.51
THC	0.33	0.32

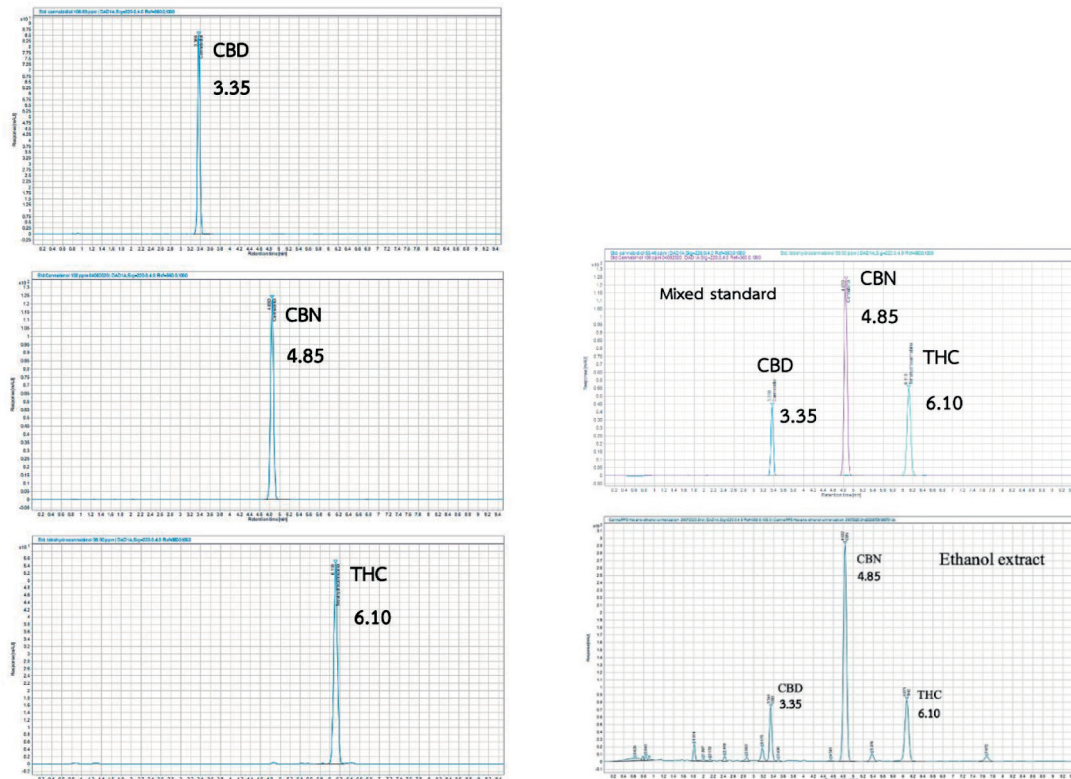
การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (**Limit of detection, LOD**) พบว่า LOD ของการวิเคราะห์ CBD, CBN และ THC เท่ากับร้อยละ 0.006, 0.009 และ 0.003 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (**limit of quantitation, LOQ**) พบว่า LOQ ของการวิเคราะห์ CBD, CBN และ THC เท่ากับร้อยละ 0.020, 0.032 และ 0.011 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ โดยมีค่า %RSD เท่ากับ 1.00, 1.19 และ 1.54 ตามลำดับ และร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 95.75–98.33, 95.51–98.21 และ 97.62–99.87 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการศึกษา limit of quantitation (LOQ)

สารที่วิเคราะห์	Spiked sample ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ (% w/w)	%recovery	%recovery mean $\pm$ SD	%RSD
CBD	0.96	0.020	97.15	96.91 $\pm$ 0.97	1.00
			95.75		
			98.33		
			96.20		
			97.65		
			96.39		
CBN	6.34	0.032	95.51	96.90 $\pm$ 1.16	1.19
			97.08		
			98.21		
			95.57		
			98.01		
			97.03		
THC	2.14	0.011	99.87	98.52 $\pm$ 1.52	1.54
			97.62		
			98.74		
			96.00		
			100.08		
			98.81		

การทดสอบความจำเพาะ (**Specificity**) จากการฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง พบว่า ภายใต้สภาวะ UHPLC ที่พัฒนาขึ้น สามารถแยกสาร CB, CBN และ THC ออกจากกันได้ และไม่มีการรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง โดยมีค่า retention time เท่ากับ 3.35, 4.85 และ 6.10 นาที ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 Chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน CBD, CBN และ THC และสารละลายตัวอย่างใบกัญชา

การวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในใบกัญชา

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในตัวอย่างใบกัญชา จำนวน 12 ตัวอย่าง พบว่าใบกัญชาพันธุ์ทางกระรอกภูพานเอสที1 (ST1) ทางเสือกลนครที่ที่1 (TT1) ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิลยูเอ1 (WA1) และตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี1 (RD1) มีปริมาณสาร THC ในระยะใบอ่อนสูงกว่าใบเฟสลาดและใบแก่ ส่วนปริมาณสาร CBD พบมากในใบแก่ของพันธุ์ RD1 ถึงร้อยละ 2.50 โดยน้ำหนัก ปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในตัวอย่างใบกัญชามีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.002–2.500, 0.002–0.023 และ 1.363–7.392 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ปริมาณ CBD, CBN และ THC มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.002–2.500, 0.002–0.023 และ 1.363–7.392 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในใบกัญชาด้วยวิธี UHPLC

ตัวอย่าง	พันธุ์/ระยะการเก็บเกี่ยว	น้ำหนัก ตัวอย่าง (g)	ความเข้มข้นของสารที่คำนวณได้จากสมการ เส้นตรงจาก Calibration curve ($\mu\text{g/ml}$)			ปริมาณสาร (% w/w)		
			CBD	CBN	THC	CBD	CBN	THC
1	ST1 ระยะใบอ่อน	1.0044	12.037	0.060	54.585	1.198	0.006	5.435
2	ST1 ระยะใบเฟสลาด	1.0033	14.160	0.081	55.360	0.882	0.002	1.379
3	ST1 ระยะใบแก่	1.0040	40.164	0.457	54.720	1.000	0.011	1.363
4	TT1 ระยะใบอ่อน	1.0049	0.284	0.121	74.284	0.028	0.012	7.392
5	TT1 ระยะใบเฟสลาด	1.0036	0.320	0.440	70.531	0.016	0.022	3.514

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ CBD CBN และ THC ในใบกัญชาด้วยวิธี UHPLC (ต่อ)

ตัวอย่าง	พันธุ์/ระยะการเก็บเกี่ยว	น้ำหนัก ตัวอย่าง (g)	ความเข้มข้นของสารที่คำนวณได้จากสมการ เส้นตรงจาก Calibration curve ($\mu\text{g/ml}$)			ปริมาณสาร (%w/w)		
			CBD	CBN	THC	CBD	CBN	THC
6	TT1 ระยะใบแก่	1.0045	0.082	0.640	67.380	0.002	0.016	1.677
7	WA1 ระยะใบอ่อน	1.0054	0.750	0.470	71.492	0.075	0.020	7.111
8	WA1 ระยะใบเพสลาด	1.0019	0.223	0.347	68.060	0.011	0.017	3.397
9	WA1 ระยะใบแก่	1.0050	0.139	0.454	49.694	0.007	0.023	2.472
10	RD1 ระยะใบอ่อน	1.0043	23.990	0.080	45.420	2.389	0.008	4.523
11	RD1 ระยะใบเพสลาด	1.0045	41.725	0.286	61.665	2.077	0.014	3.069
12	RD1 ระยะใบแก่	1.0046	50.222	0.424	44.182	2.500	0.021	2.199

วิจารณ์

กัญชาเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพเชิงพาณิชย์และมีประโยชน์ทั้งเป็นยาและเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ สามารถนำมาผสมในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น เครื่องดื่มสมุนไพร ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง มีรายงานการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ทางด้านเคมี เกษตวิทยา และพิษวิทยามากมายที่สนับสนุนการใช้ แต่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์นั้น ปัจจัยที่สำคัญที่ควรคำนึงถึงคือ ปัจจัยด้านคุณภาพของสมุนไพรเนื่องจากกัญชามีสารสำคัญกลุ่มแคนนาบินอยด์ คือ CBD, CBN และ THC ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบินอยด์ ในวัตถุดิบใบกัญชา โดยสกัดใบกัญชาแห้งน้ำหนัก 1 กรัม ด้วย ethanol ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยวิธี reflux เป็นเวลา 60 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 และนำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask แล้วกรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายดังกล่าว ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีของเครื่อง UHPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ชนิด ARC-18, ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร และใช้ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน deionized water และ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดด้วย DAD ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร จะปรากฏ peak ของ CBD, CBN และ THC ที่ retention time เท่ากับ 3.35, 4.85 และ 6.10 นาที ตามลำดับ ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่า calibration curve มีความเป็นเส้นตรง โดยสารมาตรฐาน CBD มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.07–106.89 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 สารมาตรฐาน CBN มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.00–99.60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9997 และสารมาตรฐาน THC มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.00–99.90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 ค่า %recovery อยู่ในช่วง 97.17–99.85, 97.92–101.89 และ 97.08–98.99% ตามลำดับ ค่า HORRAT เท่ากับ 0.60–1.96, 0.41–1.23 และ 0.30–1.47 ตามลำดับ LOD ของการวิเคราะห์ CBD, CBN และ THC เท่ากับร้อยละ 0.006, 0.009 และ 0.003 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ LOQ ของการวิเคราะห์ CBD, CBN และ THC เท่ากับร้อยละ 0.020, 0.032 และ 0.011 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ โดยมีค่า %RSD เท่ากับ 1.00, 1.19 และ 1.54 ตามลำดับ และร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 95.75–98.33, 95.51–98.21 และ 97.62–99.87 ตามลำดับ ปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในตัวอย่างวัตถุดิบใบกัญชา จำนวน

12 ตัวอย่าง สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการกำหนดปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในตัวอย่างวัตถุดิบ ใบกัญชาได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจปริมาณสารแคนนาบินอยด์ของตัวอย่างใบกัญชาในระยะเวลาเจริญเติบโตของใบที่แตกต่างกัน คือ ในระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ของกัญชาไทย 4 พันธุ์ ได้แก่ ทางกระรอกภูพานเอสที 1 (ST1) ทางเสือกลนครที่ 1 (TT1) ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิลยูเอ 1 (WA1) และตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี 1 (RD1) พบว่าปริมาณสาร THC ในระยะใบอ่อนสูงกว่าใบเพสลาดและใบแก่ในกัญชาอายุ 2 เดือน ส่วนปริมาณสาร CBD พบมากในใบแก่ของพันธุ์ RD1 ถึงร้อยละ 2.50 โดยน้ำหนัก ส่วนปริมาณสาร CBN พบในใบค่อนข้างน้อย เมื่อเปรียบเทียบพันธุ์กับปริมาณสารแคนนาบินอยด์ พบว่า WA1 และ TT1 มีปริมาณสาร THC และ CBN สูงกว่าพันธุ์อื่น ซึ่งปริมาณของ CBN จะแปรผันตามปริมาณสาร THC ที่สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าสาร CBN จะเป็นผลผลิตที่ได้จาก THC ในช่วงของการ decarboxylation ระหว่างการอบแห้งผ่านความร้อน ซึ่งถ้าหากมีปริมาณ THC ที่สูง ปริมาณของ CBN จะสูงไปด้วย^(10, 11) ส่วนปริมาณสาร CBD พบมากเพียง 2 พันธุ์ คือ RD1 และ ST1 ซึ่งจากข้อมูลปริมาณสารสำคัญที่อยู่ในใบค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ศึกษาปริมาณสารแคนนาบินอยด์ในใบ ซึ่งพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 1.10–2.10%⁽¹²⁾ จากข้อมูลสามารถนำไปกัญชาไทยในแต่ละพันธุ์ไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างเหมาะสม รวมถึงเป็นข้อมูลในการพัฒนาพันธุ์กัญชาเพื่อเพิ่มมูลค่าของใบกัญชาทางเศรษฐกิจต่อไป

UHPLC เป็น High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่มีการพัฒนาเพื่อให้มีประสิทธิภาพการแยกสาร ความไวในการแยกสารที่ดีขึ้น ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่น้อยลง และลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ คือ เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในใบกัญชาด้วยวิธี UHPLC ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ เปรียบเทียบกับการหาปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในกัญชาด้วยวิธี HPLC/UV⁽⁷⁾ และวิธี HPLC-DAD⁽⁸⁾ พบว่าวิธี HPLC/UV และวิธี HPLC-DAD ใช้เวลาวิเคราะห์ตัวอย่างกัญชาต่อ 1 ตัวอย่าง นาน 22 นาที และ 50 นาที ตามลำดับ ทำให้สิ้นเปลืองวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) ส่วนวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 10 นาที ซึ่งรวดเร็วและประหยัดวัฏภาคเคลื่อนที่ ดังนั้นจึงเลือกใช้เครื่อง UHPLC ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในใบกัญชา จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ที่พัฒนาขึ้น พบว่า %recovery จากการวิเคราะห์ spiked sample อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ (95–105%) ซึ่งแสดงถึงความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ และค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ (< 2) ซึ่งแสดงถึงความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น วิธีดังกล่าวจึงมีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร CBD, CBN และ THC เพื่อใช้ควบคุมปริมาณสารของใบกัญชาต่อไปได้ ในเบื้องต้นจะนำวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ตรวจวิเคราะห์วัตถุดิบจากแหล่งปลูกต่างๆ เพื่อให้มีข้อมูลหลากหลายเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาพันธุ์กัญชาไทยต่อไป

สรุป

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบินอยด์ในใบกัญชาด้วยวิธี UHPLC และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ผลการศึกษาพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องแม่นยำ สะดวก รวดเร็ว และประหยัดสารเคมีที่ใช้ใน mobile phase จึงนำวิธีที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบินอยด์ในตัวอย่างใบกัญชาไทย 4 พันธุ์ ทำให้ได้ข้อมูลซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาพันธุ์กัญชา และผลิตภัณฑ์ผสมกัญชาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยนี้ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ห้องปฏิบัติการฟิสิกส์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัยเพื่อแยกสารสำคัญจากสมุนไพรทุกท่าน ที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. นันทวัน บุญยะประภัศร, อรุณช โชคชัยเจริญพร, บรรณธิการ. สมุนไพรไม้พุ่มบ้าน. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2542.
2. Mechoulam R, Hanuš LO, Pertwee R, Howlett AC. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat Rev Neurosci* 2014; 15(11): 757-64.
3. Velasco G, Sánchez C, Guzmán M. Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(6): 436-44.
4. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 424 (พ.ศ. 2564) เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 138 ตอนพิเศษ 45 ง (วันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2564). หน้า 32.
5. สำนักงานจัดการกัญชาและกระท่อมทางการแพทย์แผนไทย. Infographic 16 ตำรับยาแผนไทยที่มีกัญชาปรุงผสมอยู่. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 2 ก.ค. 2564]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://ockt.dtam.moph.go.th/index.php/cannabis-formula/200-infographic-16>.
6. ศราวุธ ระดาพงษ์, พราว ศุภจริยวัตร, เมธิณ ผดุงกิจ.ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของกัญชา. ว. กรมวิทย์ พ 2564; 63(1) : 219-32.
7. Veniero G, Lucia D, Fiorenza F, Rino F, Elisa S, Giovanna T. Determination of primary active constituents in Cannabis preparations by high-resolution gas chromatography/flame ionization detection and high-performance liquid chromatography/UV detection. *Anal Chim Acta* 2002; 468(2): 245-54.
8. Ciolino LA, Ranieri TL, Taylor AM. Commercial cannabis consumer products part 2 : HPLC-DAD quantitative analysis of cannabis cannabinoids. *Forensic Sci Int* 2018; 289 : 438-47.
9. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
10. Hazekamp A, Fishedick JT, Díez ML, Lubbe A, Ruhaak RL. Chemistry of cannabis. In : Mander L, Liu HW, editors. *Comprehensive natural products II*. Oxford, UK: Elsevier Science; 2010. p. 1033-1084.
11. Russo EB, Marcu J. Cannabis pharmacology: the usual suspects and a few promising leads. *Adv Pharmacol* 2017; 80 : 67-134.
12. Dan Jin, Kaiping Dai, Zhen Xie & Jie Chen. Secondary metabolites profiled in cannabis inflorescences, leaves, stem barks, and roots for medicinal purposes. *Sci Rep* 2020; 10(1) : 3309. (14 pages).

Development and Method Validation of Cannabinoid Contents In *Cannabis sativa* L. Leaves by Ultra High Performance Liquid Chromatography

Thanawat Thongchin Sorrapetch Marsud Peradhama Thiemthieprat Sayan Ruengkhet Sakwichai Ontong Phichet Banyati Siriwan Chaisomboonpan and Aussavashai Shuayprom
Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Cannabis (*Cannabis sativa* L.) has been used to treat several diseases since the ancient time. Tetrahydrocannabinol (THC) is the major psychoactive compound and the other non-psychoactive ingredients are Cannabidiol (CBD) and Cannabinol (CBN). THC has been used for pain relief, reducing nausea from chemotherapy and muscle contraction treatment. CBD has antiepileptic mechanism, relieve pain and neuroprotective property for Parkinson's disease, while CBN has a potential use for anti-cancer therapy. Cannabis have been used as active ingredient of several drugs and products in the markets. However, the appropriate analytical methods for quality control of those compounds are still limited. This study aimed to develop analytical methods for quantification assessment of CBD, CBN and THC in cannabis leaf samples using the Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) technique. Samples were prepared by refluxing in ethanol, filtering and evaporating until dry. The residue was redissolved and adjusted with methanol and injected into UHPLC system. Linearity was established for CBD, CBN and THC at concentration range of 1.07–106.89, 1.00–99.60 and 1.00–99.90 µg/ml, respectively, with a determination correlation coefficient (r) of 0.999. The %recovery was in the range of 96.83–100.89% and HORRAT was in the range of 0.30–1.96. The limit of detection (LOD) of CBD, CBN and THC were 0.006, 0.009, and 0.003 %w/w, respectively, while limit of quantitation (LOQ) was 0.020, 0.032, and 0.011 %w/w, respectively. It has been shown that the developed method is suitable and can be used to analyze the content of CBD, CBN and THC in cannabis leaves. Therefore, the appropriate specification of cannabinoid contents (CBD, CBN and THC) in cannabis leaf extract can be established.

Keywords: Cannabis, CBD, CBN, THC, UHPLC

ปริมาณสารแคนนาบินอยด์ในระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันของใบกัญชาพันธุ์ไทย

สรเพชร มาสุต¹ ธนวัฒน์ ทองจีน¹ กรวิชัย สมคิด¹ ภาณุวิชญ์ พูลทรัพย์¹ ปภาวดี สุนันทบุตร¹
กชพร โชติมนธธรรม¹ ทิพวรรณ ปรีกมานนท์¹ ราตรี พระนคร² วรรณวิภา พันธะ² พิเชฐ บัญญัติ¹
และศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์¹

¹กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

²มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร อำเภอพังโคน สกลนคร 47160

บทคัดย่อ กัญชามีสารหลักเป็นกลุ่มแคนนาบินอยด์ โดยสารที่มีฤทธิ์ต่อจิตประสาท คือ THC และสารที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท ได้แก่ CBN และ CBD ซึ่งกลุ่มสารแคนนาบินอยด์มักพบในช่อดอกของกัญชาและยังสามารถพบได้ในส่วนของใบอีกด้วย การนำใบกัญชาไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ยังไม่มีข้อมูลสัดส่วนของสารสำคัญที่ชัดเจนโดยเฉพาะกัญชาพันธุ์ไทย ดังนั้นในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจปริมาณสารแคนนาบินอยด์ด้วยวิธี Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) ในระยะการเจริญเติบโตของใบที่ต่างกัน ได้แก่ ในระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ของกัญชาไทย 4 พันธุ์ ได้แก่ ทางกระรอกภูพานเอสที1 (ST1) ทางเสือสกลนครทีที1 (TT1) ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิลยูเอ1 (WA1) และตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี1 (RD1) พบว่าใบเพสลาดของกัญชาอายุ 2 เดือน พันธุ์ ST1 และ RD1 มีน้ำหนักต่อใบทั้งใบสดและใบแห้งสูงกว่าพันธุ์อื่น และพบว่าพันธุ์ RD1 มีความยาวก้านใบในช่วงใบเพสลาดและใบแก่มากกว่าพันธุ์อื่น ส่วนความยาวและความกว้างของใบมีค่าไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้พบสาร THC มีปริมาณสูงสุดในระยะใบอ่อนของใบกัญชาอายุ 2 เดือน ส่วนปริมาณสาร CBD พบสูงสุดในใบอ่อนของพันธุ์ RD1 ถึงร้อยละ 3.83 โดยน้ำหนัก ที่อายุ 1 เดือน ส่วนปริมาณสาร CBN พบในใบค่อนข้างน้อย ข้อมูลนี้ช่วยให้การนำใบกัญชาพันธุ์ไทยไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างเหมาะสม รวมทั้งการพัฒนาพันธุ์กัญชาเพื่อเพิ่มมูลค่าของใบกัญชาทางเศรษฐกิจ

คำสำคัญ: กัญชา, พันธุ์, สารแคนนาบินอยด์

Corresponding author E-mail: Sorrapetch.m@dmsc.mail.go.th

Received: 15 July 2021

Revised: 3 September 2021

Accepted: 7 September 2021

บทนำ

กัญชา เป็นพืชล้มลุกชนิดหนึ่ง อยู่ในวงศ์ Cannabidaceae มีส่วนประกอบของสารเคมีมากกว่า 450 ชนิด โดยมากกว่า 60 ชนิด เป็นสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ (cannabinoids) มีองค์ประกอบหลักคือ Tetrahydrocannabinol (THC) และสารชนิดอื่น ๆ เช่น Cannabinol (CBN), Cannabidiol (CBD), Cannabichromene (CBC), Cannabigerol (CBG) เป็นต้น^(1, 2) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 424) พ.ศ. 2564 เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย ลงวันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2564 ได้ปลดล็อกกัญชา-กัญชง จากบัญชียาเสพติดให้โทษ รวมถึงการอนุญาตให้นำใบซึ่งไม่มียอดหรือช่อดอกติดมาด้วย กิ่ง ก้าน ราก เปลือก ลำต้น เส้นใย ที่ไม่จัดเป็นยาเสพติดประเภทที่ 5 มาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ การศึกษาวิจัย ผลิตภัณฑ์สุขภาพ รวมทั้งให้ประชาชนสามารถใช้ส่วนต่างๆ ของกัญชา-กัญชงไปประกอบอาหาร ทำยารักษาโรคได้⁽³⁾ ซึ่งปัจจุบันสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้ออกใบอนุญาตปลูกกัญชาสำหรับองค์กรต่าง ๆ ไปแล้วจำนวน 2,210 ราย มีผู้ปลูกกัญชาทั้งพันธุ์ต่างประเทศและพันธุ์ไทย อย่างไรก็ตามกัญชาพันธุ์ไทยยังไม่มีข้อมูลชัดเจนในเรื่องของสายพันธุ์โดยทางสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ร่วมกับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร ได้ทำการศึกษาพันธุ์กัญชาพันธุ์ไทยจำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ ทางกระรอกภูพานเอสที1 ทางเสือสกลนครทีที1 ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิลยูเอ1 และตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี1 โดยทำการศึกษาทั้งลักษณะฟีโนไทป์ จีโนไทป์ และเคมีไทป์ในส่วนของช่อดอก ซึ่งได้ขึ้นทะเบียนพันธุ์กับกรมวิชาการเกษตร พบว่ากัญชาพันธุ์ไทย 4 พันธุ์ มีลักษณะเด่นถึง 3 แบบ แบบที่ 1 เป็นกัญชาที่ให้สาร THC สูง ได้แก่ พันธุ์ WA1 และ TT1 แบบที่ 2 เป็นกัญชาที่ให้สาร THC และ CBD ในอัตราส่วนที่เท่ากัน (THC : CBD = 1 : 1) ได้แก่ พันธุ์ ST1 และกัญชาแบบที่ 3 ที่ให้สาร CBD สูง ได้แก่ พันธุ์ RD1 เมื่อได้พันธุ์ที่ถูกต้องแล้วจะสามารถนำไปส่งเสริมให้กับเกษตรกร วิสาหกิจชุมชนต่างๆ นำไปปลูกได้และนำส่วนต่างๆ ของกัญชา (ยกเว้นช่อดอกและเมล็ด) ไปใช้ประโยชน์ได้ โดยเฉพาะ “ใบ”

ใบกัญชาเป็นส่วนประกอบหนึ่งของกัญชาที่มีสารสำคัญในกลุ่ม Cannabinoids อยู่ โดยสารที่เป็นที่รู้จักกันดีคือ THC, CBD และ CBN ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ กระตุ้นระบบประสาท สมอง และภูมิคุ้มกันต่างๆ มีการใช้ประโยชน์ของใบกัญชาในการประกอบอาหาร เพื่อให้ได้รสชาติที่ดีขึ้นและใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตยาแผนโบราณหลายตำรับ เช่น ยาอัคคินิวคณะ ยาสุไสยาสน์ ยาแก้สัณห์ฆาตกล่อนแห้ง ยาแก้โรคจิต ยาอัมฤตโอสถ ยาไพศาลี ยาโกลยาสาลี ยาทำลายพระสุเมรุ และยาทัพยาคิณณ เป็นต้น⁽⁴⁾ ซึ่งการนำใบกัญชามาใช้ประกอบอาหารและเป็นส่วนประกอบการผลิตยาแผนโบราณหลายตำรับยังไม่มีข้อมูลสำคัญและยังไม่ทราบชนิดของพันธุ์กัญชาที่นำมาใช้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระยะการเจริญเติบโตของใบต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสาร cannabinoid ของกัญชาไทย 4 พันธุ์ เพื่อหาปริมาณสารสำคัญที่อยู่ในใบและสามารถนำใบกัญชาพันธุ์ไทยของแต่ละพันธุ์ไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างเหมาะสม รวมถึงเป็นข้อมูลในการพัฒนาพันธุ์กัญชาเพื่อเพิ่มมูลค่าของใบกัญชาทางเศรษฐกิจต่อไป

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์กัญชาไทยที่ใช้ในการศึกษา 4 พันธุ์ ได้แก่ ทางกระรอกภูพานเอสที1 (ST1) ทางเสือสกลนครทีที1 (TT1) ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิลยูเอ1 (WA1) และตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี1 (RD1) ซึ่งทั้ง 4 พันธุ์มีการศึกษาวิจัยทางด้านลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เคมี และพันธุกรรมแล้ว เป็นจำนวน 3 รุ่น ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2562 โดยได้รับใบอนุญาตปลูกตามแบบ ย.ส. 4/5-2 หนังสือสำคัญที่ 4/2562 ปลูกโดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร ทำการวิจัยร่วมกับกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปัจจุบันทำการปลูกเป็นรุ่นที่ 4 ณ สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยได้รับใบอนุญาตปลูกตามแบบ ย.ส. 4/5-2 หนังสือสำคัญที่ 90/2564 จำนวน 130 ต้น

วัสดุปลูก ได้แก่ พืชมอส (คลาสแมน®), โคโคพีท (บริษัทโคโค อะกรีคัลเจอร์ จำกัด), เวอร์มิคูไลท์ (บริษัท Speedy access) ขนาด 2-4 มิลลิเมตร, เพอร์ไลท์ (บริษัท Speedy access) 4-8 มิลลิเมตร, กาบมะพร้าวสับ, ปุ๋ยไฮโดรโปนิกส์ (สูตรที่ 1 สำหรับเร่งการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น และสูตรที่ 2 สำหรับเร่งการออกดอก), กระจก ขนาด 24 นิ้ว

สารมาตรฐาน ได้แก่ Cannabidiol (CBD) ความบริสุทธิ์ $\geq 99.9\%$ (THC Pharm GmbH, Batch : S19-014) มีลักษณะเป็นผงสีขาว, Cannabinol (CBN) ความบริสุทธิ์ $\geq 99.6\%$ (THC Pharm GmbH, Batch : DWO180.707-1) มีลักษณะเป็นผงสีขาว, Tetrahydrocannabinol (THC) ความบริสุทธิ์ $\geq 98.6\%$ (THC Pharm GmbH, Batch : DWO181.121-1) มีลักษณะเป็นของเหลวใส

สารเคมีและตัวทำละลาย ได้แก่ ethanol และ hexane (AR grade, RCI Labscan, Ireland), methanol (HPLC grade, Honeywell, United States of America), acetonitrile (HPLC grade, Fisher Chemical, England), น้ำปราศจากอิออน (deionized water)

เครื่องมือ ได้แก่ ตู้อบแห้ง (Hot air oven) Memmert® รุ่น ULM 600, เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter) Gendo® รุ่น PL-700 PCS, เครื่องบดปั่น รุ่น RT 34 (ChyunTseh Industrial), เครื่องระเหยสุญญากาศ ประกอบด้วย อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิรุ่น SB-1000 (Eyela), เครื่อง rotavapor รุ่น N-1000 (Eyela), เครื่อง Aspirator รุ่น A-3S (Eyela) และเครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน รุ่น CA-101 (Eyela), เครื่อง Ultra High Performance Liquid Chromatography-DAD detector (Agilent 1290 Infinity II, Germany), เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 4 ตำแหน่ง (Precisa Analytical Balance, Switzerland), เครื่องวัดความยาว (vernier calipers)

วัสดุวิทยาศาสตร์ ได้แก่ คอลัมน์ชนิด ARC-18 ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร (Restek, United States of America), PVDF membrane filter 0.2 ไมโครเมตร และ 0.45 ไมโครเมตร, Nylon filter syringe 0.2 ไมโครเมตร, กระดาษกรองเบอร์ 4 และเครื่องแก้ว

วิธีการปลูก

ดำเนินการปลูกกัญชาในโรงเรือนแบบ Green House ขนาดกว้าง 6 เมตร ยาว 36 เมตร และสูง 2.8 เมตร ตามมาตรฐานการปลูกและการเก็บเกี่ยวที่ดีของพืชสมุนไพร Good Agricultural Practices (GAP) ใช้วัสดุปลูกประกอบด้วย กาบมะพร้าวสับ พืชมอส เพอร์ไลท์ เวอร์มิคูไลท์ โคโคพีท ในอัตราส่วน 2 : 1 : 1 : 1 : 1 ตามลำดับ นำมาผสมให้เข้ากัน ตรวจวิเคราะห์โลหะหนักในดินก่อนปลูกพบว่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน การปลูกมีการจัดการให้น้ำและธาตุอาหาร โดยใช้ปุ๋ยไฮโดรโปนิกส์ จำนวน 2 สูตร คือ

สูตรที่ 1 สำหรับเร่งการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น เริ่มให้ปุ๋ยตั้งแต่เริ่มปลูกจนกระทั่งต้นกัญชาอายุครบ 1 เดือน

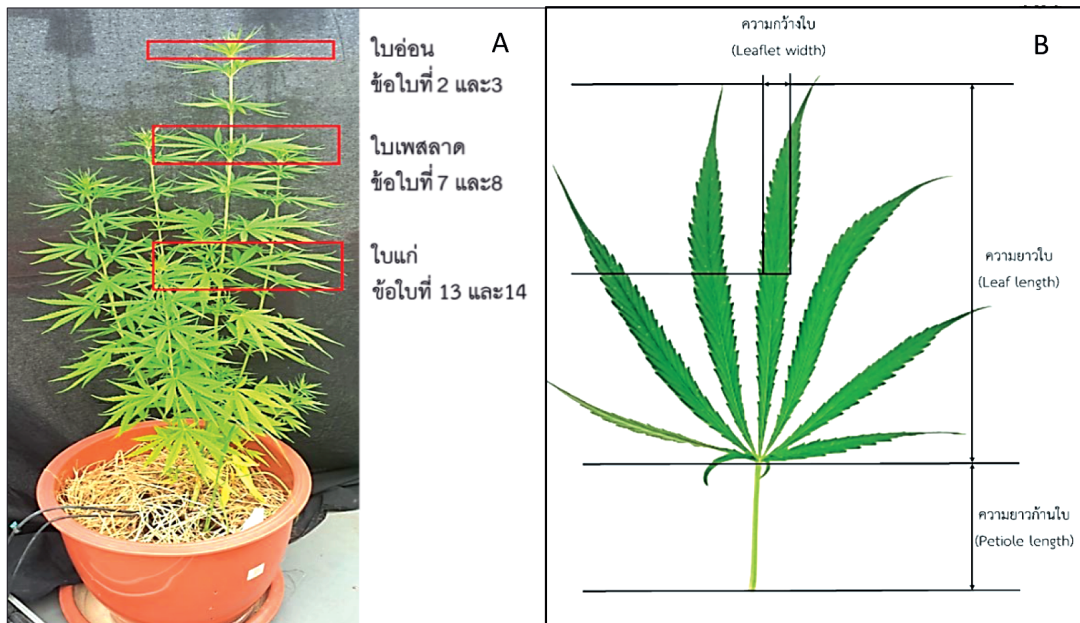
สูตรที่ 2 สำหรับเร่งการออกดอก เริ่มให้ปุ๋ยเมื่อต้นกัญชาอายุได้ 1 เดือน จนถึงระยะออกดอก

วิธีให้ปุ๋ยโดยระบบน้ำหยด (Drip irrigation) มีการปรับสภาพค่า pH และการนำไฟฟ้าของธาตุอาหาร เพื่อให้ได้ค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญของต้นกัญชาในแต่ละช่วงของการเจริญเติบโต วางแผนการทดลองการปลูกกัญชาแต่ละพันธุ์แบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD)⁽⁵⁾ ประกอบด้วยกัญชา 4 พันธุ์ 1 ต้น ต่อ 1 กระถาง ดังนี้

กัญชาพันธุ์ที่ 1	หางกระรอกภูพานเอสที 1 (ST1)	จำนวน 22 ต้น
กัญชาพันธุ์ที่ 2	หางเสือสกลนครที 1 (TT1)	จำนวน 22 ต้น
กัญชาพันธุ์ที่ 3	ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิลยูเอ 1 (WA1)	จำนวน 22 ต้น
กัญชาพันธุ์ที่ 4	ตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี 1 (RD1)	จำนวน 22 ต้น

การศึกษาการเจริญเติบโตของใบอ่อน (young leaves) ใบเพสลาด (Immature leaves) และใบแก่ (mature leaves) ของกัญชา 4 พันธุ์

โดยสุ่มเก็บตัวอย่างใบกัญชาไทย 4 พันธุ์ เมื่อต้นกัญชาอายุได้ 1 และ 2 เดือน หลังปลูก โดยแต่ละพันธุ์เก็บ ใบอ่อนจำนวน 20 ใบ (ตำแหน่งข้อใบที่ 2 และข้อที่ 3 จากปลายยอด) ใบเพสลาด 20 ใบ (ตำแหน่งข้อใบที่ 7 และข้อที่ 8 จากปลายยอด) และใบแก่ 20 ใบ (ตำแหน่งข้อใบที่ 13 และข้อที่ 14 จากปลายยอด) ดังแสดงในภาพภาพที่ 1 ทำการวัดน้ำหนักใบสด น้ำหนักใบแห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ความกว้างใบ ความยาวใบ และความยาวของก้านใบ ใช้ไม้บรรทัด และ vernier calipers ในการวัด ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ตำแหน่งของใบอ่อน ใบแก่ และใบเพสลาด (A) ความกว้างใบ ความยาวใบ และความยาวของก้านใบ (B) ของกัญชาพันธุ์ไทยที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

การศึกษาปริมาณสารแคนนาบินอยด์ของใบกัญชาไทย 4 พันธุ์

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างใบกัญชาทั้งใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ ของแต่ละพันธุ์ที่ปลูกจำนวน 20 ต้น จากต้นกัญชาที่มีอายุได้ 1 และ 2 เดือน หลังปลูก ให้ได้ประมาณ 20 กรัมต่อน้ำหนักสด นำใบที่เก็บได้มาอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อแห้งแล้วนำมาบดให้ละเอียด ทำการชั่งตัวอย่างใบกัญชาจำนวน 1,000 มิลลิกรัม นำมาสกัดตัวอย่างด้วย ethanol 95% ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ด้วยวิธี reflux เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำมากรอง และนำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้ง จากนั้นละลายกลับและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask นำสารละลายตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ ได้แก่สาร THC CBD และ CBN มีขั้นตอนดังนี้

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน CBD CBN และ THC โดยนำสารมาตรฐาน CBD CBN และ THC มาชั่งน้ำหนักให้ได้ 10, 25 และ 100 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 10, 25 และ 50 มิลลิลิตร ด้วย volumetric flask ตามลำดับ จะได้ stock สารละลายมาตรฐาน CBD CBN และ THC ที่ความเข้มข้น 1,000 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐาน ปริมาตร 1,000, 1,000 และ 500 ไมโครลิตร ตามลำดับ ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol ได้ความเข้มข้น 1, 10, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปสร้างกราฟมาตรฐานต่อไป

สภาวะของระบบโครมาโทกราฟี : วัฏภาคคงที่ (stationary phase) ใช้ UHPLC column ชนิด ARC-18 ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส, วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) A: 0.1% ortho-phosphoric acid ในน้ำ B: 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile

การเตรียม 0.1% ortho-phosphoric acid ในน้ำกลั่น (deionized water) : ปิเปต 0.1% ortho-phosphoric acid ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ลงในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

การเตรียม 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile : ปิเปต 0.1% ortho-phosphoric acid ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ลงใน acetonitrile และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จนครบ 1,000 มิลลิลิตร

ปริมาตรการฉีด 5 ไมโครลิตร, อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตร/นาที, ตรวจวัดสาร Diode array detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS version 16.0 ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)⁽⁶⁾ ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.01$

ผล

การศึกษาระยะการเจริญของกัญชาพันธุ์ไทย 4 พันธุ์ ที่อายุ 1 เดือนหลังปลูก

ผลจากการศึกษาระยะการเจริญของกัญชาพันธุ์ไทย 4 พันธุ์ ที่อายุ 1 เดือน หลังปลูก ในระยะใบอ่อนพบว่า กัญชาพันธุ์ทางกระรอกภูพานเอสที1 (ST1) มีน้ำหนักใบสดต่อใบเท่ากับ 0.985 กรัม ซึ่งมากกว่าพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 1 รองลงมา คือ พันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี1 (RD1) มีน้ำหนักใบสดต่อใบเท่ากับ 0.770 กรัม ในขณะที่น้ำหนักใบแห้งพันธุ์ RD1 และ ST1 มีน้ำหนักใบแห้งต่อใบมากที่สุดเท่ากับ 0.224 และ 0.221 กรัม ตามลำดับ แตกต่างจากพันธุ์ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิลยูเอ1 (WA1) และพันธุ์ทางเสือสกลนครที่ที1 (TT1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

ความยาวใบพบว่าพันธุ์ TT1 RD1 และ ST1 มีค่าเท่ากับ 8.66, 8.58 และ 8.18 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกัน ส่วนพันธุ์ WA1 มีความยาวใบสั้นที่สุด มีค่าเท่ากับ 7.35 เซนติเมตร ความกว้างของใบพบว่าพันธุ์ TT1 และ WA1 มีความกว้างของใบมากที่สุดและแตกต่างจากพันธุ์อื่น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.00 และ 0.87 เซนติเมตร ตามลำดับ ในส่วนความยาวก้านใบพบว่า พันธุ์ ST1 มีความยาวก้านใบมากกว่าพันธุ์อื่น ๆ มีค่าเท่ากับ 1.05 เซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 2 ในระยะใบเพสลาด พบว่ากัญชาพันธุ์ ST1 TT1 และ RD1 มีน้ำหนักใบสดเท่ากับ 1.790, 1.781 และ 1.633 กรัม มากกว่าพันธุ์ WA1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ในขณะที่น้ำหนักใบแห้งพบว่าพันธุ์ RD1 และ ST1 มีน้ำหนักใบแห้งต่อใบมากที่สุดเท่ากับ 0.454 และ 0.443 กรัม ตามลำดับ แตกต่างจากพันธุ์ WA1 และพันธุ์ TT1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ความยาวใบพบว่าพันธุ์ TT1 WA1 และ ST1 มีค่าเท่ากับ 17.13, 16.87 และ 15.39 เซนติเมตร ตามลำดับ ไม่แตกต่างกัน ส่วนพันธุ์ RD1 มีความยาวใบสั้นที่สุด มีค่าเท่ากับ 14.35 เซนติเมตร

ความกว้างของใบพบว่าพันธุ์ WA1 มีความกว้างใบมากที่สุดเท่ากับ 2.89 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และในส่วนความยาวก้านใบพบว่า พันธุ์ WA1 มีความยาวก้านใบมากกว่าพันธุ์อื่น ๆ โดยมีค่าเท่ากับ 5.36 เซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 2 ในระยะใบแก่ พบว่ากัญชาพันธุ์ ST1 มีน้ำหนักใบสดมากที่สุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.832 กรัม โดยมากกว่าพันธุ์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) อีกทั้ง

ยังพบว่าพันธุ์ ST1 มีน้ำหนักใบแห้งต่อใบมากที่สุดเท่ากับ 0.406 กรัม ซึ่งไม่แตกต่างจากพันธุ์ TT1 และพันธุ์ WA1 ที่มีน้ำหนักใบแห้งต่อใบเท่ากับ 0.402 และ 0.362 กรัม ตามลำดับ

ความยาวของใบพบว่าพันธุ์ WA1 และ RD1 มีความยาวใบไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าเท่ากับ 14.02 และ 13.32 เซนติเมตร ตามลำดับ ความกว้างของใบพบว่าพันธุ์ TT1 และพันธุ์ RD1 มีความกว้างใบมากที่สุดเท่ากับ 1.89 และ 1.70 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และในส่วนของความยาวก้านใบพบว่า พันธุ์ WA1 และ ST1 มีความยาวก้านใบมากกว่าพันธุ์อื่นๆ มีค่าเท่ากับ 4.59 และ 4.37 เซนติเมตร ตามลำดับ แตกต่างจากพันธุ์ RD1 และ TT1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 2

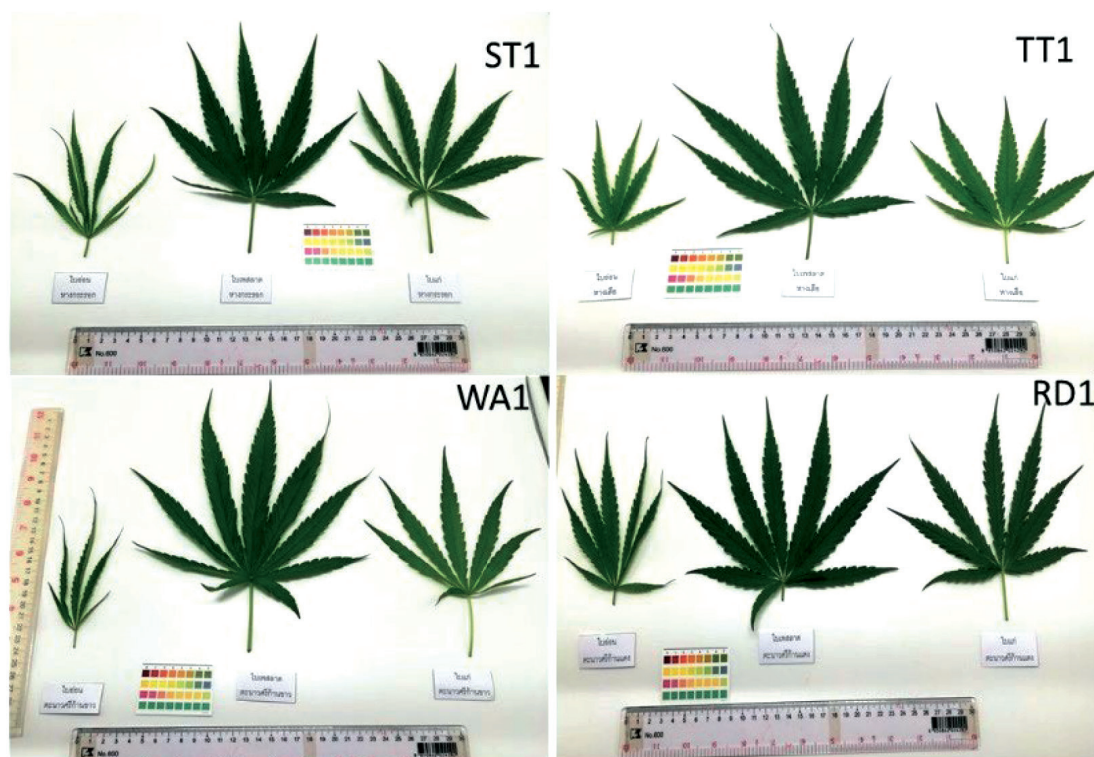
ตารางที่ 1 น้ำหนักใบสด น้ำหนักใบแห้ง ความยาวใบ ความกว้างใบ ความยาวก้านใบ ของกัญชา 4 พันธุ์ ที่ระยะใบอ่อน ใบเฟสลาด และใบแก่ ของต้นกัญชาอายุ 1 เดือน หลังปลูก

ระยะใบ	พันธุ์	น้ำหนักใบสด/ ใบ (กรัม)	น้ำหนักใบแห้ง/ ใบ (กรัม)	ความยาวใบ (เซนติเมตร)	ความกว้างใบ (เซนติเมตร)	ความยาวก้านใบ (เซนติเมตร)
ใบอ่อน	ST1	$0.985 \pm 0.12^{1/a}$	0.221 ± 0.11^a	8.18 ± 1.17^{ab}	0.78 ± 0.09^{bc}	1.05 ± 0.14^a
	TT1	0.580 ± 0.07^c	0.158 ± 0.01^b	8.66 ± 0.65^a	1.00 ± 0.11^a	0.81 ± 0.10^b
	WA1	0.630 ± 0.06^c	0.168 ± 0.01^b	7.45 ± 0.49^b	0.87 ± 0.08^a	0.91 ± 0.11^b
	RD1	0.770 ± 0.06^b	0.224 ± 0.01^a	8.58 ± 0.89^a	0.71 ± 0.06^c	0.80 ± 0.08^b
	F-test	**	**	**	**	**
	C.V.(%)	11.79	9.57	10.28	10.23	12.43
ใบเฟสลาด	ST1	1.790 ± 0.26^a	0.443 ± 0.04^a	15.39 ± 1.68^{ab}	1.82 ± 0.20^b	3.67 ± 0.19^b
	TT1	1.781 ± 0.24^a	0.379 ± 0.03^b	17.13 ± 1.29^a	1.94 ± 0.21^a	3.34 ± 0.23^b
	WA1	1.332 ± 0.13^a	0.351 ± 0.04^b	16.87 ± 1.94^a	2.89 ± 0.22^a	5.36 ± 0.52^a
	RD1	1.633 ± 0.17^a	0.454 ± 0.05^a	14.35 ± 1.62^b	1.88 ± 0.17^{cb}	1.56 ± 0.15^c
	F-test	**	**	**	**	**
	C.V.(%)	12.86	11.36	10.34	9.46	8.94
ใบแก่	ST1	1.832 ± 0.25^a	0.406 ± 0.04^a	11.55 ± 1.34^c	1.53 ± 0.18^b	4.37 ± 0.28^a
	TT1	1.310 ± 11^b	0.402 ± 0.04^{ab}	12.21 ± 1.33^{bc}	1.89 ± 0.18^a	2.38 ± 0.27^c
	WA1	1.435 ± 13^b	0.362 ± 0.02^{ab}	14.02 ± 1.57^a	1.67 ± 0.19^b	4.59 ± 0.39^a
	RD1	1.366 ± 13^b	0.353 ± 0.03^a	13.32 ± 0.73^{ab}	1.70 ± 0.12^{ab}	3.33 ± 0.21^b
	F-test	**	**	**	**	**
	C.V.(%)	11.26	10.20	10.03	10.07	7.98

^{1/a} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละตัว (a, ab, b, bc และ c) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

การศึกษาระยะการเจริญของกัญชาพันธุ์ไทย 4 พันธุ์ ที่อายุ 2 เดือน หลังปลูก

จากการศึกษาระยะการเจริญของกัญชาพันธุ์ไทย 4 พันธุ์ ที่อายุ 2 เดือน หลังปลูก ในระยะใบอ่อนพบว่า กัญชาพันธุ์ RD1 มีน้ำหนักใบสดและใบแห้งต่อใบมากกว่าพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยมีค่าเท่ากับ 0.428 กรัม และ 0.128 กรัม ตามลำดับ ความยาวใบพบว่าพันธุ์ WA1 มีความยาวใบมากที่สุดมีค่าเท่ากับ 12.40 เซนติเมตร แตกต่างกันทางสถิติกับพันธุ์อื่นๆ ความกว้างใบพบว่าพันธุ์ TT1 มีความกว้าง



ภาพที่ 2 ระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ (เรียงจากซ้ายไปขวา) ของกัญชาพันธุ์ ST1 TT1 WA1 และ RD1 ในช่วง 1 เดือน หลังปลูก

ใบสูงสุดมีค่าเท่ากับ 1.32 เซนติเมตร แตกต่างจากพันธุ์อื่นๆ และในส่วนของความยาวก้านใบพบว่าพันธุ์ RD1 และ TT1 มีความยาวก้านใบมากกว่าพันธุ์อื่นๆ มีค่าเท่ากับ 1.36 และ 1.32 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 3

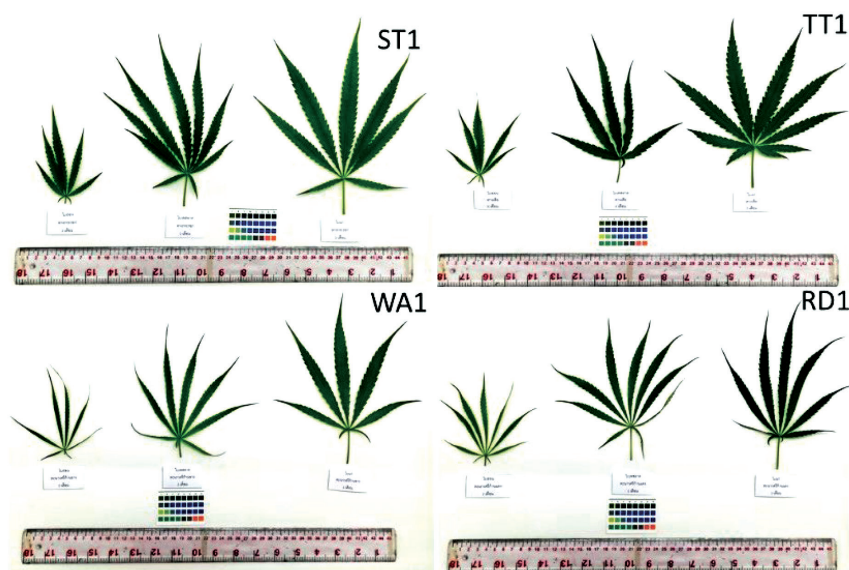
ในระยะใบเพสลาด พบว่ากัญชาพันธุ์ ST1 และ RD1 มีน้ำหนักใบสดมากที่สุดเท่ากับ 0.867 และ 0.821 กรัม ตามลำดับ และมีน้ำหนักใบแห้งเท่ากับ 0.219 และ 0.217 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ความยาวใบและความกว้างใบ ทั้ง 4 พันธุ์ ไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 14.04–15.52 เซนติเมตร และ 1.35–1.54 เซนติเมตร ตามลำดับ และในส่วนของความยาวก้านใบพบว่าพันธุ์ RD1 มีความยาวก้านใบมากกว่าพันธุ์อื่นๆ มีค่าเท่ากับ 3.08 เซนติเมตร แตกต่างจากพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 3

ในระยะใบแก่ พบว่ากัญชาพันธุ์ RD1 มีน้ำหนักใบสดมากที่สุดเท่ากับ 1.487 กรัม มากกว่าพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) รองลงมา คือ พันธุ์ ST1 มีน้ำหนักใบสดเท่ากับ 1.248 กรัม น้ำหนักใบแห้งพบว่าพันธุ์ RD1 ST1 และ TT1 มีน้ำหนักใบแห้งต่อใบมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 0.372, 0.358 และ 0.340 กรัม ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากพันธุ์ WA1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ความยาวใบพบว่าพันธุ์ TT1 WA1 และ ST1 มีความยาวใบมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 17.92, 17.33 และ 16.11 เซนติเมตร ตามลำดับ แตกต่างจากพันธุ์ RD1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ความกว้างใบพบว่าพันธุ์ TT1 WA1 และ ST1 มีความกว้างของใบมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 2.05 1.95 และ 1.89 เซนติเมตร ตามลำดับ แตกต่างจากพันธุ์ RD1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และในส่วนของความยาวก้านใบพบว่า พันธุ์ RD1 มีความยาวก้านใบมากกว่าพันธุ์อื่นๆ มีค่าเท่ากับ 4.19 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 3

ตารางที่ 2 น้ำหนักใบสด น้ำหนักใบแห้ง ความยาวใบ ความกว้างใบ ความยาวก้านใบ ของกัญชา 4 พันธุ์ ที่ระยะ ใบอ่อน ใบเฟสลาด และใบแก่ ของต้นกัญชาอายุ 2 เดือน หลังปลูก

ระยะใบ	พันธุ์	น้ำหนักใบสด/ ใบ (กรัม)	น้ำหนักใบแห้ง/ ใบ (กรัม)	ความยาวใบ (เซนติเมตร)	ความกว้างใบ (เซนติเมตร)	ความยาวก้านใบ (เซนติเมตร)
ใบอ่อน	ST1	$0.206 \pm 0.03^{1/c}$	0.063 ± 0.01^c	9.44 ± 1.01^b	0.93 ± 0.11^c	0.56 ± 0.08^c
	TT1	0.279 ± 0.05^b	0.091 ± 0.01^b	10.73 ± 0.09^b	1.31 ± 0.11^a	0.32 ± 0.12^{ab}
	WA1	0.302 ± 0.05^b	0.082 ± 0.01^b	12.40 ± 1.60^a	1.14 ± 0.16^b	1.21 ± 0.13^b
	RD1	0.428 ± 0.05^0	0.128 ± 0.01^a	10.29 ± 1.18^a	0.86 ± 0.01^c	0.36 ± 0.12^a
	F-test	**	**	**	**	**
	C.V.(%)	16.42	12.45	11.58	11.32	10.30
ใบเฟสลาด	ST1	0.867 ± 0.11^a	0.219 ± 0.10^a	14.95 ± 1.73	1.38 ± 0.15	2.48 ± 0.32^b
	TT1	0.610 ± 0.06^b	0.189 ± 0.04^b	14.20 ± 1.13	1.54 ± 0.150	2.40 ± 0.31^b
	WA1	0.558 ± 0.06^b	0.151 ± 0.06^c	15.52 ± 1.59	1.40 ± 0.19	2.66 ± 0.27^b
	RD1	0.821 ± 0.10^a	0.217 ± 0.05^a	14.04 ± 1.48	1.35 ± 0.17	3.08 ± 0.34^a
	F-test	**	**	ns	ns	**
	C.V.(%)	12.46	10.17	10.23	11.79	11.80
ใบแก่	ST1	1.248 ± 0.18^b	0.358 ± 0.03^a	16.10 ± 1.73^{ab}	1.89 ± 0.15^a	3.57 ± 0.43^b
	TT1	0.971 ± 0.17^c	0.340 ± 0.05^a	17.92 ± 1.13^a	2.05 ± 0.25^a	3.55 ± 0.38^b
	WA1	0.999 ± 0.15^c	0.295 ± 0.03^b	17.33 ± 1.59^a	1.95 ± 0.25^a	3.46 ± 0.32^b
	RD1	1.487 ± 0.23^a	0.372 ± 0.04^a	14.76 ± 1.48^b	1.61 ± 0.19^b	4.19 ± 0.53^a
	F-test	**	**	**	**	**
	C.V.(%)	15.57	11.66	9.01	11.55	11.37

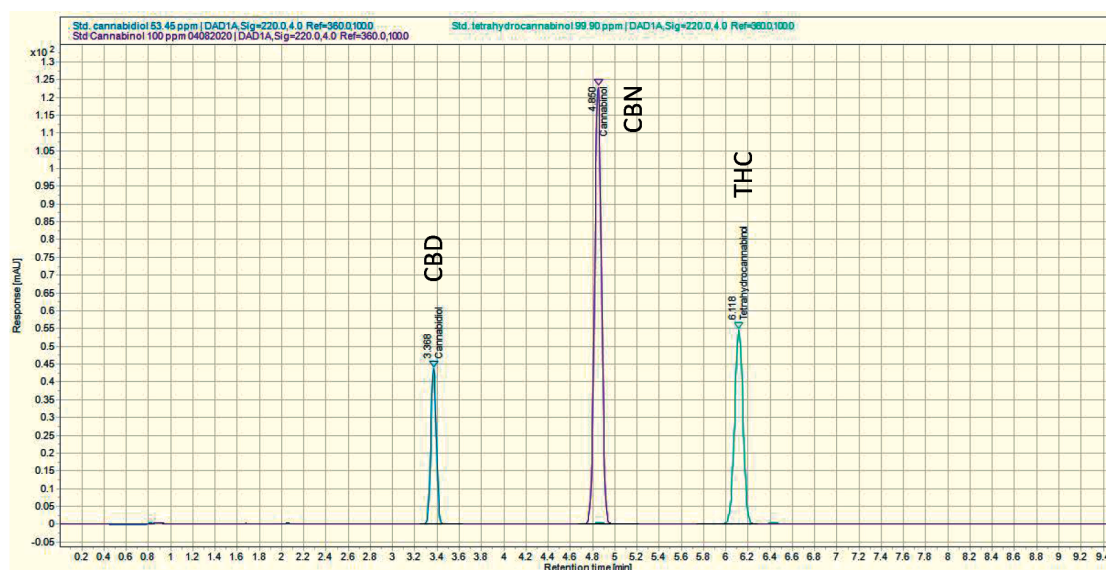
^{1/c} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถว (a, ab, b, b และ c) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$), ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



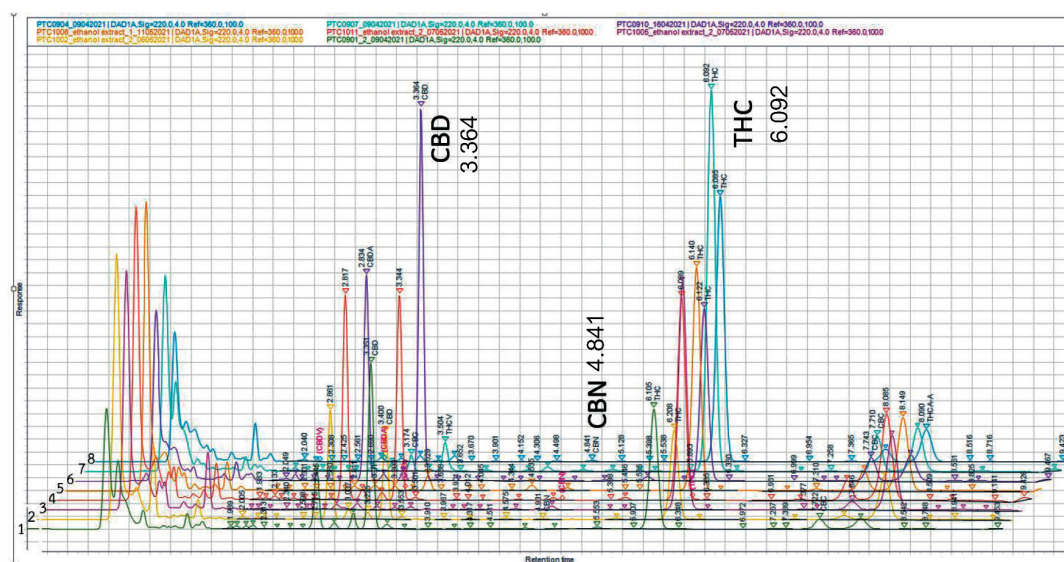
ภาพที่ 3 ระยะใบอ่อน ใบเฟสลาด และใบแก่ (เรียงจากซ้ายไปขวา) ของกัญชาพันธุ์ ST1 TT1 WA1 และ RD1 ที่อายุ 2 เดือน หลังปลูก

การศึกษาวิธีการตรวจปริมาณสารแคนนาบินอยด์ของใบกัญชาพันธุ์ไทยด้วยวิธี UHPLC

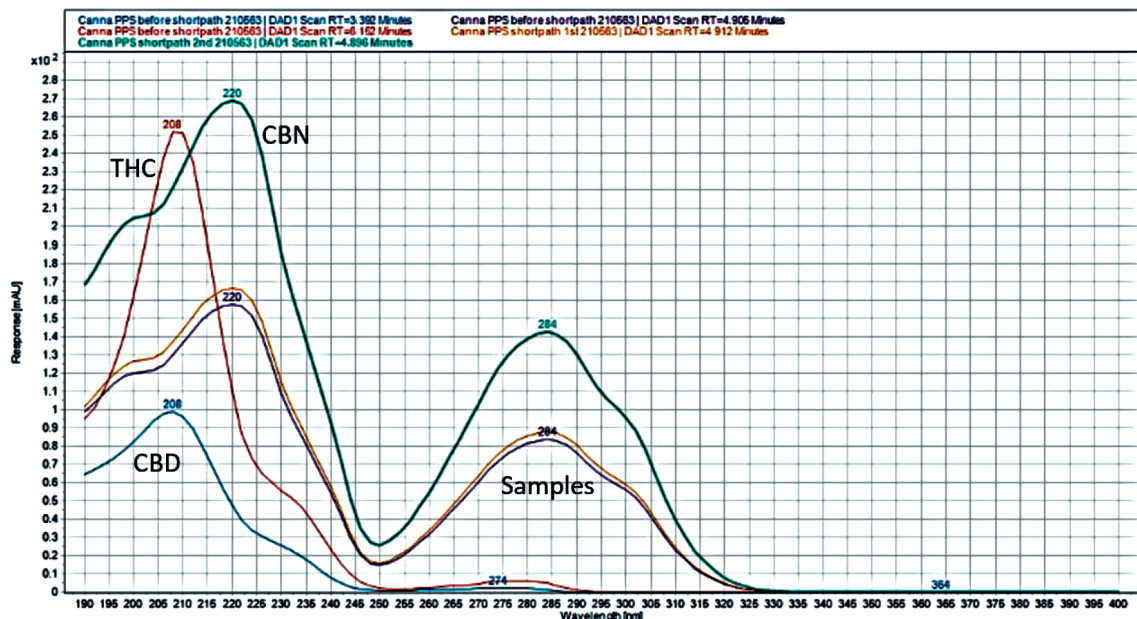
จากการฉีดสารมาตรฐานของสาร CBD CBN THC พบว่า retention time ของสาร CBD CBN และ THC เท่ากับ 3.36, 4.85 และ 6.12 นาที ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4 เมื่อตรวจวิเคราะห์สารสำคัญในใบกัญชาแต่ละพันธุ์ที่อายุ 1 และ 2 เดือน พบว่า retention time ของสาร CBD CBN และ THC แสดงที่เวลาใกล้เคียงกันกับสารมาตรฐานเท่ากับ 3.36, 4.84 และ 6.09 นาที ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 5 และเมื่อเปรียบเทียบ UV spectrum ของสาร CBD CBN และ THC พบว่า $\lambda_{\max}$ ของสาร CBD และ THC มีค่าเท่ากับ 208 นาโนเมตร ส่วน $\lambda_{\max}$ ของ CBN มีค่าเท่ากับ 220 และ 284 นาโนเมตร เมื่อวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างกัญชาด้วยเครื่อง UHPLC โดยใช้ DAD เป็นดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร ไม่พบการเกิด co-elute ของสารอื่นที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน CBD CBN และ THC ด้วยวิธี UHPLC



ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมสาร CBD CBN และ THC ด้วยวิธีตรวจวิเคราะห์ UHPLC ของตัวอย่างใบกัญชา 4 พันธุ์ที่อายุ 1 เดือน (เลข 1, 8, 7, 6) และ 2 เดือน (เลข 2, 3, 4, 5) (1 = ใบอ่อน ST1, 2 = ใบเพศลาด ST1, 3 = ใบเพศลาด TT1, 4 = ใบเพศลาด WA1, 5 = ใบเพศลาด RD1, 6 = ใบอ่อน RD1, 7 = ใบอ่อน WA1 และ 8 = ใบอ่อน TT1)



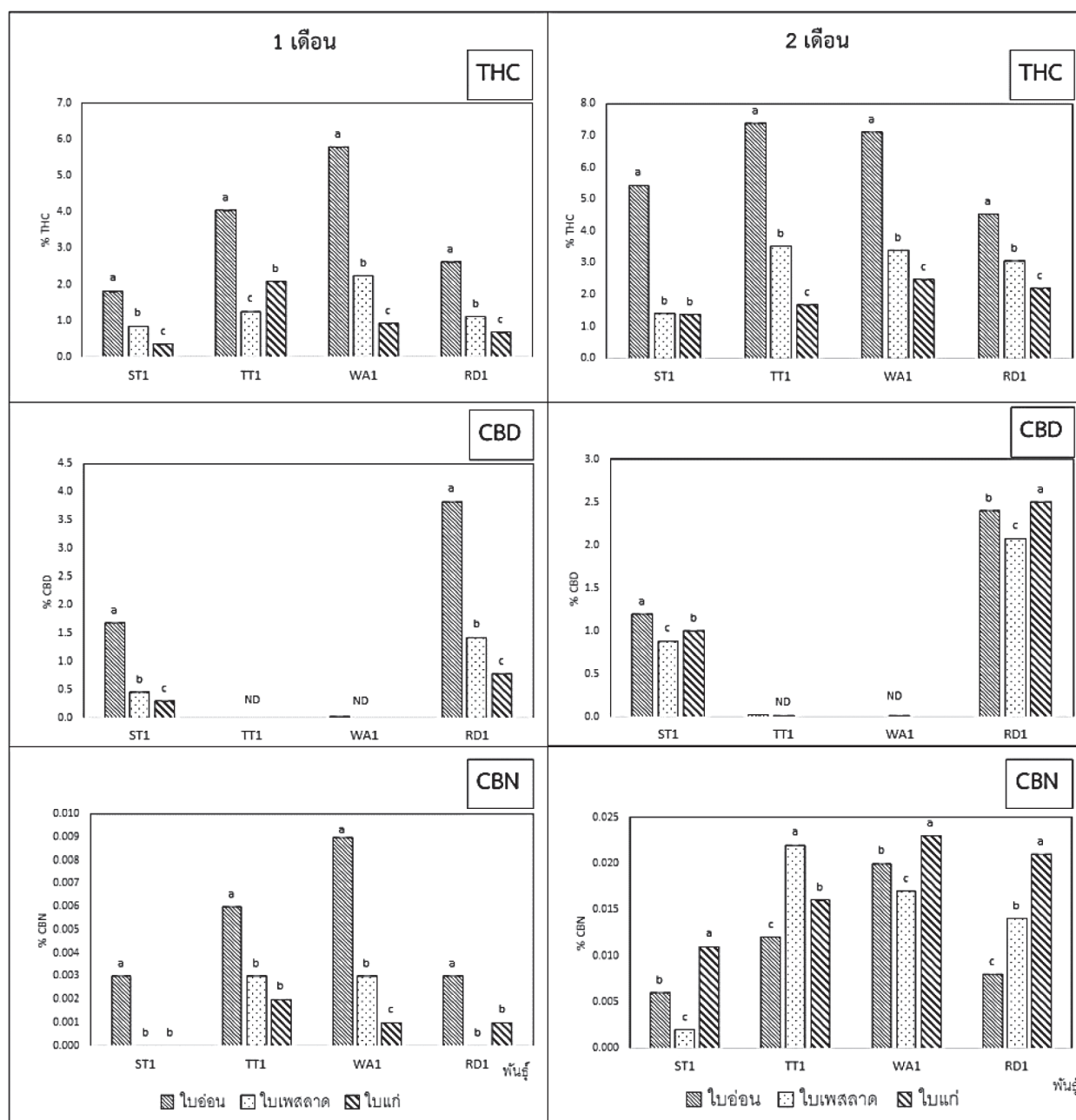
ภาพที่ 6 UV spectrum ของสารมาตรฐาน CBD CBN THC และตัวอย่าง ด้วยวิธีตรวจวิเคราะห์ UHPLC

การเปรียบเทียบระยะเวลาการเจริญของใบ ต่อการเปลี่ยนแปลงสารแคนนาบินอยด์

ผลจากการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารแคนนาบินอยด์ ได้แก่ สาร THC CBD และ CBN ของใบกัญชา ในระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ พบว่าในช่วง 1 เดือน หลังปลูก สาร THC ในระยะใบอ่อนทุกสายพันธุ์ มีปริมาณสาร THC สูงกว่าใบเพสลาดและใบแก่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 1.825–5.79 % โดยน้ำหนัก (w/w) โดยพันธุ์ WA1 และ TT1 มีสาร THC ในใบอ่อนค่อนข้างสูงโดยมีปริมาณ 5.79 และ 4.04% w/w ส่วนใบเพสลาดมีสาร THC รองลงมาจากใบอ่อน โดยแต่ละพันธุ์มีค่า THC อยู่ระหว่าง 0.857–2.244% w/w ซึ่งพันธุ์ ST1 มีสาร THC ต่ำกว่า 1% w/w ส่วนใบแก่ของแต่ละพันธุ์มีปริมาณสาร THC ลดลง มีค่าอยู่ในช่วง 0.367–2.084% w/w โดยพบว่าพันธุ์ TT1 มีสาร THC ในใบแก่สูงที่สุดเท่ากับ 2.084% w/w ในขณะที่ช่วง 2 เดือน หลังปลูก สาร THC ในระยะใบอ่อนทุกพันธุ์ มีปริมาณสาร THC มากกว่าใบเพสลาดและใบแก่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 4.53–7.39% w/w รองลงมา คือ ใบเพสลาด มีปริมาณสาร THC ของแต่ละพันธุ์อยู่ในช่วง 1.397–3.514% w/w และในใบแก่ทุกพันธุ์มีสาร THC ต่ำที่สุดมีค่าอยู่ในช่วง 1.363–2.472% w/w ดังแสดงในภาพที่ 7

สำหรับการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสาร CBD พบว่า ในช่วง 1 เดือน หลังปลูก ใบอ่อนมีสาร CBD สูงที่สุดมีค่าอยู่ในช่วง 0.010–3.828% w/w โดยพบสาร CBD มากในพันธุ์ ST1 และ RD1 รองลงมา คือ ใบเพสลาด และใบแก่ มีค่าอยู่ในช่วง 0.001–1.427% w/w และ 0.000–0.787% w/w ตามลำดับ และยังพบสารอยู่เพียง 2 พันธุ์ ในขณะที่ปริมาณสาร CBD ในช่วง 2 เดือน หลังปลูก พบเพียงพันธุ์ ST1 และ RD1 โดยใบอ่อนมีสาร CBD สูงที่สุดในพันธุ์ ST1 แตกต่างจากใบแก่และใบเพสลาด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 1.198, 1.000 และ 0.882% w/w ตามลำดับ ส่วนพันธุ์ RD1 พบสาร CBD สูงในใบ แตกต่างจากใบอ่อนและใบเพสลาดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 2.500, 2.398 และ 2.077% w/w ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 7

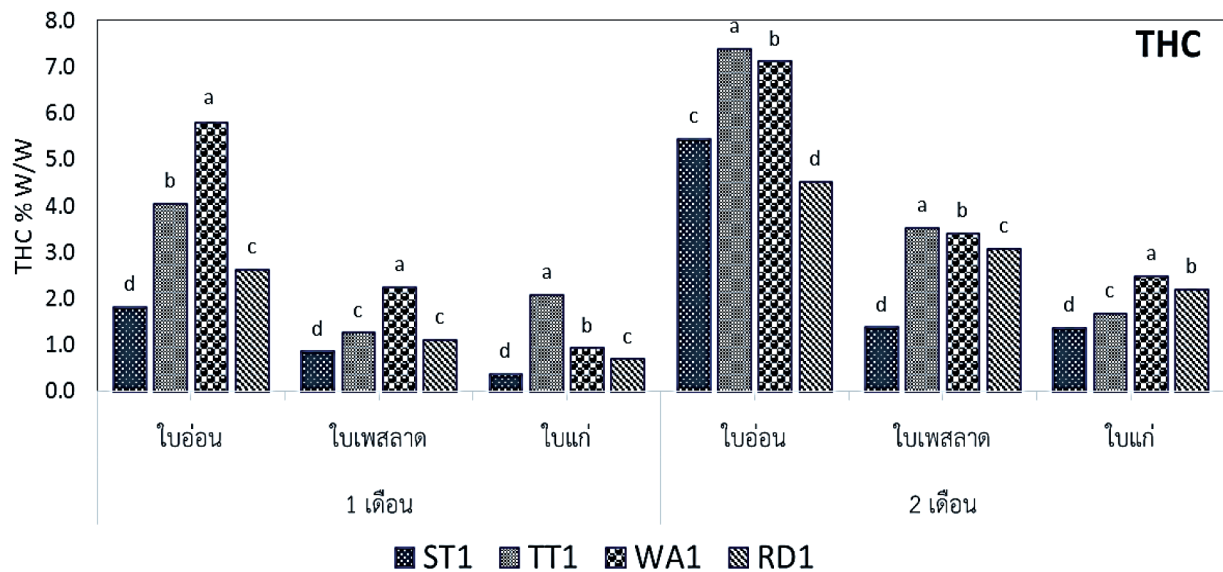
เมื่อตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสาร CBN พบว่า ในช่วง 1 เดือน หลังปลูก ใบอ่อนมีสาร CBN สูงที่สุดพบทุกพันธุ์โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.003–0.009% w/w รองลงมาคือใบแก่และใบเพสลาดตามลำดับ ในขณะที่ช่วง 2 เดือน หลังปลูก ใบแก่พันธุ์ ST1 WA1 และ RD1 มีสาร CBN สูงกว่าใบเพสลาดและใบอ่อน มีค่าอยู่ในช่วง 0.011–0.023% w/w ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ปริมาณสาร cannabinoid ของใบกัญชาในระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ ช่วง 1 และ 2 เดือน หลังปลูก

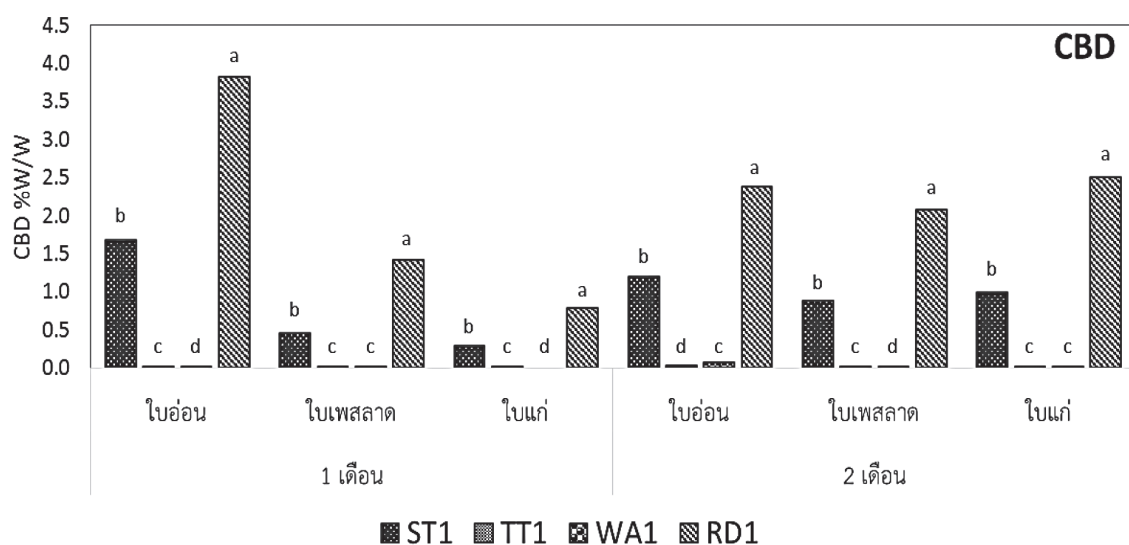
การเปรียบเทียบปริมาณสารแคนนาบินอยด์ของกัญชาพันธุ์ไทย ในระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่

จากการวิเคราะห์ปริมาณสาร THC ในใบกัญชาที่อายุ 1 เดือน พบว่าในใบอ่อนและใบเพสลาดพันธุ์ WA1 จะมี THC สูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ 5.798 ± 0.005 และ $2.244 \pm 0.004\%$ w/w ในใบแก่พันธุ์ TT1 มีปริมาณสาร THC สูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ $2.084 \pm 0.001\%$ w/w จากภาพจะเห็นได้ว่าปริมาณสาร THC ในกัญชาทั้ง 4 พันธุ์ จะมีปริมาณสารที่สูงในใบอ่อน และมีแนวโน้มที่ลดลงในใบเพสลาดและใบแก่ ยกเว้นพันธุ์ TT1 ที่มีแนวโน้มในใบแก่ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับใบเพสลาด ส่วนใบกัญชาที่อายุ 2 เดือน พบว่าในใบอ่อนและใบเพสลาด พันธุ์ TT1 จะมี THC สูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ $7.392 \pm 0.007\%$ w/w และ $3.514 \pm 0.004\%$ w/w ในใบแก่พันธุ์ WA1 มีปริมาณสาร THC สูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ $2.472 \pm 0.001\%$ w/w จากภาพจะเห็นได้ว่าปริมาณสาร THC ในกัญชาทั้ง 4 พันธุ์ จะมีปริมาณสารที่สูงในใบอ่อนและมีแนวโน้มที่ลดลงในใบเพสลาดและใบแก่ ดังแสดงในภาพที่ 8



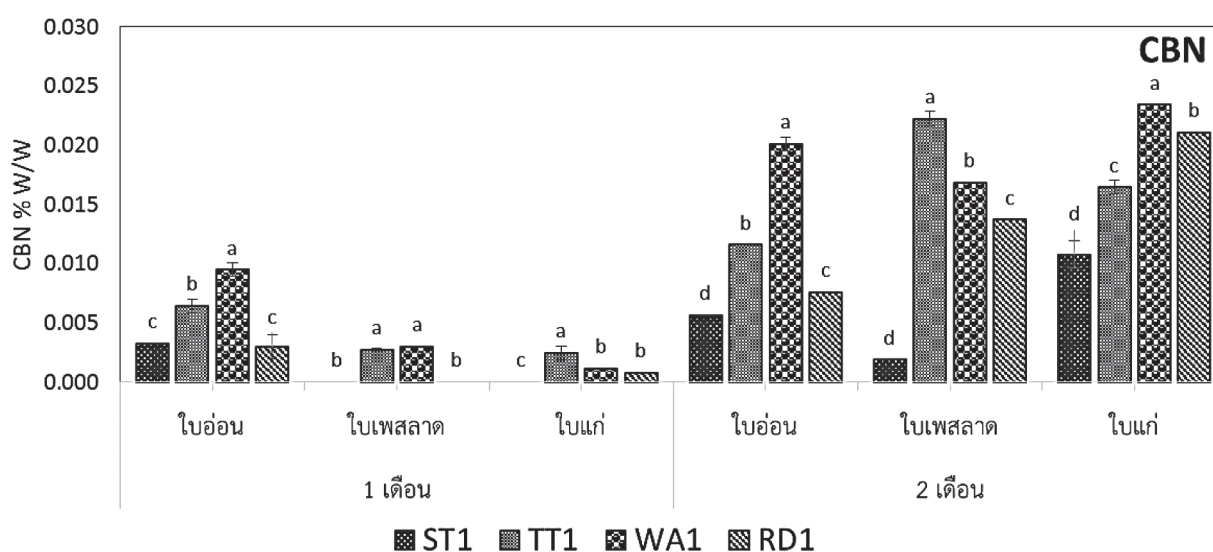
ภาพที่ 8 ปริมาณสาร THC ของใบกัญชาพันธุ์ ST1 TT1 WA1 และ RD1 ในระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ ช่วง 1 เดือน และ 2 เดือน หลังปลูก

จากการวิเคราะห์ปริมาณสาร CBD ในใบกัญชาที่อายุ 1 เดือน พบว่าใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ของกัญชาพันธุ์ RD1 มีปริมาณ CBD สูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ 3.829 ± 0.003 , 1.427 ± 0.001 และ $0.787 \pm 0.000\%$ w/w ตามลำดับ จากภาพจะเห็นได้ว่าพันธุ์ ST1 และ RD1 จะพบปริมาณ CBD สูงในใบอ่อน และมีแนวโน้มลดต่ำลงในใบเพสลาดและใบแก่ ตามลำดับ ส่วนใบกัญชาที่อายุ 2 เดือน พบว่าใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ของกัญชาพันธุ์ RD1 มีปริมาณ CBD สูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ 2.389 ± 0.002 , 2.077 ± 0.00 และ $2.500 \pm 0.001\%$ w/w ตามลำดับ จากภาพจะเห็นได้ว่าพันธุ์ ST1 และ RD1 จะพบปริมาณ CBD สูงในใบอ่อน และมีเพียงพันธุ์เดียวคือ RD1 ที่มีสาร CBD ทั้งในใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ ซึ่งมีปริมาณสูงเท่า ๆ กัน และสูงกว่าพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ปริมาณสาร CBD ของใบกัญชาพันธุ์ ST1 TT1 WA1 และ RD1 ในระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ ช่วง 1 เดือนและ 2 เดือน หลังปลูก

จากการวิเคราะห์ปริมาณสาร CBN ในใบกัญชาที่อายุ 1 เดือน พบว่าใบอ่อน และใบเพสลาด ของกัญชาพันธุ์ WA1 มีปริมาณ CBN สูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ 0.009% และ 0.003% w/w ตามลำดับ ใบแก่พันธุ์ TT1 จะมีปริมาณ CBN สูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ 0.003% w/w จากภาพจะเห็นได้ว่าพันธุ์ ST1 พบ CBN ในใบอ่อนเท่านั้น พันธุ์ TT1 และ WD1 มีปริมาณ CBN ที่สูงในใบอ่อนและมีแนวโน้มที่ลดลงในใบเพสลาดและใบแก่ เมื่อวิเคราะห์หาสาร CBN ในใบกัญชาที่อายุ 2 เดือน พบว่าใบแก่และใบอ่อนของกัญชาพันธุ์ WA1 มีปริมาณ CBN สูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ 0.023 และ 0.020% w/w ตามลำดับ ใบเพสลาดพันธุ์ TT1 จะมีปริมาณ CBN สูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ 0.022% w/w จากภาพจะเห็นได้ว่าพันธุ์ RD1 และ WA1 จะมีปริมาณ CBN สูงที่สุดในใบแก่เมื่อเทียบในพันธุ์เดียวกัน และจะมีค่าลดลงในใบเพสลาด ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 ปริมาณสาร CBN ของใบกัญชาพันธุ์ ST1 TT1 WA1 และ RD1 ในระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ ช่วง 1 เดือน และ 2 เดือน หลังปลูก

วิจารณ์

ผลจากการศึกษาปริมาณสารแคนนาบินอยด์ ในแต่ละระยะของการเจริญเติบโตของใบกัญชาต่อการเปลี่ยนแปลงของกัญชาพันธุ์ไทย 4 พันธุ์ ได้แก่ กระรอกภูพานเอสที 1 (ST1) ทางเสือกลนครที่ 1 (TT1) ตะนาวศรี ก้านขาวดัดเบิลยูเอ 1 (WA1) และตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี 1 (RD1) ในระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ พบว่าพันธุ์ ST1 และพันธุ์ RD1 ให้น้ำหนักใบสดต่อใบ น้ำหนักใบแห้งต่อใบ ค่อนข้างดีกว่าพันธุ์อื่น โดยในช่วง 2 เดือนหลังปลูก ระยะใบเพสลาดของพันธุ์ ST1 และ RD1 มีน้ำหนักใบสดต่อใบมากที่สุด ซึ่งเมื่อพิจารณาจากรูปทรงต้นพันธุ์ ST1 จะมีช่วงของข้อในลำต้นที่ค่อนข้างยาวกว่าพันธุ์อื่น ทำให้ใบที่แตกออกมาจากข้อมีพื้นที่ในการสังเคราะห์แสงได้มากขึ้น ส่งผลให้ใบมีความหนามากขึ้น อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาปริมาณการสังเคราะห์แสง รวมถึงปริมาณคลอโรฟิลล์ที่อยู่ในใบเพิ่มเติม ซึ่งอาจมีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักสด น้ำหนักแห้งภายในใบ ในขณะเดียวกันพันธุ์ RD1 มีน้ำหนักใบสดและใบแห้งมาก เนื่องจากมีขนาดของก้านใบที่ค่อนข้างยาวกว่าพันธุ์อื่น ซึ่งก้านใบมีการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านแพทย์แผนไทยโดยใช้เป็นส่วนประกอบยาบางตำรับ การได้ก้านใบที่ยาวและมีขนาดใหญ่จึงเป็นลักษณะที่ดีของกัญชาพันธุ์ไทย เมื่อศึกษาปริมาณสารแคนนาบินอยด์ด้วยวิธี UHPLC พบว่าสามารถตรวจวัดปริมาณสาร THC CBD และ CBN ในใบกัญชาได้ทั้งใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ วิธีดังกล่าวใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างประมาณ 10 นาที ซึ่งใช้เวลาน้อยทำให้สามารถตรวจได้เร็วกว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ที่ใช้เวลานานถึง 25 นาที⁽⁷⁾

จากการตรวจด้วยวิธี UHPLC และ HPLC ในรายงานยังพบว่าสามารถตรวจสอบสารแคนนาบินอยด์ที่อยู่ในวัตถุดิบกัญชาในรูปของ native form รวมถึง acidic cannabinoids เช่น THCA CBDA ได้ง่ายกว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วย Gas Chromatography ที่ต้องใช้ความร้อนเพื่อเปลี่ยนกระบวนการ decarboxylation^(7, 8, 9) เมื่อตรวจสอบสารแคนนาบินอยด์ ในใบกัญชาพบว่าปริมาณสาร THC ในช่วง 1 เดือน และ 2 เดือน ระยะใบอ่อนทุกพันธุ์มีปริมาณสาร THC สูงกว่าใบเพสลาดและใบแก่ และยิ่งพบว่าในระยะ 2 เดือน หลังปลูก จะมีสาร THC สูงกว่าในช่วง 1 เดือน สอดคล้องกับสาร CBD และ CBN ที่มีแนวโน้มของปริมาณสารเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามสาร CBD ในใบอ่อนในช่วงระยะเวลาการปลูก 1 เดือน จะสูงกว่าในใบอ่อนที่ระยะ 2 เดือน ของพันธุ์ ST1 และ RD1 แสดงให้เห็นว่าการสร้างสาร CBD ในใบจะเริ่มสร้างสารสำคัญได้ที่อายุ 1 เดือน ซึ่งจากการจัดการธาตุอาหารในการทดลองนี้ ได้ทำการใส่ปุ๋ยสูตรเร่งดอกโดยเริ่มให้ปุ๋ยเมื่อต้นกัญชาอายุได้ 1 เดือน จนถึงระยะออกดอก ปุ๋ยสูตรดังกล่าวจะมีปริมาณไนโตรเจนต่ำกว่าสูตรที่ 1 ที่ใช้ในการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น เมื่ออายุต้นถึง 2 เดือน กัญชาเริ่มมีการออกดอก แสดงว่าธาตุอาหารอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีส่วนช่วยให้ต้นกัญชาออกดอกได้ ซึ่งมีผู้ศึกษาผลของไนโตรเจนต่อลักษณะทางเคมี การทำงานและสรีรวิทยาของกัญชาในระยะออกดอก โดยให้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ถูกควบคุม พบว่าไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีปริมาณของแคนนาบินอยด์ และเทอร์พีนอยด์ ที่สูงและลดต่ำลงตามปริมาณของไนโตรเจนที่สูงขึ้น แสดงให้เห็นว่าระดับของไนโตรเจนอาจมีผลต่อการควบคุมปริมาณของสารแคนนาบินอยด์ และเทอร์พีนอยด์⁽¹⁰⁾ เมื่อเปรียบเทียบพันธุ์กับปริมาณสารแคนนาบินอยด์ พบว่าพันธุ์ WA1 และ TT1 มีปริมาณสาร THC และ CBN สูงกว่าพันธุ์อื่น ซึ่งปริมาณของ CBN จะแปรผันตามปริมาณสาร THC ที่สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าสาร CBN จะเป็นผลผลิตที่ได้จาก THCA ในช่วงของการผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative degradation) ซึ่งถ้าหากมีปริมาณ THC สูง ปริมาณของ CBN จะสูงไปด้วย^(11, 12) ส่วนปริมาณสาร CBD พบมากเพียง 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ RD1 และ ST1 ซึ่งจากข้อมูลปริมาณสารสำคัญที่อยู่ในใบค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ศึกษาปริมาณของแคนนาบินอยด์ในใบกัญชาซึ่งพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 1.10–2.10%⁽¹³⁾ จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่า พันธุ์กัญชามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารแคนนาบินอยด์ โดยสามารถพบได้ตั้งแต่ระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ ซึ่งจากข้อมูลที่ได้สอดคล้องกับลักษณะทางพันธุกรรมที่ศึกษาโดยสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ร่วมกับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร พบว่ากัญชาพันธุ์ไทย 4 พันธุ์ มีลักษณะเด่นถึง 3 แบบ แบบที่ 1 เป็นกัญชาที่ให้สาร THC สูง ได้แก่ พันธุ์ WA1 และ TT1 แบบที่ 2 เป็นกัญชาที่ให้สาร THC และ CBD ในอัตราส่วนที่เท่ากัน (THC : CBD เท่ากับ 1 : 1) ได้แก่ พันธุ์ ST1 และกัญชาแบบที่ 3 ที่ให้สาร CBD สูง ได้แก่ พันธุ์ RD1 จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าสารแคนนาบินอยด์ในใบกัญชาอาจจะมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางพันธุกรรมของกัญชา ซึ่งจะประโยชน์ต่อการศึกษากัญชา โดยสามารถตรวจสอบสารสำคัญในใบเพื่อคัดเลือกพันธุ์กัญชาได้เร็วมากขึ้นไม่ต้องรอให้ถึงช่วงออกดอก อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องเก็บรวบรวมตัวอย่างพันธุ์กัญชาจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องมากขึ้น รวมถึงควรศึกษาในเรื่องของปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมของแต่ละพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณและคุณภาพของผลผลิตทั้งในส่วนของใบ ราก และช่อดอก เพื่อพัฒนาปรับปรุงกัญชาพันธุ์ไทยให้มีศักยภาพในการแข่งขันกับตลาดโลกต่อไป

สรุป

การศึกษาระยะการเจริญเติบโตของใบกัญชาพบว่ามีความแตกต่างกันของแต่ละพันธุ์ โดยพันธุ์ ST1 และพันธุ์ RD1 ให้น้ำหนักใบสดและน้ำหนักใบแห้งต่อใบมากกว่าพันธุ์อื่น ส่วนความยาวและความกว้างของใบมีค่าไม่แตกต่างกัน สำหรับความยาวของก้านใบพบว่าพันธุ์ RD1 มีความยาวก้านใบในช่วงใบเพสลาดยาวมากกว่าพันธุ์อื่น เมื่อตรวจสอบปริมาณสารแคนนาบินอยด์ในใบพบว่ามีสาร THC และ CBD ในใบอ่อนสูงกว่าใบเพสลาดและใบแก่ และเมื่อต้นกัญชามีอายุมากขึ้นจะมีสารดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น ส่วนสาร CBN พบน้อยมากในใบ แต่จะพบปริมาณสาร CBN สูงในใบแก่และใบเพสลาด ซึ่งสารจะเพิ่มขึ้นเมื่อต้นกัญชามีอายุมากขึ้นเช่นเดียวกับสาร THC และ CBD นอกจากนี้ยังพบว่าพันธุ์

ของกัญชามีผลต่อปริมาณสารแคนนาบินอยด์ในใบ โดยพันธุ์ WA1 และ TT1 มีสาร THC และ CBN สูง ส่วนพันธุ์ RD1 และ ST1 เป็นพันธุ์ที่พบสาร CBD สูงเพียงสองพันธุ์เท่านั้น และพบสารดังกล่าวในปริมาณสูงตั้งแต่อายุ 1 เดือน หลังปลูก งานวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการนำใบกัญชาไปใช้ประโยชน์ควรพิจารณาในเรื่องของพันธุ์และอายุของ ต้นกัญชา รวมถึงส่วนต่างๆ ที่จะนำมาใช้ประโยชน์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายทรงพล ชีวะพัฒน์ อดีตผู้อำนวยการสถาบันวิจัยสมุนไพร ดร.ประไพ วงศ์สินคงมั่ง หัวหน้าสำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ช่วยสนับสนุนและช่วยเหลือด้านการยื่นขออนุญาตปลูกกัญชา ขอขอบคุณ ผศ.พิเชษฐ เวชวิฐาน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร นายสนอง ดวงศรีจันทร์ นายธนะชัย ชื่นสกุล และนายกัมพล รัตนแก้ว ที่ช่วยเก็บตัวอย่างและให้องค์ความรู้ในเรื่องการปลูกกัญชา ขอขอบคุณ นายชยกร ยุกวณิช นายสุเทพ ศรีสนาม และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และห้องปฏิบัติการจีโนมิกส์พืช ที่ช่วยเหลือการเก็บตัวอย่างพืชกัญชา

เอกสารอ้างอิง

1. Mechoulam R, Hanus LO, Pertwee R, Howlett AC. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat Rev Neurosci* 2014; 15(11): 757–64.
2. Velasco G, Sánchez C, Guzmán M. Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(6): 436–44.
3. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 424 (พ.ศ. 2564). ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 138 ตอนพิเศษ 45 ง (วันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2564). หน้า 32.
4. สำนักงานจัดการกัญชาและกระท่อมทางการแพทย์แผนไทย. Infographic 16 ตำรับยาแผนไทยที่มีกัญชาปรุงผสม อยู่. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 2 ก.ค. 2564]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL : <https://ockt.dtam.moph.go.th/index.php/cannabis-formula/200-infographic-16>.
5. สุรพล อุปติสสกุล. สถิติการวางแผนการทดลองเบื้องต้น. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2528.
6. Duncan DB. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 1995; 11: 1–42.
7. Rudd J. UHPLC enables rapid quantitation of native cannabinoids. [online]. 2018; [cited 2021 Aug 30]; [2 screens]. Available from: URL: <https://www.analyticalcannabis.com/articles/uhplc-enables-rapid-quantitation-of-native-cannabinoids-298930>.
8. Romano LL, Hazekamp A. Cannabis oil: chemical evaluation of an upcoming cannabis-based medicine. *Cannabinoids* 2013; 1(1): 1–11.
9. Lazarjani MP, Torres S, Hooker T, Fowlie C, Young O, Seyfoddin A. Methods for quantification of cannabinoids: a narrative review. *J Cannabis Res* 2020; 2: 35. (10 pages).
10. Saloner A, Bernstein N. Nitrogen supply affects cannabinoid and terpenoid profile in medical cannabis (*Cannabis sativa* L.). *Ind Crop Prod* 2021; 167: 113516. (13 pages).
11. Hazekamp A, Fishedick JT, Díez ML, Lubbe A, Ruhaak RL. Chemistry of cannabis. In: Mander L, Liu HW, editors. *Comprehensive natural products II*. Oxford, UK: Elsevier Science; 2010. p. 1033–1084.

12. Fathordoobady F, Singh A, Kitts DD, Singh AP. Hemp (*Cannabis sativa* L.) extract : anti-microbial properties, methods of extraction, and potential oral delivery. *Food Rev Int* 2019; 35(7): 664-84.
 13. Jin D, Dai K, Xie Z, Chen J. Secondary metabolites profiled in cannabis inflorescences, leaves, stem barks, and roots for medicinal purposes. *Sci Rep* 2020; 10(1): 3309. (14 pages).
-

The Cannabinoid Contents in Different Growth Stages of Thai *Cannabis sativa* L. Leaves

Sorrapetch Marsud¹ Thanawat Thongchin¹ Korravit somkid¹ Phanuwit Poolsab¹
Paparvadee Suchantaboot¹ Kotchaporn Chotmanotham¹ Tipawan Phrugmanon¹
Ratree Pranakhon² Wanwipa Pinta² Phichet Banyati¹ and Siriwan Chaisomboonpan¹

¹Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000

²Rajamangala University of Technology Isan, Sakon Nakhon Campus, Sakon Nakhon 47160 Thailand

ABSTRACT Cannabinoids are the major compounds in cannabis containing tetrahydrocannabinol (THC), which is a psychoactive compound and other non-psychoactive compounds, such as cannabinol (CBN), cannabidiol (CBD). Cannabinoids are mainly found in inflorescence of cannabis, but some of them are also detected in other parts including leaves. The information of cannabinoids contents in cannabis leaves is still limited, especially in Thai cannabis. This study, therefore, aims to investigate cannabinoids contents using the Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) technique in leaves of different growth stages. Four cultivars of Thai cannabis including Hang Kra Rog Phu Phan (ST1), Hang Suea Sakonnakhon (TT1), Tanao Si Kan Khaw (WA1) and Tanao Si Kan Dang (RD1) were grown and recorded leaf sizes as well as THC and CBD contents in different growth stages. The results showed that the immature leaves (both fresh and dried) of 2-month-grown ST1 and RD1 gave the highest weight compared to others. The immature and mature leaf stalks of RD1 were higher in length than others, but not different in width and length of their leaves. The highest THC content was detected in 2-month young leaves cannabis, while CBD content showed the highest (3.83 %w/w) in 1-month young leaves of RD1. In contrast, a small amount of CBN was detected in all cannabis leaves. The information reported here could appropriately support medical use and create value-added for Thai cannabis.

Keyword: *Cannabis sativa*, Cultivar, Cannabinoids

การพัฒนาตัวอย่างทดสอบความชำนาญการวิเคราะห์ สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช และโลหะหนักในพืชผัก

วิชาดา จงมีวาสนา พนาวัลย์ กลิ่งกลางตอน วีรฤติ วิทยานันท์ สุพัฒน์ แสงสวຍ ธรณิศวรรค์ ไชยมงคล
และกรรกริรมย์ เลิศบำรุงชัย

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง นครบุรี 11000

บทคัดย่อ สืบเนื่องจากนโยบายกัญชาทางการแพทย์ ปี พ.ศ. 2562 ทำให้เกิดห่วงโซ่คุณค่าในการพัฒนาการปลูก การจำหน่ายและการผลิตผลิตภัณฑ์กัญชาอย่างรวดเร็ว สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างและโลหะปนเปื้อนเป็นรายการสำคัญ ที่ใช้ในการคัดกรองความปลอดภัยของวัตถุดิบพืชกัญชาสำหรับผลิตภัณฑ์ที่ใช้เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ได้ดำเนินโครงการบูรณาการสร้างเครือข่ายห้องปฏิบัติการ และติดตามส่งเสริมห้องปฏิบัติการเครือข่ายให้มีความ สามารถในการตรวจวิเคราะห์ การศึกษาจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตัวอย่างทดสอบความชำนาญพืชกัญชา โดยใช้วัตถุดิบ พืชกัญชาที่เป็นของกลางจากสำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติดที่พบสารตกค้างและสารปนเปื้อน โดยนำ มาเตรียม แบ่งบรรจุ และทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของสารคลอโรฟิลล์และไซเปอร์เมทริน ด้วยเครื่อง GC-ECD/ FPD มีค่าเฉลี่ยความเข้มข้น 85.6 ± 3.5 และ $32,520 \pm 1,625$ ไมโครกรัมต่อกรัม ส่วนแคดเมียม มีความเข้มข้น 344 ± 18 ไมโครกรัมต่อกรัม เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICP-MS จากนั้นทดสอบความคงตัวในอุณหภูมิที่เลียนแบบสภาวะขนส่ง โดยเก็บตัวอย่างในพื้นที่ที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าปริมาณสารคลอโรฟิลล์ ไซเปอร์เมทริน และแคดเมียม มีความเข้มข้นที่ระดับ 89.6 ± 3.4 , $33,753 \pm 2,619$ และ 321 ± 11 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งผลการวิเคราะห์ทางสถิติมีความคงตัวอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ตัวอย่างพืชกัญชา ที่เตรียมขึ้นนี้สามารถนำไปใช้เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่มีคุณสมบัติเหมาะสม เป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับ ISO 13528: 2015 และใช้ในการประเมินความสามารถห้องปฏิบัติการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและโลหะหนักได้อย่างมีคุณภาพ

คำสำคัญ: ตัวอย่างทดสอบความชำนาญ, พืชกัญชา, สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้าง, โลหะปนเปื้อน

Corresponding author E-mail: wischada.j@gmail.com

Received: 16 July 2021

Revised: 7 September 2021

Accepted: 9 September 2021

บทนำ

กัญชาเป็นพืชในสกุล Cannabis จัดเป็นยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 แห่งพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 ต่อมาในปี พ.ศ. 2562 ได้มีการแก้ไขเพิ่มเติม พระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ (ฉบับที่ 7)⁽¹⁾ “มาตรา 26/2 ห้ามมิให้ผู้ใดผลิต นำเข้า หรือส่งออกซึ่งยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 เว้นแต่ ในกรณีจำเป็นเพื่อประโยชน์ของทางราชการ การแพทย์ การรักษาผู้ป่วย หรือการศึกษาวิจัย และพัฒนา ทั้งนี้ ให้รวมถึงการเกษตรกรรม พาณิชยกรรม วิทยาศาสตร์ หรืออุตสาหกรรม เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ด้วย ซึ่งได้รับใบอนุญาตจากผู้อนุญาตโดยความเห็นชอบของคณะกรรมการ” และมีประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 พ.ศ. 2563 ได้มีการระบุยกเว้นวัตถุหรือสารของกัญชาและกัญชง (Hemp) ที่ผลิตในประเทศ ได้แก่ (ก) เปลือก ลำต้น เส้นใย กิ่ง ก้าน และราก (ข) ใบ ซึ่งไม่มียอดหรือช่อดอกติดมาด้วย (ค) สารสกัดที่มีสารแคนนาบินาไดโอด (cannabidiol, CBD) เป็นส่วนประกอบ และต้องมีสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอล (tetrahydrocannabinol, THC) ไม่เกินร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก (ง) กากหรือเศษที่เหลือจากการสกัดกัญชาและต้องมีสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอล (tetrahydrocannabinol, THC) ไม่เกินร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ไม่เป็นยาเสพติดให้โทษในประเภท 5⁽²⁾ เพื่อให้สามารถนำไปใช้ในการผลิตยาหรือสมุนไพรจากนโยบายการใช้กัญชาเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ ในรูปแบบสารสกัดกัญชา น้ำมันกัญชา และยาตำรับแผนไทย ซึ่งการคัดกรองวัตถุดิบให้ได้คุณภาพตามที่ต้องการและลดความเสี่ยงสารตกค้างและสารปนเปื้อนก่อนนำมาใช้ในกระบวนการผลิตยาและผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ จากประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุตำรายา พ.ศ. 2561 ให้ตำรายาต่อไปนี้เป็นตำรายาแผนปัจจุบัน ได้แก่ ตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย พ.ศ. 2560 และฉบับเพิ่มเติม (Thai Herbal Pharmacopoeia 2017 and Supplements) ในเบื้องต้นจึงมีการใช้เกณฑ์กำหนดปริมาณสารตกค้างและสารปนเปื้อนในพืชกัญชาอ้างอิงตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยฉบับดังกล่าว⁽³⁾ สำหรับ crude drugs มีการกำหนดปริมาณสูงสุด (maximum limits) สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้าง ได้แก่ สารในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต กลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์และกลุ่มอื่น ๆ รวม 33 ชนิด และกำหนดปริมาณสูงสุดของโลหะปนเปื้อน 4 ชนิด ได้แก่ สารหนู (arsenic) แคดเมียม (cadmium) ตะกั่ว (lead) และปรอท (mercury) เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค สำหรับวิธีวิเคราะห์สารตกค้างและโลหะปนเปื้อนทางห้องปฏิบัติการ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารฐานะห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านคุณภาพและความปลอดภัยอาหารของประเทศ ได้รับมอบหมายจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ให้รับผิดชอบการตรวจวิเคราะห์ด้านความปลอดภัยของกัญชาเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ให้ครอบคลุมชนิดตัวอย่างพืชกัญชา สารสกัดกัญชา น้ำมันกัญชาและตำรับยากัญชา รวมทั้งมีการถ่ายทอดเทคโนโลยีการวิเคราะห์ให้กับศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ส่วนภูมิภาค⁽⁴⁾ เพื่อเป็นการขยายหน่วยบริการรองรับความต้องการในพื้นที่ทั้ง 12 เขตสุขภาพ และสร้างเครือข่ายห้องปฏิบัติการที่มีคุณภาพ ให้เป็นที่ยอมรับในความเท่าเทียมกันของผลการวิเคราะห์ จึงจำเป็นต้องมีกระบวนการตรวจสอบความสามารถห้องปฏิบัติการ เช่น การเข้าร่วมเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory comparison) การเข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญ (proficiency testing) แต่เนื่องจากพืชกัญชา มีการควบคุมเป็นยาเสพติดและเป็นเรื่องใหม่ จึงไม่มีหน่วยงานทั้งภายในและภายนอกประเทศเป็นหน่วยบริการด้านแผนทดสอบความชำนาญในการวิเคราะห์สารตกค้างและโลหะปนเปื้อน ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาและพัฒนาตัวอย่างทดสอบความชำนาญพืชกัญชาให้มีคุณสมบัติเหมาะสมซึ่งอ้างอิงเกณฑ์ยอมรับการทดสอบความแม่นยำและความคงตัว ตามมาตรฐาน ISO 13528:2017⁽⁵⁾ เพื่อนำไปใช้ประเมินความสามารถห้องปฏิบัติการวิเคราะห์เชิงปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างและโลหะปนเปื้อนได้อย่างมีคุณภาพ ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2010⁽⁶⁾

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

ตัวอย่างกัญชาที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นพืชกัญชาที่เป็นของกลาง มีลักษณะเป็นกัญชาแห้งอัดแท่ง จำนวน 5 ก้อน น้ำหนักรวม 5 กิโลกรัม ได้รับจากสำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด ตามหนังสือ ที่ ยส 1102/15458 ลงวันที่ 7 สิงหาคม 2562 โดยที่สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นหน่วยงานที่มีภารกิจในการตรวจวิเคราะห์และศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์สารพิษ สารปนเปื้อน และสารสำคัญของกัญชาและกัญชง ซึ่งมีการดำเนินงานภายใต้โครงการบูรณาการพัฒนากัญชาทางการแพทย์และผลิตภัณฑ์สุขภาพจากพืชกัญชา จึงเป็นผู้ได้รับอนุญาตมีไว้ในครอบครอง ซึ่งยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 (หนังสือสำคัญ ที่ 25/2562) และเป็นผู้รับอนุญาตจำหน่าย ซึ่งยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 5 (หนังสือสำคัญ ที่ 8/2563)

สารละลายมาตรฐานทั้งหมดเป็น certified reference material (CRM) grade และเป็นผลิตภัณฑ์ของ CPA chem ประเทศฝรั่งเศส ประกอบด้วย สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ได้แก่ synthetic pyrethroid pesticide standard 8 components ความเข้มข้น 100 mg/l, organophosphorus pesticide standard 25 components ความเข้มข้น 100 mg/l โดยมีค่า uncertainty value ≤ 2.6 mg/l และสารละลายมาตรฐานโลหะหนัก ประกอบด้วย ตะกั่ว แคดเมียม สารหนู และปรอท ความเข้มข้น 1,000 mg/l มีค่า uncertainty value ≤ 4.9 mg/l

เครื่องมือและอุปกรณ์ ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้า 3 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง, เครื่องบด (Mill Machine, POWTEQ HM100), เครื่องผสมอาหาร ขนาด 3 ลิตร, เครื่องปิดผนึกด้วยความร้อน (heat sealer machine), เครื่อง GC-ECD/FPD (Gas Chromatograph-Electron Capture Detector/Flame Photometric Detector), เครื่องย่อยระบบไมโครเวฟ ยี่ห้อ Mile stone รุ่น UltraWave, เครื่อง Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS), เครื่อง Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometer (GFAAS), เครื่อง Mercury Analyzer (cold vapour atomic absorption spectrometry technique), เครื่องระเหยด้วยไนโตรเจน, micropipettes ขนาด 2-20 μ l, 20-200 และ 200-1000 μ l, volumetric flask ขนาด 5 ml, 10 ml และ 25 ml, round bottom flask ขนาด 250 มิลลิลิตร, centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร, Quartz sample tube ขนาด 1 มิลลิลิตร, มีดสแตนเลส, ช้อนสแตนเลส, ขອງพลาสติกลามิเนตอลูมิเนียมฟอยด์

วัสดุวิทยาศาสตร์ ได้แก่ QuEChERS Extraction Packet, AOAC Method P/N 5982-7755; MgSO_4 6 g และ NaOAc 4 g, dispersive SPE P/N 5982-5421; MgSO_4 150 mg, C18EC 50 mg, GCB 50 mg และ 50 mg PSA

การเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

การดำเนินแผนทดสอบความชำนาญการวิเคราะห์พืชกัญชามีการวางแผนดำเนินการ ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043 : 2010 โดยขั้นตอนการวางแผนมีการพิจารณาและกำหนดประเด็นสำคัญ ตามข้อกำหนด 4.4.1 ได้แก่ วัตถุประสงค์ กลุ่มเป้าหมายสมาชิกห้องปฏิบัติการ ชนิดสาร ช่วงปริมาณการวิเคราะห์ การจัดการตัวอย่างทดสอบ วิธีที่ใช้ในการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว กำหนดเกณฑ์การประเมินผล จัดเตรียมเอกสารที่จำเป็นสำหรับสมาชิก รูปแบบการรายงาน และรายละเอียดอื่น ในการเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ตามข้อกำหนด 4.4.2 จะต้องพิจารณาลักษณะชนิดตัวอย่าง ปริมาณสารที่ตรวจวัด สมบัติความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว เพื่อใช้เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญได้อย่างมีคุณสมบัติเหมาะสม ซึ่งตัวอย่างทดสอบความชำนาญเป้าหมายที่ต้องการ คือ ตัวอย่างที่เตรียมจากพืชกัญชาที่มีสารตกค้างและสารปนเปื้อนอยู่แล้ว (incurred sample) จึงได้มีการคัดเลือกพืชกัญชาที่เป็นของกลาง ซึ่งมีรายงานการตรวจพบสารตกค้างและสารปนเปื้อน ทั้งนี้ตัวอย่างที่เตรียมจะมีชนิดและปริมาณสารที่ตรวจวัดตามสถานการณ์จริงของตัวอย่างที่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์จะได้รับ การเตรียมตัวอย่างเริ่มจาก

นำกัญชาแห้งอัดแท่งน้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัม หั่นแบ่งชิ้นส่วนด้วยมีดให้เป็นชิ้นเล็กขนาดประมาณ 1 นิ้ว จากนั้น บดละเอียดด้วยเครื่องบดปั่น (Mill Machine, POWTEQ HM100) ก่อนนำมาผสมรวมกันแล้วร่อนผ่านตะแกรง สแตนเลส (Standard Sieve, Aperture 1.0 mm) ได้ตัวอย่างพืชกัญชาที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นผง ขนาดไม่เกิน 1.0 มิลลิเมตร น้ำหนักรวม 840 กรัม นำตัวอย่างที่ได้ผสมรวมกันด้วยเครื่องผสมอาหารหัวตะกร้อ แล้วใช้ช้อนสแตนเลส ตักเก็บตัวอย่างแบบสุ่ม จำนวน 3 จุด เพื่อนำตัวอย่างแต่ละจุดไปทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันเบื้องต้น เมื่อผลการทดสอบปริมาณสารผ่านเกณฑ์ของการทำซ้ำ (Relative Standard Deviation) น้อยกว่าร้อยละ 22 ทำการแบ่งบรรจุโดยนำผงพืชกัญชามาผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมอาหารหัวตะกร้อ นาน 30 นาที พร้อมทั้งกวนให้เข้ากันอย่างสม่ำเสมอในแต่ละครั้งที่มีการสุ่มตัก บรรจุใส่ของพลาสติกกลาไมเนตอลูมิเนียมฟอยด์ที่ติดฉลากเรียงหมายเลขตามลำดับการบรรจุ ซึ่งน้ำหนักประมาณ 15 กรัมต่อซอง ผนึกปากซองปิดสนิทด้วยเครื่องปิดผนึกด้วยความร้อน (heat sealer machine) และรวบรวมซองตัวอย่างใส่กล่องพลาสติกปิดฝา เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน -10 องศาเซลเซียส เมื่อทำการสุ่มตัวอย่างที่เตรียมได้ไปทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวกรณีที่พบว่าผลเป็นไปตามเกณฑ์ ISO 13528 : 2015 จะถือว่าตัวอย่างดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญ

วิธีวิเคราะห์การตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช

วิธีวิเคราะห์ที่ใช้เป็น modified QuEChERS^(7,8) Smart DI 0600 SOP 0005 : In-house method based on AOAC (2019) 2007.01 ซึ่งตัวอย่างพืชกัญชาที่บดละเอียด 1.0 กรัม ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นหรือน้ำ (deionized water) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อเพิ่มความชื้นจนตัวอย่างดูดซับน้ำและฟองตัว ใส่แท่งเซรามิกเพื่อช่วยในการกวนผสม จากนั้นเติม 1% acetic acid in acetonitrile 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือ 1 นาที เติมสารผสม extraction kit (AOAC 2007.01) แล้วเขย่าให้เข้ากันด้วยมืออีก 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ตัวอย่างจะเกิดการแยกชั้น ปิเปต 1 มิลลิลิตร ดูดสารสกัดชั้นบนนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย dispersive SPE ที่เหมาะสม จากนั้น centrifuge อีกครั้ง ที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างของแข็งและของเหลว ปิเปตสารละลายด้านบน 0.5 มิลลิลิตร ระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วปรับปริมาตรเป็น 0.5 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายผสมระหว่าง n-hexane และ ethyl acetate นำไปตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณด้วยเครื่องมือ GC-ECD สำหรับการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ และ GC-FPD สำหรับการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาฟอสฟอรัส วิเคราะห์ด้วยเทคนิค matrix-matched calibration curve มีการควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์ โดยทำการสกัดและตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างชา (dried tea) ที่ตรวจไม่พบสารตกค้าง (blank sample) แล้วเติมสารมาตรฐาน ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ใช้เกณฑ์ยอมรับการคืนกลับ (recovery) อยู่ในช่วง 70-120% วิธีที่ใช้วิเคราะห์ผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธี และความคุ้มครองกระบวนการวิเคราะห์ตามเอกสาร SANTE/12682/2019 ซึ่งเป็นแนวทางวิธีการตรวจสอบความถูกต้องและข้อกำหนดในการควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์ในสหภาพยุโรป เพื่อให้มั่นใจในความถูกต้องของข้อมูลที่ใช้สำหรับตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ระบุปริมาณการตกค้างสูงสุดที่สามารถยอมรับได้ตามกฎหมาย หรือนำข้อมูลไปใช้ในการประเมินการสัมผัสสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช

วิธีวิเคราะห์การปนเปื้อนของโลหะหนัก

การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของแคดเมียม (Cadmium) ด้วยวิธี In-house method based on AOAC (2019) 2015.01⁽⁹⁾ โดยซึ่งตัวอย่างพืชกัญชาที่บดละเอียด 0.6 กรัม ลงใน Quartz sample tube เติมน้ำกลั่นหรือน้ำ (deionized water) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันตัวอย่างเกิดการระเหิดจากการเติมกรดไนตริกเข้มข้น (min. 67% w/v,

high purity for trace analysis) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปย่อยด้วยเครื่องย่อยไมโครเวฟจนสารละลายใสไม่มีตะกอน ยกออกจากเครื่องและปล่อยให้เย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง แล้วเทใส่ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย deionized water ให้เป็น 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดหาความเข้มข้นของแคดเมียมโดยใช้เครื่องมือ ICP-MS

การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของตะกั่ว (Lead) และสารหนูทั้งหมด (Total Arsenic) โดยย่อยตัวอย่างพร้อมกันแล้ววัดหาปริมาณสารทั้งสองชนิดด้วยเทคนิคที่แตกต่างกัน ดังนี้ ซึ่งตัวอย่างพืชผักที่บดละเอียด 0.3 กรัม ลงใน Quartz sample tube เติมน้ำ deionized water ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันตัวอย่างเกิดการระเหยจากการเติมกรดไนตริกเข้มข้น (min. 67% w/v, high purity for trace analysis) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อยด้วยเครื่องย่อยไมโครเวฟจนสารละลายใสไม่มีตะกอน ยกออกจากเครื่องและปล่อยให้เย็นลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง จากนั้นเทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย deionized water ให้เป็น 25 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายปริมาตรประมาณ 1 - 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวัดหาความเข้มข้นของตะกั่วด้วยเครื่อง GFAAS ตาม Smart DI 0600 SOP 0012: AOAC (2019) 999.10⁽¹⁰⁾ และตรวจหาสารละลายปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำ internal standard ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดหาความเข้มข้นของสารหนูทั้งหมดด้วยเครื่องมือ ICP-MS ตาม In-house method based on AOAC (2019) 2015.01

การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของปรอททั้งหมด (Total Mercury) ใช้วิธี Smart DI 0600 SOP 0013: In-house method based on AOAC (2019) 997.15⁽¹¹⁾ โดยซึ่งตัวอย่างพืชผักที่บดละเอียด 0.3 กรัม ลงใน round bottom flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกรดผสมเข้มข้นระหว่างกรดไนตริกและกรดซัลฟิวริก อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ตั้งบนเปลวไฟเพื่อเร่งการย่อยสารอินทรีย์และอนินทรีย์จนกลายเป็นสารละลายใสไม่มีตะกอน ยกออกจากเปลวไฟและปล่อยให้เย็นลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง เติมน้ำสารละลาย KMnO₄ เพื่อออกซิไดส์ปรอทให้อยู่ในรูป Hg²⁺ จากนั้นเติมน้ำสารละลาย Tin (II) chloride เพื่อรีดิวซ์ปรอทให้อยู่ในรูป Hg⁰ ซึ่งอยู่ในสถานะไอ สามารถตรวจวัดปรอททั้งหมดโดยเครื่องมือ mercury analyzer ซึ่งเรียกว่า cold vapour atomic absorption spectrometry technique

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

สุ่มของบรรจุตัวอย่างพืชผักที่เตรียมได้ แบบสุ่มอิสระ (random sampling) จำนวน 10 ซอง โดยใช้คำสั่ง RANDBETWEEN ในโปรแกรม Excel ก่อนนำมาวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและโลหะหนัก โดยทำการวิเคราะห์ของละ 2 ซ้ำ ตามวิธีวิเคราะห์ที่ระบุดังกล่าวข้างต้น นำผลการวิเคราะห์มาคำนวณทางสถิติเพื่อตรวจสอบค่าสุดต่าง (maximum difference) โดยใช้ Cochran's test ในการทดสอบความแปรปรวนภายในของตัวอย่าง (within sample variation) จากนั้นทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันตาม ISO 13528: 2015 โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย One way ANOVA single factor for homogeneity test ได้ค่า mean square between (MSB) และ mean square within (MSW) คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างตัวอย่าง (S_s , between samples standard deviation)

$$\text{จากสูตร} \quad S_s = \frac{\sqrt{MSB - MSW}}{\sqrt{2}}$$

โดยใช้เกณฑ์ยอมรับที่ S_s ของทุกรายการวิเคราะห์ ควรมีค่าน้อยกว่า 0.3 ของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานประเมินผลการทดสอบความชำนาญ (standard deviation ของ PT, σ_{pt})

การทดสอบความคงตัว

สุ่มของบรรจุตัวอย่างพืชกัญชา แบบสุ่มอิสระ จำนวน 3 ของ นำมาบรรจุในซองกระดาษ วางไว้ในพื้นที่ที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 3 วัน เพื่อเลียนแบบสภาวะการขนส่งที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ ในช่วงเวลาการเดินทางจากสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ไปถึงห้องปฏิบัติการสมาชิก จากนั้นนำมาเก็บไว้ที่ -10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน นำมาวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและโลหะหนัก โดยควบคุมสภาวะที่เหมือนกันตลอดกระบวนการทดสอบคงตัวและการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ได้แก่ วิธีวิเคราะห์ ผู้วิเคราะห์ และเครื่องมือ นำค่าเฉลี่ยที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน พิจารณาการยอมรับจากเกณฑ์กำหนดตาม ISO 13528 : 2015

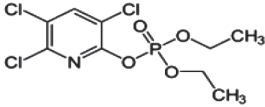
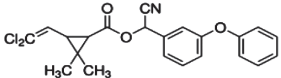
ผล

ตัวอย่างพืชกัญชาที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นผง ขนาดไม่เกิน 1.0 มิลลิเมตร น้ำหนักรวม 840 กรัม เมื่อสุ่มตัวอย่างจาก 3 จุด และนำแต่ละจุดมาตรวจวิเคราะห์ พบว่ามีการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ได้แก่ chlorpyrifos และ cypermethrin และตรวจพบการปนเปื้อนของโลหะหนัก ได้แก่ cadmium, lead, total arsenic และ total mercury โดยผลการทดสอบปริมาณสารผ่านเกณฑ์ของการทำซ้ำ น้อยกว่าร้อยละ 22 ของทุกสาร จากนั้นทำการแบ่งบรรจุ ได้ตัวอย่างจำนวน 56 ของ งานวิจัยครั้งนี้ต้องการนำเสนอรายละเอียดผลการศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกัน และความคงตัวของสาร 3 ชนิด ได้แก่ chlorpyrifos, cypermethrin และ cadmium ซึ่งสมบัติทางเคมีและความเป็นพิษของสารเหล่านี้ดังแสดงในตารางที่ 1

ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ของสารดังกล่าวจากตัวอย่าง 10 ของ ทำการวิเคราะห์ของละ 2 ซ้ำ พบปริมาณสารและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ดังนี้ chlorpyrifos 85.6 ± 3.5 , cypermethrin $32,520 \pm 1,625$ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ cadmium 344 ± 18 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อประเมินค่าความเบี่ยงเบนทางสถิติของปริมาณสารตกค้างภายในซองตัวอย่างเดียวกัน และระหว่างซองตัวอย่างที่ต่างกัน จากเกณฑ์กำหนด ตาม ISO 13528 : 2015 การวิเคราะห์ค่าสุดต่างโดย Cochran's test เพื่อทดสอบความแปรปรวนภายในของตัวอย่าง และคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างตัวอย่าง (between samples standard deviation, s_b) พบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างตัวอย่าง มีค่าน้อยกว่า 0.3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเป้าหมายที่คำนวณจาก Horwitz' equation และค่าเฉลี่ยของการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (ค่า $s_b < 0.3\sigma_{pt}(\text{Horwitz})$) ซึ่งแสดงว่าตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกันและเพียงพอที่จะใช้เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ดังแสดงในตารางที่ 2

เนื่องจากคุณสมบัติสำคัญของตัวอย่างทดสอบความชำนาญต้องมีทั้งความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว ในช่วงเวลาที่กำหนดเพื่อดำเนินแผนทดสอบความชำนาญ ดังนั้นเมื่อตัวอย่างพืชกัญชาที่เตรียมผ่านการทดสอบและมีสมบัติของความเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว จำเป็นจะต้องศึกษาความคงตัวของสารในตัวอย่าง เพื่อให้มั่นใจว่าตัวอย่างดังกล่าวมีความเหมาะสมที่จะใช้ในการประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการ จากการออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาความคงตัวโดยเก็บตัวอย่างในบริเวณที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งตัวอย่างจะอยู่ในสภาวะสัมผัสกับอุณหภูมิในช่วง $28-34$ องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาเก็บไว้ที่ -10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน ก่อนนำมาวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและการวิเคราะห์โลหะหนักด้วยวิธีวิเคราะห์เดียวกันกับการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน มีค่าเฉลี่ยจากการทดสอบความคงตัวและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานดังนี้ chlorpyrifos 89.6 ± 3.4 , cypermethrin $33,75 \pm 2,619$ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ cadmium 321 ± 11 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ 1 สมบัติทางเคมีและความเป็นพิษของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและโลหะหนักในตัวอย่างพืชผัก

Chemicals	Properties	Toxicity
Organophosphorus pesticide: chlorpyrifos 	CAS Number 2921-88-2 Molecular Formula $C_9H_{11}Cl_2NO_3PS$	Acute toxicity, (Category 3), H301 Toxic if swallowed Acute toxicity, (Category 1), H400 Very toxic to aquatic life. Aquatic Chronicity, (Category 1), H410 Very toxic to aquatic life with long lasting effects Acceptable Daily Intake (ADI): 0.01 mg/kg body weight (JMPR in 2004) ⁽¹²⁾
Synthetic pyrethroid Pesticide: cypermethrin (mix isomers) 	CAS Number: 52315-07-8 Molecular Formula $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$	Acute toxicity, Oral (Category 3), H301 Acute toxicity, Inhalation (Category 4), H332 Specific target organ toxicity - single exposure (Category 3), Respiratory system, H335 Acceptable Daily Intake (ADI): 0-0.02 mg/kg body weight, summary for cypermethrins, including alpha-cypermethrin and zeta-cypermethrin (JMPR in 2006) ⁽¹³⁾
Food Contaminant: Cadmium Cd^{2+}	CAS Number: 7440-43-9	Mutagenicity, (category 1B), H340 May cause genetic defects Carcinogenicity, (category 1B), H350 May cause cancer Reproduction toxicity, (category 1), H360 May damage fertility or the unborn child. Eye irritation (category 2A), H319 Causes serious eye irritation. Provisional tolerable monthly intake (PTMI): 25 µg/kg body weight ⁽¹⁴⁾

วิเคราะห์ผลความคงตัวโดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย จากการทดสอบความคงตัวเป็นเนื้อเดียวกันและค่าเฉลี่ย จากการทดสอบความคงตัว ซึ่งผลของการศึกษาความคงตัวของปริมาณสาร chlorpyrifos cypermethrin และ cadmium เมื่อเก็บในสภาวะเลียนแบบการขนส่งโดยไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 3 วัน พบว่ามีความคงตัวเพียงพอตามมาตรฐาน ISO 13528 : 2015 รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและโลหะหนักในตัวอย่างพืชกัญชา

รหัสตัวอย่าง	ปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้าง ($\mu\text{g/kg}$)				ปริมาณโลหะปนเปื้อน ($\mu\text{g/kg}$)	
	Chlorpyrifos		Cypermethrin		Cadmium	
	Duplicate 1	Duplicate 2	Duplicate 1	Duplicate 2	Duplicate 1	Duplicate 2
#MJ-05	86.6	83.2	33,833	34,134	357	314
#MJ-10	92.9	84.6	30,632	32,299	362	346
#MJ-14	81.5	87.3	30,694	32,939	347	324
#MJ-18	92.7	83.0	29,825	32,411	344	347
#MJ-22	81.7	82.5	29,051	32,043	326	333
#MJ-28	90.6	87.4	35,670	32,374	358	328
#MJ-49	84.7	83.0	32,438	33,055	364	359
#MJ-51	84.6	88.1	31,791	34,089	317	353
#MJ-55	87.6	84.2	33,391	33,055	349	317
#MJ-56	84.9	81.5	34,679	32,002	371	369
Mean _{homogeneity}	85.6		32,520		344	
SD	3.5		1,625		18	
Cochran _{critical}	0.602		0.602		0.602	
Cochran _{calculation}	0.367		0.229		0.311	
$\sigma_{\text{pt(Horwitz)}}$	18.8		3,080		65	
$s_s(\text{between samples standard deviation})$	0		537.8		8	
$0.3 \sigma_{\text{pt(Horwitz)}}$	5.6		924		19	
$s_s < 0.3 \sigma_{\text{pt(Horwitz)}}$	Passed		Passed		Passed	

หมายเหตุ s_s (between samples standard deviation) คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างตัวอย่าง

$$\text{คำนวณ จาก } s_s = \frac{\sqrt{|\text{MSB}-\text{MSW}|}}{\sqrt{2}}$$

$\sigma_{\text{pt(Horwitz)}}$ คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเป้าหมายที่คำนวณจาก Horwitz' equation และค่าเฉลี่ยของการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันเพื่อใช้ประเมินผลการทดสอบความชำนาญ

เมื่อนำค่าปริมาณสารตกค้างและสารปนเปื้อนที่ได้จากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน และทดสอบความคงตัว แสดงเป็น scatter plot เพื่อสังเกตแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างลำดับหมายเลขตัวอย่างหรือลำดับของการแบ่งบรรจุ โดย แกน x คือ หมายเลขตัวอย่างที่ซ่อง และ แกน y คือ ปริมาณสาร โดยปริมาณสารทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ chlorpyrifos, cypermethrin และ cadmium มีการกระจายตัว ดังแสดงในภาพที่ 1-3 ตามลำดับ จากภาพที่ 1 พบว่าผลการวิเคราะห์ความเป็นเนื้อเดียวกันของสาร chlorpyrifos มีการกระจายตัวอยู่ในช่วง $\pm 0.3 \sigma_{\text{pt(Horwitz)}}$ มีค่าเฉลี่ยของความเป็นเนื้อเดียวกันที่ความเข้มข้น 85.6 ± 3.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) ร้อยละ 4.1 และค่าเฉลี่ยความคงตัวที่ 89.6 ± 3.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับ เนื่องจาก $|y_1 - y_2| < 0.3 \sigma_{\text{pt(Horwitz)}}$

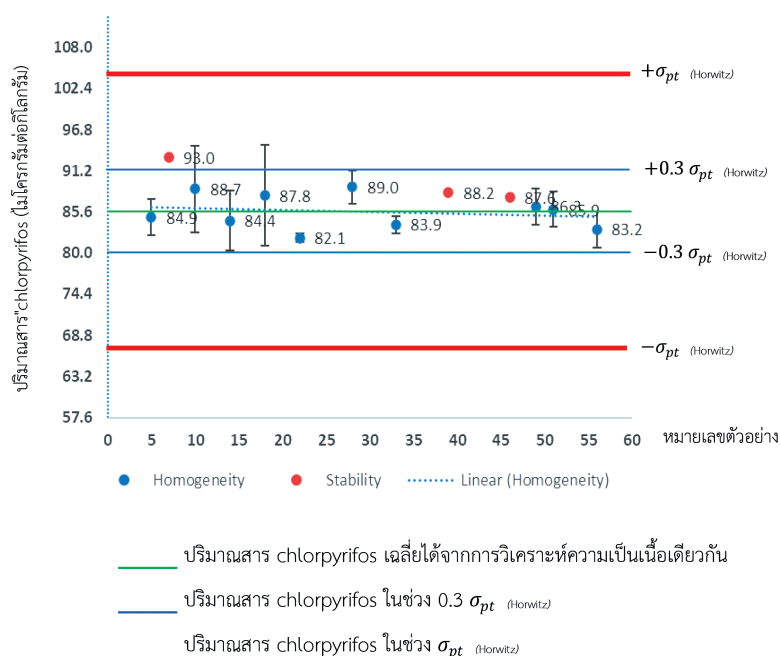
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความคงตัวของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและโลหะหนักในตัวอย่างพืชผัก

รหัสตัวอย่าง	ปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้าง ($\mu\text{g/kg}$)				ปริมาณโลหะปนเปื้อน ($\mu\text{g/kg}$)	
	Chlorpyrifos		Cypermethrin		Cadmium	
	Duplicate 1	Duplicate 2	Duplicate 1	Duplicate 2	Duplicate 1	Duplicate 2
#MJ-07	95.3	90.8	35,296	35,213	303	335
#MJ-39	89.7	86.6	33,478	33,267	322	326
#MJ-46	89.3	85.9	36,302	28,961	322	317
Mean _{(stability): y2}	89.6		33,753		321	
SD	3.4		2,619		11	
Mean _{(homogeneity): y1}	85.6		32,520		344	
$ y_1 - y_2 $	4.0		1,233		23	
$\sigma_{\text{pt(Horwitz)}}$	18.8		3,080		65	
$0.3\sigma_{\text{pt(Horwitz)}}$	5.6		924		19	
$ y_1 - y_2 < 0.3\sigma_{\text{pt(Horwitz)}}$	Passed		Not Passed ^a		Not Passed ^a	
$0.3\sigma_{\text{pt(Horwitz)} + 2\sqrt{u^2(y_1) + u^2(y_2)}}$	-		2,028		27	
$ y_1 - y_2 < 0.3\sigma_{\text{pt(Horwitz)} + 2\sqrt{u^2(y_1) + u^2(y_2)}}$	-		Passed ^b		Passed ^b	

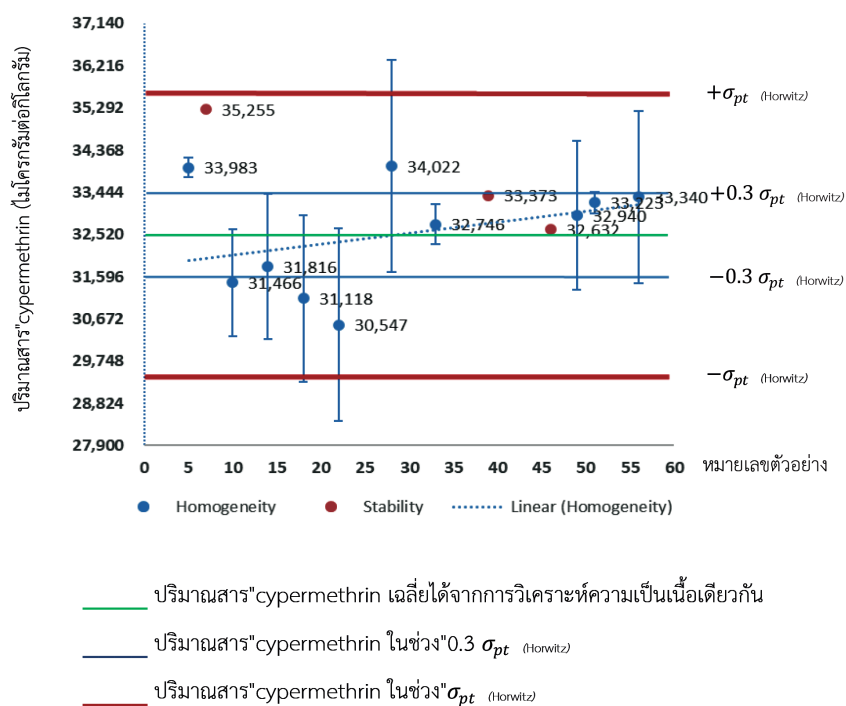
หมายเหตุ: ^a ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณสารจากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและปริมาณสารจากการทดสอบความคงตัว มีค่ามากกว่า 0.3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเป้าหมาย ที่คำนวณจาก Horwitz' equation เพื่อใช้ประเมินผลการทดสอบความชำนาญ

^b ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณสารจากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและปริมาณสารจากการทดสอบความคงตัวอยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับ เมื่อค่าความไม่แน่นอนขยายของค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและการทดสอบความคงตัว รวมกับ 0.3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเป้าหมาย ที่คำนวณจาก Horwitz' equation

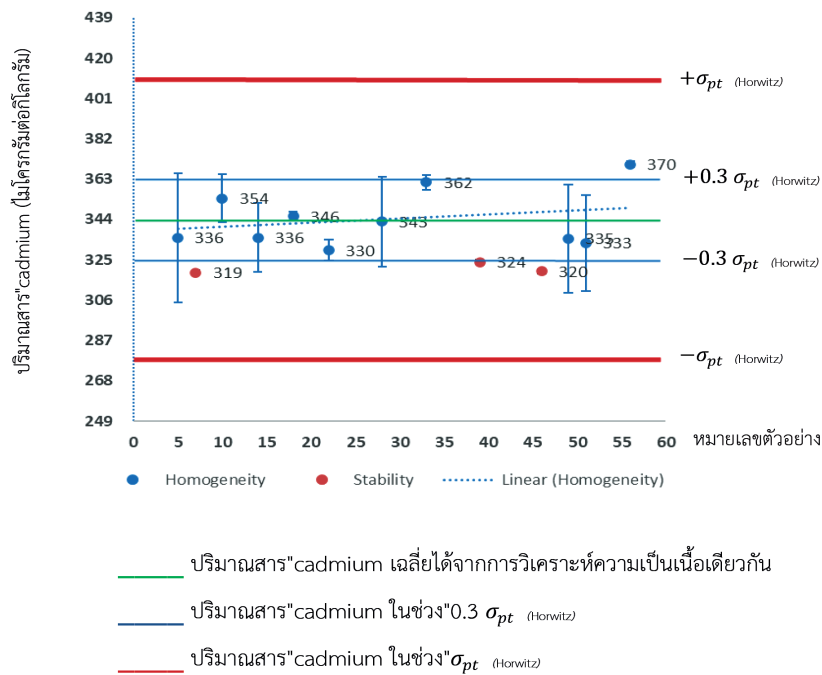
ผลการวิเคราะห์ความเป็นเนื้อเดียวกันของสาร cypermethrin ดังแสดงในภาพที่ 2 พบว่ามีการกระจายตัวอยู่ในช่วง $\pm 0.3 \sigma_{\text{pt(Horwitz)}}$ มีค่าเฉลี่ยของความเป็นเนื้อเดียวกันที่ความเข้มข้น $32,520 \pm 1,625$ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า RSD ร้อยละ 5.0 ในเบื้องต้นผลค่าเฉลี่ยของการทดสอบความคงตัวที่ $33,750 \pm 2,619$ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าไม่อยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับ แต่เมื่อนำค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty) ของค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและการทดสอบความคงตัว รวมกับ 0.3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเป้าหมาย ที่คำนวณจาก Horwitz' equation ซึ่งเป็นการขยายช่วงเกณฑ์ยอมรับ คำนวณจากสูตร $|y_1 - y_2| < 0.3 \sigma_{\text{pt(Horwitz)} + 2\sqrt{u^2(y_1) + u^2(y_2)}}$ จะพบว่าสาร cypermethrin ในตัวอย่างมีความคงตัวอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ สำหรับผลการวิเคราะห์ความเป็นเนื้อเดียวกันของ cadmium จะพบว่ามีมีการกระจายตัวอยู่ในช่วง $\pm 0.30.3\sigma_{\text{pt(Horwitz)}}$ มีค่าเฉลี่ยของความเป็นเนื้อเดียวกันที่ความเข้มข้น 344 ± 18 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า RSD ร้อยละ 5.2 ในเบื้องต้นผลค่าเฉลี่ยของการทดสอบความคงตัวที่ 321 ± 11 มีค่าไม่อยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับ แต่เมื่อนำค่าความไม่แน่นอนขยายช่วงเกณฑ์ยอมรับโดยพิจารณาค่าความไม่แน่นอนเช่นเดียวกันกับกรณีการทดสอบความคงตัวของสาร cypermethrin พบว่า cadmium มีความคงตัวอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 1 การกระจายตัวของผลวิเคราะห์ปริมาณสาร chlorpyrifos จากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและการทดสอบความคงตัว



ภาพที่ 2 การกระจายตัวของผลวิเคราะห์ปริมาณสาร cypermethrin จากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน และการทดสอบความคงตัว



ภาพที่ 3 การกระจายตัวของผลวิเคราะห์ค่าปริมาณโลหะ cadmium จากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน การทดสอบความคงตัว

วิจารณ์

การศึกษาพัฒนาตัวอย่างทดสอบพืชผัก โดยเลือกชนิดตัวอย่างที่ตรวจพบการตกค้างอยู่แล้ว (incurred sample) เนื่องจากพืชผักมีการดูดซึมสารเหล่านี้เข้าไปในเนื้อเยื่อพืชได้จากสิ่งแวดล้อมหรืออาจได้รับการฉีดพ่นในแปลงเกษตร หรือนีตพ่นเพื่อทำลายแมลงที่อาจก่อให้เกิดความเสียหายในขณะเก็บรักษาผักแห้ง เป็นต้น ซึ่งจะเป็นสภาพตัวอย่างจริงที่ห้องปฏิบัติการจะได้รับ ทั้งนี้ตัวอย่างดังกล่าวจะเกิดประโยชน์ในการใช้ประเมินประสิทธิภาพวิธีวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติสมาชิกเครือข่ายที่อาจผ่านการศึกษ single laboratory validation โดยใช้ spiked sample เพียงอย่างเดียว แม้ว่าจะมีค่าใช้จ่ายของการกลับคืนในการควบคุมคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ แต่เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่เป็น incurred sample อาจมีผลวิเคราะห์ที่เบี่ยงเบนไปในทางลบ หรือน้อยกว่าค่าปริมาณสารในตัวอย่างทดสอบที่เป็นค่ากำหนด สังเกตจากผลการประเมินมีค่า z-score เป็นลบนอกเกณฑ์กำหนด ซึ่งห้องปฏิบัติการควรพิจารณาสาเหตุสำคัญ ได้แก่ การเลือกใช้ตัวทำละลายที่ไม่เหมาะสมหรือมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอ ที่จะละลายหรือสกัดสารที่อยู่ในเนื้อเยื่อของตัวอย่างออกมา โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นพืชแห้ง ในการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและการวิเคราะห์โลหะหนัก จำเป็นต้องมีขั้นตอนการเติมน้ำลงในตัวอย่างทั้งนี้เพื่อให้เนื้อเยื่อของตัวอย่างและเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดเมื่อเติมตัวทำละลาย ในกรณีที่ไม่มีการเติมน้ำจะพบว่าผลการวิเคราะห์มีปริมาณสารน้อยกว่าเมื่อเติมน้ำเนื่องจากตัวทำละลายจะสามารถสกัดสารที่เคลือบอยู่ที่บนผิวของตัวอย่างได้เท่านั้น การใช้ตัวอย่างทดสอบความชำนาญลักษณะดังกล่าวจึงสอดคล้องกับหลักการออกแบบตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่มุ่งให้เกิดประโยชน์ต่อการพัฒนาความสามารถของห้องปฏิบัติการสมาชิกล้วนจะต้องคำนึงถึงชนิดและปริมาณสารที่ตรวจวัดให้สอดคล้องใกล้เคียงกับตัวอย่างจริงที่ห้องปฏิบัติการทำการวิเคราะห์ รวมทั้งใช้สารมาตรฐานที่มีสมบัติการสอกลับได้ทางมาตริวิทยา ทำให้สามารถต่อยอดพัฒนาตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่มีคุณสมบัติ

เป็นวัสดุอ้างอิงเนื่องจากมีเป็นความเป็นเนื้อเดียวกัน มีความคงตัวที่เหมาะสมและมีค่าความไม่แน่นอนที่มีความสมเหตุสมผลน่าเชื่อถือ อย่างไรก็ตามการค้นหาคำว่าตัวอย่างที่เป็น incurred sample ที่มีชนิดสารและปริมาณที่เหมาะสมกับการประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการนั้นเป็นเรื่องยาก อาจต้องมีการคัดเลือกตัวอย่างจากหลายแหล่งเพื่อนำมาวิเคราะห์ทราบปริมาณสารในเบื้องต้นที่เหมาะสมแล้วนำมาเตรียมเป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญต่อไป

จากผลการวิเคราะห์ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน พบชนิดสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้าง ได้แก่ chlorpyrifos มีค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ระดับความเข้มข้น 85.6 ± 3.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อเทียบกับปริมาณสูงสุด (maximum limits, ML) ของ chlorpyrifos ที่ระบุ 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (หรือ 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) คิดเป็นปริมาณตกค้างน้อยกว่าค่า ML ประมาณ 0.4 เท่า ในขณะที่พบสาร cypermethrin ที่ $32,520 \pm 1,625$ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม คิดเป็นปริมาณตกค้างมากกว่าค่า ML 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (หรือ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ถึง 32.5 เท่า และพบการปนเปื้อนของ cadmium ที่ระดับความเข้มข้น 344 ± 18 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับค่า ML ที่ระบุ 0.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย พ.ศ. 2560 และฉบับเพิ่มเติม ดังนั้นตัวอย่างพืชกัญชาที่เตรียมได้มีชนิดและปริมาณสารที่สามารถใช้เป็นตัวแทนชนิดสาร ที่มีการควบคุมปริมาณสารตกค้างและโลหะหนักปนเปื้อนในวัตถุดิบกัญชาสำหรับการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์จากผลศึกษาความคงตัวโดยเก็บไว้ในพื้นที่ที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิเพื่อเลียนแบบสถานะในขณะขนส่ง ซึ่งตัวอย่างที่เตรียมได้มีการสัมผัสกับอุณหภูมิในช่วง 28-34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างพืชกัญชาที่เตรียม มีสมบัติของความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวเพียงพอ ตามเกณฑ์กำหนดมาตรฐาน ISO 13528: 2015 สามารถใช้เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่มีคุณภาพในการประเมินความสามารถการวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) เพื่อระบุชนิดของสารและการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) ของห้องปฏิบัติการสมาชิกเครือข่ายได้ต่อไป

สรุป

ตัวอย่างทดสอบความชำนาญพืชกัญชาที่เตรียมได้มีคุณสมบัติความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวที่เหมาะสมเป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับมาตรฐาน ISO 13528: 2015 สามารถนำไปใช้ในการประเมินความสามารถห้องปฏิบัติการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและโลหะหนัก ทั้งการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสาร chlorpyrifos, cypermethrin และ cadmium ในพืชกัญชา ซึ่งอ้างอิงการกำหนดค่าปริมาณสูงสุดเพื่อควบคุมปริมาณสารตกค้างและสารปนเปื้อนในวัตถุดิบสำหรับผลิตภัณฑ์ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย พ.ศ. 2560 การจัดทำแผนทดสอบความชำนาญการวิเคราะห์กัญชาที่ใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีวัตถุประสงค์เพื่อติดตามประเมินผลและพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการเครือข่ายให้มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ตัวอย่างพืชกัญชาโดยตรงเนื่องจากพืชกัญชาเป็นกลุ่มตัวอย่างชนิดใหม่ซึ่งหลายห้องปฏิบัติการอาจไม่มีประสบการณ์วิเคราะห์ และการใช้ตัวอย่างทดสอบความชำนาญที่มีลักษณะเป็น incurred sample ที่เป็นตัวแทนของตัวอย่างจริง ทำให้เกิดประโยชน์ในการประเมินประสิทธิภาพ วิธี และความสามารถของผู้วิเคราะห์ จากการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการซึ่งเป็นวิธีการควบคุมคุณภาพจากภายนอก (external quality control) ตามข้อกำหนดของมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2017⁽¹⁵⁾ นอกเหนือจากการใช้ spiked sample ซึ่งห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ใช้ในการวิเคราะห์เพื่อควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control) ทั้งนี้เมื่อห้องปฏิบัติการนำผลวิเคราะห์ จากการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการมาปรับปรุงคุณภาพการวิเคราะห์นั้น เป็นการส่งเสริมพัฒนาความสามารถเครือข่ายห้องปฏิบัติการของประเทศให้มีคุณภาพ เป็นที่ยอมรับในความเท่าเทียมกันของผลการวิเคราะห์ และสร้างความมั่นใจให้กับผู้ที่นำผลการวิเคราะห์ไปใช้ประโยชน์ในการคัดกรองวัตถุดิบพืชกัญชาให้ได้คุณภาพตามที่ต้องการและลดความเสี่ยงของสารตกค้างและสารปนเปื้อนก่อนนำมาใช้ในการผลิตยาและผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ภายใต้โครงการบูรณาการพัฒนากัญชาทางการแพทย์และผลิตภัณฑ์สุขภาพจากพืชกัญชา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562-2565 และได้รับการสนับสนุนให้ดำเนินงานจนสำเร็จจากผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ขอขอบคุณนางสาวจิตตภา สันต์ตรบ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์เชี่ยวชาญ ที่ให้คำปรึกษาในการวางแผนทดสอบความชำนาญ และนางสาวบุษยา แสงวิรุฬห์ หัวหน้าฝ่ายสารพิษและสารปนเปื้อนที่เป็นที่ปรึกษาในการวิเคราะห์โลหะหนัก

เอกสารอ้างอิง

1. พระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ ฉบับที่ 7 (พ.ศ. 2562). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 136 ตอนที่ 19 ก (วันที่ 18 กุมภาพันธ์ 2562). หน้า 1.
2. พระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 (พ.ศ. 2563). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 290 ง (วันที่ 14 ธันวาคม 2563). หน้า 33.
3. Department of Medical Sciences. Thai herbal pharmacopoeia 2017. Nonthaburi, Thailand : Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; 2017.
4. สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร. รายงานประจำปี 2563. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 10 ก.ค. 2564]; [97 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL : http://bqsf.dmshc.moph.go.th/bqsfWeb/wp-content/uploads/2017/Publish/annual_report/BQSF%20Annual%20Report-2020.pdf.
5. ISO 13528 : 2015. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva, Switzerland : International Organization for Standardization; 2015.
6. ISO/IEC 17043 : 2010. Conformity assessment – general requirements for proficiency testing. Geneva, Switzerland : International Organization for Standardization; 2010.
7. AOAC Official Method 2007.01 : Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate. In : Official methods of analysis. 19th ed. Rockville, Maryland : AOAC International; 2012.
8. รติยากร ศรีโคตร, วิชาดา จงมีวาสนา. วิธีลดปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้. ว รมวทย พ 2564; 63(1): 38-50.
9. Briscoe. M. Determination of heavy metals in food by inductively coupled plasma-mass spectrometry : First Action 2015.01. J AOAC Int 2015; 98(4): 1113-20.
10. AOAC Official Method 999.10 : Lead, cadmium, zinc, copper, iron in foods. Atomic absorption spectrophotometry after microwave digestion. In : Official methods of analysis. 21th ed. Rockville, Maryland : AOAC International; 2019.
11. AOAC Official Method 997.15 : Lead in sugars and syrups. Graphite furnace atomic absorption method. In : Official method of analysis. 21th ed. Rockville, Maryland : AOAC International; 2019.
12. World Health Organization. Pesticide residues in food 2004 : joint meeting of the FAO panel of experts on pesticide residues in food and the environment and the WHO core assessment

- group. 20–29 September 2004. Rome, Italy : Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2004. p. 44–48.
13. World Health Organization. Pesticide residues in food 2006 : joint FAO/WHO meeting on pesticide residue. Rome, Italy : Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2006. p. 95–101.
 14. World Health Organization. Preventing disease through health environments. Exposure to cadmium : a major public health concern. Geneva, Switzerland : WHO; 2010.
 15. ISO/IEC 17025 : 2017. General requirement for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva, Switzerland : International Organization for Standardization; 2017.
-

Development of Cannabis Proficiency Test Sample for Pesticide Residue and Heavy Metal Analysis

Wischada Jongmevasna Panawan Kluengklangdon Weerawut Wittayanon Supat Sangsuay
Thoranit Chaimongkol and Kanpirom Lertbumroongchai

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

ABSTRACT Since 2019, the medicinal cannabis policy has been established, the value chains related to cannabis plantation, distribution and product development have then been dramatically increasing. For the quality and safety of medical product' concerns, pesticide residues and heavy metals are highly recommended parameters for cannabis raw material analysis. To monitor and enhance the competency of DMSc network laboratories, the Department of Medical Sciences, a reference laboratory for medical services and public health has planned for setting the cannabis proficiency testing. Therefore, this study focused on the development of a cannabis proficiency test (PT) sample. The dried cannabis containing incurred pesticide residues and heavy metals provided by the Office of the Narcotics Control Board was prepared, packed and tested for its homogeneity. The result showed that the candidate PT sample was sufficiently homogeneous, the average concentration and standard deviation determined by using GC-ECD/FPD for chlorpyrifos and cypermethrin were in the range of 85.6 ± 3.5 and $32,520 \pm 1,625$ $\mu\text{g/kg}$, respectively. That of cadmium analyzed by using ICP-MS was 344 ± 18 $\mu\text{g/kg}$. In addition, temperature effects during transportation for 3-day at uncontrolled temperature and 2-month at -10°C storage were carried out. Chlorpyrifos, cypermethrin and cadmium concentrations still remained at the level of 89.6 ± 3.4 , $33,753 \pm 2,619$ and 321 ± 11 $\mu\text{g/kg}$, respectively. As a result of statistical analysis, it indicated that those analytes in the prepared PT sample were satisfactorily homogeneous and stable. It could be concluded that the prepared sample was successfully developed as a potential PT sample with sufficiently homogeneous and stable properties following ISO 13528: 2015 and suitably used for the laboratory evaluation of pesticide residues and heavy metals.

Keywords: Proficiency test sample, Cannabis, Pesticide residue, Trace element

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สาร กลุ่มแคนนาบินอยด์ในน้ำมะพร้าว โดยเทคนิค LC-MS/MS

สกุรัตน์ สมสันติสุข อัจฉรี อินแก้ว เสาวณีย์ วาจาสิทธิ์ สุวิมล หมวดหิมะ กัญญารัตน์ เชื้อกุลชาติ วิทวัส วังแก้วหิรัญ และทองสุข ปายะนันท์

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ กัญชาและกัญชงจัดเป็นยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 5 แต่ปัจจุบันได้อนุญาตให้นำบางส่วนไปใช้ได้อย่างถูกกฎหมายตามเงื่อนไขที่กำหนด ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มที่มีกัญชาหรือกัญชงเป็นส่วนประกอบกลายเป็นที่สนใจของทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค เนื่องจากมีสารสำคัญกลุ่มแคนนาบินอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ทั้ง psychotropic และ non-psychotropic มีอนุพันธ์หลัก ได้แก่ CBD และ Δ^9 -THC สามารถช่วยให้ผ่อนคลาย คลายความกังวล และช่วยในการนอนหลับ อย่างไรก็ตามการบริโภคในปริมาณที่มากเกินไปอาจก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ เช่น เชื่องซึม ปวดศีรษะ หัวใจเต้นแรง และอาจรุนแรงจนถึงขั้นประสาทหลอน และควบคุมตัวเองไม่ได้ ดังนั้นการควบคุมปริมาณแคนนาบินอยด์ในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มจึงมีความสำคัญในการคุ้มครองความปลอดภัยของผู้บริโภค สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารได้พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, THCA, THCV, CBD และ CBN ในน้ำมะพร้าว โดยการสกัดอาศัยเทคนิค liquid-liquid extraction แล้ว clean-up ด้วย SPE HLB cartridge ทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณโดยเทคนิค LC-MS/MS พบว่าวิธีนี้มีขีดจำกัดของการตรวจพบเท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงเท่ากับ 3 – 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และมีค่า correlation coefficient ในช่วง 0.9921 – 0.9985 มีความแม่นยำแสดงด้วยค่าเฉลี่ย %recovery อยู่ในช่วง 91.16 – 113.37% และความเที่ยงแสดงด้วย %RSD อยู่ในช่วง 2.65 – 15.00% วิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้มีความน่าเชื่อถือและเหมาะสมในการนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์สารแคนนาบินอยด์ในเครื่องดื่มแต่งกลิ่นรส

คำสำคัญ: กัญชา, กัญชง, แคนนาบินอยด์, LC-MS/MS, น้ำมะพร้าว

Corresponding author E-mail sakulrat.so@dmsc.mail.go.th

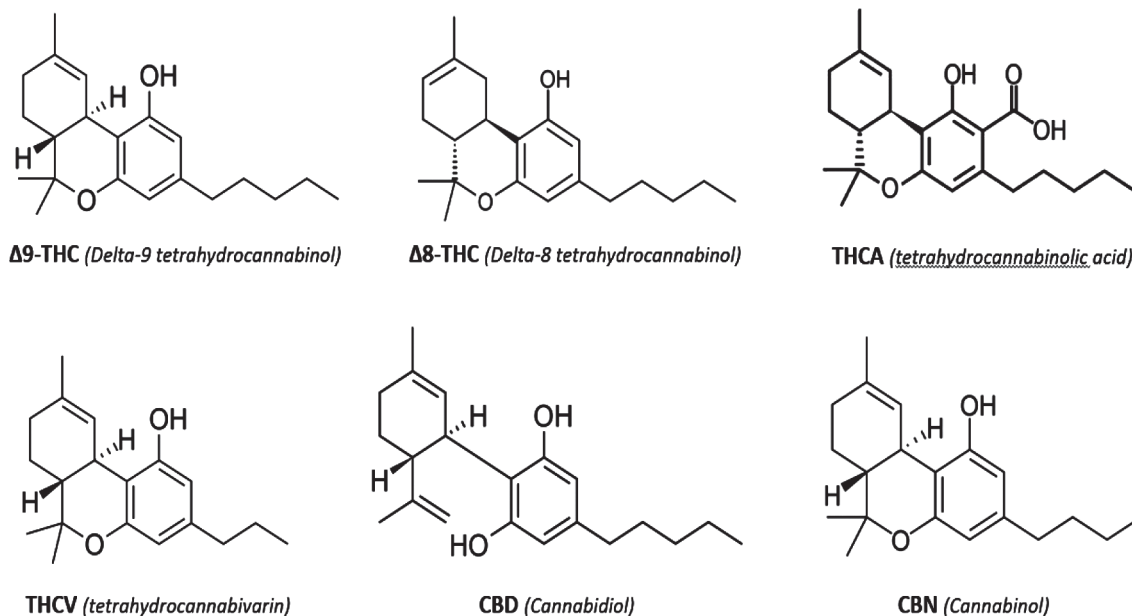
Received: 15 July 2021

Revised: 8 September 2021

Accepted: 10 September 2021

บทนำ

กัญชา (Cannabis) และ กัญชง (Hemp) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. เป็นพืชล้มลุกชนิดหนึ่งในวงศ์ Cannabidaceae ซึ่งกำลังได้รับความสนใจจากหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย เนื่องจากมีฤทธิ์ช่วยให้ผ่อนคลาย สดชื่น คลายความตึงเครียดและกังวล บรรเทาความรู้สึกเจ็บปวด และช่วยให้นอนหลับ ซึ่งฤทธิ์นี้มาจากสารเคมีที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของพืชกัญชาและกัญชง ได้แก่ สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ ซึ่งมีมากกว่า 60 ชนิด⁽¹⁾ แบ่งตามลักษณะการออกฤทธิ์ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ สารที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท (non-psychoactive compound) เช่น Tetrahydrocannabinolic acid (THCA), Cannabidiol (CBD) และ Cannabinol (CBN) และสารที่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท (psychoactive compound) โดยสารที่สามารถออกฤทธิ์ได้มากที่สุด คือ Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) โดยสาร THC นี้จะออกฤทธิ์คล้าย Endocannabinoid ที่พบในร่างกายของสัตว์และมนุษย์ เมื่อจับกับตัวรับจำเพาะ ซึ่งได้แก่ Cannabinoid receptors ชนิด CB1 ที่พบมากในสมอง จะส่งผลให้รู้สึกมีความสุข และยังมีผลต่อสมองส่วนที่รับรู้ความกังวล ความเจ็บปวด การรับรู้ความรู้สึก การควบคุมระบบการเคลื่อนไหวของร่างกาย และระบบต่อมไร้ท่ออีกด้วย ส่วนตัวรับชนิด CB2 จะพบมากที่เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน และเส้นประสาทส่วนปลาย⁽²⁾ ผลของการได้รับแคนนาบินอยด์จึงคล้ายกับยากระตุ้นประสาท ยากดประสาท ยาหลอนประสาท ยาแก้ปวด และยาที่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท การนำมาใช้จึงอาจก่อให้เกิดประโยชน์และโทษ ขึ้นอยู่กับปริมาณที่รับเข้าไป และสภาพร่างกายของบุคคล ดังแสดงในตารางที่ 1⁽³⁾



ภาพที่ 1 โครงสร้างของสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในกัญชาและกัญชง⁽³⁾

หลายประเทศมีการปรับเปลี่ยนกฎหมายหรือออกกฎหมายใหม่ที่เกี่ยวข้องกับกัญชาและกัญชงเพื่อเปิดทางสู่การนำไปใช้เชิงพาณิชย์มากขึ้น สำหรับประเทศไทยมีการออกประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 424⁽⁴⁾ ระบุให้บางส่วนของพืชกัญชาและกัญชง ได้แก่ เปลือก ลำต้น เส้นใย กิ่งก้าน ราก ใบ (ที่ไม่มีช่อดอกติดมาด้วย) สารสกัด และกากที่เหลือจากการสกัด (ที่มี THC ไม่เกิน 0.2% โดยน้ำหนักแห้ง) เฉพาะที่ได้รับอนุญาตให้ผลิตในประเทศเท่านั้น ปลดพ้นจากการเป็นยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 5 และมีการส่งเสริมการนำกัญชาและกัญชงมาใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์สุขภาพ เครื่องสำอางและอาหาร เพื่อตอบสนองนโยบายการพัฒนา กัญชาและกัญชงเป็นพืชเศรษฐกิจ ซึ่งได้รับการตอบรับที่ดีมากและมีการนำมาใช้อย่างกว้างขวาง เนื่องจาก CBD เป็นสารจากธรรมชาติที่ให้ฤทธิ์หลากหลายและมีประโยชน์

ต่อสุขภาพ เช่น ช่วยการนอนหลับ เจริญอาหาร ลดการอักเสบ ลดปวด ลดอาการเกร็งกล้ามเนื้อ ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นยาและอาหารได้ ส่วนฤทธิ์ในการต่อต้านการอักเสบและอนุมูลอิสระ ช่วยลดความเสียหายของผิวหนังจากแสงแดด กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในผิว เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในเครื่องสำอาง สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่ม มีการนำส่วนต่างๆ ของกัญชาและกัญชงมาใช้อย่างหลากหลาย เช่น น้ำซุ้ที่ต้มจากลำต้นกัญชา คุกกี้ เบเกอรี่ เยลลี่ และเครื่องดื่มผสมใบกัญชา อาหารเตรียมสำเร็จผสมใบกัญชา น้ำมันผสมสารสกัดกัญชา ซึ่งความเสี่ยงอย่างหนึ่งในการบริโภค คือ อันตรายจากการบริโภคเกินขนาด เนื่องจากการระบุปริมาณการบริโภคที่เหมาะสมเป็นสิ่งที่ทำได้ยาก มีข้อควรคำนึงหลากหลาย เช่น สายพันธุ์ อายุ คุณภาพ และส่วนของกัญชาหรือกัญชงที่นำมาใช้ กระบวนการผลิตและส่วนผสมอื่นๆ ในอาหารและเครื่องดื่ม รวมถึงปัจจัยจากผู้บริโภค เช่น น้ำหนักตัว อายุ เพศ ระบบเมตาบอลิซึม เป็นต้น นอกจากนี้ การบริโภคกัญชาหรือกัญชงต้องใช้ระยะเวลาในการออกฤทธิ์ โดยใช้เวลานานถึง 30 - 90 นาที ในการลำเลียงสาร THC ไปยังสมอง และมีระยะเวลาในการออกฤทธิ์สูงสุดประมาณ 2 - 4 ชั่วโมง หลังจากบริโภค จึงทำให้ผู้บริโภคอาจไม่รู้สึกริเริ่มในขณะแรก และบริโภคจนเกินขนาด ส่งผลให้เกิดอาการคลื่นไส้อาเจียน เวียนศีรษะ วิงเวียน ปวดศีรษะ และหัวใจเต้นแรง หากได้รับในปริมาณที่มากเกินไปอาการอาจรุนแรงจนถึงขั้นประสาทหลอน เห็นภาพลวงตา หูแว่ว หวาดระแวง ความคิดสับสน และควบคุมตัวเองไม่ได้

ประเทศไทยมีการกำหนดปริมาณสูงสุดของสารสำคัญกัญชาและกัญชงในอาหารแต่ละประเภท โดยอ้างอิงจากข้อแนะนำด้านสุขภาพและความปลอดภัยของ Federal Institute for Risk Assessment (Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR)⁽⁵⁾ ประเทศเยอรมนีที่ใช้หลักการ ALARA (As Low As Reasonably Achievable) และมีค่าต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับประเทศอื่นๆ พบว่า เมื่อเทียบกับค่า Acute Reference Dose (ARfD) ของ total THC ซึ่งเท่ากับ 0.001 mg/kg bw/day⁽⁶⁾ ณ ระดับที่เกณฑ์กำหนดสามารถทำให้เกิดความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภคได้ โดยประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 425) พ.ศ. 2564⁽⁷⁾ ได้กำหนดเกณฑ์ให้ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของเมล็ด น้ำมัน หรือโปรตีนจากเมล็ดกัญชง เช่น ผลิตภัณฑ์ธัญชาติสำหรับอาหารเข้า ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ขนมขบเคี้ยว ที่มีมันฝรั่ง ธัญชาติ แป้งหรือสตาร์ช (starch) เป็นส่วนผสม มีค่าการปนเปื้อนสูงสุดของ total THC เท่ากับ 0.15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ CBD เท่ากับ 3.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม รวมทั้งมีเกณฑ์สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของกัญชาหรือกัญชง ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 427) พ.ศ. 2564⁽⁸⁾ ที่กำหนดให้ตรวจพบสาร THC ได้ไม่เกิน 1.6 มิลลิกรัมต่อหน่วยบรรจุ และ CBD ไม่เกิน 1.41 มิลลิกรัมต่อหน่วยบรรจุ ยกเว้นอาหาร นม อาหารเสริมสำหรับทารกและเด็กเล็ก และเครื่องดื่มที่ผสมกาแฟอื่น

การตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ ในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มที่มีกัญชาหรือกัญชง จึงเป็นส่วนสำคัญในการคุ้มครองความปลอดภัยของผู้บริโภค ซึ่งเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์ นั้นมีหลากหลาย เช่น Gas Chromatography (GC), Liquid Chromatography (LC), Thin Layer Chromatography (TLC), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) และ Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry (NMR) โดยเทคนิคหลักที่นิยมใช้ได้แก่ HPLC และ GC เนื่องจากสามารถวิเคราะห์สารหลายชนิดได้พร้อมกัน มีความจำเพาะและความไวสูง สามารถตรวจสอบสารที่มีปริมาณน้อยได้อย่างแม่นยำ แต่มีข้อดีและข้อจำกัดบางประการ โดย GC มักใช้ร่วมกับ detector แบบ Mass Spectrometry (MS) หรือ Flame Ionization Detection (FID) ข้อดีของการใช้ GC คือสามารถวิเคราะห์สารระเหย (volatile compounds) อื่นๆ ในกัญชาและกัญชงได้ เช่น Terpenes อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ด้วย GC มีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถแยกอนุพันธ์แคนนาบินอยด์ ในรูปกรดและกลาง เช่น THCA และ THC ออกจากกันได้ เนื่องจากในการวิเคราะห์ต้องใช้ความร้อนสูงถึง 300 องศาเซลเซียส จึงทำให้ THCA เกิด decarboxylation กลายเป็น THC และผลการวิเคราะห์ที่ได้จะเป็นผลรวมในรูปของ total THC ดังนั้น หากต้องการวิเคราะห์โดยแยกชนิดสารกัน สาร THCA จะต้องผ่านกระบวนการ derivatisation ก่อน⁽⁹⁾ สำหรับเทคนิค HPLC หรือ LC มี detector ที่สามารถใช้ร่วมกัน ได้แก่ Mass Spectrometry (MS), UV/VIS Spectrophotometer

(UV) และ Diode-Array Detection (DAD) คอลัมน์ที่นิยมใช้ในการแยกสารเป็นประเภท C18 stationary phase เนื่องจากสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic นอกจากนี้ ประโยชน์ของการใช้ LC คือ สามารถแยกอนุพันธ์ในรูปกรดและกลางได้ เนื่องจากไม่มีการให้ความร้อนสูง THCA จึงไม่เปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปอื่น แต่มีข้อจำกัดที่ไม่สามารถวิเคราะห์สารระเหยชนิดอื่นๆ ไปพร้อมกันได้ สำหรับวิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจยืนยันสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ได้มีการระบุในประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 425 และ 427 (พ.ศ. 2564) ให้ใช้เครื่องมือที่อาศัยหลักการโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) หรือสูงกว่า

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดและตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, THCA, THCV, CBD และ CBN ในเครื่องต้ม โดยเทคนิค LC-MS/MS เมื่อได้วิธีการที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการทดสอบความถูกต้องของวิธี (method validation) ใช้น้ำมะพร้าวเป็นตัวแทน (representative matrix) ของเครื่องต้มแต่งกลิ่นรส เนื่องจากตัวอย่างของเครื่องต้มที่พบตามท้องตลาดมีลักษณะเป็นเครื่องต้มปรุงแต่งรสหวาน ซึ่งน้ำมะพร้าวพาสเจอร์ไรส์ที่นำมาใช้นี้ มีปริมาณน้ำตาลใกล้เคียงกับตัวอย่างชนิดอื่นๆ จึงนำมาใช้เป็นตัวแทนได้ และทำการวิเคราะห์ method blank, matrix blank, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), linearity and working range, accuracy และ precision ตาม EURACHEM Guide 2014⁽¹⁰⁾ เพื่อยืนยันว่าวิธีที่ได้มีความถูกต้อง เหมาะสม สามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อประโยชน์ในการขึ้นทะเบียนอาหาร การควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมาย และการเฝ้าระวังความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค นอกจากนี้ ยังมีประโยชน์ต่อการประเมินความเสี่ยง การกำหนดมาตรฐานวิธีทดสอบสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในอาหาร สามารถใช้ผลการวิเคราะห์เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เพื่อป้องกัน และเฝ้าระวังการใช้สารเหล่านี้ให้เหมาะสมต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน: delta 8-Tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), delta 9-Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), Tetrahydrocannabinolic acid (THCA), Tetrahydrocannabivarin (THCV), Cannabinol (CBN) (ผลิตภัณฑ์ของ Lipomed, purity > 98%) และ Cannabidiol (CBD) (ผลิตภัณฑ์ของ Bureau of Drug and Narcotic DMS, purity 99%)

สารเคมี: methanol (CH_3OH), dichloromethane (CH_2Cl_2), acetonitrile (CH_3CN) เป็น HPLC grade และ glacial acetic acid (CH_3COOH) เป็น AR grade

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง และ 5 ตำแหน่ง, เครื่องบดปั่น, vortex mixer, reciprocal shaker, refrigerated centrifuge, turbo nitrogen evaporator temperature controlled, SPE vacuum manifold, micro pipette ขนาด 10-100, 20-200, 100-1000 และ 1,000-10,000 ไมโครลิตร, screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิตร, test tube ขนาด 15 มิลลิตร, micro-spin filter tube 0.22 μm PVDF, cellulose nitrate ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 mm 0.45 μm , HPLC vials สีขาว ขนาด 1.5 ml, solid phase extraction cartridges (SPE) Oasis HLB 6 cc (200 mg), เครื่อง LC-MS/MS ประกอบด้วย binary pump, autosampler, micro vacuum degasser, thermostatted column compartment: Agilent 1100-API 4000, detector ชนิด triple quadrupole mass spectrometer และคอลัมน์ EC 150/3 NUCLEOSHELL RP 18, 2.7 μm

การเตรียมตัวอย่าง

สกัดสารกลุ่มแคนนาบินอยด์จากตัวอย่าง โดยใช้น้ำมะพร้าวพาสเจอไรส์เป็นตัวแทนในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สำหรับ matrix เครื่องดื่มแต่งกลิ่นรส ตามวิธีการดังนี้ ชั่งตัวอย่าง 10 ± 0.10 กรัม ลงใน screw cap centrifuge tube ขนาด 30 มิลลิลิตร จากนั้นเติม dichloromethane 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer และเขย่าด้วยเครื่อง shaker เป็นเวลา 10 - 15 นาที ก่อนนำไป centrifuge ที่ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดสารละลายชั้น dichloromethane ด้านล่างทั้งหมด ใส่ test tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ระเหยสารละลายด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40 - 45 องศาเซลเซียส จนเกือบแห้ง และละลาย residue ด้วย methanol 1 มิลลิลิตร

นำไป clean-up ด้วย SPE Oasis HLB 6 cc (200 มิลลิกรัม) โดยมีขั้นตอนดังนี้ (1) Pre-washing: ด้วย methanol 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ (2) Loading: ใส่สารละลายที่สกัดได้ทั้งหมดลงใน cartridge (3) Washing: ด้วย 25% methanol 3 มิลลิลิตร (4) Eluting: สะสารวิเคราะห์ และเก็บส่วนที่ไหลผ่านลงมา โดยใช้ 90 : 10 acetonitrile : methanol 5 มิลลิลิตร และ 60 : 40 acetonitrile : methanol 3 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยทุกขั้นตอนต้องควบคุมให้มีอัตราการไหลสม่ำเสมอ และ cartridge ไม่แห้งจนเกินไป ระเหยสารสกัดที่ได้จากการ clean-up ด้วยเครื่อง nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40 - 45 องศาเซลเซียส จนเกือบหมด นำมาละลายด้วย acetonitrile 500 ไมโครลิตร กรองผ่าน PVDF filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้วเทสารสกัดใส่ HPLC vial สีชา ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง LC-MS/MS

การวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

สภาวะเครื่องมือ Liquid chromatography: Agilent 1100

mobile phase เป็นระบบตัวทำละลาย 2 ชนิด โดยตัวทำละลาย A คือ 0.1% acetic acid in DI water : methanol (95 : 5) และตัวทำละลาย B คือ 0.1% acetic acid in acetonitrile : methanol (95 : 5) อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส injection volume เท่ากับ 5 ไมโครลิตร และสภาวะที่ใช้ในการแยกสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ เป็นแบบ isocratic ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 LC conditions สำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์

Time	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)	Flow rate
0	27	73	0.7
15	27	73	0.7

สภาวะเครื่องมือ Mass spectrometer: API 4000

การวิเคราะห์โดย MS/MS สารจะถูกทำให้เป็นไอออนบวกและลบ โดย electrospray ionization (ESI) ไอออนที่ได้จะถูกวิเคราะห์ด้วย Multiple reaction monitoring (MRM) mode โดยมีสภาวะของ mass spectrometer ดังตารางที่ 2 และ 3

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียม matrix-matched calibration curve โดยใช้น้ำมะพร้าวที่เป็น matrix blank จำนวน 6 หลอด แล้วเติมสารมาตรฐาน Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, THCA, THCV, CBD และ CBN ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ได้แก่

0, 3, 5, 10, 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นทำการสกัดและทำให้บริสุทธิ์เหมือนการสกัดตัวอย่าง สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ peak area ของสารมาตรฐาน (แกน y) และคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2)

ตารางที่ 2 MS/MS พารามิเตอร์สำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์

Ionization mode	ESI, positive and negative
Ion spray voltage	5500 eV
Temperature TEM	500°C
collision gas, CAD	Nitrogen, 7 psig
curtain gas (CUR)	25 psig
ion spray nebulizer gas (GS-1)	60 psig
TIS Heater Gas (GS-2)	60 psig

ตารางที่ 3 M/Z ของสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ และ fragmentation conditions

compound name	precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	Dwell time (m/z)	DP (ms)	CE (eV)	RT (min)
Δ^9 -THC	315.00	193.000 (primary)	50	70	31	6.28
		135.000 (secondary)	50	70	27	
Δ^8 -THC	315.100	193.100 (primary)	50	70	31	5.97
		135.100 (secondary)	50	70	25	
THCA	357.400	313.000 (primary)	50	-100	-35	8.41
		245.200 (secondary)	50	-100	-42	
THCV	286.900	165.000 (primary)	50	60	30	3.29
		123.000 (secondary)	50	60	45	
CBN	311.000	222.900 (primary)	50	80	30	4.65
		241.100 (secondary)	50	80	30	
CBD	315.000	123.100 (primary)	50	73	45	3.09
		259.000 (secondary)	50	73	24	

การวิเคราะห์ method blank และ matrix blank

วิเคราะห์ method blank โดยสกัดตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา ด้วยการใช้สารเคมีทั้งหมดแต่ไม่มีการเติมตัวอย่าง และ matrix blank โดยการสกัดน้ำมะพร้าวที่ไม่มีการปนเปื้อนของสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ ตามวิธีวิเคราะห์ข้างต้น ฉีดสารสกัด method blank และ matrix blank เข้าเครื่อง LC-MS/MS เพื่อดูว่ามี m/z หรือ peak ที่รบกวน ตรงกับตำแหน่งของสารมาตรฐานหรือไม่

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อกรัม ลงใน matrix blank วิเคราะห์ 10 ซ้ำ แล้วตรวจสอบค่า signal/noise โดยผลต้องไม่พบ false negative

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อกรัม ลงใน matrix blank วิเคราะห์ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับ calibration curve แล้วคำนวณ %recovery, %RSD และ HORRAT

การทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงการวิเคราะห์

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้นตาม calibration curve ทั้งหมด 6 ระดับ ได้แก่ 0, 3, 5, 10, 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน กับ peak area ของสารมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด และคำนวณหาค่า r^2

การทดสอบความแม่นยำ และความเที่ยง

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 3, 5 และ 50 ไมโครกรัมต่อกรัม ลงใน matrix blank วิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับ calibration curve แล้วคำนวณ ค่าเฉลี่ย %recovery, %RSD และ HORRAT โดยประเมินผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีตามเกณฑ์ที่กำหนดดังนี้

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

$$\text{HORRAT} = \frac{\text{Experimental RSDr}}{\text{Predicted RSDr}}$$

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์

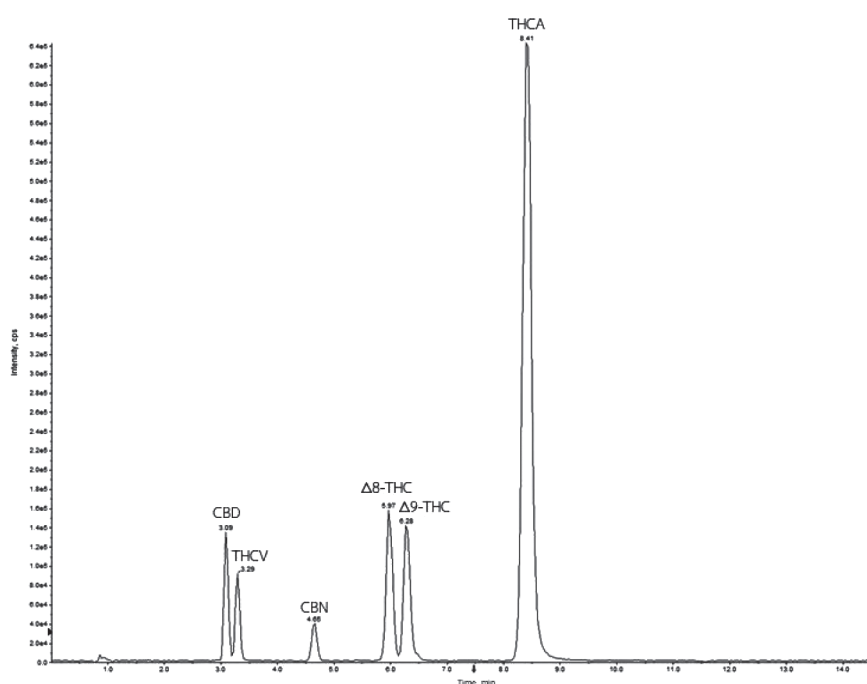
การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด⁽¹¹⁾ คำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนจากทุกแหล่ง ได้แก่ น้ำหนัก ปริมาตร กราฟมาตรฐาน ความเที่ยง และความแม่นยำ แล้วคำนวณรวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด จากนั้นหาค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($k = 2$) เพื่อประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตามวิธีที่ได้ทดสอบ

ปริมาณสารที่พบหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อกรัม ($\mu\text{g/kg}$) และคำนวณความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบจาก standard curve

$$\begin{aligned} \text{โดยใช้สมการเส้นตรง} \quad Y &= aX + b \\ \text{ปริมาณของสารที่ตรวจพบ} \quad CA (\mu\text{g/kg}) &= (Y - b)/a \\ \text{โดย} \quad X &= \text{concentration} \\ Y &= \text{peak area} \\ C_A &= \text{conc. of analyte } (\mu\text{g/kg}) \\ a &= \text{slope ของ calibration curve} \\ b &= \text{intercept ของ calibration curve} \end{aligned}$$

ผล

จากการศึกษาการวิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ ทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, THCA, THCV, CBD และ CBN ภายใต้วิธีการและสภาวะที่กำหนด สามารถสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น กับ peak area ของสารมาตรฐานดังกล่าวได้ ในช่วงความเข้มข้น 3 – 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้กราฟที่เป็นเส้นตรง มีค่า r^2 ในช่วง 0.9921 – 0.9985 และมีลักษณะของ peak ดังแสดงในภาพที่ 2 และเมื่อวิเคราะห์ method blank ของสารเคมีที่ใช้ทั้งหมด และ matrix blank ของตัวอย่างน้ำมะพร้าว ไม่พบ peak รบกวนในช่วงของการตรวจวัดสารเป้าหมาย



ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานแคนนาบินอยด์ 6 ชนิด ได้แก่ Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, THCA, THCV, CBD และ CBN วิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ของสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ ทั้ง 6 ชนิด สำหรับ matrix เครื่องดื่ม เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยให้สัญญาณ S/N สูงกว่า 3 เท่า ในทุกตัวอย่าง ส่วนค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผลการพิสูจน์ค่า LOQ โดยการเติมสารมาตรฐานและวิเคราะห์ 10 ซ้ำ พบว่า มีค่าความแม่นยำที่ประเมินจากค่าเฉลี่ย %recovery ในช่วง 103.93 – 113.37% และ %RSD ในช่วง 2.6 – 4.3% ความเที่ยงจาก HORRAT อยู่ในช่วง 0.10 – 0.17 ดังแสดงในตารางที่ 4

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and working range) ที่ช่วงความเข้มข้น 3 – 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้กราฟเส้นตรง มีค่า r^2 ในช่วง 0.9921 – 0.9985 ส่วนการทดสอบค่าความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 3, 5 และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่า มีค่าความแม่นยำที่ประเมินจากค่าเฉลี่ย %recovery ของสาร Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, THCA, THCV, CBD และ CBN อยู่ในช่วง 92.20 – 108.20, 95.96 – 107.53, 94.00 – 112.70, 91.16 – 113.37, 96.02 – 106.96 และ 94.82 – 109.13% ตามลำดับ ซึ่ง %recovery ที่ทุกระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วงการยอมรับ 60 – 120% และความเที่ยง (precision) ที่ประเมินจาก %RSD และ HORRAT อยู่ในช่วง 2.65 – 15.00% และ 0.10 – 0.90 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในตัวอย่างน้ำมะพร้าวที่ค่า LOD และ LOQ

	$\Delta 9$ -THC	$\Delta 8$ -THC	THCA	THCV	CBD	CBN
Limit of Detection (LOD)						
2 $\mu\text{g/kg}$						
Range of S/N	30.7 – 54.9	15.6 – 30.5	35.1 – 153.9	11.6 – 34.1	13.8 – 59.1	5.9 – 12.9
Average S/N	39.40	22.07	69.18	17.15	30.03	8.58
Limit of Quantification (LOQ) 3 $\mu\text{g/kg}$						
Average conc. ($\mu\text{g/kg}$)	3.23	3.25	3.26	3.40	3.12	3.27
Recovery (%)	107.53	108.20	108.57	113.37	103.93	109.13
Standard deviation (SD)	0.14	0.13	0.09	0.13	0.13	0.10
Relative standard deviation (%RSD)	4.31	4.01	2.65	3.86	4.33	2.94
%RSD _{expected}	25.32	25.32	25.32	25.32	25.32	25.32
HORRAT	0.17	0.16	0.10	0.15	0.17	0.12

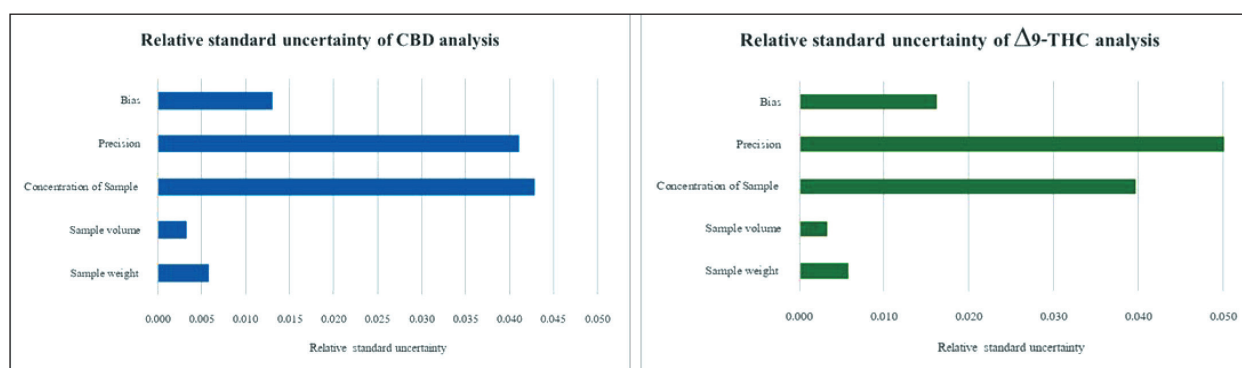
ตารางที่ 5 Accuracy และ precision ของวิธีการวิเคราะห์แคนนาบินอยด์ในน้ำมะพร้าว

สารมาตรฐาน	Spiked level ($\mu\text{g/kg}$)	%recovery (n=10) Min - Max	Mean $\pm$ SD	%RSD (เกณฑ์ยอมรับ $\leq 20\%$)	HORRAT (เกณฑ์ยอมรับ ≤ 2)
$\Delta 8$ -THC	3	99.67 – 114.33	108.20 $\pm$ 4.34	4.01	0.16
	5	95.60 – 111.20	104.50 $\pm$ 4.62	4.42	0.19
	50	69.80 – 109.40	92.20 $\pm$ 13.83	15.00	0.90
$\Delta 9$ -THC	3	100.67 – 113.33	107.53 $\pm$ 4.64	4.31	0.17
	5	99.20 – 109.60	105.38 $\pm$ 3.69	3.51	0.15
	50	77.20 – 115.0	95.96 $\pm$ 14.32	14.32	0.86
THCA	3	105.67 – 113.67	108.57 $\pm$ 2.88	2.65	0.10
	5	103.40 – 120.00	112.68 $\pm$ 5.38	4.78	0.20
	50	75.60 – 110.20	94.00 $\pm$ 13.60	14.47	0.87
THCV	3	104.33 – 118.67	113.37 $\pm$ 4.38	3.86	0.15
	5	97.60 – 118.60	109.52 $\pm$ 8.09	7.39	0.32
	50	74.40 – 103.80	91.16 $\pm$ 10.19	11.18	0.67
CBD	3	97.00 – 110.00	103.93 $\pm$ 4.50	4.33	0.17
	5	99.80 – 115.00	106.96 $\pm$ 4.95	4.63	0.20
	50	74.60 – 107.00	96.02 $\pm$ 10.14	10.56	0.64
CBN	3	102.33 – 112.67	109.13 $\pm$ 3.21	2.94	0.12
	5	97.00 – 113.00	104.12 $\pm$ 5.36	5.15	0.22
	50	75.00 – 112.80	94.82 $\pm$ 11.94	12.60	0.76

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ นำการวิเคราะห์สาร CBD และ $\Delta 9$ -THC ในน้ำมะพร้าวเป็นตัวอย่าง พบแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน ได้แก่ น้ำหนักของตัวอย่าง ปริมาตร ความเข้มข้นที่อ่านได้จาก calibration curve สารมาตรฐาน bias และ precision เมื่อคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายของสาร CBD และ $\Delta 9$ -THC พบว่ามีค่าเท่ากับ $\pm 12.2\%$ และ 13.4% ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 6 และภาพที่ 3 และเปรียบเทียบสัดส่วนค่าความไม่แน่นอน จากแหล่งความไม่แน่นอนที่ส่งผลต่อปริมาณสาร CBD จากมากไปน้อย ได้แก่ calibration curve (4.3%) ความเที่ยง (4.1%) ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (1.3%) การชั่งน้ำหนัก (0.6%) และปริมาตร (0.3%) สำหรับ $\Delta 9$ -THC ได้แก่ ความเที่ยง (5.1%) calibration curve (4.0%) ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (1.6%) การชั่งน้ำหนัก (0.6%) และปริมาตร (0.3%) ตามลำดับ

ตารางที่ 6 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สำหรับสาร CBD และ $\Delta 9$ -THC

Source of uncertainty	unit	x	CBD		x	$\Delta 9$ -THC	
			u(x)	Percent		u(x)	Percent
1. Sample weight	g	10	0.06	0.58	10	0.06	0.58
2. Sample volume	mL	5	0.02	0.33	5	0.02	0.33
3. Concentration of Sample	$\mu\text{g/kg}$	50.83	2.18	4.29	50.33	1.99	3.96
4. Precision	%	100	4.10	4.10	100	5.12	5.12
5. Bias	%	100	1.30	1.30	100	1.62	1.62
- Combined relative standard uncertainty of sample conc.	$\mu\text{g/kg}$	50.83	3.11	6.11	50.33	3.38	6.71
- Expanded Uncertainty at C.I. 95 % (k=2)			6.21	12.23		6.75	13.41



ภาพที่ 3 Relative standard uncertainty ของการวิเคราะห์ CBD และ $\Delta 9$ -THC จากแหล่งความไม่แน่นอนต่าง ๆ

วิจารณ์

สารวิเคราะห์ทั้ง 6 ชนิดที่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS ครอบคลุมตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีสารสกัดแคนนาบิไดโอยด์เป็นส่วนประกอบ ที่มีค่ากำหนดสำหรับสาร CBD และ THC นอกจากนี้การวิเคราะห์ยังครอบคลุมอนุพันธ์อื่น ๆ ที่สำคัญ ได้แก่ total THC หรือปริมาณสารออกฤทธิ์ THC ทั้งหมดที่สามารถพบได้หลังจากกัญชาหรือกัญชงได้รับความร้อน เช่น จากกระบวนการการต้มหรือพาสเจอร์ไรส์ในการผลิตเครื่องดื่ม ซึ่งคำนวณจากผลรวมของ $\Delta 8$ -THC, $\Delta 9$ -THC และ THCA โดย THCA เป็นสารที่ไม่ออกฤทธิ์

ต่อจิตประสาทโดยตรง แต่เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ ตั้งแต่ 85 องศาเซลเซียส ขึ้นไป สามารถเกิด decarboxylation และกลายเป็น THC โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิสูง 160 องศาเซลเซียส 10 นาที และ 200 องศาเซลเซียส ไม่กี่วินาที สามารถเปลี่ยน THCA ทั้งหมดไปเป็น THC ได้อย่างสมบูรณ์⁽¹²⁾ และ จะเริ่มระเหยตั้งแต่อุณหภูมิ 157 องศาเซลเซียส ขึ้นไป ดังนั้นการให้ความร้อนสูงในระยะเวลาที่นานเกินไปจะทำให้ปริมาณสาร THC ลดลงเป็นอย่างมาก⁽¹³⁾ สำหรับสาร Δ^8 -THC ซึ่งเป็นสารที่ไม่ออกฤทธิ์และเป็นไอโซเมอร์ของ Δ^9 -THC สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผ่านการเกิด isomerization กลายเป็นสารออกฤทธิ์ Δ^9 -THC ได้ นอกจากนี้วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ CBN ได้เช่นกัน ซึ่ง CBN เป็นสารที่เกิดจากการสลายตัวของ THCA และ THC เมื่อได้รับความร้อน 85 - 100 องศาเซลเซียส และเพื่อให้สามารถระบุปริมาณสารสำคัญได้อย่างครอบคลุม ควรเพิ่มเติมการตรวจวิเคราะห์สาร Cannabidiolic acid (CBDA) เนื่องจาก CBDA เป็นสารตั้งต้นที่สามารถเปลี่ยนเป็น CBD ผ่าน decarboxylation เช่นเดียวกับการเปลี่ยนจาก THCA เป็น THC แต่จะมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าประมาณ 2 เท่า⁽³⁾

อนุพันธ์ในกลุ่ม แคนนาบินอยด์ มีโครงสร้างเป็น bi- หรือ tri-cyclic ซึ่งประกอบด้วยธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นหลัก มีออกซิเจน 2 อะตอม จึงมีคุณสมบัติเป็นสารไม่มีขั้ว (hydrophobic) ละลายได้ไม่ดีในน้ำหรือตัวทำละลายที่มีขั้วมาก แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเฉพาะไขมันและแอลกอฮอล์⁽¹⁴⁾ และมีอนุพันธ์ที่เป็นกรด เช่น THCA ซึ่งประกอบไปด้วยออกซิเจน 4 อะตอม และมีหมู่ฟังก์ชันเป็นกรดคาร์บอกซิลิก จึงเป็นสารที่มีขั้วมากกว่าอนุพันธ์อื่นๆ ดังนั้นการเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญอย่างมากในการสกัดให้ได้ recovery สูง และทำให้สารสกัดบริสุทธิ์ ไม่มีสารปนเปื้อนมากเกินไป การใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง (intermediate polarity) ผสมกัน เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง แต่ต้องมีการปรับชนิดและสัดส่วนให้เหมาะสม⁽¹⁵⁾ งานวิจัยก่อนหน้านี้⁽¹⁶⁾ ได้ทำการสกัดสารกลุ่มแคนนาบินอยด์จากน้ำอัดลม โดย degassing ด้วยวิธีการ sonication และใช้ 1 : 99 acetic acid : acetonitrile เป็นตัวทำละลาย ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS อย่างไรก็ดีตาม วิธีการนี้ใช้หลักการเจือจาง ซึ่งทำให้ได้ค่า LOD และ LOQ สูงเกินกว่าที่ต้องการ เนื่องจากข้อแนะนำระบุการปนเปื้อนสูงสุดของ THC ในเครื่องดื่มไว้เพียง 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จึงทดลองโดยใช้วิธีการ liquid-liquid extraction (LLE) และใช้ตัวทำละลายเป็น dichloromethane ซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ค่อนข้างมีขั้วน้อย มี polarity index เท่ากับ 3.1 ทำให้แยกชั้นกับตัวอย่างเครื่องดื่มและสามารถดึงสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ออกมาในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ รวมทั้งแยกสารที่ละลายได้ในน้ำชนิดอื่นๆ ที่อาจรบกวนการวิเคราะห์ เช่น น้ำตาล เกลือแร่ ออกไป มีงานวิจัยที่ใช้การสกัดด้วยวิธีการ LLE เช่นกัน⁽¹⁷⁾ โดยเป็นการสกัดผลิตภัณฑ์จากกัญชง เช่น เครื่องดื่ม เบียร์ ชา และวอดก้า ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง ethyl acetate : hexane อัตราส่วน 1 : 9 ซึ่งมี polarity index เท่ากับ 4.4 และ 0.1 ตามลำดับ

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid chromatography หากเป็นการวัดที่ระดับความเข้มข้นสูง เช่น ในระดับ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถใช้ detector ชนิด UV และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร⁽¹⁸⁾ แต่สำหรับวิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้ มีเป้าหมายเพื่อตรวจวัดในระดับที่ต่ำกว่า 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จึงเลือกใช้เทคนิค LC-MS/MS ซึ่งมีความไวและจำเพาะกับสารวิเคราะห์ที่ต้องการ เนื่องจากเป็นการตรวจวัด m/z ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิด ยกเว้นสารที่เป็น isomer กันบางชนิด ในการวิเคราะห์นี้ ได้แก่ Δ^8 -THC และ Δ^9 -THC ซึ่งมีค่า m/z เท่ากันทั้ง precursor ion และ product ions⁽¹⁹⁾ ดังนั้นการแยกสารทั้งสองชนิดนี้ออกจากกันรวมถึงการแยกอนุพันธ์อื่น ๆ เพื่อให้สามารถระบุชนิดและปริมาณได้อย่างถูกต้อง ต้องอาศัยการใช้ mobile phase และ stationary phase ที่เหมาะสม มีงานวิจัยรายงานว่า คอลัมน์ชนิด C18 ซึ่งเป็น reversed-phase chromatography มีประสิทธิภาพสูงในการแยกสารกลุ่มแคนนาบินอยด์⁽⁹⁾ ในการพัฒนาวิธีครั้งนี้ เคยทดลองใช้ Zorbax SB-C18 column ผลพบว่า ไม่สามารถแยกสาร Δ^8 -THC และ Δ^9 -THC ออกจากกันได้ โดยสารทั้งสองชนิดมีการ co-elute ออกมาพร้อมกันเป็น single peak จึงเปลี่ยนคอลัมน์เป็นชนิด EC 150/3 NUCLEOSHELL RP 18, 2.7 μ m ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กลง

และมีความจำเพาะกับการแยกสารในกลุ่มแคนนาบินอยด์ จึงสามารถแยกอนุพันธ์ทั้ง 6 ชนิด ออกจากกันได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม การใช้คอลัมน์นี้ ส่งผลให้ความดันในส่วนของ LC ค่อนข้างสูง และความระมัดระวังไม่ให้มีอนุภาคขนาดใหญ่เข้าสู่คอลัมน์ เนื่องจากมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็กมาก ดังนั้นควรกรองสารสกัดด้วย filter ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.2 ไมครอนเมตร ทุกครั้งก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่อง LC อีกทั้งการเลือกใช้ mobile phase มีความสำคัญในการแยกสาร ซึ่งพบว่าการใช้ mobile phase ที่เติม formic acid เล็กน้อย สามารถช่วยให้ลักษณะของ peak ดีขึ้นได้และช่วยให้สารแยกออกจากกันได้ดีขึ้น⁽²⁰⁾ มีการศึกษารายงานว่าการใช้ mobile phase ที่มี pH 5 สามารถแยกสารได้ดีขึ้น peak มีความสมมาตรมากขึ้นและมี baseline น้อยกว่าที่ pH 7.15⁽²¹⁾ โดยในการพัฒนานี้ขึ้นแรกใช้ mobile phase ชนิด 0.1% formic acid in DI water และ 0.1% formic acid in acetonitrile พบว่ามีความสามารถในการแยกสารทั้ง 6 ชนิดได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ 0.1% acetic acid in (95 : 5) DI water : methanol และ 0.1% acetic acid in (95 : 5) acetonitrile : methanol พบว่า peak ของแต่ละสารมีการแยกกันชัดเจนมากขึ้น ลักษณะของ peak มีความสมมาตรกัน และ intensity สูงขึ้น

จากการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ผ่านการทดสอบในทุกพารามิเตอร์ ค่า precision ที่ได้มีค่า HORRAT น้อยกว่า 2 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ของ Codex และ EU กำหนดไว้ นอกจากนี้ยังได้มีการวางแผนการควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control) เพื่อความมั่นใจในผลการวิเคราะห์ตัวอย่างทุก batch โดยจะทำการทดสอบ method blank, matrix blank, duplication และ spiked sample ที่ระดับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ควบคุม %recovery ให้อยู่ในช่วง 60 – 120% โดยการนำ control chart สำหรับกราฟมาตรฐานของสารบางชนิดที่มี r^2 น้อยกว่า 0.995 เนื่องจากการทำ matrix-matched calibration curve จึงทำให้อาจมีความแปรผันจากขั้นตอนการสกัด ส่งผลให้บางจุดเบี่ยงเบนไปจากกราฟเส้นตรง เมื่อพิจารณาถึงความสมเหตุสมผลของค่าความไม่แน่นอน โดยใช้เกณฑ์การคำนวณจากค่า standard deviation ซึ่งค่าความไม่แน่นอนที่เหมาะสมควรน้อยกว่า 2 เท่าของ predicted Horwitz's RSD⁽²²⁾ โดยค่าความไม่แน่นอนที่ควรจะเป็นจากการคำนวณ เท่ากับ 46.9% ส่วนค่าความไม่แน่นอนขยาย ($k = 2$) ของวิธีจากแหล่งความไม่แน่นอนต่าง ๆ สำหรับการวิเคราะห์ CBD และ $\Delta 9$ -THC มีค่าเท่ากับ 12.2% และ 13.4% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าเกณฑ์กำหนดประมาณ 3 – 4 เท่า เนื่องจากการทำ calibration curve แบบ matrix-matched calibration curve ซึ่งเป็นการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ลงใน matrix blank ที่มีความใกล้เคียงกับตัวอย่างจริง และทำการสกัดตามขั้นตอนการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง จึงเป็นการชดเชยผลกระทบจากลักษณะตัวอย่าง (matrix effect) และชดเชยการสูญเสียของสารที่สนใจที่อาจเกิดขึ้นในขั้นตอนการสกัด ทำให้สามารถลดค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งความไม่แน่นอนที่มาจาก recovery ลงได้ เช่น ค่าความไม่แน่นอนจากความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (bias) นอกจากนี้การเลือกใช้สารมาตรฐานและเครื่องมือที่มีค่าความไม่แน่นอนน้อย ก็มีผลทำให้ค่าความไม่แน่นอนของวิธีลดลงได้เช่นกัน สุดท้ายนี้ เนื่องจากเครื่องเดิมเป็น matrix ที่มีความหลากหลายการนำไปประยุกต์ใช้กับเครื่องเดิมชนิดอื่น ๆ จึงควรทำการทดสอบ working range ก่อน ซึ่งผู้วิจัยจะดำเนินการต่อไปในอนาคต

สรุป

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจสอบสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในน้ำมะพร้าวได้ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ $\Delta 8$ -THC, $\Delta 9$ -THC, THCA, THCV, CBD และ CBN โดยเทคนิค LC-MS/MS เป็นวิธีที่มีสมรรถนะผ่านเกณฑ์การยอมรับของการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว มีความถูกต้องแม่นยำ มีความไว และมีความจำเพาะต่อสารที่ต้องการทดสอบ เหมาะกับการใช้งานตามวัตถุประสงค์ สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อควบคุมคุณภาพอาหารควบคุมเฉพาะ ตามร่างประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีสารสกัด Cannabidiol (CBD) เป็นส่วนประกอบ รวมถึงสามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์

เพื่อสำรวจปริมาณสารแคนนาบินอยด์ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทอื่น ๆ ที่มีกัญชาหรือกัญชง เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการประเมินความปลอดภัยในการบริโภคอาหารประเภทนี้ของคนไทยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ หัวหน้าฝ่ายยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ และบุคลากรทุกท่านในฝ่ายที่ช่วยดำเนินการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์และสนับสนุนในทุกขั้นตอน จนการศึกษานี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Newton DE. Marijuana : a reference handbook. 2nd ed. California : ABC-CLIO; 2017.
2. ยาใจ อภิบุณโยภาส, วินัย วนานุกูล. ภาวะพิษจากกัญชา. จุลสารพิษวิทยา 2552; 17(2) : 3-5.
3. Wang M, Wang YH, Avula B, Radwan MM, Wanas AS, van Antwerp J, et al. Decarboxylation study of acidic cannabinoids : a novel approach using ultra-high-performance supercritical fluid chromatography/photodiode array-mass spectrometry. Cannabis Cannabinoid Res 2016; 1(1) : 262-71.
4. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 424 (พ.ศ. 2564) เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 138 ตอนพิเศษ 45 ง (วันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2564). หน้า 32.
5. BfR. BgVV empfiehlt Richtwerte für THC (tetrahydrocannabinol) in hanfhaltigen Lebensmitteln. [online]. 2000; [cited 2021 Jul 9]; [1 screen]. Available from : URL : https://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2000/07/bgvv_empfiehlt_richtwerte_fuer_thc_tetrahydrocannabinol_in_hanfhaltigen_lebensmitteln-884.html.
6. Arcella D, Cascio C, Mackay K. Acute human exposure assessment to tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC). EFSA J 2020; 18(1) : 5953. (41 pages).
7. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 425 (พ.ศ. 2564) เรื่อง เมล็ดกัญชง น้ำมันจากเมล็ดกัญชง โปรตีนจากเมล็ดกัญชง และผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของเมล็ดกัญชง น้ำมันจากเมล็ดกัญชง หรือโปรตีนจากเมล็ดกัญชง. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 138 ตอนพิเศษ 49 ง (วันที่ 4 มีนาคม 2564). หน้า 1.
8. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 427 (พ.ศ. 2564) เรื่อง ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของส่วนของกัญชาหรือกัญชง. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 138 ตอนพิเศษ 168 ง (วันที่ 23 กรกฎาคม 2564). หน้า 22.
9. Pourseyed Lazarjani M, Torres S, Hooker T, Fowlie C, Young O, Seyfoddin A. Methods for quantification of cannabinoids : a narrative review. J Cannabis Res 2020; 2 : 35. (10 pages).
10. Magnusson B, Örnemark U, editors. The fitness for purpose of analytical method : a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. United Kingdom : EURACHEM; 2014.
11. Ellison SLR, Williams A, editors. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. United Kingdom : EURACHEM/CITAC; 2012.
12. Iffland K, Carus M, Grotenhermen F. Decarboxylation of Tetrahydrocannabinolic acid (THCA) to active THC. Brussels, Belgium : European Industrial Hemp Association; 2016.

13. Dussy FE, Hamberg C, Luginbühl M, Schwerzmann T, Briellmann TA. Isolation of Delta9-THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Delta9-THC in cannabis products. *Forensic Sci Int* 2005; 149(1): 3-10.
14. Saingam W, Sakunpak A. Development and validation of reverse phase high performance liquid chromatography method for the determination of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in oromucosal spray from cannabis extract. *Rev Bras Farmacogn* 2018; 28: 669-72.
15. Klein RFX. Analysis of “marijuana edibles” – food products containing marijuana or marijuana extracts – an overview, review, and literature survey. *Microgram J* 2017; 14(1-4): 9-32.
16. Telepchak MJ, Searfoss J, Wang X, Mackowsky D. Determination of cannabinoid content and pesticide residues in cannabis edibles and beverages. *LCGC* 2016; 34(10): 20-7.
17. Holler JM, Bosy TZ, Dunkley CS, Levine B, Past MR, Jacobs A. Delta9-tetrahydrocannabinol content of commercially available hemp products. *J Anal Toxicol* 2008; 32(6): 428-32.
18. Mandrioli M, Tura M, Scotti S, Gallina Toschi T. Fast detection of 10 cannabinoids by RP-HPLC-UV method in Cannabis sativa L. *Molecules* 2019; 24(11): 2113. (12 pages).
19. Christinat N, Savoy MC, Mottier P. Development, validation and application of a LC-MS/MS method for quantification of 15 cannabinoids in food. *Food Chem* 2020; 318: 126469. (10 pages).
20. Citti C, Ciccarella G, Braghiroli D, Parenti C, Vandelli MA, Cannazza G. Medicinal cannabis: principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method. *J Pharm Biomed Anal* 2016; 128: 201-9.
21. De Backer B, Debrus B, Lebrun P, Theunis L, Dubois N, Decock L, et al. Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009; 877(32): 4115-24.
22. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.

The Development and Validation of Analysis Method for Cannabinoids in Coconut Juice using LC-MS/MS

Sakulrat Somsuntisuk Atcharee Inkaew Saovane Wajasi Suwimol Muadmah

Kanyarat Chuakunchat Witthawat Wangkaewhiran and Thongsuk Payanan

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

ABSTRACT Cannabis and hemp have been classified as narcotics of category V, but some parts of them are recently allowed to be used legally. Consequently, foods and beverages containing hemp or cannabis have been in the limelight among food producers and consumers due to their active substances called cannabinoids, which consist of both psychotropic and non-psychotropic compounds. The main metabolites, CBD and Δ^9 -THC, can provide effects of relaxing, relieving worries and improving sleep. However, the overconsumption of cannabis and hemp products can cause adverse effects, such as drowsiness, headache, fast heart rate and possibly severe symptoms, such as hallucination and an uncontrollable body. Therefore, the regulation of cannabinoids in foods and beverages is very important for protecting consumer's health. The Bureau of Quality and Safety of Food has developed and validated method for analyzing 6 derivatives of cannabinoid group which are Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, THCA, THCV, CBD and CBN in coconut juice. The extraction method was relied on liquid-liquid extraction and cleaning-up with SPE HLB cartridge. For the analysis technique, LC-MS/MS was employed to determine the type and quantify the amount of cannabinoids in beverages. As a result, this method had the limit of detection (LOD) at 2 $\mu\text{g/kg}$ and the limit of quantitation (LOQ) at 3 $\mu\text{g/kg}$. The linearity of working range remained at 3 - 50 $\mu\text{g/kg}$, and the method could provide a correlation coefficient between 0.9921 - 0.9985. The accuracy was demonstrated by percentage of mean recovery which was in the range of 91.16 - 113.37%. Finally, the precision of the method was proven by percent relative standard deviation (%RSD) which was approximately 2.65 - 15.00%. In conclusion, this developed method is reliable and suitable for analyzing cannabinoids in flavored beverages.

Keyword: Cannabis, Hemp, Cannabinoids, LC-MS/MS, Coconut juice

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในธัญพืชและถั่วเมล็ดแห้ง โดย GC-MS/MS

ธรรณิศจัย ไชยมงคล และวีรภูมิ วิทยานันท์

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ธัญพืชและถั่วเมล็ดแห้งเป็นอาหารที่ถูกบริโภคเป็นปริมาณมากทั่วโลก การเพาะปลูกพืชเหล่านี้อาจมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อป้องกัน รักษา และเพิ่มปริมาณผลผลิต และเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ผลผลิตทางการเกษตรจึงต้องได้รับการตรวจสอบว่าปราศจากสารพิษอันตรายตกค้างด้วยวิธีวิเคราะห์ที่ถูกต้องน่าเชื่อถือ ได้ทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่างระหว่างวิธี QuEChERS และ FaPEX® แล้วเลือกวิธี QuEChERS เพื่อพัฒนา ปรับปรุง และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารที่น่าสนใจ 122 ชนิด พร้อมกันในข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งได้ โดยตัวอย่างจะถูกสกัดด้วยอะซิโตนไตริลและผ่านการ salting out ด้วยสารผสมของแมกนีเซียม ซัลเฟต และโซเดียม อะซิเตท สารสกัดถูกทำให้เข้มข้นแล้วเปลี่ยนตัวทำละลายที่เหมาะสม สารทั้งหมดจะถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS โดยเทคนิค MRM เพื่อลดสารรบกวน ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พบขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณเป็น 0.02 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ตัวอย่างข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งที่เติมสารมาตรฐานที่ระดับ 0.05, 0.20 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ระดับละ 8 ซ้ำ พบค่าเฉลี่ยการคืนกลับอยู่ระหว่าง 74.3-119.8% และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 20% วิธีมีช่วงความเป็นเส้นตรงเป็น 0.05-2.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ($r > 0.995$) วิเคราะห์ภายใต้กระบวนการควบคุมคุณภาพภายใน และมีผลการควบคุมคุณภาพภายนอกจากการเข้าร่วม PT ให้ค่าเป็นที่น่าพอใจ บ่งชี้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้วิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในธัญพืชและถั่วเมล็ดแห้งเพื่อการคุ้มครองผู้บริโภคและตอบสนองกฎหมายที่เกี่ยวข้องได้ตรงตามวัตถุประสงค์

คำสำคัญ: สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้าง, ธัญพืช, ถั่วเมล็ดแห้ง, GC-MS/MS, QuEChERS

Corresponding E-mail: thoranit.c@dmso.mail.go.th

Received: 12 November 2020

Revised: 2 June 2021

Accepted: 10 July 2021

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นหนึ่งในธัญพืชที่กว่าครึ่งหนึ่งของประชากรโลกบริโภคเป็นอาหารหลัก^(1, 2) ถือเป็นอาหารประจำชาติไทยและเป็นแหล่งสารอาหารที่สำคัญ ได้แก่ พลังงาน วิตามิน และแร่ธาตุ แม้อัตราการบริโภคข้าวจะแตกต่างกันไปตามวิถีชีวิตและสิ่งแวดล้อมโดยคนเมืองจะบริโภคข้าวน้อยกว่าสังคมชนบท⁽³⁾ แต่มีการคาดการณ์ว่าในปี พ.ศ. 2567 อัตราการบริโภคข้าวเฉลี่ยของคนไทยจะสูงถึง 147.2 กิโลกรัมต่อคนต่อปี⁽⁴⁾ นอกจากนี้ข้าวยังเป็นพืชที่มีมูลค่าทางการค้าสูงที่สุดในโลก⁽⁵⁾ โดยไทยเป็นผู้ส่งออกข้าวรายใหญ่ที่สุด ในปี พ.ศ. 2562 ไทยส่งออกข้าวปริมาณเกือบ 4.6 ล้านตัน มีมูลค่ากว่า 1.3 แสนล้านบาท⁽⁶⁾ จากอัตราการบริโภคข้าวที่สูงของทั้งคนไทยและประชากรโลก หากมีสารพิษตกค้างจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพ

การเพาะปลูกธัญพืชและถั่วเมล็ดแห้งในปัจจุบันเป็นกิจกรรมเชิงอุตสาหกรรมและการพาณิชย์ เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณผลผลิตจึงมีการนำสารเคมีทางการเกษตร เช่น ปุ๋ยเคมี และสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชมาใช้⁽⁷⁾ สารเคมีเหล่านี้สามารถกำจัดวัชพืชและแมลงศัตรูพืชได้ดี แต่สามารถตกค้างในผลผลิตและสิ่งแวดล้อมได้เช่นกัน การได้รับสัมผัสสารพิษโดยการบริโภคโดยตรงถือว่ามีความเสี่ยงสูง จึงมีการกำหนดค่ามาตรฐานปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit; MRL) พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 และได้รับการปรับปรุงให้เป็นปัจจุบันมาอย่างต่อเนื่อง โดยประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 387 พ.ศ. 2560 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง⁽⁸⁾ กำหนดค่า MRLs ของสารหลายชนิดไว้ในข้าวสาร ข้าวเปลือก และถั่วเมล็ดแห้ง นอกจากนี้ประเทศคู่ค้าที่สำคัญของไทย เช่น สหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป และกลุ่มประเทศอาเซียน ได้กำหนดค่ามาตรฐานต่างๆ ไว้เพื่อเป็นการคุ้มครองสุขภาพผู้บริโภคด้วยเหตุผลนี้ กระทรวงสาธารณสุขจึงต้องมีวิธีตรวจวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและครอบคลุมจำนวนสารที่มีค่ากำหนดตามกฎหมาย เพื่อการเฝ้าระวังความปลอดภัยจากสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในอาหารที่จำหน่ายในประเทศและยังเป็นการส่งเสริมคุณภาพสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออกให้มีการพัฒนาทางเศรษฐกิจไปพร้อมกัน

การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในอาหารเป็นสิ่งยุ่งยาก มีขั้นตอนซับซ้อน ใช้เวลานาน เดิมมีข้อจำกัดด้านขอบข่ายชนิดสารที่วิเคราะห์ได้จาก detector ชนิด ECD, FPD และ NPD ผู้วิเคราะห์ต้องมีความชำนาญและมีประสบการณ์สูง ปัจจุบันมีการพัฒนาการเตรียมตัวอย่างให้ง่าย สะดวก รวดเร็วขึ้น เช่น วิธี QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe)⁽⁹⁾ เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในระดับนานาชาติ อาทิ AOAC 2007.01⁽¹⁰⁾ และ EN 15662⁽¹¹⁾ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารประเภทผักผลไม้ที่มีความชื้นสูงและไขมันต่ำ⁽¹²⁾ มีการดัดแปลงปรับปรุงวิธีตั้งต้นนี้ให้ใช้ได้กับอาหารที่มีไขมันปานกลางและสูง เช่น น้ำมันจากพืชและสัตว์ ไข่⁽¹³⁾ และอาหารที่มีความชื้นต่ำมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก เช่น ข้าวบาร์เลย์⁽¹⁴⁾ เป็นต้น ซึ่งเป็นการปรับปรุงวิธีการคืนสภาพตัวอย่างให้มีปริมาณความชื้นที่เหมาะสมก่อนการสกัดแล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่องมือที่มีความไวและความจำเพาะสูง เช่น gas และ liquid chromatograph-mass spectrometer/mass spectrometer (GC and LC-MS/MS) เป็นต้น⁽¹⁵⁾ ยังคงประสบปัญหาสารรบกวนในเมทริกซ์อีกหลายชนิด เช่น ธัญพืช (cereal grains) และถั่วเมล็ดแห้ง (pulse) ที่จำเป็นต้องกำจัดสารรบกวนได้อย่างมีประสิทธิภาพก่อนการวิเคราะห์ ซึ่งต้องคำนึงถึงในการตรวจวัดที่ระดับความเข้มข้นต่ำมากในระดับ ppm และ ppb⁽¹⁶⁾

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือเพื่อให้ได้วิธีเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในอาหารกลุ่มธัญพืชและกลุ่มถั่วเมล็ดแห้งสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจสอบความปลอดภัยของอาหาร สำหรับการคุ้มครองผู้บริโภคซึ่งเป็นภารกิจหลักของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร จึงดำเนินการศึกษา พัฒนา ปรับปรุงวิธีวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างจำนวน 122 ชนิด ที่มีคุณสมบัติทางเคมีที่หลากหลายพร้อมกันด้วยเครื่อง GC-MS/MS ที่ห้องปฏิบัติการใช้อยู่ในตัวอย่างผักผลไม้สดและได้รับการรับรองตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025: 2017 เพื่อขยายขอบข่ายชนิดตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งเป็นตัวแทนของกลุ่มธัญพืชและกลุ่มถั่วเมล็ดแห้ง ตามลำดับ ในขั้นตอนการคัดเลือกวิธีเตรียมตัวอย่างทำการเปรียบเทียบ

คุณลักษณะและประสิทธิภาพวิธี QuEChERS ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานกับวิธี FaPEX[®] (Fast Pesticides Extraction)⁽¹⁷⁾ ซึ่งเป็นวิธีเตรียมตัวอย่างแบบใหม่ที่น่าจะมีศักยภาพในการลดรอบเวลาการวิเคราะห์ได้ จากนั้นจึงคัดเลือกวิธีที่เหมาะสมนำไปทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ วิธีที่ได้จะถูกนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ความปลอดภัยของธัญพืชและถั่วเมล็ดแห้ง ตรวจสอบติดตามการตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตรเพื่อให้ทราบสถานการณ์และความรุนแรงของปัญหา นำมาประเมินความปลอดภัยของผู้บริโภคและสามารถนำไปใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สำหรับสนับสนุนการส่งออกของประเทศ นอกจากนี้ยังได้ถ่ายทอดองค์ความรู้และวิธีไปยังห้องปฏิบัติการเครือข่ายกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโครงการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (Inter laboratory comparison, ILC) ปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 เพื่อการพัฒนาศักยภาพการตรวจวิเคราะห์ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ในภูมิภาคอีกด้วย

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: acetonitrile, HPLC (Merck สหรัฐอเมริกา) acetone, AR (RCI Labscan สหรัฐอเมริกา) n-hexane, PG (Burdick & Jackson สหรัฐอเมริกา) ethyl acetate, HPLC (Burdick & Jackson เกาหลีใต้) QuEChERS Extraction Packets, EN Method Part No: 5982-7650 เป็นส่วนผสมของ MgSO_4 4 กรัม NaCl 1 กรัม sodium citrate dehydrate 1 กรัม และ disodium hydrogen citrate sesquihydrate 0.5 กรัม (Agilent Technologies สหรัฐอเมริกา) น้ำ reverse osmosis (RO), D-sorbitol, AR $\geq 98\%$ glacial acetic acid (Merck KGaA เยอรมนี) และ SiliaFast FaPEX Cereals Part No: FPX-CER-50 (SILICYCLE Inc. แคนาดา)

สารมาตรฐาน (Standards): เกรดวัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified reference material, CRM) เป็นสารละลายผสมของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 122 ชนิด มีความเข้มข้นอ้างอิงรับรองประมาณ 100 ± 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยี่ห้อ CPACChem (C.P.A. Chem Ltd. ฝรั่งเศส)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน: เตรียมสารละลายผสมความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารมาตรฐาน 122 ชนิด ใน acetone โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมแต่ละขวดจำนวน 6 ขวด ประมาณ 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า -18°C เตรียม intermediate solution ก่อนการใช้งาน ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารสกัดที่ได้จากตัวอย่าง และ working solution ช่วงความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.25 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารละลาย D-sorbitol 3% (analytical protectant) ปริมาณ 3 ไมโครลิตร ใช้วิเคราะห์ทันที หรือสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า -18°C ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 กรัม สำหรับชั่งตัวอย่าง เครื่องบดปั่น mill machine POWEQ รุ่น HM100 เครื่องปั่นตกตะกอน (centrifuge) รุ่น HERMLE Z366 เครื่องระเหยสารละลายแบบ heating box และใช้แก๊สไนโตรเจนในการระเหยสารสกัด REACTI-THERM III #TS-18824 Thermo scientific เครื่องหมุนปั่นผสมสารละลาย Vortex-2Genie micropipette ขนาด 2-20 ไมโครลิตร ขนาด 20-200 ไมโครลิตร และขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร amber vial ขนาด 4 มิลลิลิตร centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร และ 15 มิลลิลิตร ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำกว่า -18°C certified volumetric flask ก่อนการใช้งานเครื่องแก้วทุกชนิดให้ล้างด้วย acetone 2 ครั้ง และ n-hexane 2 ครั้ง แล้วผึ่งให้แห้งก่อนนำมาใช้งาน

เครื่อง GC-MS/MS: Agilent Technology 7890B, TQ7000C Triple Quadrupole MS/MS โดยใช้ analytical column: DB-5MS (30 m, 0.25 mm id, 0.25 μm film thickness) มีสถานะเครื่องดังนี้

ส่วน injector เป็น ALS, pulsed splitless mode, initial temperature 80°C hold 0.1 min, 300°C to 300°C cryogenic temperature 50°C มี injection volume เป็น 4 ไมโครลิตร oven temperature program เป็น initial 70°C hold 1 min, rate 50°C/min to 150°C, rate 6°C/min to 200°C, rate 16°C/min to 280°C hold 8.5 min, rate 50°C/min to final 300°C hold 0.5 min และ post-run at 70°C ใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 30 นาที ใช้ ion source temperature 280°C ใช้ quadrupole temperature MS1 และ MS2 เป็น 180°C ใช้ mode constant pressure ที่ 15.8 psi และทำ RT locked สาร chlorpyrifos ที่ 12.0 ± 0.1 นาที สารสนใจเมื่อเข้าสู่เครื่อง GC-MS/MS จะถูกทำให้แตกตัวเป็นประจุโดยใช้แก๊ส He เป็น quench gas และ N₂ เป็น collision gas ที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และถูกตรวจวัดด้วย multiple reaction monitoring, MRM mode ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูล mass transition ของสารต่างๆ ในเครื่อง GC/MS/MS

Pesticides	RT (min)	Transition 1			Transition 2		
		Quantifier (m/z)	Dwell time (ms)	CE (eV)	Qualifier (m/z)	Dwell time (ms)	CE (eV)
DDD-p,p'	14.75	234.9>199.1	10	15	234.9>165.1	10	20
DDE-p,p'	14.03	246.1>176.2	10	15	315.8>246.0	10	15
DDT-p,p'	15.34	234.9>165.1	10	20	234.9>199.1	10	15
acephate	5.09	136.0>94.0	10	10	142.0>96.0	10	5
alachlor	10.92	160.0>132.1	10	10	188.1>132.1	10	15
aldrin	12.01	254.9>220.0	10	20	262.9>190.9	10	35
ametryn	11.19	185.0>170.0	10	5	227.0>170.1	10	10
atrazine	8.85	214.9>58.1	10	10	200.0>122.1	10	5
azinphos-ethyl	17.24	160.0>77.1	10	20	132.0>77.1	10	15
azinphos-methyl	16.68	160.0>132.1	10	4	132.0>77.1	10	15
bendiocarb	7.76	126.0>108.0	10	5	126.0>52.1	10	15
BHC-alpha	8.20	218.9>183.0	10	5	180.9>145.0	10	15
BHC-beta	8.89	218.9>183.1	10	5	216.9>181.1	10	5
BHC-delta	9.91	217.0>181.1	10	5	219.0>183.1	10	5
BHC-gamma	9.07	218.9>183.1	10	5	216.9>181.0	10	5
bifenazate	16.14	199.0>184.2	20	10	184.0>156.2	20	10
bifenthrin	16.02	166.2>165.2	10	20	181.2>165.2	10	25
bromacil	11.72	207.0>190.0	30	15	205.0>162.0	30	15
bromophos-ethyl	13.34	302.8>284.7	10	15	358.7>302.8	10	15
bromopropylate	16.09	338.8>182.9	10	20	341.0>185.0	10	20
buprofezine	14.17	305.0>172.0	10	5	105.0>104.1	10	10
butachlor	13.53	160.1>132.1	10	10	176.1>147.1	10	10
cadusafos	7.95	158.8>131.0	10	5	158.8>97.0	10	15
carboxin	14.21	234.9>143.0	10	10	234.9>87.0	10	20
chlordan-alpha	13.62	372.9>265.9	10	20	271.9>236.9	10	15

ตารางที่ 1 ข้อมูล mass transition ของสารต่างๆ ในเครื่อง GC/MS/MS (ต่อ)

Pesticides	RT (min)	Transition 1			Transition 2		
		Quantifier (m/z)	Dwell time (ms)	CE (eV)	Qualifier (m/z)	Dwell time (ms)	CE (eV)
chlordane-oxy	12.89	114.9>87.0	10	15	114.9>51.1	10	25
chlordane-gamma	13.38	372.8>265.8	10	15	374.8>265.8	10	15
chlorfenapyr	14.32	246.9>227.0	10	15	136.9>102.0	10	15
chlorfenvinphos	12.96	266.9>159.1	10	15	268.9>161.0	10	15
chlorobenzilate	14.61	251.1>139.1	10	15	139.1>75.1	10	30
chloroneb	5.82	208.0>193.1	10	10	191.0>113.0	10	15
chlorothalonil	9.51	263.8>168.0	10	25	265.8>231.0	10	20
chlorpropham	7.59	213.0>171.0	10	5	213.0>127.0	10	5
chlorpyrifos	11.98	196.9>169.0	10	15	313.8>257.8	10	15
chlorpyrifos-methyl	10.70	285.9>92.9	10	20	124.9>47.0	10	15
cyanophos	9.21	242.9>109.0	10	10	124.9>47.0	10	15
cyfluthrin I	18.32	226.0>206.0	20	10	198.9>170.1	20	25
cyfluthrin II	18.45	226.0>206.0	20	10	165.0>91.0	10	5
cyfluthrin III	18.52	226.0>206.0	20	10	162.9>91.1	20	5
cyfluthrin IV	18.58	226.0>206.0	20	10	162.9>91.1	20	5
cyhalothrin-lambda	16.86	197.0>161.0	10	10	197.0>141.0	10	10
cypermethrin I	18.77	181.0>152.0	30	20	162.9>91.1	30	5
cypermethrin II	18.91	181.0>152.0	30	20	163.0>127.0	30	5
cypermethrin III	18.99	181.0>152.0	30	20	165.0>91.0	30	10
cypermethrin IV	19.05	181.0>152.0	30	20	165.0>91.0	30	10
DCPA	12.07	300.9>223.0	10	25	331.8>300.9	10	10
DEET	6.59	119.1>91.0	10	10	119.1>65.1	10	20
deltramethrin	21.72	253.0>172.0	20	5	253.0>174.0	20	8
demeton-S-methyl	7.15	88.0>60.0	10	5	112.0>79.0	10	5
diazinon	9.38	199.1>93.0	10	15	179.0>137.0	10	20
dichlorvos	3.75	184.9>93.0	10	10	144.9>109.0	10	10
dicofol	12.35	139.0>111.0	10	10	250.0>139.0	10	8
dicrotophos	7.64	127.0>109.0	20	15	193.0>127.1	20	5
dieldrin	14.12	345.0>263.0	10	8	262.9>191.0	10	30
dimethoate	8.52	92.9>63.0	10	10	86.9>86.0	10	5
dioxathion	9.06	270.0>197.0	10	5	152.9>96.9	10	10
disulfoton	9.68	142.0>109.0	10	5	153.0>96.9	10	10
ditalimfos	13.67	148.0>130.1	10	10	130.0>102.1	10	10

ตารางที่ 1 ข้อมูล mass transition ของสารต่างๆ ในเครื่อง GC/MS/MS (ต่อ)

Pesticides	RT (min)	Transition 1			Transition 2		
		Quantifier (m/z)	Dwell time (ms)	CE (eV)	Qualifier (m/z)	Dwell time (ms)	CE (eV)
endosulfan-alpha	13.61	194.5>125.0	10	20	194.9>160.0	10	5
endosulfan-beta	14.68	194.9>124.9	10	25	206.9>172.0	10	15
endosulfan sulfate	15.29	387.0>289.0	10	5	273.8>236.9	10	15
endrin	14.48	316.7>280.8	10	5	262.8>193.0	10	35
EPN	16.07	157.0>110.0	10	15	169.0>141.1	10	5
ethion	14.75	230.9>129.0	10	25	230.9>175.0	10	10
ethoprophos	7.30	138.9>97.0	20	5	157.9>114.0	20	5
etrimfos	9.84	291.9>181.0	10	5	168.0>153.1	10	5
fenchlorphos	11.19	285.0>269.9	10	15	286.9>272.0	10	15
fenitrothion	11.60	277.0>260.1	10	5	125.1>47.0	10	15
fenobucarb	6.93	121.0>77.0	10	20	149.9>121.1	10	5
fenpropathrin	16.19	181.1>152.1	10	25	265.0>210.0	10	10
fenthion	12.10	278.0>109.0	10	15	124.9>79.0	10	5
fenvalerate I	20.20	167.0>125.1	10	5	181.0>152.0	10	25
fenvalerate II	20.58	167.0>125.1	10	5	125.0>89.0	10	20
fipronil	12.86	366.8>212.8	10	25	350.8>254.8	10	15
folpet	13.22	261.8>130.1	10	15	259.8>130.1	10	15
fosthiazate I	12.53	199.0>102.0	10	5	195.0>139.0	10	5
fosthiazate II	12.59	195.0>103.0	10	5	195.0>139.0	10	5
heptachlor	11.10	271.7>236.9	10	15	273.7>236.9	10	15
heptachlor epoxide (cis)	12.89	352.8>262.9	10	15	354.8>264.9	10	15
heptachlor epoxide (trans)	12.97	216.9>181.9	10	20	262.9>193.0	10	35
heptenophos	6.50	124.0>89.0	10	10	108.9>78.9	10	5
hexachlorobenzene	8.26	283.8>248.8	10	15	283.8>213.8	10	35
hexazinone	15.42	171.0>71.1	10	10	171.0>85.1	10	10
isofenphos	12.93	212.9>185.1	10	5	212.9>121.1	10	10
isoprocarb	6.13	121.0>103.1	10	10	121.1>77.1	10	20
isoxathion	14.39	177.1>130.0	10	10	105.0>77.1	10	15
malathion	11.86	126.9>99.0	10	5	157.8>125.0	10	5
metacrifos	5.69	208.0>180.0	10	5	208.0>93.0	10	15
metalaxyl	11.15	234.0>174.1	10	10	234.0>146.1	10	20
methamidophos	3.70	95.0>64.0	10	10	141.0>95.0	10	5

ตารางที่ 1 ข้อมูล mass transition ของสารต่างๆ ในเครื่อง GC/MS/MS (ต่อ)

Pesticides	RT (min)	Transition 1			Transition 2		
		Quantifier (m/z)	Dwell time (ms)	CE (eV)	Qualifier (m/z)	Dwell time (ms)	CE (eV)
methidathion	13.35	144.9>85.0	10	5	144.9>58.1	10	15
methoxychlor	16.16	227.0>169.0	10	25	227.0>141.1	10	40
metolachlor	11.92	238.0>162.2	10	10	162.2>133.2	10	15
metribuzin	10.74	198.0>82.0	10	15	198.0>55.0	10	30
mevinphos	5.01	192.0>127.0	10	10	127.0>95.0	10	15
monocrotophos	7.87	127.1>109.0	10	10	127.1>95.0	10	15
naled	7.55	184.9>109.0	10	15	144.9>109.0	10	15
omethoate	6.78	155.9>110.0	10	5	155.9>79.0	10	20
parathion	12.18	138.9>109.0	10	5	290.9>109.0	10	10
parathion-methyl	10.91	262.9>109.0	10	10	125.0>47.0	10	10
permethrin I	17.70	183.1>168.1	10	10	183.1>165.1	10	10
permethrin II	17.84	182.9>168.1	10	10	182.9>155.1	10	10
phenthoate	13.07	274.0>121.0	10	10	274.0>125.0	10	15
phorate	8.07	121.0>65.0	10	10	231.0>129.0	10	20
phosalone	16.60	182.0>111.0	10	15	182.0>102.1	10	15
phosmet	16.04	160.0>77.1	10	20	160.0>133.1	10	10
phosphamidon	10.48	192.9>127.0	10	5	127.0>109.0	10	10
picoxystrobin	13.65	145.0>117.1	10	10	145.0>115.1	10	15
pirimiphos-ethyl	12.51	318.1>182.0	10	10	318.1>166.1	10	10
pirimiphos-methyl	11.54	232.9>151.0	10	5	232.9>125.0	10	5
profenofos	13.97	296.8>268.7	10	5	337.0>309.0	10	6
propachlor	6.97	176.1>57.1	10	5	120.0>77.1	10	20
propargite	15.57	149.9>135.1	10	5	135.0>107.1	10	10
propetamphos	9.18	138.0>110.0	10	5	138.0>64.0	10	15
prothiofos	13.89	266.9>239.0	10	5	309.0>221.0	10	25
pyrimethanil	9.51	198.0>183.1	10	15	198.0>118.1	10	25
quinalphos	13.08	146.0>118.0	10	10	157.0>129.1	10	15
quintozene	8.90	295.0>265.0	10	10	295.0>237.0	10	15
simazine	8.72	201.1>173.1	10	5	173.0>138.2	10	5
tebufenpyrad	16.27	332.9>276.0	10	5	332.9>171.0	10	20
tecnazene (TCNB)	6.79	214.9>179.0	10	10	258.9>201.0	10	10
terbacil	9.74	160.0>117.1	10	5	161.1>144.1	10	10
terbufos	9.20	230.9>175.0	10	10	152.9>97.0	10	5

ตารางที่ 1 ข้อมูล mass transition ของสารต่างๆ ในเครื่อง GC/MS/MS (ต่อ)

Pesticides	RT (min)	Transition 1			Transition 2		
		Quantifier (m/z)	Dwell time (ms)	CE (eV)	Qualifier (m/z)	Dwell time (ms)	CE (eV)
tetrachlorvinphos	13.47	330.8>108.9	10	15	328.8>108.9	10	15
tetradifon	16.50	226.9>199.0	10	15	356.0>159.0	10	10
thiometon	8.38	93.0>63.0	10	5	125.0>47.0	10	15
tolclofos-methyl	10.93	265.0>250.0	10	15	265.0>93.0	10	25
tolyfluanid	12.92	136.9>91.1	10	20	237.9>137.0	10	15
triadimefon	12.25	208.0>181.1	10	5	208.0>127.0	10	15
triazophos	15.00	161.2>134.2	10	10	161.2>106.1	10	10
trifluralin	7.61	305.9>264.0	10	5	264.0>160.1	10	15

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธี ได้แก่ ข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งบดเป็นตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องบดปั่น ซึ่งแบ่งตัวอย่างเพื่อเป็น analytical portions โดยชั่งตัวอย่างสำหรับวิธี QuEChERS น้ำหนัก 2.0 ± 0.02 กรัม ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร สำหรับวิธี FaPEX[®] น้ำหนัก 0.5 ± 0.01 กรัม ลงใน syringe พลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร ตัวอย่างที่ยังไม่ได้นำมาวิเคราะห์จะถูกเก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ ต่ำกว่า -15°C

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี QuEChERS และวิธี FaPEX[®]

ทดสอบประสิทธิภาพของ 2 วิธี โดยการเติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวนวิธีละ 8 ซ้ำ ($n=8$) ในตัวอย่างข้าว คำนวณ mean %recovery และ %RSD วิธีที่มีจำนวนสารที่ให้ %recovery และ %RSD อยู่ในเกณฑ์ยอมรับที่ 70–120% และ $\leq 20\%$ ตามลำดับ มากกว่าถือเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากกว่า และเลือกวิธีนั้นเพื่อทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธี

วิธี QuEChERS: นำตัวอย่างที่ชั่งไว้มาเติมน้ำ RO ปริมาตร 8 มิลลิลิตร เขย่าผสมกันแล้ววางทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที เติม acetonitrile ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมืออย่างแรง 1 นาที แล้วเติม QuEChERS extraction kit เขย่าต่ออีก 1 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แบ่งสารสกัดส่วนใส ด้านบน 2 มิลลิลิตร ใส่ใน amber vial ขนาด 8 มิลลิลิตร นำไประเหยแห้งปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายผสมของ n-hexane: ethyl acetate (3:1) เป็น 2 มิลลิลิตร เติม D-sorbitol 3% ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ได้ความเข้มข้น ตัวอย่าง 0.2 กรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS

วิธี FaPEX[®]: ตัวอย่างน้ำหนัก 0.5 ± 0.1 กรัม ใน syringe พลาสติกที่ปิดปลายไว้ ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำ RO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดด้วย plunger ไล่อากาศออกบางส่วน เขย่าผสมกันแล้ววางทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที เติม 1% acetic acid in acetonitrile ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วย Vortex นาน 1 นาที แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า ความเร็ว 100 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ต่ปลาย syringe เข้ากับ FaPEX[®] cartridge กด plunger ให้สารสกัดผ่าน cartridge อัตราเร็ว 1 หยดต่อวินาที ลงใน amber vial นำสารสกัด 2 มิลลิลิตร ไประเหยแห้งปรับปริมาตรด้วย ตัวทำละลายผสมของ n-hexane: ethyl acetate (3:1) เป็น 1 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นตัวอย่าง 0.2 กรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ความจำเพาะของวิธี

ฉีดสารมาตรฐานเข้าเครื่อง GC-MS/MS ตามสภาวะที่กำหนดจำนวน 3 ซ้ำ บันทึก Retention time (RT) และ ion intensity ratio แล้วทดสอบความจำเพาะของวิธีโดยวิเคราะห์ method blank (reagent blank) ที่ใช้น้ำ RO แทนตัวอย่าง และ sample blank ได้แก่ ข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง เมื่อไม่พบพีคหรือพบพีคที่มีสัญญาณ signal-to-noise ratio (S/N) น้อยกว่า 3 ที่มี RT และ/หรือค่า m/z ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานถือว่าวิธีปราศจากสารรบกวนและวิธีมีความจำเพาะ

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

สร้างกราฟมาตรฐานแบบ matrix-matched calibration (MMC) โดยใช้สารสกัดที่ได้จากข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งที่เป็น blank เป็นตัวทำละลาย เจือจาง intermediate standard solution ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการและฉีดเข้าเครื่อง GC-MS/MS แบบสุ่ม (random, $n=3$) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient: r) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ r มีค่ามากกว่า 0.995

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD)

หาขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) โดยเติมสารละลายมาตรฐานลงในสารสกัดจากข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งที่ระดับ LOD แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC-MS/MS คำนวณค่า signal-to-noise ratio (S/N) จากนั้นยืนยันค่า LOD ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง แล้วสกัดตามขั้นตอน วิเคราะห์จำนวน 8 ซ้ำ ($n=8$) แล้วคำนวณค่า S/N ค่า LOD คือระดับความเข้มข้นที่ให้ค่า S/N มากกว่า 3

ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

หาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) โดยใช้ข้อมูลจากการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของการวิเคราะห์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์จำนวน 8 ซ้ำ ($n=8$) แล้วคำนวณ %recovery กำหนดเกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วงร้อยละ 70-120 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ $\leq 20\%$

ความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์

ศึกษาความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์โดยการเติมสารมาตรฐานในตัวอย่าง (sample blank) ที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.25 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ ($n=3$) สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่างกับความเข้มข้นที่ตรวจพบ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient: r) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ r มีค่ามากกว่า 0.95

ความแม่นยำและความเที่ยง

เติมสารมาตรฐานในตัวอย่าง (sample blank) ที่ระดับ LOQ, $4 \times \text{LOQ}$ และ $25 \times \text{LOQ}$ ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.2 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ วิเคราะห์ระดับละ 8 ซ้ำ ($n=8$) แล้วคำนวณ %recovery และ RSD โดยเกณฑ์ยอมรับความแม่นยำ (accuracy): mean recovery 70-120% และเกณฑ์ยอมรับความเที่ยง (precision): RSD มีค่า $\leq 20\%$

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Estimation of Measurement Uncertainty, MU) ของการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในอาหารที่ทำการทดสอบใช้วิธีการของ EURACHEM ซึ่งเป็นการคำนวณโดยใช้ทุกแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน จากนั้นคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้ค่า $k = 2$ เป็นวิธีที่มีความถูกต้องเป็นที่ยอมรับและเหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน

การถ่ายทอดองค์ความรู้เพื่อพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการเครือข่าย

เพื่อเป็นการสนับสนุนและยกระดับความสามารถห้องปฏิบัติการเครือข่ายกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในภูมิภาค จึงดำเนินการฝึกอบรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ให้แก่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ชั้นพื้นฐานและชั้นสูงรวม 7 แห่ง และเพื่อทดสอบความสามารถห้องปฏิบัติการที่เข้ารับการอบรม จึงดำเนินการจัดโครงการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory comparison, ILC) การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าว ปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 (ILC-PR01-63) มีสมาชิก 3 แห่ง ได้แก่ ห้องปฏิบัติการฝ่ายสารกำจัดศัตรูพืชและยาสัตว์ตกค้าง สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์อีก 2 แห่ง ใช้ค่าอ้างอิงของวัสดุทดสอบ (QC sample) ซึ่งเป็นตัวอย่างข้าวบาสมати (Basmati Rice) ที่ได้จากการทดสอบความชำนาญของ FAPAS Product Code: FCPM2-CCP51 Test No. 09128 แจกจ่ายให้แก่ผู้เข้าร่วมการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ ผลวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจะถูกประเมินความเท่าเทียมกันโดยใช้ค่า RU (Relative expanded uncertainty)⁽¹⁸⁾ คำนวณได้จาก Reference value และ Expanded uncertainty (U) ที่ระบุใน reference data sheet ของ FAPAS โดยค่า reference value $\pm U$ ของสาร alpha-BHC, methamidophos, profenofos และ fenpropathrin เป็น 18.2 ± 8.0 , 42.0 ± 18.5 , 45.4 ± 20.0 และ 59.8 ± 26.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ กำหนดเกณฑ์ยอมรับ $\leq U$ หรือ $RU \leq \pm 1$ เมื่อ $RU = \text{Relative expanded uncertainty}$, $RV_x = \text{Reported value}$, $RV_o = \text{Reference value}$, $U = \text{Expanded uncertainty}$ ดังสมการ

$$RU = (RV_x - RV_o)/U$$

ผล

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี QuEChERS และวิธี FaPEX[®]

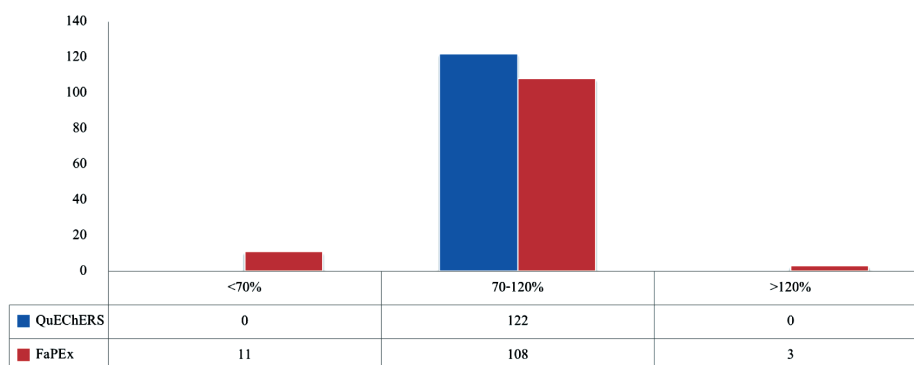
เปรียบเทียบประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่าง 2 วิธี ก่อนการคัดเลือกวิธีที่จะนำไปทดสอบความใช้ได้ ได้แก่ วิธี QuEChERS ซึ่งห้องปฏิบัติการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารใช้สำหรับวิเคราะห์ผักผลไม้สด กับวิธี FaPEX[®] ซึ่งผู้ผลิตระบุว่ามีหลักการเดียวกัน แต่ได้ลดขนาดและขั้นตอนทำให้รวดเร็วขึ้น ซึ่งอาจจะสามารถนำมาใช้ทดแทนวิธีเดิมได้ โดยเติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 8 ซ้ำ ($n=8$) คำนวณ %recovery และ %RSD ดังแสดงในภาพที่ 1 สำหรับวิธี QuEChERS อ้างอิงจากวิธี EN 15662 เป็นวิธีที่ใช้กับตัวอย่างความชื้นสูง ได้พัฒนาปรับปรุงก่อนการใช้งานให้สามารถใช้วิเคราะห์ของแห้งได้ เนื่องจากต้องคืนสภาพให้ตัวอย่างที่มีความชื้น 10-15% ให้มีความชื้นที่เหมาะสมกับวิธี (ความชื้น $\geq 70\%$) โดยการเติมน้ำ 4 เท่าของปริมาณตัวอย่าง ในส่วนของวิธี FaPEX[®] ใช้หลักการที่อ้างอิงจากวิธี AOAC 2007.01 ดังแสดงในภาพที่ 1

จากการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีเตรียมตัวอย่าง ผลพบว่าวิธี QuEChERS ให้จำนวนสารที่มี %recovery อยู่ระหว่าง 70-120% จำนวน 122 สาร คิดเป็นร้อยละ 100 และความเที่ยงที่แสดงด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ สารทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ($\leq 20\%$) ในขณะที่วิธี FaPEX[®] ให้จำนวนสารที่มี %recovery อยู่ระหว่าง 70-120% จำนวน 108 สาร คิดเป็นร้อยละ 88 และมี 2 สาร ให้ %RSD ไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ แสดงว่าวิธี QuEChERS มีความเหมาะสมที่จะใช้สำหรับการเตรียมตัวอย่างมากกว่า จึงเลือกใช้วิธีนี้สำหรับการทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

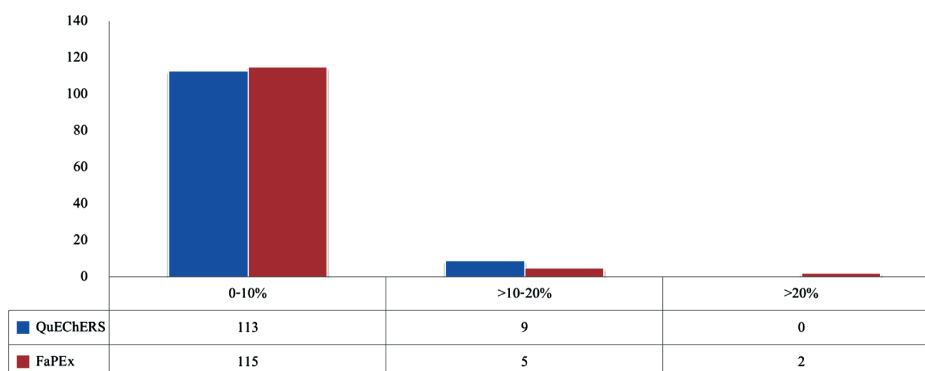
ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

จากการศึกษาการวิเคราะห์ method blank และ sample blank ที่เป็นข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง ตรวจไม่พบสารรบกวนที่ให้พีคตรงหรือใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน การวิเคราะห์แบบ MRM ด้วยเครื่อง GC-MS/MS ทำให้สามารถตรวจวัดพีคสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้อย่างชัดเจน เป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจวัดสารสนใจในเมทริกซ์ที่มีสารรบกวนได้ดีดังแสดงในภาพที่ 2

ผลการเปรียบเทียบร้อยละการคืนกลับระหว่างวิธี QuEChERS กับ FaPEx



ผลการเปรียบเทียบส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ระหว่างวิธี QuEChERS กับ FaPEx

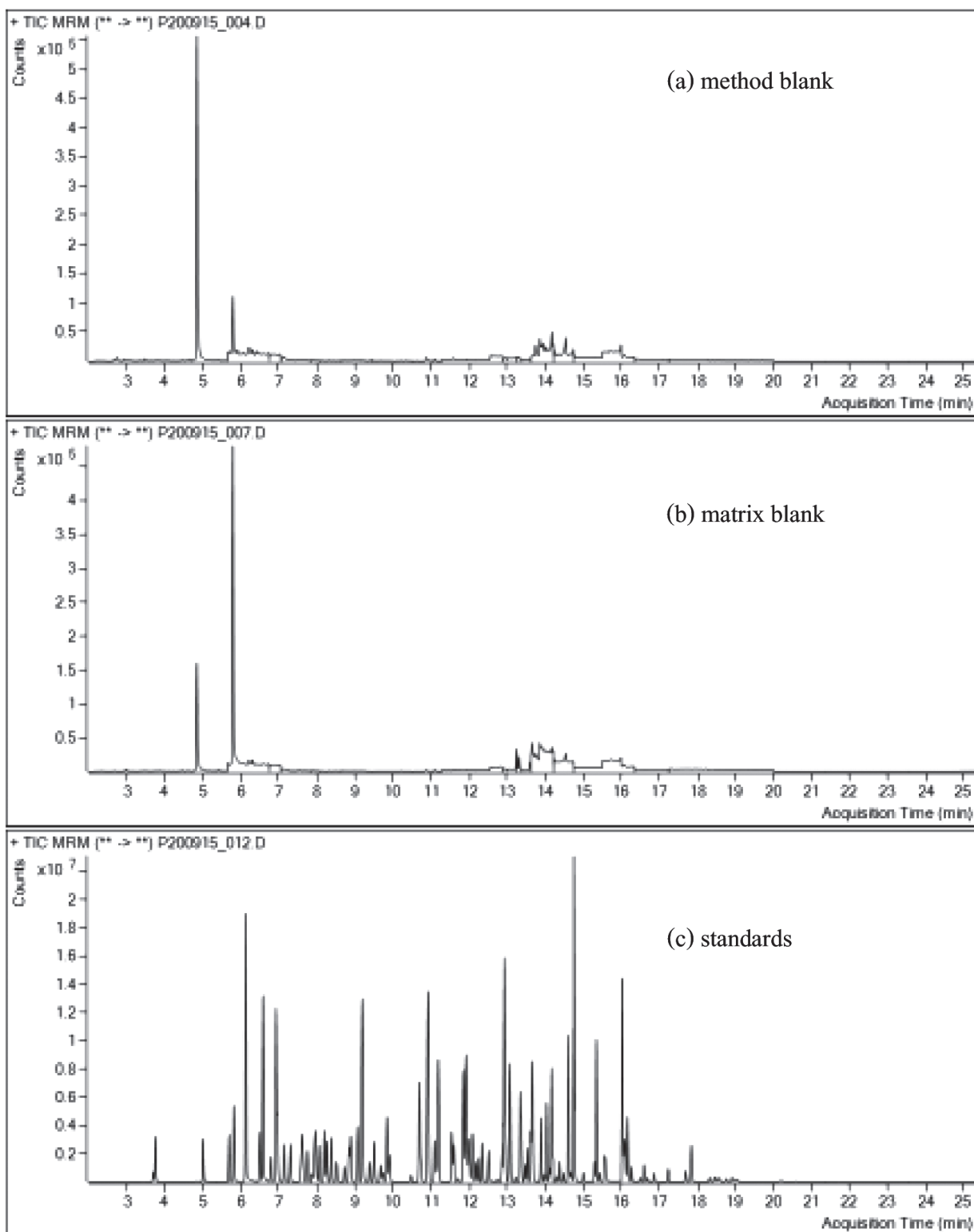


ภาพที่ 1 ผลการเปรียบเทียบร้อยละการคืนกลับและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ระหว่างวิธี QuEChERS กับ FaPEx® แสดงจำนวนสารที่มี %recovery อยู่ระหว่าง 70-120% และ %RSD ≤20%.

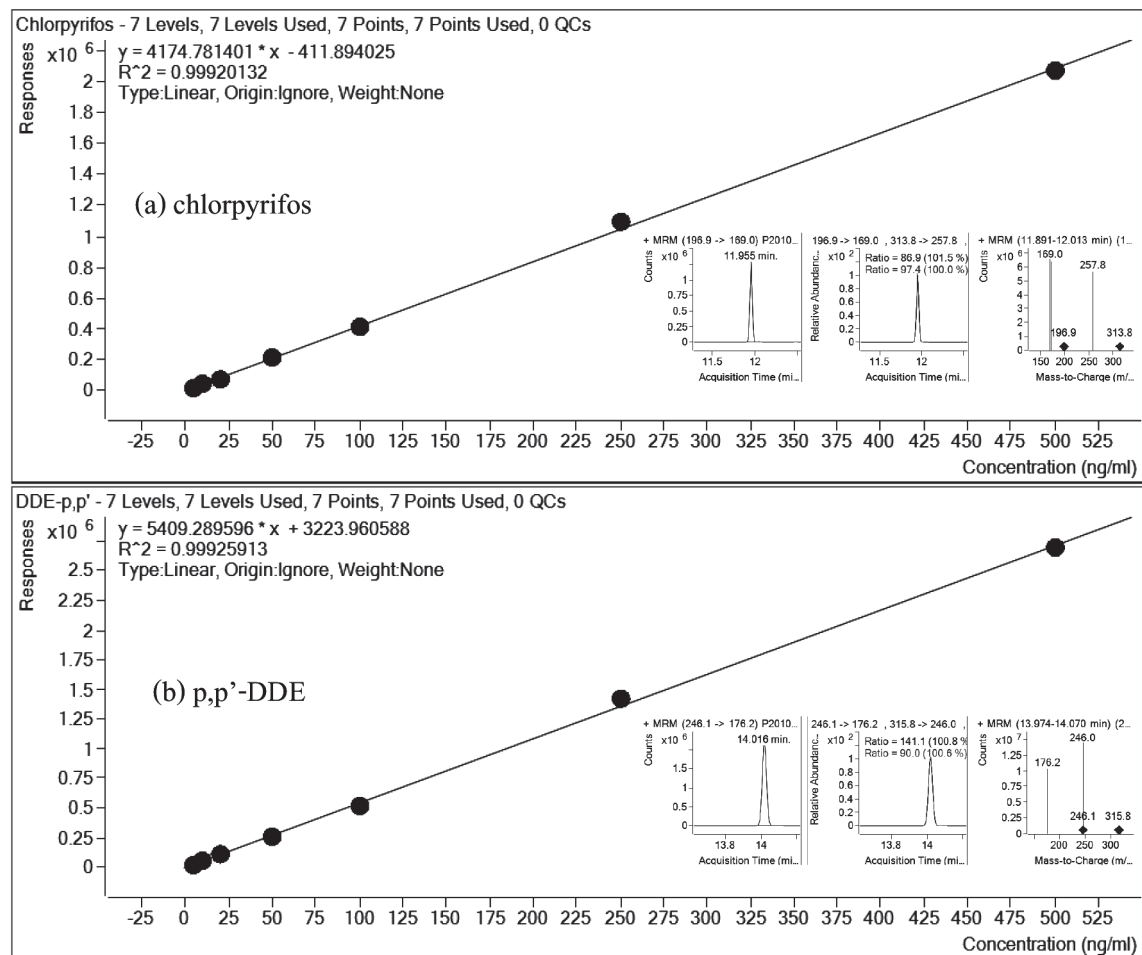
สามารถสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง concentration กับ peak area (response) ของสารสนใจมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.005 ถึง 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 3 โดยกราฟมาตรฐานของสารทุกชนิดมีค่า r ในช่วง 0.995-0.999 ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์ยอมรับที่ 0.995

ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ของสารทุกชนิดเท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ($S/N > 3$) และการยืนยันโดยการสกัดตัวอย่างที่ระดับ LOD ผลพบว่าพบสารทุกชนิดทั้ง 8 ขั้ว โดยมีขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีดังแสดงในตารางที่ 2 ค่าความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับ LOQ, 4xLOQ และ 25xLOQ ที่ 0.05, 0.20 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 122 ชนิด ในข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง ผลการทดสอบความแม่นยำ (%recovery) ที่ระดับ LOQ มีค่าระหว่าง 74.3-119.8% และความเที่ยงจาก RSD มีค่าระหว่าง 1.2-20.0% ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับกลาง (4xLOQ) และ สูง (25xLOQ) มีค่า 91.3-120.0 % และ 0.5-20.0% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับที่ 70-120% และ ≤20% ตามลำดับ



ภาพที่ 2 Total ion chromatogram แสดง (a) method blank (b) matrix blank ปราศจากสารรบกวน และ (c) พืชสารมาตรฐาน 122 ชนิด



ภาพที่ 3 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานและ Chromatogram แสดง quantification transition, qualification transition, ion intensity ratio และ mass-to-charge (m/z) ของ (a) chlorpyrifos และ (b) p,p'-DDE

ตารางที่ 2 ความแม่นยำ (average %recovery) และความเที่ยง (%RSD) ของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งที่ความเข้มข้นต่างๆ

Pesticides	ข้าว						ถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง					
	0.05 mg/kg		0.2 mg/kg		1.25 mg/kg		0.05 mg/kg		0.2 mg/kg		1.25 mg/kg	
	(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)	
	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
DDD-p,p'	110.5	2.9	118.1	19.1	102.1	3.3	103.7	1.9	110.1	5.7	98.4	1.5
DDE-p,p'	104.3	3.9	118.2	12.4	100.2	2.2	104.6	2.1	109.9	6.0	99.9	0.9
DDT-p,p'	103.8	1.8	119.9	7.8	105.3	4.2	102.1	2.1	108.6	6.1	99.6	0.9
acephate	119.5	8.2	74.6	13.8	119.8	4.0	105.3	6.3	106.6	8.9	107.8	1.4
alachlor	109.4	4.2	119.1	6.3	100.6	2.0	105.6	3.1	104.4	16.9	104.4	0.9
aldrin	100.8	4.2	117.6	16.4	97.5	1.9	103.6	3.8	106.9	6.7	98.7	1.0
ametryn	107.0	4.1	119.6	11.2	100.7	2.1	106.3	2.6	105.2	15.5	101.5	0.8
atrazine	104.3	2.7	118.1	11.9	100.6	1.6	103.0	1.7	106.5	10.0	100.5	0.6
azinphos-ethyl	112.4	4.0	116.8	13.9	120.0	9.5	101.5	2.5	108.9	6.6	105.2	1.5

ตารางที่ 2 ความแม่นยำ (average %recovery) และความเที่ยง (%RSD) ของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ต่อ)

Pesticides	ข้าว						ถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง					
	0.05 mg/kg		0.2 mg/kg		1.25 mg/kg		0.05 mg/kg		0.2 mg/kg		1.25 mg/kg	
	(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)	
	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
azinphos-methyl	111.0	13.5	113.0	18.7	118.2	11.3	104.5	1.5	109.0	6.4	105.2	1.4
bendiocarb	106.5	3.3	120.7	6.7	107.7	2.2	102.4	1.8	111.0	6.4	101.6	0.8
BHC-alpha	104.2	4.6	116.1	10.7	98.0	1.8	103.4	3.5	112.2	6.3	101.0	0.7
BHC-beta	104.6	4.8	119.5	11.2	98.9	1.4	103.1	3.3	110.0	6.1	100.1	0.6
BHC-delta	107.7	4.8	115.8	14.7	101.0	1.5	102.9	3.6	109.7	5.5	100.2	0.7
BHC-gamma	103.6	4.9	107.4	19.8	98.9	1.1	104.5	3.5	111.4	5.4	101.0	0.8
bifenazate	105.6	8.7	119.2	11.3	92.8	8.1	106.1	8.2	115.0	8.0	87.4	4.5
bifenthrin	108.7	2.5	114.4	18.5	104.1	4.7	103.3	2.1	112.5	5.6	101.5	0.9
bromacil	105.2	18.2	119.4	8.0	110.6	2.7	104.3	3.8	107.2	6.7	99.3	1.1
bromophos-ethyl	102.3	4.6	119.9	7.2	100.7	2.4	105.0	3.7	109.6	5.4	100.2	0.9
bromopropylate	109.3	3.2	119.4	9.9	106.3	4.8	102.6	1.3	108.9	6.5	97.3	1.3
buprofezine	106.9	5.2	116.6	14.5	101.3	2.5	108.2	4.0	111.0	5.8	98.7	1.2
butachlor	103.8	2.3	119.3	6.2	103.5	2.2	107.2	1.9	109.3	5.3	101.0	1.1
cadusafos	107.8	5.1	119.9	18.1	99.7	1.9	106.3	3.2	111.1	5.5	100.3	0.7
carboxin	74.3	19.9	155.2	18.1	110.7	4.4	109.5	4.4	105.6	7.1	102.2	1.0
chlordane-alpha	104.6	3.9	119.6	8.6	98.6	1.9	105.1	2.4	108.1	5.7	99.0	1.4
chlordane-oxy	100.3	2.7	119.5	10.3	99.2	2.1	110.1	1.9	109.9	6.1	99.6	0.9
chlordane-gamma	104.0	2.7	118.7	12.9	98.6	2.2	106.0	3.6	108.1	5.7	98.5	0.7
chlorfenapyr	110.3	7.4	116.0	18.7	102.7	3.4	96.4	3.4	108.8	5.6	99.4	1.2
chlorfenvinphos	112.4	5.5	117.0	16.3	108.4	2.8	107.0	1.9	110.6	6.1	101.6	0.9
chlorobenzilate	108.3	2.6	115.4	16.6	105.0	3.2	102.5	1.8	110.6	5.8	100.5	0.8
chloroneb	104.1	7.4	115.2	9.4	96.4	2.5	107.8	4.9	109.5	5.9	100.3	1.0
chlorothalonil	110.9	5.0	120.0	14.4	107.3	2.1	101.2	3.9	109.5	5.8	101.8	0.7
chlorpropham	105.8	5.7	117.9	12.7	98.7	1.5	103.9	3.9	111.5	6.4	101.9	0.9
chlorpyrifos	108.6	3.6	118.8	16.8	101.4	1.8	104.6	2.3	109.2	5.9	100.9	0.8
chlorpyrifos-methyl	106.4	3.0	117.7	14.1	104.1	1.4	104.6	2.1	111.3	5.7	102.4	1.1
cyanophos	104.2	4.1	119.8	11.7	101.7	1.8	104.5	2.5	110.3	5.8	106.1	0.8
cyfluthrin I	112.4	7.7	118.7	8.6	118.6	8.7	108.7	2.9	112.8	6.4	108.9	3.7
cyfluthrin II	100.0	5.5	119.5	11.9	116.5	10.3	113.9	4.5	108.3	5.8	106.0	2.8
cyfluthrin III	97.0	14.5	119.8	7.8	118.2	9.6	105.0	4.1	107.7	6.3	105.5	3.4
cyfluthrin IV	109.6	13.9	119.7	10.4	115.4	9.3	104.8	3.4	114.1	6.7	108.7	3.6

ตารางที่ 2 ความแม่นยำ (average %recovery) และความเที่ยง (%RSD) ของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งที่ความเข้มข้นต่างๆ (ต่อ)

Pesticides	ข้าว						ถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง					
	0.05 mg/kg		0.2 mg/kg		1.25 mg/kg		0.05 mg/kg		0.2 mg/kg		1.25 mg/kg	
	(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
cyhalothrin-lambda	119.4	7.5	116.9	17.6	111.6	7.1	106.7	3.0	109.9	6.8	101.7	0.8
cypermethrin I	95.7	16.1	119.3	10.1	120.0	7.4	118.1	3.9	100.2	6.9	103.6	3.1
cypermethrin II	102.0	18.2	119.7	9.7	117.0	10.0	111.5	4.5	108.4	7.2	104.6	2.5
cypermethrin III	114.6	20.0	117.3	13.3	119.0	6.7	116.9	8.5	103.9	9.7	101.2	2.5
cypermethrin IV	117.2	14.4	119.9	11.5	115.6	8.9	96.2	5.2	108.8	6.9	111.2	3.0
DCPA	104.7	4.1	119.4	12.1	100.1	1.8	105.6	2.6	109.5	5.9	99.9	0.9
DEET	107.1	3.6	115.3	15.8	101.3	1.7	104.9	3.4	109.9	6.0	109.2	0.6
deltramethrin	101.3	9.8	119.8	10.4	114.0	8.6	103.2	3.6	107.3	6.7	105.9	3.1
demeton-S-methyl	96.1	12.0	119.9	5.8	107.4	2.1	112.7	2.9	108.3	6.4	103.0	0.8
diazinon	103.8	3.5	119.4	8.0	100.7	1.4	106.9	1.8	110.6	6.2	100.5	0.8
dichlorvos	109.5	8.7	119.0	7.1	98.5	2.2	105.2	4.6	111.7	5.7	106.4	0.8
dicofol	106.3	2.3	116.7	13.7	101.1	2.5	111.1	3.0	111.0	5.5	105.8	1.3
dicrotophos	111.5	6.1	119.8	4.9	116.0	3.0	104.0	2.8	110.8	5.8	113.1	1.5
dieldrin	105.2	6.1	119.4	5.4	100.9	2.6	105.3	5.2	108.9	4.4	100.1	1.3
dimethoate	108.7	4.4	119.6	4.4	110.0	2.3	106.2	1.9	111.2	5.9	102.6	1.0
dioxathion	98.0	7.1	119.9	6.4	95.9	1.7	103.1	2.7	111.9	6.8	102.7	1.1
disulfoton	94.3	16.5	119.1	2.4	100.9	1.0	112.2	3.6	109.4	5.8	101.4	0.9
ditalimfos	107.5	2.7	119.7	10.5	104.9	2.9	104.9	2.1	108.2	5.9	99.5	0.6
endosulfan-alpha	103.7	6.5	119.1	6.7	100.8	2.8	102.6	7.4	109.0	4.9	99.0	1.0
endosulfan-beta	97.8	3.1	119.7	7.4	102.3	2.9	106.6	2.0	110.8	5.6	96.4	1.5
endosulfan sulfate	104.3	6.5	116.8	17.2	102.5	2.8	103.1	3.6	107.2	6.8	95.9	1.4
endrin	98.1	9.6	119.3	5.0	96.9	3.6	107.6	9.3	106.6	5.4	92.1	3.6
EPN	104.1	4.0	118.4	7.9	112.6	5.1	111.4	1.5	112.7	5.8	110.2	3.6
ethion	109.1	3.4	118.7	11.4	104.3	3.3	107.2	1.9	111.1	5.8	102.1	0.9
ethoprophos	104.0	3.8	117.1	11.7	100.9	1.7	103.7	3.0	111.0	5.6	101.2	0.6
etrimfos	109.0	6.1	119.0	10.2	99.9	1.5	105.8	2.7	111.1	5.7	101.3	0.5
fenchlorphos	105.1	4.9	118.4	9.9	101.7	1.5	105.3	3.4	110.5	5.8	101.4	1.0
fenitrothion	102.5	4.3	119.5	10.4	107.8	2.0	107.1	4.2	116.7	5.4	111.1	4.2
fenobucarb	104.8	3.8	121.3	4.3	101.4	1.4	104.4	2.4	110.0	5.9	109.9	0.6
fenpropathrin	108.8	4.1	118.1	12.6	105.3	5.8	105.9	2.7	110.1	6.1	99.8	0.8
fenthion	105.3	3.1	116.7	15.2	102.2	1.7	105.1	1.8	110.7	5.5	101.2	0.8

ตารางที่ 2 ความแม่นยำ (average %recovery) และความเที่ยง (%RSD) ของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งที่ความเข้มข้นต่างๆ (ต่อ)

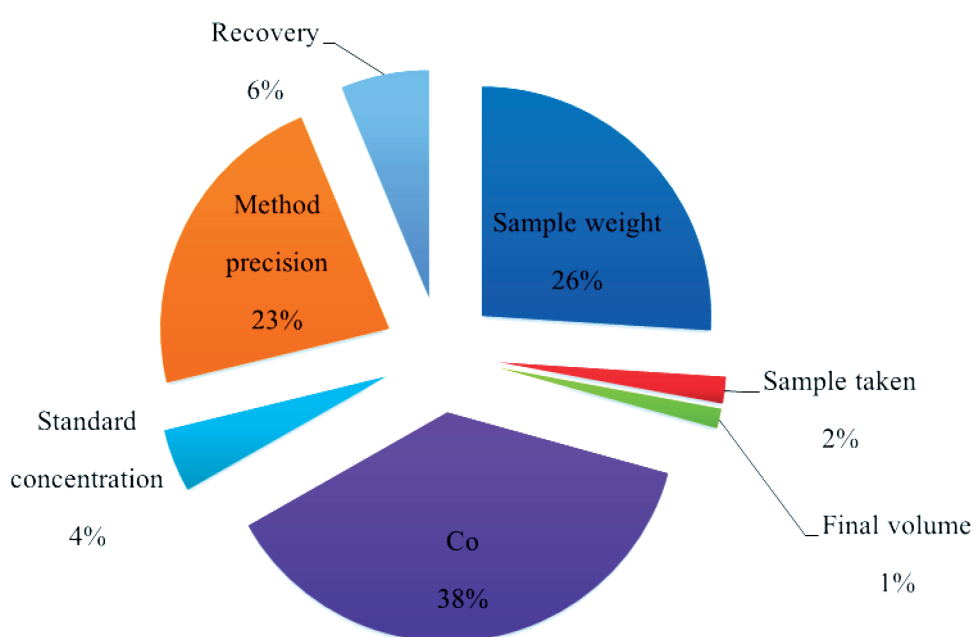
Pesticides	ข้าว						ถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง					
	0.05 mg/kg		0.2 mg/kg		1.25 mg/kg		0.05 mg/kg		0.2 mg/kg		1.25 mg/kg	
	(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
fenvalerate I	102.4	4.1	119.7	10.7	118.4	11.1	108.0	3.2	108.2	6.7	106.1	2.2
fenvalerate II	115.4	5.6	119.8	17.1	118.6	10.7	107.6	4.3	107.6	6.2	106.6	2.6
fipronil	107.0	4.9	120.0	10.2	108.3	3.0	108.5	3.0	113.6	5.5	106.3	2.5
folpet	103.4	6.5	119.1	6.8	113.9	4.1	101.3	4.4	109.3	6.7	105.1	1.4
fosthiazate I	109.0	7.6	106.3	14.0	118.9	3.3	98.8	2.1	108.1	6.7	102.4	1.5
fosthiazate II	117.6	15.8	118.3	19.0	116.8	3.8	104.5	2.5	112.7	5.7	106.3	2.5
heptachlor	106.6	4.4	116.2	11.9	101.2	1.6	105.9	3.1	111.2	5.6	101.4	1.0
heptachlor epoxide (cis)	105.0	3.4	117.7	7.2	98.4	1.9	106.2	3.5	109.9	5.3	98.7	1.0
heptachlor epoxide (trans)	99.2	3.7	119.8	9.9	100.4	1.9	104.3	3.6	110.0	6.2	99.2	1.0
heptenophos	111.3	4.3	118.3	8.7	104.6	1.6	103.6	3.0	110.3	5.9	102.0	0.8
hexachlorobenzene	103.5	6.1	119.4	3.6	96.4	1.8	105.1	4.2	110.9	6.1	100.7	0.6
hexazinone	107.9	4.4	120.9	5.4	105.4	2.4	104.5	1.2	108.2	6.5	103.0	1.0
isofenphos	102.5	3.1	119.4	10.2	100.3	2.5	105.1	2.3	109.7	5.8	99.3	0.9
isoprocab	105.5	3.9	124.1	8.3	100.9	1.1	107.3	4.0	109.4	5.8	106.8	0.7
isoxathion	104.4	4.6	116.7	4.4	119.7	9.5	109.4	3.2	119.3	5.4	123.1	8.1
malathion	107.0	3.6	119.6	11.4	105.3	2.4	107.2	2.5	110.2	5.7	101.4	1.0
metacrifos	105.8	7.3	119.7	5.1	96.6	2.1	106.2	4.6	109.7	5.6	101.5	0.7
metalaxyl	103.9	4.9	117.0	3.2	103.3	2.8	102.6	1.9	108.0	6.3	99.4	0.6
methamidophos	98.6	3.9	118.6	14.5	105.9	1.9	105.5	5.8	108.7	5.9	102.0	1.2
methidathion	110.9	2.9	118.8	10.7	108.5	3.1	106.5	1.5	110.9	5.4	101.9	0.9
methoxychlor	107.7	2.9	118.3	14.8	106.0	5.3	104.9	2.7	108.2	6.7	99.1	0.7
metolachlor	105.4	3.1	119.6	3.9	101.9	2.3	104.3	2.8	109.7	5.9	98.9	0.7
metribuzin	110.8	2.7	117.9	15.2	103.4	1.6	110.5	2.0	120.0	6.3	107.8	2.8
mevinphos	111.1	7.6	115.1	11.2	102.2	1.9	106.4	4.4	109.0	5.9	101.7	0.8
monocrotophos	108.7	10.0	119.6	3.8	114.6	5.0	104.2	2.9	109.6	6.0	106.9	1.7
naled	116.7	16.4	126.1	17.6	94.1	8.9	112.6	6.0	107.5	7.9	92.6	5.0
omethoate	112.2	9.4	104.0	17.8	119.6	3.3	104.6	6.5	109.4	6.4	112.1	1.4
parathion	109.8	4.4	119.9	11.0	107.0	2.3	110.5	2.1	113.2	5.4	110.4	3.4
parathion-methyl	113.3	2.5	118.9	12.7	110.4	2.3	110.2	3.0	117.7	5.3	113.5	5.2

ตารางที่ 2 ความแม่นยำ (average %recovery) และความเที่ยง (%RSD) ของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งที่ความเข้มข้นต่างๆ (ต่อ)

Pesticides	ข้าว						ถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง					
	0.05 mg/kg		0.2 mg/kg		1.25 mg/kg		0.05 mg/kg		0.2 mg/kg		1.25 mg/kg	
	(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)	
	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
permethrin I	117.4	14.2	117.6	13.5	114.4	8.0	98.6	4.5	109.2	7.8	100.0	3.4
permethrin II	119.8	6.3	119.0	14.8	110.3	8.3	106.6	2.6	109.3	6.6	98.8	1.5
phenthoate	105.1	2.4	118.7	5.2	103.6	2.2	104.4	2.3	112.7	5.4	103.6	1.2
phorate	104.5	3.5	119.7	5.3	99.7	1.1	107.1	2.2	112.6	5.6	102.2	0.8
phosalone	115.3	3.8	116.9	16.8	117.1	9.0	105.5	1.7	110.2	6.3	102.5	1.1
phosmet	118.2	5.5	118.8	9.5	118.7	5.8	104.4	1.4	108.0	6.4	102.5	1.4
phosphamidon	115.6	5.8	117.4	14.4	118.4	3.9	104.3	3.6	111.9	5.4	103.0	1.3
picoxystrobin	114.1	5.7	127.0	14.5	101.7	3.0	95.8	4.5	108.2	7.8	101.4	1.2
pirimiphos-ethyl	104.8	2.7	116.2	14.8	100.7	2.2	108.4	2.5	110.4	5.4	101.1	1.0
pirimiphos-methyl	98.8	4.5	119.6	6.8	102.0	2.0	107.2	2.3	110.9	5.5	100.9	1.0
profenofos	112.2	8.6	119.9	7.5	107.2	6.6	102.2	5.9	105.8	7.3	98.0	6.1
propachlor	107.1	3.3	117.5	10.5	101.5	1.4	104.4	2.9	111.2	6.1	100.8	0.6
propargite	111.1	3.7	117.5	9.8	103.6	5.0	102.4	1.7	107.2	6.3	91.3	4.1
propetamphos	105.3	4.0	119.5	3.6	101.1	0.9	105.4	2.3	114.1	5.5	112.5	1.8
prothiofos	106.7	3.5	119.1	8.7	101.4	2.8	102.9	2.8	109.1	5.9	99.9	0.7
pyrimethanil	106.1	3.7	119.7	5.6	98.8	1.5	108.7	3.2	110.5	5.9	102.5	0.7
quinalphos	107.3	2.4	118.2	7.0	102.9	2.7	105.8	2.2	109.9	5.6	101.8	0.8
quintozen	109.6	7.5	117.4	6.7	99.2	1.5	107.9	5.0	111.6	4.8	104.8	2.0
simazine	106.3	4.0	122.8	4.1	100.0	1.6	104.2	3.8	111.2	5.8	102.2	0.7
tebufenpyrad	107.2	5.1	119.6	11.3	108.5	5.7	103.3	3.5	109.8	6.0	99.5	0.6
tecnazene (TCNB)	108.2	5.9	119.8	2.1	97.9	1.8	106.0	4.0	111.9	5.6	103.7	1.0
terbacil	111.2	4.1	120.0	8.1	108.0	2.4	104.7	3.0	110.0	6.6	101.8	1.0
terbufos	104.0	5.9	117.5	10.5	98.7	1.5	106.2	3.5	111.8	5.8	101.9	0.7
tetrachlorvinphos	113.9	2.5	112.9	9.9	115.4	4.1	103.4	1.9	110.4	5.6	100.9	1.3
tetradifon	111.3	5.7	104.1	17.8	107.5	6.4	106.2	2.6	109.7	6.6	98.1	1.8
thiometon	100.4	12.0	115.8	8.5	101.3	1.3	110.9	3.5	107.6	6.5	100.7	0.8
tolclofos-methyl	105.0	4.6	118.2	5.5	99.5	1.4	106.6	3.3	111.0	5.7	101.1	1.0
tolyfluanid	108.1	2.9	117.5	10.8	103.7	2.0	106.0	2.3	112.0	5.1	101.0	1.1
triadimefon	106.5	3.0	118.9	7.8	103.4	2.9	104.5	2.2	110.2	5.7	101.0	0.9
triazophos	113.0	6.2	122.9	14.1	110.4	5.1	103.7	1.4	109.9	6.2	102.1	1.2
trifluralin	106.6	6.1	114.4	14.2	100.0	1.9	107.5	4.3	115.3	5.3	105.9	2.0

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ พบว่าสารทั้งหมดมีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ระหว่าง 0.05–2.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยคุณลักษณะทั้งหมดที่ทำการทดสอบความใช้ได้นี้แสดงว่าสามารถใช้วิธีนี้วิเคราะห์สารสนใจดังกล่าวได้ และเมื่อพิจารณาข้อกำหนดทางกฎหมายของประเทศไทยที่กำหนดค่า Maximum Residue Limit (MRL) ของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชไว้ที่ 0.01–10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิธีนี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์แบบคัดกรอง (screening) สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มธัญพืชและกลุ่มถั่วเมล็ดแห้งได้ตรงตามวัตถุประสงค์

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดตามแนวของ ISO GUM Approach หรือ Bottom-up Approach ผลจากการประมาณค่าความไม่แน่นอนพบว่าแหล่งความไม่แน่นอนที่สำคัญที่สุด คือ calibration curve (38%) sample weight (26%) และ method precision (23%) ส่วน bias หรือ recovery และ standard concentration (6 และ 4%) และองค์ประกอบอื่น ๆ นั้นถือเป็นองค์ประกอบที่น้อยมาก ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ chlorpyrifos ในข้าว

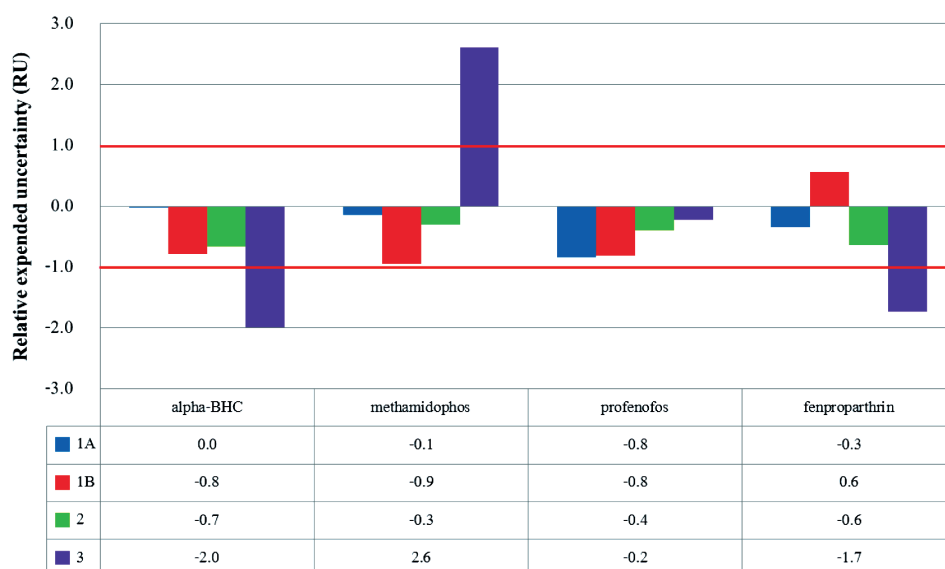
ผลการถ่ายทอดองค์ความรู้เพื่อพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการเครือข่าย

ห้องปฏิบัติการเครือข่ายได้รับการฝึกอบรมวิธีวิเคราะห์ของแห่งจากสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ในปี พ.ศ. 2563 จำนวน 7 แห่ง แบ่งเป็นห้องปฏิบัติการที่ใช้เครื่องมือชั้นสูง 4 แห่ง ทั้งหมดเปิดให้บริการตรวจวิเคราะห์แล้ว และห้องปฏิบัติการที่ใช้เครื่องมือพื้นฐานอีก 3 แห่ง เปิดให้บริการแล้ว 1 แห่ง เพื่อเป็นการทดสอบความสามารถและประเมินประสิทธิภาพการฝึกอบรมจึงจัดทำโครงการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าว โดยใช้ค่าอ้างอิง (Reference value) และ Expanded uncertainty $U (k = 2)$ ของสารที่ศึกษา 4 ชนิด คือ alpha-BHC, methamidophos, profenofos และ fenpropathrin ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยมีห้องปฏิบัติการเข้าร่วม 3 แห่ง รายงาน 4 ค่า (1A, 1B, 2 และ 3) จากการประเมินผลสมาชิกโดยใช้ Relative expanded uncertainty (RU) ดังแสดงในภาพที่ 5 โดยกำหนดเกณฑ์ยอมรับเป็น $RU \leq \pm 1$ สมาชิกรายงานผลปริมาณสาร profenofos ได้ในระดับที่น่าพอใจทั้ง 3 แห่ง (ร้อยละ 100) ส่วนสาร alpha-BHC, methamidophos และ fenpropathrin มีค่า RU ในระดับที่น่าพอใจ 2 แห่ง (ร้อยละ 66.7) ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการเดียวกัน และมีห้องปฏิบัติการ 1 แห่ง ที่มีค่า RU ในระดับไม่น่าพอใจทั้ง 3 สาร ซึ่งสรุปได้ว่ามีห้องปฏิบัติการที่สามารถวิเคราะห์

สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวได้ในระดับที่น่าพอใจทั้ง 4 สาร มีจำนวน 2 แห่ง และอีก 1 แห่ง สามารถวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวได้ในระดับที่น่าพอใจ 1 สาร ทั้งนี้ห้องปฏิบัติการสามารถทบทวนผลการวิเคราะห์เพื่อดำเนินการพัฒนาปรับปรุงงานในระบบคุณภาพการวิเคราะห์ให้ดียิ่งขึ้น

ตารางที่ 3 ค่าอ้างอิง (Reference value) และ Expanded uncertainty U (k = 2) ของสารที่ศึกษา

Pesticides	Reference value (µg/kg)	Expanded uncertainty
alpha-BHC	18.2	8.0
methamidophos	42.0	18.5
profenofos	45.4	20.0
fenpropathrin	59.8	26.4



ภาพที่ 5 RU ของการวิเคราะห์สาร alpha-BHC, methamidophos, profenofos และ fenpropathrin ในตัวอย่างข้าวบาสมาดิ เกณฑ์ยอมรับ RU ≤ ±1

วิจารณ์

การทดสอบประสิทธิภาพของวิธี QuEChERS และ FaPEX[®] พบว่าวิธีมาตรฐาน QuEChERS ให้ค่า %recovery และ %RSD อยู่ในเกณฑ์ยอมรับมากกว่าวิธี FaPEX[®] แม้วิธีนี้จะใช้เวลาและสารเคมีน้อยกว่า แต่เกณฑ์การคัดเลือกต้องมาจากความถูกต้องของวิธีเป็นอันดับแรก และการใช้ตัวอย่างปริมาณน้อยจะส่งผลถึงความแม่นยำและความเที่ยงของวิธี รวมทั้งเป็น cartridge ที่บรรจุ SPE สำเร็จรูปที่มีผลต่อความแม่นยำของวิธียังเป็นลิขสิทธิ์เฉพาะของบริษัทผู้ผลิต ทั้งนี้วิธี FaPEX[®] มีศักยภาพที่สามารถพัฒนาให้เป็นวิธีมาตรฐานได้เมื่อมีการพัฒนา SPE ให้เหมาะสมในอนาคตต่อไป

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC-MS/MS ในขั้นตอน instrument method development เป็นสิ่งสำคัญและมีความจำเป็นต่อการวิเคราะห์แบบ multi-residue method อย่างมาก โดยเฉพาะการหาสถานะและ MRM transitions ที่เหมาะสม โดยต้องคำนึงถึงเมทริกซ์ที่อยู่ในสารสกัด การเลือก transitions ที่ไม่เหมาะสม

จะทำให้ผลการวิเคราะห์ผิดพลาดจากสารรบกวน และการวิเคราะห์สารจำนวนมากพร้อมกันยังถือเป็นความท้าทายเชิงเทคนิคต่อผู้วิเคราะห์

วิธีเตรียมตัวอย่าง QuEChERS ได้รับการพัฒนาขึ้นเป็นครั้งแรกให้ใช้ได้กับตัวอย่างที่มีความชื้นสูงมากกว่า 70% ประเภทผักและผลไม้สด ในขณะที่การวิเคราะห์อาหารกลุ่มธัญพืชและถั่วเมล็ดแห้งซึ่งเป็นตัวอย่างในกลุ่มของแห้ง ความชื้นต่ำ มีแป้ง โปรตีน และกรดไขมันอยู่ปริมาณมาก ซึ่งจะแสดงเป็นสารรบกวนในระบบ chromatography ทำให้การวิเคราะห์ในระดับต่ำเป็นไปได้ยาก เพื่อกำจัดสารเหล่านี้มีความพยายามใช้เทคนิคต่าง ๆ เช่น dispersive SPE ที่มีส่วนผสมของ PSA และ C18 เพื่อกำจัดกรดอินทรีย์ กรดไขมันและน้ำตาลบางชนิดได้ หรือการ centrifuge ที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อกำจัด co-extracts การเลือกใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะสูงจะสามารถทำให้ลดสารรบกวนได้ดีโดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์ได้เช่นกัน การสกัดโดยใช้ acetonitrile เป็นตัวทำละลายสามารถละลายสารที่มีคุณสมบัติหลากหลายได้ทั้งมีขั้วและไม่มีขั้ว หากฉีดเข้าเครื่องมือวิเคราะห์โดยตรง สารชนิดนี้จะทำลาย stationary phase ทำให้อายุการใช้งานของ analytical column สั้นลง เพื่อเป็นการยืดอายุให้สามารถวิเคราะห์สารได้นานขึ้นและเป็นการประหยัดทรัพยากรจึงทำการเปลี่ยนตัวทำละลายโดยการระเหยแห้งโดยใช้แก๊สไนโตรเจนแล้วปรับปริมาตรโดยใช้สารผสมของ ethyl acetate และ n-hexane อัตราส่วน 1 ต่อ 3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS สารหลายชนิดอาจทำปฏิกิริยากับ active site ในเครื่องมือ จึงต้องมีการเติม analytical protectant (D-sorbitol) ลดการ adsorption และการ degradation ของสารสนใจก่อนฉีดเข้าเครื่องมือ วิธีการนี้จะช่วยให้ repeatability ดีขึ้น⁽¹⁹⁾

การเลือกใช้ inlet ชนิด PTV (programmable temperature vaporizer) โดยการค่อย ๆ ปรับอุณหภูมิให้สูงขึ้นเป็นการช่วยให้สารที่มี volatility ที่แตกต่างกันเข้าสู่ column ไม่พร้อมกัน เพิ่มประสิทธิภาพการแยกสารได้ดี ในกรณีที่เครื่องมือไม่มี inlet ชนิดนี้สามารถใช้ MMI (multimode inlet) ที่ใช้ได้ทั้งแบบ split/splitless และปรับอุณหภูมิขึ้นลงได้ เครื่องตรวจวัดสารชนิด triple quadrupole mass spectrometer ใน mode MRM, multiple reaction monitoring ถูกใช้เพื่อเพิ่ม sensitivity และ selectivity สามารถตรวจวัดสารที่ระดับต่ำมากได้และเป็นเครื่องมือที่มีความทน (robustness) โดยทั่วไปจะใช้ในงานวิเคราะห์ drug metabolism, pharmacokinetics, environmental contaminants, biological analyses และงานสารตกค้างในอาหาร ต้องมีการตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมก่อนการใช้เครื่องมือทุกครั้ง พารามิเตอร์ที่มักมีการตรวจสอบ ได้แก่ ความคงที่ของ retention time, peak area (response) หรือในบางกรณีสามารถตรวจสอบค่า ion intensity ratio ได้เช่นกัน

ดำเนินการควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์ทั้งภายในและภายนอก โดยการวิเคราะห์ method blank, spiked sample และ duplicate sample ทุกชุดของการสกัดหรืออย่างน้อยประมาณ 5% ของตัวอย่างทดสอบ ในกรณีที่ตัวอย่างจำนวนมาก และหากพบสารที่สงสัยว่าเป็นสารตกค้างสนใจจะต้องทำการตรวจยืนยันด้วยทุกครั้ง การยืนยันชนิดของสารที่ตรวจพบต้องยืนยันผลด้วย ion intensities ratio โดยค่า ion intensities ratio ของสารที่วิเคราะห์แต่ละตัวในตัวอย่าง และ ion intensities ratio เฉลี่ยของสารมาตรฐานนั้น ต้องแตกต่างกันไม่เกิน 30% และยืนยันปริมาณที่ตรวจพบโดยทำการทดสอบตัวอย่างใหม่ (retest) แบบ duplicate test แล้วรายงาน โดยใช้ค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำดังกล่าว และเกณฑ์ยอมรับของ %RPD ต้องไม่เกิน 25% สำหรับการควบคุมคุณภาพภายนอก ได้เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญกับ FAPAS ผล z-score ≤ 2 เป็นการยืนยันว่ากระบวนการวิเคราะห์ทั้งหมดมีความถูกต้องเหมาะสมและสอดคล้องกับเอกสารอ้างอิงเฉพาะด้านและสอดคล้องกับมาตรฐานห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ ISO/IEC 17025:2017

ผลการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าว โดยใช้ตัวอย่างข้าวบาสมати (Basmati Rice) มีจำนวนสมาชิก ห้องปฏิบัติการเข้าร่วม 3 แห่ง ห้องปฏิบัติการทุกแห่งส่งผลมาเพื่อรับการประเมิน และมีห้องปฏิบัติการ 1 แห่ง รายงานผลการวิเคราะห์ 2 ค่า เนื่องจากใช้วิธีวิเคราะห์ที่ต่างกัน จึงมีผลวิเคราะห์ที่นำมาประเมินจำนวน 4 ค่าของสารแต่ละชนิด เมื่อนำค่าที่สมาชิกรายงานมาเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงและใช้ Expanded

uncertainty (U) คำนวณเป็นค่า RU พบว่าการประเมินความสามารถการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวของสมาชิก ห้องปฏิบัติการ ทั้ง 3 แห่งนั้น อยู่ในเกณฑ์น่าพอใจสำหรับการวิเคราะห์สาร profenofos มีห้องปฏิบัติการ 2 แห่ง รายงานผลการวิเคราะห์สาร alpha-BHC, methamidophos, และ fenpropathrin อยู่ในเกณฑ์น่าพอใจ แต่มีห้องปฏิบัติการ 1 แห่ง รายงานผลอยู่ในเกณฑ์ไม่น่าพอใจ โดยห้องปฏิบัติการแห่งนี้รายงานปริมาณไปในทิศทางที่มากกว่าค่าอ้างอิงกรณีวิเคราะห์สาร methamidophos ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงในกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส และรายงานไปในทางน้อยกว่าค่าอ้างอิง กรณีวิเคราะห์สาร alpha-BHC และ fenpropathrin ที่อยู่ในกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและกลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ ตามลำดับ ซึ่งมีความเป็นพิษต่ำ จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าห้องปฏิบัติการมีความเปี่ยงเบนเชิงระบบ ซึ่งอาจเกิดจากเทคนิคการวิเคราะห์ในขั้นตอนการสกัด หรือการเตรียมสารมาตรฐาน ทั้งนี้ห้องปฏิบัติการดังกล่าวควรติดตามหาสาเหตุที่แท้จริงเพื่อการป้องกัน และพัฒนาคุณภาพการวิเคราะห์ที่เป็นงานประจำของห้องปฏิบัติการต่อไป

สรุป

วิธีวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธี multi-residue method โดยใช้วิธีที่อ้างอิงจาก EN 15662 หรือ QuEChERS ใช้ GC-MS/MS เป็นเครื่องมือตรวจวัด เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ประหยัด และมีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธี FaPEX[®] ผ่านการทดสอบความใช้ได้เป็นวิธีที่มีคุณลักษณะและสมรรถนะที่เหมาะสม มีความถูกต้อง แม่นยำ มีความไวและความจำเพาะ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับตาม SANTE/12682/2019⁽²⁰⁾ เมื่อใช้วิธีพร้อมกับการควบคุมคุณภาพภายในและภายนอก สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้สำหรับตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัยให้เป็นไปตามข้อกำหนดทางกฎหมายที่ระบุในพระราชบัญญัติอาหาร ปี พ.ศ.2522 และตรวจสอบคุณภาพให้เป็นไปตามมาตรฐานระหว่างประเทศเพื่อการส่งออกสินค้าทางการเกษตรได้อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 10 อุบลราชธานี และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา สำหรับการเข้าร่วมการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ บริษัท S.M. Chemical Supplies Co., Ltd. สำหรับการสนับสนุน FaPEX[®] cartridge นางวิชาดา จงมีวาสนา นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ สำหรับคำแนะนำข้อเสนอแนะทางวิชาการ

เอกสารอ้างอิง

1. Food and Agriculture Organization (FAO). Save and grow in practice: maize, rice and wheat – a guide to sustainable cereal production. [online]. 2016; [cited 2020 Nov 6]; [124 screens]. Available from: URL: <http://www.fao.org/3/a-i4009e.pdf>.
2. Kukusamude C, Kongsri S. Elemental and isotopic profiling of Thai jasmine rice (Khao Dawk Mali 105) for discrimination of geographical origins in Thung Kula Rong Hai area, Thailand. Food Control 2018; 91: 357-64.

3. United States Department of Agriculture (USDA). Thailand grain and feed annual. GAIN report number: TH9031. [online]. 2019; [cited 2020 Nov 6]; [17 screens]. Available from: URL: https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Grain%20and%20Feed%20Annual_Bangkok_Thailand_3-14-2019.pdf.
4. Hensawang S, Chanpiwat P. Health impact assessment of arsenic and cadmium intake via rice consumption in Bangkok, Thailand. *Environ Monit Assess* 2017; 189(11): 599. (10 pages).
5. FAOSTAT. Online statistical database: production - value of agricultural production. [online]. 2019; [cited 2020 Nov 6]; [1 screen]. Available from: URL: <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>.
6. สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. ปริมาณการส่งออกข้าวของไทย รายประเทศ ระหว่างปี 2561-2563. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 6 พ.ย. 2563]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://www.thairiceexporters.or.th/export%20by%20country%202020.html>.
7. Yang A, Park JH, Abd El-Aty AM, Choi JH, Oh JH, Do JA, et al. Synergistic effect of washing and cooking on the removal of multi-classes of pesticides from various food samples. *Food Control* 2012; 28(1): 99-105.
8. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 387 (พ.ศ. 2560) เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 134 ตอนพิเศษ 228 ง (วันที่ 18 กันยายน 2560). หน้า 8.
9. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int* 2003; 86(2): 412-31.
10. AOAC Official method 2007.01 pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with Magnesium Sulfate. [online]. 2007; [cited 2020 Nov 6]; [9 screens]. Available from: URL: https://nucleus.iaea.org/sites/fcris/Shared%20Documents/SOP/AOAC_2007_01.pdf.
11. BS EN 15662:2008. Foods of plant origin - determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/ partitioning and cleanup by dispersive SPE QuEChERS-method. [online]. 2008; [cited 2020 Nov 6]; [84 screens]. Available from: URL: http://www.chromnet.net/Taiwan/QuEChERS_Dispersive_SPE/QuEChERS_%E6%AD%90%E7%9B%9F%E6%96%B9%E6%B3%95_EN156622008_E.pdf.
12. Wittayan W, Chaimongkol T, Jongmevasna W. Multiresidue method for determination of 20 organochlorine pesticide residues in fruits and vegetables using modified QuEChERS and GC-ECD/GC-MSD. *Int Food Res J* 2017; 24(6): 2340-6.
13. วีรฤติ วิทยานันท์, ธณิศวรร ไชยมงคล. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสและกลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ตกค้างพร้อมกันในอาหารบางชนิดโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี. *ว กรมวิทย พ* 2561; 60(1): 29-44.

14. Fenik J, Tankiewicz M, Biziuk M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *Trends Analyt Chem* 2011; 30(6): 814-26.
15. Díez C, Traag WA, Zommer P, Marinero P, Atienza J. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. *J Chromatogr A* 2006; 1131(1-2): 11-23.
16. Lehotay SJ, de Kok A, Hiemstra M, Van Bodegraven P. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *J AOAC Int* 2005; 88(2): 595-614.
17. Chuang WC, Chen JW, Huang CH, Shyu TH, Lin SK. FaPEX[®] multipesticide residues extraction kit for minimizing sample preparation time in agricultural produce. *J AOAC Int* 2019; 102(6): 1864-76.
18. Sutarno R, Steger HF. The use of certified reference materials in the verification of analytical data and methods. *Talanta* 1985; 32(6): 439-45.
19. Anastassiades M, Mastovská K, Lehotay SJ. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. *J Chromatogr A* 2003; 1015(1-2): 163-84.
20. SANTE/12682/2019 – analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. [online]. 2020; [cited 2020 Nov 6]; [52 screens]. Available from: URL: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf

Method Development for Pesticide Residue Analysis in Cereal Grains and Pulses using GC-MS/MS

Thoranit Chaimongkol and Weerawut Wittayanon

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

ABSTRACT Cereal grains and pulses are the most common consumed foods worldwide and the use of pesticides in agricultural production for plant protection has been the cause for increasing concern. The safety of these products must be checked for toxic pesticide residue contamination by reliable and trustable analytical method. The efficiency of QuEChERS and FaPEX® method for sample preparation procedure was compared. A modified QuEChERS method was selected and was improved for simultaneous determination of 122 pesticide residues in rice and dried soybeans and the method was established and validated. The samples were initially extracted with acetonitrile (MeCN) and combined with salting out step by the mixture of MgSO_4 and CH_3COONa . The final extract was concentrated and reconstituted with appropriate solvent. The target pesticides were detected by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) with MRM technique to minimize interference. The limit of detection and the limit of quantification of the validated method were 0.02 and 0.05 mg/kg for the pesticides respectively. Analysis of fortified rice and dried soybean samples were performed at three different levels (0.05, 0.2 and 1.25 mg/kg). Mean recoveries from eight replicates ranged from 74.3–119.8%, with relative standard deviation, RSD lower than 20. The evaluation showed that the QuEChERS method held excellent linearity at 0.05–2.5 mg/kg ($r > 0.995$). The participation in PT scheme for external quality control showed the satisfactory results and internal quality control was applied for routine analysis. Based on our results, the developed method was successfully applied for the detection and quantification of pesticide residues in rice and cereal grains for health concern and regulatory propose.

Keywords: Pesticide residues, Cereal grains, Pulses, GC-MS/MS, QuEChERS

Historical Control Data from Repeated Dose 90-days Oral Toxicity Studies of Wistar Rats (Mlac:WR)

Passaraporn Srimangkornkaew Kittigan Suwannasaroj Pakamon Yottharat
and Aunchalee Sirimontaporn

National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand

ABSTRACT The control group data of any parameters such as age, sex, food/water consumptions, hematological, clinical biochemistry parameters and organs weights were useful for toxicity studies. The aim of this study was to collect data from 13-week of Wistar rats (Mlac:WR) which the strain widely used for toxicity study and efficacy research. The data of this research consist of hematological parameters and clinical biochemistry parameters including organ weights in 239 rats (119 males and 120 females) were collected base on 8 repeated dose 90-days oral toxicity studies and the result were shown as maximum and minimum values, means and standard deviations. Thus, these historical control group data would help to support for interpret the effects of test items in toxicity studies that used Wistar rats for further study.

Keywords: Wistar rat, Historical control data, Toxicity studies

Corresponding author E-mail: kittigan.suw@mahidol.edu

Received: 14 Feburaury 2020

Revised: 30 May 2021

Accepted: 11 July 2021

Introduction

Wistar stain rat which the scientific name was *Rattus norvegicus* and this strain derived from Denmark. The weight of mature had in range 250 – 300 and 180– 220 grams for male and female animals, respectively. For the husbandry, various environment factors, such as ventilation, temperature and humidity were controlled under the HVAC system. The temperature and humidity were controlled at $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ and 30– 70% RH. Lighting cycle was 12 hours lighting and 12 hours dark including the noise control to not more than 85 dB. Drinking water was reversed osmosis (RO) water with chlorine concentration of 5 – 7 ppm which sterile for *Pseudomonas aeruginosa*. Bedding made from corn cob and mixed with water hyacinth that sterilized at 135°C for 7 minutes before being used. The Wistar rat was used to study and research in different fields such as Nutrition, Pathology, Pharmacology, Toxicology, Physiology, etc.⁽¹⁾ This strain produced, husbandry by National Laboratory Animal Center (NLAC), Mahidol University and used in various toxicity and efficacy studies in many products such as food additives, pharmaceuticals and industrial chemicals which carried out according to international guidelines, such as OECD guideline or ISO 10993. For the background or historical data are used to determine various parameters ranges and these data were invaluable and essential because it was the first step for appropriate interpretation of treatment related changes and help better evaluate the toxicity of various substances.⁽²⁾ Historical control data on toxicity studies in rodent,⁽³⁾ rat^(4, 5) and rabbit⁽⁶⁾ or some strain of rat such as CrI: CD (SD)⁽²⁾ or RccHan™: WIST and CrI: WI(Han)⁽⁷⁾ have been previously reported. However, the background data of experimental parameters for Wistar rat (Mlac: WR) from National Laboratory Animal Center, Mahidol University in toxicity studies have not been published yet. The results in many studies that use this strain have been interpreted on the basis of background data from previous toxicity study instead of the histological control data. Therefore, the purpose of this study is to publish histological control data in Wistar rat (Mlac: WR) by collecting data from 13- week of Wistar rats (Mlac: WR) on 8 repeated dose 90- days oral toxicity studies. The results had 3 parts (hematological, clinical biochemistry parameters and organ weights) which were analyzed and shown as maximum and minimum values, means and standard deviations.

Materials and Methods

Preparation of Animals:

Healthy 13 weeks, 119 male and 120 female, Wistar rats (Mlac: WR) of body weight range $200\text{ g} \pm 20\%$ were obtained from Office of Laboratory Animal Production, National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand. The animal had been quarantined and acclimatized for at least 6 days prior to the study. They were observed from their general health. The animals had been housed in stainless steel cages (two rats/cage) with commercial feed diet (No. CP 082, Perfect Companion Group Co., Ltd) and 5– 7 ppm chlorinated water ad libitum under the following conditions: 12 hours light dark cycle, at temperature $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ and 30– 70% relative humidity.

In during the dosing period, the animal had received distilled water by gavage once daily. Guidelines of “Guide for the care and use of laboratory animals” were strictly followed throughout the study.⁽⁸⁾ The study was approved by National Laboratory Animal Center Animal Care and Use Committee (NLAC- ACUC), Mahidol University; Thailand, approved all experimental protocols conducted between 2018 and 2020.

Hematological and Clinical biochemistry Analysis:

On the last day, all animals were kept for overnight (15–18 hours) fasting (feed but not water) prior to blood sample collection. The animals were euthanized using CO₂ inhalation.⁽⁹⁾ Blood samples were collected via cardiac puncture and separated into 2 tubes, one tube contained EDTA for hematological and the other tube for serum clinical biochemistry analysis. The hematological analysis used approximately 200 µl of blood and were analyzed by using an automated hematology analyzer (Procyte DxTM, IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA) which parameters, unit and measurement method were summarized in Table 1. For the clinical biochemistry analysis, that used approximately 800 µl of blood per sample. After that, blood will be coagulated by remaining at room temperature for 60 – 120 minutes and then centrifuged 2 times at 6,000 rpm for 10 minutes to collect serum samples. The clinical biochemistry analysis were measured by an automated blood analyzer (Cobas®c311, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The parameters, unit and measurement method were shown in Table 2.

Table 1 The parameter, unit and measurement method for hematological analysis

Parameter	Abbreviation	Unit	Measurement Method
Red blood cell count	RBC	M/µl	Laser Flow Cytometry
Hemoglobin	HGB	g/dL	SLS-Hemoglobin Method
Hematocrit	HCT	%	Laser Flow Cytometry
Mean corpuscular volume	MCV	fL	$MCV = \frac{(\text{Hct}(\%) \times 10)}{(\text{RBC Count} \times (\frac{10}{L})^{12})}$
Mean corpuscular hemoglobin	MCH	pg	$MCH = \frac{(\text{HGB} (\frac{g}{dL}) \times 10)}{(\text{RBC Count} \times (\frac{10}{L})^{12})}$
Mean corpuscular hemoglobin concentration	MCHC	g/dL	$MCHC = \frac{(\text{HGB} (\frac{g}{dL}) \times 1,000)}{MCV(fL) \times \text{RBC} \times (\frac{10}{L})^{12}}$
Red blood cell distribution width	RDW	fL	Laser Flow Cytometry
Reticulocyte count	RET	%	Laser Flow Cytometry
Reticulocyte hemoglobin	RET-He	pg	Optical Fluorescence
Platelet	PLT	K/µl	Laser Flow Cytometry
Platelet distribution width	PDW	fL	Laser Flow Cytometry

Table 1 The parameter, unit and measurement method for hematological analysis (Continued)

Parameter	Abbreviation	Unit	Measurement Method
Mean platelet volume	MPV	fL	Laminar Flow Impedance
Plateletcrit	PCT	%	Laminar Flow Impedance
White blood cell count	WBC	K/ μ l	Laser Flow Cytometry
Neutrophil	NEUT	%	Laser Flow Cytometry
Lymphocyte	LYMPH	%	Laser Flow Cytometry
Monocyte	MONO	%	Laser Flow Cytometry
Eosinophil	EO	%	Laser Flow Cytometry
Basophil	BASO	%	Laser Flow Cytometry

Table 2 The parameter, unit and measurement method for clinical biochemistry analysis

Parameter	Abbreviation	Unit	Method
Sodium	Na	mmol/L	ISE Indirect
Potassium	K	mmol/L	ISE Indirect
Chloride	Cl	mmol/L	ISE Indirect
Glucose	SGLU3	mg/dL	Enzymatic Hexokinase
Cholesterol	CHO2I	mg/dL	Enzymatic Colorimetric
Triglyceride	TRIGL	mg/dL	Enzymatic Colorimetric
Uric acid	UA2	mg/dL	Enzymatic Colorimetric
Blood urea nitrogen	U-BUN	mg/dL	Enzymatic Colorimetric
Creatinine	CREA2	mg/dL	Enzymatic Colorimetric
Total protein	TP2	g/dL	Colorimetric Assay
Albumin	ALB2	g/dL	Colorimetric Assay (Bromocresol Green – BCG)
Globulin	GLO	mg/dL	Calculate from Total Protein Albumin
High-density lipoprotein	HDLC4	mg/dL	Enzymatic Colorimetric
Low-density lipoprotein	LDLC3	mg/dL	Enzymatic Colorimetric
Alanine amino transferase	ALTL	U/L	IFCC without Pyridoxal Phosphate
Aspartate amino transferase	ASTL	U/L	IFCC without Pyridoxal Phosphate
Alkaline phosphatase	ALP2S	U/L	Colorimetric Assay/IFCC

Organ Weighting:

After blood samples collection, all animals were sacrificed. The positions, shapes, sizes and colours of internal organs were evaluated. The following organ: Liver, Kidneys, Heart, Adrenal glands, Brain, Testes, Epididymides, Ovaries and oviduct, Uterus, Spleen and Thymus were trimmed to visually detect gross lesions and weighed (For all of the paired organs were separately weighed) by using an electronic balance 4 digits (Mettler – Toledo, Columbus, Ohio, USA). Then, the weights of these organs were converted to relative organ weights by calculating in the relative weights per 100 g animal body weight.

Data collection and analyzed:

The data of Wistar rats (Mlac: WR) that same breeder, ages and animal sources of Wistar rats (Mlac: WR) on 8 repeated dose 90- days oral toxicity studies. This studies had been performed in the same of environment, equipment, and facility testing (National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand). All animal data were collected for hematological parameters, clinical biochemistry parameters, organ weights and then, statistical analysis was calculated by using Microsoft Excel (Version 2013, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) and performed in maximum, and minimum values, means and standard deviations.

Results

The clinical biochemistry analysis data for male and female animals were shown in Table 3 and 4, respectively. For both sexes animal, the standard deviations of Total protein, Albumin, Sodium and Chloride were less than 10% of mean values. The standard deviations of male animals were less than 20% of mean values for Blood urea nitrogen, Creatinine, Uric acid, Cholesterol, Alkaline phosphatase, Potassium, Globulin and the standard deviations were more than 30% of mean values for Glucose, Triglyceride, Low- density lipoprotein, Aspartate amino transferase, Alanine amino transferase, High- density lipoprotein. In female animals had the standard deviations of Blood urea nitrogen, Creatinine, Alkaline phosphatase, Potassium, High- density lipoprotein, Globulin less than 20% of mean values and the standard deviations of Glucose, Uric acid, Cholesterol, Triglyceride, Low- density lipoprotein, Aspartate amino transferase and Alanine amino transferase were more than 20% of mean values.

Table 3 The hematological analysis of male animals

Organ	N	Mean $\pm$ SD	MAX	MIN	-2S.D.	+2S.D.
RBC (M/ μ l)	119	9.90 $\pm$ 0.74	12.06	3.49	8.42	11.38
HGB (g/dl)	119	17.4 $\pm$ 0.73	20.5	16.0	16.0	18.9
HCT (%)	119	54.8 $\pm$ 2.78	67.0	48.3	49.2	60.4
MCV (fL)	119	55.1 $\pm$ 1.94	58.8	50.1	51.2	59.0
MCH (pg)	119	17.5 $\pm$ 0.43	18.5	16.1	16.6	18.4
MCHC (g/dl)	119	31.8 $\pm$ 0.94	34.5	29.8	29.9	33.7
RDW (fL)	119	32.0 $\pm$ 1.27	35.7	30.0	29.5	34.6
RET (%)	119	3.18 $\pm$ 0.53	4.48	0.61	2.12	4.25
RET-He (pg)	119	19.1 $\pm$ 0.47	20.1	17.9	18.2	20.0
PLT (K/ μ l)	119	888 $\pm$ 78.72	1215	699	731	1046
PDW (fL)	119	8.8 $\pm$ 0.51	10.2	7.5	7.8	9.8
MPV (fL)	119	7.3 $\pm$ 0.32	8.2	6.6	6.7	7.9

Table 3 The hematological analysis of male animals (Continued)

Organ	N	Mean $\pm$ SD	MAX	MIN	-2S.D.	+2S.D.
PCT (%)	119	0.65 $\pm$ 0.07	0.93	0.50	0.51	0.79
WBC (K/ μ l)	119	6.92 $\pm$ 1.09	9.89	4.18	4.73	9.11
NEUT (%)	119	12.1 $\pm$ 4.14	21.5	0.7	3.8	20.4
LYMPH (%)	119	81.4 $\pm$ 4.32	94.0	71.8	72.8	90.1
MONO (%)	119	5.4 $\pm$ 1.72	13.8	2.1	2.0	8.9
EO (%)	119	0.9 $\pm$ 0.30	1.9	0.3	0.3	1.5
BASO (%)	119	0.1 $\pm$ 0.11	0.5	0.0	0.0	0.3

Table 4 The hematological analysis of female animals

Organ	N	Mean $\pm$ SD	MAX	MIN	-2S.D.	+2S.D.
RBC (M/ μ l)	120	9.57 $\pm$ 0.60	11.26	8.35	8.36	10.78
HGB (g/dl)	120	17.8 $\pm$ 1.08	20.9	15.5	15.6	20.0
HCT (%)	120	55.9 $\pm$ 3.65	67.7	49.2	48.6	63.2
MCV (fL)	120	58.4 $\pm$ 1.53	62.4	53.9	55.4	61.5
MCH (pg)	120	18.6 $\pm$ 0.37	19.6	17.5	17.8	19.3
MCHC (g/dl)	120	31.8 $\pm$ 0.73	33.5	30.0	30.4	33.3
RDW (fL)	120	29.7 $\pm$ 1.09	32.9	27.4	18.2	22.9
RET (%)	120	3.43 $\pm$ 0.61	4.98	2.15	2.20	4.66
RET-He (pg)	120	20.1 $\pm$ 0.52	21.6	18.7	19.1	21.1
PLT (K/ μ l)	120	931 $\pm$ 86.24	1150	702	758	1103
PDW (fL)	120	8.5 $\pm$ 0.52	9.8	7.6	7.4	9.5
MPV (fL)	120	7.2 $\pm$ 0.31	7.8	6.5	6.5	7.8
PCT (%)	120	0.67 $\pm$ 0.07	0.90	0.52	0.53	0.81
WBC (K/ μ l)	120	4.87 $\pm$ 1.02	8.68	2.69	2.83	6.91
NEUT (%)	120	8.6 $\pm$ 3.11	19.2	0.8	2.4	14.8
LYMPH (%)	120	85.9 $\pm$ 3.41	93.7	74.2	79.1	92.8
MONO (%)	120	4.7 $\pm$ 1.15	8.8	2.5	2.4	7.0
EO (%)	120	0.6 $\pm$ 0.28	1.8	0.2	0.0	1.1
BASO (%)	120	0.2 $\pm$ 0.17	0.9	0.0	0.0	0.5

The hematological analysis data of both sexes animal showed the standard deviations of Red blood cell count, Hemoglobin, Hematocrit, Mean corpuscular volume, Mean corpuscular hemoglobin, Mean corpuscular hemoglobin concentration, Red blood cell distribution width, Reticulocyte hemoglobin, Platelet, Platelet distribution width, Mean platelet volume, Lymphocyte and Reticulocyte count, Platelet, White blood cell count were less than 10% and 20% of mean values, respectively but the standard deviations of other differential counts were more than 30% of mean values. The all data for the clinical chemistry analysis were summarized in Table 5 for male animals and Table 6 for female animals.

Table 5 The clinical biochemistry analysis of male animals

Organ	N	Mean $\pm$ SD	MAX	MIN	-2S.D.	+2S.D.
SGLU3 (mg/dL)	119	451.1 $\pm$ 94.54	731.3	255.8	262.0	640.2
U-BUN (mg/dL)	119	20.8 $\pm$ 3.22	31.3	14.4	14.4	27.2
CREA2 (mg/dL)	119	0.39 $\pm$ 0.06	0.61	0.29	0.27	0.50
UA2 (mg/dL)	119	8.4 $\pm$ 1.64	15.0	4.6	5.2	11.7
CHO2l (mg/dL)	119	81.7 $\pm$ 15.87	141.0	43.9	50.0	113.4
TRIGL (mg/dL)	119	133.3 $\pm$ 34.11	224.8	69.9	65.1	201.5
LDLC3 (mg/dL)	119	9.0 $\pm$ 3.48	18.5	2.8	2.0	15.9
ASTL (U/L)	119	129.9 $\pm$ 43.28	267.0	63.7	43.3	216.4
ALTL (U/L)	119	126.2 $\pm$ 60.92	324.8	37.0	4.3	248.0
ALP2S (U/L)	119	75 $\pm$ 14.29	143	45	46	103
TP2 (g/dL)	119	7.56 $\pm$ 0.74	11.74	5.73	6.09	9.03
ALB2 (g/dL)	119	5.16 $\pm$ 0.43	7.06	3.88	4.30	6.02
HDLC4 (mg/dL)	119	63.0 $\pm$ 13.11	108.6	33.4	36.8	89.2
Na (mmol/L)	119	152.9 $\pm$ 11.25	197.0	124.8	130.4	175.4
K (mmol/L)	119	11.65 $\pm$ 1.98	16.55	7.83	7.68	15.61
Cl (mmol/L)	119	104.0 $\pm$ 7.78	134.8	84.6	88.5	119.6
GLO (mg/dL)	119	2.39 $\pm$ 0.34	4.48	1.85	1.71	3.07

Table 6 The clinical biochemistry analysis of female animals

Organ	N	Mean $\pm$ SD	MAX	MIN	-2S.D.	+2S.D.
SGLU3 (mg/dL)	120	220.7 $\pm$ 91.99	524.1	59.4	36.7	404.6
U-BUN (mg/dL)	120	20.1 $\pm$ 3.15	35.2	12.7	13.8	26.4
CREA2 (mg/dL)	120	0.42 $\pm$ 0.07	0.65	0.29	0.29	0.56
UA2 (mg/dL)	120	5.0 $\pm$ 1.04	9.2	2.2	2.9	7.1
CHO2l (mg/dL)	120	95.9 $\pm$ 19.39	152.1	55.2	57.2	134.7

Table 6 The clinical biochemistry analysis of female animals (Continued)

Organ	N	Mean $\pm$ SD	MAX	MIN	-2S.D.	+2S.D.
TRIGL (mg/dL)	120	85.8 $\pm$ 27.20	182.6	42.1	31.4	140.2
LDLC3 (mg/dL)	120	8.5 $\pm$ 3.54	21.2	1.7	1.4	15.6
ASTL (U/L)	120	86.5 $\pm$ 18.57	224.4	60.3	49.4	123.7
ALTL (U/L)	120	47.9 $\pm$ 10.05	82.0	28.2	27.8	68.0
ALP2S (U/L)	120	35 $\pm$ 6.68	67	20	22	49
TP2 (g/dL)	120	7.54 $\pm$ 0.68	9.92	5.82	6.18	8.89
ALB2 (g/dL)	120	5.48 $\pm$ 0.45	7.38	4.39	4.58	6.39
HDLC4 (mg/dL)	120	78.9 $\pm$ 14.64	119.0	44.0	49.6	108.2
Na (mmol/L)	120	151.1 $\pm$ 10.22	205.0	131.5	130.6	171.5
K (mmol/L)	120	12.18 $\pm$ 2.37	19.32	6.52	7.44	16.92
Cl (mmol/L)	120	107.2 $\pm$ 8.12	146.4	90.7	91.0	123.4
GLO (mg/dL)	120	2.05 $\pm$ 0.27	2.89	1.48	1.50	2.60

The standard deviations for the organ weights of male animals were less than 10% of mean values for liver, right kidney, heart, spleen, brain, right and left testis. For the left kidney, lung, right and left adrenal, right and left epididymis had the standard deviations less than 20% of mean values except the standard deviations of thymus which more than 20% of mean values. The standard deviations of liver, right and left kidney, heart, spleen and brain in female animals were less than 10% of mean values. The other organ as lung, right and left adrenal, right and left ovary and oviduct and thymus had the standard deviations less than 20% of mean values on the other hand, uterus had the standard deviations more than 30% of mean values. The organ weights for male and female animals can be summarized as shown in the Table 7 and 8, respectively.

Table 7 The organ weights of male animals

Organ	N	Mean $\pm$ SD	MAX	MIN	-2S.D.	+2S.D.
Liver	119	2.6916 $\pm$ 0.19	3.2191	2.2943	2.3042	3.0790
Right Kidney	119	0.2547 $\pm$ 0.02	0.3087	0.2106	0.2177	0.2917
Left Kidney	119	0.2511 $\pm$ 0.03	0.4185	0.2080	0.1930	0.3093
Heart	119	0.2861 $\pm$ 0.02	0.3346	0.2538	0.2542	0.3179
Lung	119	0.4123 $\pm$ 0.06	0.6473	0.2875	0.2931	0.5316
Spleen	119	0.1751 $\pm$ 0.02	0.2121	0.1382	0.1434	0.2068
Brain	119	0.4260 $\pm$ 0.03	0.5060	0.3464	0.3628	0.4892
Right Adrenal	118	0.0075 $\pm$ 0.00	0.0107	0.0055	0.0057	0.0093

Table 7 The organ weights of male animals (Continued)

Organ	N	Mean $\pm$ SD	MAX	MIN	-2S.D.	+2S.D.
Left Adrenal	119	0.0084 $\pm$ 0.00	0.0112	0.0061	0.0063	0.0105
Right Testis	119	0.3674 $\pm$ 0.03	0.4567	0.2879	0.3017	0.4330
Left Testis	119	0.3695 $\pm$ 0.03	0.4523	0.2904	0.3072	0.4317
Right Epididymides	74	0.1136 $\pm$ 0.01	0.1441	0.0889	0.0903	0.1368
Left Epididymides	74	0.1133 $\pm$ 0.01	0.1431	0.0836	0.0900	0.1366
Thymus	119	0.0598 $\pm$ 0.01	0.0956	0.0384	0.0358	0.0838

Table 8 The organ weights of female animals

Organ	N	Mean $\pm$ SD	MAX	MIN	-2S.D.	+2S.D.
Liver	120	2.7335 $\pm$ 0.25	3.4176	2.2193	2.2328	3.2343
Right Kidney	120	0.2936 $\pm$ 0.01	0.3278	0.2526	0.2643	0.3229
Left Kidney	120	0.2804 $\pm$ 0.02	0.3147	0.2385	0.2484	0.3124
Heart	120	0.3473 $\pm$ 0.02	0.4135	0.3096	0.3074	0.3871
Lung	120	0.5895 $\pm$ 0.09	0.8703	0.4058	0.4144	0.7646
Spleen	120	0.2271 $\pm$ 0.02	0.2765	0.1639	0.1876	0.2667
Brain	120	0.7669 $\pm$ 0.04	0.8795	0.6544	0.6817	0.8521
Right Adrenal	120	0.0162 $\pm$ 0.00	0.0243	0.0119	0.0117	0.0206
Left Adrenal	120	0.0174 $\pm$ 0.00	0.0282	0.0080	0.0121	0.0226
Right Ovary and oviduct	120	0.0179 $\pm$ 0.00	0.0243	0.0127	0.0131	0.0227
Left Ovary and oviduct	120	0.0179 $\pm$ 0.00	0.0258	0.0114	0.0127	0.0230
Uterus	120	0.2150 $\pm$ 0.08	0.4324	0.1260	0.0624	0.3658
Thymus	120	0.0849 $\pm$ 0.02	0.1405	0.0464	0.0521	0.1177

Discussion

The analyzed parameters for hematological and clinical biochemistry were frequently affected by fasting period, collection technique, conditions and methods of storage. In addition, the hematological parameters can be affected further by anticoagulants and measurement method. In our study, the parameter of hematological analysis consists of Red Blood Cells (RBC), Hemoglobin (HGB), Hematocrit (HCT), MCV, White Blood Cells (WBC), Neutrophils (NEUT), Reticulocytes (RET) in both sex animal and Lymphocytes (LYMPH), Basophils (BASO) in female animal were differences from previous reported findings.⁽¹⁰⁾ The analyzed parameters of clinical biochemistry analysis were mostly differences tendency to that previously reported⁽¹⁰⁾ except Alkaline Phosphatase (ALP). The fluctuation of data could be occurred due to age, gender, species and other factors.

The organ weights, male animal had number of epididymites in both sides less than another organ because some cases the tissue were missing. The organ weights parameters had affected by trimming method, weighting time, and measurement sensitivity. Addition notes of number for male and female animals were not the same because one of male animal died by the husbandry accident. For our study, the organ weight was similar tendency to that previously reported⁽⁵⁾ except liver, kidney, heart, lung and testis in male animals and liver in female animals which the variation of data caused by species and other factors. However, the data included in this publication are for informational purposes only and can be used for establishing reference values for Wistar strain rats (Mlac: WR).

Conclusion

The present study carried out the hematological parameters, clinical chemistry parameters and organ weights data of 13- week Wistar rats (Mlac: WR) on 8 repeated dose 90- days oral toxicity studies to establish specific reference values of Wistar rats (Mlac: WR) which shown data in maximum and minimum values, means and standard deviations which will be helpful for interpretation of the experimental results and evaluation of the effects of various test items. For the future study, the data were usually improved in accuracy as the sample size increases.

Acknowledgement

The authors would like to acknowledge National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand for supporting the laboratory animal, equipment and facility all over this research.

References

1. National Laboratory Animal Center (NLAC), Mahidol University. Mlac:WR. [online]. [cited 2021 Feb 12]; [3 screens]. Available from: URL: https://nlac.mahidol.ac.th/nlac_th/index.php/mlacwr-detail.
2. Lee JM, Lee MA, Do HN, Song YI, Bae RJN, Lee Hy, et al. Historical control data from 13- week repeated toxicity studies in Crj:CD (SD) rats. Lab Anim Res 2012; 28(2): 115- 21.
3. Ema M, Endoh K, Fukushima R, Fujii S, Hara H, Hirata- Koizumi M, et al. Historical control data on developmental toxicity studies in rodents. Congenit Anom 2014; 54(3): 150- 61.
4. Kuwagata M, Sakai Y, Tanaka S, Takashima H, Katagiri R, Matsuoka T, et al. Historical control data on developmental toxicity studies in rats. Congenit Anom 2019; 59(4): 125- 31.
5. Piao Y, Liu Y, Xie X. Change trends of organ weight background data in sprague dawley rats at different ages. J Toxicol Pathol 2013; 26(1): 29- 34.
6. Ema M, Aoyama H, Arima A, Asano Y, Chihara K, Endoh K, et al. Historical control data on prenatal developmental toxicity studies in rabbits. Congenit Anom 2012; 52(3): 155- 61.

7. de Kort M, Weber K, Wimmer B, Wilutzky K, Neuenhahn P, Allingham P, et al. Historical control data for hematology parameters obtained from toxicity studies performed on different Wistar rat strains: acceptable value ranges, definition of severity degrees, and vehicle effects. *Toxicol Res Appl* 2020; 4: 1–32.
 8. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, DC: The National Academies Press; 2011.
 9. Institutional Animal Care and Use Committee. Guidelines for euthanasia of rodent fetuses and neonates. [online]. 2016; [cited 2019 Jun 18]; [3 screens]. Available from: URL: https://oacu.oir.nih.gov/system/files/media/file/2021-02/b4_rodent_euthanasia_pup.pdf
 10. Giknis MLA, Clifford CB. Clinical laboratory parameters for Crl:WI (Han). Washington, MA: Charles River Laboratories; 2008.
-

ข้อมูลกลุ่มควบคุมที่มาจากการทดสอบความเป็นพิษ ระยะกึ่งเรื้อรังทางปากของ หนูแรทสายพันธุ์ Wistar (Mlac: WR)

ภัสสรภรณ์ ศรีมังกรแก้ว กฤติกาญจน์ สุวรรณโสรัช ภาคมณ ยศทวารัตน์ และอัญชลี สิริมนตาภรณ์
ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม 73170

บทคัดย่อ ข้อมูลกลุ่มควบคุมของพารามิเตอร์ต่าง ๆ เช่น อายุ เพศ การบริโภคอาหาร/น้ำ ค่าโลหิตวิทยา ค่าเคมีคลินิกในเลือด และน้ำหนักอวัยวะ มีความสำคัญสำหรับการศึกษาความเป็นพิษ การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อรวบรวมข้อมูลกลุ่มควบคุมจากการทดสอบความเป็นพิษของหนูแรทสายพันธุ์ Wistar (MLAC: WR) อายุ 13 สัปดาห์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการทดสอบความเป็นพิษและการศึกษาประสิทธิภาพของสารทดสอบ โดยข้อมูลของงานวิจัยนี้ประกอบด้วย ค่าโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิกในเลือด รวมถึงน้ำหนักอวัยวะในหนู 239 ตัว (เพศผู้ 119 ตัว และ เพศเมีย 120 ตัว) ที่รวบรวมจากกลุ่มควบคุมของการทดสอบความเป็นพิษระยะกึ่งเรื้อรังทางปากจำนวน 8 การทดสอบ และผลการทดสอบแสดงอยู่ในรูปของค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ดังนั้น ข้อมูลกลุ่มควบคุมในอดีตเหล่านี้จะช่วยสนับสนุนการตีความผลความเป็นพิษของสารทดสอบในการทดสอบที่ใช้หนูแรทสายพันธุ์ Wistar ต่อไป

คำสำคัญ: หนูแรทสายพันธุ์ Wistar, ข้อมูลกลุ่มควบคุม, การทดสอบความเป็นพิษ

ระบาดวิทยาโรคติดเชื้อไวรัสซิกาในประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2559-2563

สุมาลี ชะนะมา¹ ภัทร วงษ์เจริญ¹ ศิริรัตน์ แนมขุนทด¹ ลัดดาวัลย์ มีแผนดี¹ อริสรา โปชนเจริญ¹ พงศ์ศิริ ตาลทอง¹
สุสนิยะห์ วาเต๊ะ¹ สาริณี ชำนาญรักษา¹ วรรัตน์ แจ่มฟ้า¹ และอารีรัตน์ สว่างแสง²

¹สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

²นักวิชาการอิสระ 690/25 ตำบลบางกระสอ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสซิกาทางห้องปฏิบัติการที่นิยม คือการตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสซิกา ในตัวอย่างซีรัม และ/หรือ ปัสสาวะ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสซิกาในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2559-2563 ด้วยการตรวจตัวอย่างซีรัมและปัสสาวะของผู้ป่วย และผู้สัมผัสที่ส่งตรวจที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างปี พ.ศ. 2559 - 2563 ด้วยวิธี real-time RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบจำนวน 3 ชุด ซึ่งจำเพาะต่อยีน prM, E และ NS2b จำนวนตัวอย่างตรวจ 12,820 ตัวอย่าง จาก 9,559 ราย พบผลบวก 918 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.16) และจากการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าผู้ป่วยไวรัสซิกาส่วนใหญ่มีอายุอยู่ในช่วง 25 - 34 ปี (ร้อยละ 23.38) รองลงมา คือ 15 - 24 ปี (ร้อยละ 16.01) และ 35 - 44 ปี (ร้อยละ 16.01) ภูมิสำเนาของผู้ป่วยกระจายอยู่ใน 35 จังหวัด ทุกภูมิภาคของประเทศไทย จังหวัดที่พบผู้ป่วยไวรัสซิกามากที่สุด 3 ลำดับแรก ได้แก่ กรุงเทพมหานคร บึงกาฬ และนนทบุรี

คำสำคัญ ไวรัสซิกา, โรคติดเชื้อไวรัสซิกา, ระบาดวิทยา

Corresponding author E-mail: sumalee.c@dmsc.mail.go.th

Received: 6 March 2021

Revised: 1 July 2021

Accepted: 12 July 2021

บทนำ

โรคติดเชื้อไวรัสซิกาเกิดจากเชื้อไวรัสซิกา ซึ่งอยู่ในตระกูลฟลาวิไวรัส มีลักษณะคล้ายคลึงกับไวรัสเดงกี ไวรัสเจี๊วไวรัสไข้เหลือง ไวรัสไข้สมองอักเสบเจอี และไวรัสเวสต์ไนล์ มีสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวความยาว 10,794 เบส แบ่งเป็น 2 สายพันธุ์ คือ African และ Asian ช่องทางติดเชื้อหลัก คือติดเชื้อผ่านยุงลายที่เป็นพาหะนำโรค และติดเชื้อทางอื่นได้ คือทางเพศสัมพันธ์ การให้เลือด และจากแม่สู่ลูก ระยะฟักตัวในคน 4 ถึง 7 วัน เมื่อปี พ.ศ. 2490 มีการเพาะเชื้อไวรัสซิกาครั้งแรกได้จากลิงในปาซิกา ประเทศยูกันดา และแยกเชื้อไวรัสซิกาจากคนได้ครั้งแรกที่ประเทศไนจีเรียในปี พ.ศ. 2511⁽¹⁾ ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่อาจไม่แสดงอาการ ส่วนน้อยมีไข้ ปวดศีรษะ ออกรูปร่าง ผื่น ตาแดง และปวดข้อที่สำคัญ คือมีหลักฐานแสดงความสัมพันธ์ว่าการติดเชื้อไวรัสซิกาเป็นสาเหตุของภาวะศีรษะเล็กแต่กำเนิด (Microcephaly) และความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลาง โรคไวรัสซิกาเคยเกิดการระบาดใหญ่ในปี พ.ศ. 2558 ที่ประเทศบราซิลและโคลัมเบีย องค์การอนามัยโลกจึงเห็นความสำคัญและประกาศภาวะฉุกเฉินด้านสาธารณสุขระหว่างประเทศเมื่อวันที่ 1 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559⁽²⁾ โดยมีประกาศคำเตือนนักท่องเที่ยวรวมทั้งหญิงวัยเจริญพันธุ์ในการเดินทางไปในพื้นที่ที่ระบาด สำหรับประเทศไทยมีรายงานพบผู้ติดเชื้อไวรัสซิกาครั้งแรกในปี พ.ศ. 2556 เป็นนักท่องเที่ยวต่างชาติ 2 ราย ที่เดินทางมาที่กรุงเทพฯ และเกิดในช่วงปลายปี พ.ศ. 2555 จากนั้นกรมควบคุมโรคได้ทำการสอบสวนโรคย้อนหลังเพิ่มเติมระหว่างปี พ.ศ. 2555 – 2557 พบผู้ป่วยยืนยันเฉลี่ยปีละ 5 ราย ต่อมาในเดือนมกราคม และพฤษภาคม พ.ศ. 2559 มีชายไทยจำนวน 2 ราย จากจังหวัดอุดรธานีถูกกักตัวที่สนามบินนานาชาติเถาหยวน กรุงไทเป ประเทศไต้หวัน เนื่องจากมีไข้และตรวจพบว่าติดเชื้อไวรัสซิกา โดยในวันที่ 3 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559 กระทรวงสาธารณสุขจึงได้ประกาศเพิ่มชื่อโรคติดเชื้อไวรัสซิกา (ในระยะแรกเรียกว่าโรคไข้ซิกา) เป็นโรคที่ต้องแจ้งความตาม พ.ร.บ. โรคติดต่อ⁽³⁾ กรมควบคุมโรคกำหนดนิยามผู้ป่วยเข้าเกณฑ์สอบสวนโรคติดเชื้อไวรัสซิกา (Patients under investigation) จำนวน 4 กลุ่ม ดังนี้ ผู้ป่วยหญิงตั้งครรภ์ ผู้ป่วยทั่วไป ทารกที่มีศีรษะเล็ก และผู้ป่วยกลุ่มอาการกิลแลง – บาร์เร โดยผู้ป่วยยืนยัน หมายถึง ผู้ป่วยเข้าเกณฑ์สอบสวนโรคหรือผู้ที่มีอาการไข้ ผื่น ที่มีผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการยืนยันพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสซิกาในเลือด หรือในปัสสาวะ หรือสารคัดหลั่งในร่างกาย โดยวิธี PCR สำหรับกรณีทารกที่มีศีรษะเล็กผิดปกติต้องตรวจพบภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อไวรัสซิกา (ZIKV IgM) หรือมี seroconversion ของ ZIKV IgM⁽⁴⁾ และมีการจัดตั้งห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสซิกาอย่างเร่งด่วน เพื่อป้องกันผู้ป่วยยืนยันในพื้นที่เป้าหมายและนำไปสู่การควบคุมโรคไม่ให้แพร่กระจายจนเกิดเป็นโรคระบาด ทั้งนี้กองโรคติดต่ออันตราย โดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ได้รายงานสถานการณ์โรคติดเชื้อไวรัสซิกาภายในประเทศ ในปี พ.ศ. 2559 – 2561 เป็นจำนวน 1,121, 577 และ 600 ราย ตามลำดับ⁽⁵⁾

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสซิกาทางห้องปฏิบัติการใช้วิธีการตรวจสอบสารพันธุกรรมไวรัสซิกาเป็นหลักวิธีอื่นๆ ได้แก่ การตรวจแอนติบอดีชนิด IgM ที่จำเพาะต่อไวรัสซิกา วิธี ELISA มักพบปฏิกิริยาข้าม (Cross reaction) กับไวรัสอื่นๆ ในกลุ่มฟลาวิไวรัส เช่น ไวรัสเดงกี ไวรัสไข้เหลือง และไวรัสเจี๊ว การตรวจนิวทรัลไลซิงแอนติบอดี (neutralizing antibody) ให้ผลจำเพาะมากกว่า IgM แต่มีขั้นตอนซับซ้อนมากกว่า การตรวจสอบสารพันธุกรรมโดยวิธี PCR สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่เริ่มป่วยถึงวันที่ 10 หลังเริ่มป่วย อาจใช้หลักการ One – step RT – PCR หรือ real – time RT – PCR บทความของ Faye O และคณะ⁽⁶⁾ ได้นำเสนอการตรวจไวรัสซิกาด้วยวิธี One – step RT – PCR พบว่ามีความไวและจำเพาะต่อไวรัสซิกา และมีค่า Limit of detection เท่ากับ 7.1 PFU/reaction Lanciotti RS และคณะ⁽⁷⁾ เผยแพร่บทความเกี่ยวกับคุณสมบัติทางพันธุกรรมและทางซีโรโลยีของเชื้อไวรัสซิกาที่ระบาดในประเทศไมโครนีเซีย (Micronesia) เมื่อปี ค.ศ. 2007 และเป็นนักวิทยาศาสตร์คณะแรกที่นำเสนอวิธีตรวจไวรัสซิกาด้วยวิธี real – time RT – PCR รวมทั้งแสดงผลวิเคราะห์ลำดับเบสของตัวเชื้อ ในปลายปี พ.ศ. 2558 คณะผู้วิจัยได้ทดลองตรวจตัวอย่างที่หลีกเลี่ยงจากการตรวจโรคไข้เลือดออก โรคหัด และหัดเยอรมัน โดยคัดเลือกรายที่ผู้ป่วยแสดงอาการออกผื่นร่วมกับตาแดงจำนวน 23 ราย (24 ตัวอย่าง) พบผลบวก 4 ราย (ข้อมูลไม่แสดง)

คณะผู้วิจัยได้ตระหนักว่า การตรวจการติดเชื้อไวรัสซิกาทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี real-time RT-PCR ในกลุ่มผู้ป่วยเข้าเกณฑ์สอบสวนโรค และนำมาวิเคราะห์เชิงระบาดวิทยามีประโยชน์ ทำให้ทราบข้อมูลเชิงประจักษ์ที่สามารถนำไปใช้ประกอบการป้องกันและควบคุมโรคได้ จึงได้ศึกษาระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อไวรัสซิกา ในตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมา และปัสสาวะของผู้ป่วยและผู้สัมผัสในประเทศไทย ในช่วงปี พ.ศ. 2559 – 2563 ที่ส่งตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการฝ่ายอาชีวไวรัส สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างตรวจวิเคราะห์

ตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมา และปัสสาวะของผู้ป่วยเข้าเกณฑ์สอบสวนโรค (Patients under Investigation) ตามนิยามของกองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค โดยพิจารณาอาการของผู้ป่วยเป็น 3 ลักษณะ ดังนี้ 1) มีผื่นร่วมกับอาการอย่างน้อย 1 ใน 3 อาการ ดังนี้ ไข้ ปวดข้อ ตาแดง 2) มีไข้ร่วมกับอาการอย่างน้อย 2 ใน 3 อาการ ดังนี้ ปวดศีรษะ ปวดข้อ ตาแดง 3) มีผื่นและอาศัยอยู่ หรือมีประวัติเดินทางเข้าไปในตำบลที่พบผู้ป่วยยืนยัน และยังอยู่ในระยะเวลาควบคุมโรค⁽⁴⁾ ส่งตรวจที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปี พ.ศ. 2559 – 2563 จำนวนรวม 12,820 ตัวอย่าง จาก 9,559 คน

ไวรัสควบคุม

ไวรัสซิกาสายพันธุ์ SV0127/14SV ที่แยกได้จากคนไทย ความแรง 1.5×10^5 PFU/ml ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร (AFRIMS) นำมาเจือจางด้วยซีรัมคนปกติ 10^{-3} แบ่งบรรจุเป็นหลอดเล็ก และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C ใช้เป็นสารควบคุมผลบวก โดยนำมาสกัดอาร์เอ็นเอพร้อมตัวอย่างตรวจทุกครั้งของการวิเคราะห์

ไพรเมอร์และโพรบ

ไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในการทดสอบ จำนวน 3 ชุด สังเคราะห์โดย Eurofins Genomics (Germany) ผ่านบริษัท อีระเทรตติ้ง จำกัด ซึ่งมีลำดับเบสจำเพาะต่อยีนส่วน prM, E และ NS2b ของไวรัสซิกา ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์และโพรบสำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัสซิกาโดยวิธี real-time RT-PCR

ชุดที่	ชื่อไพรเมอร์/โพรบ	ลำดับเบส 5'--3'	ตำแหน่ง*	ยีน
1	ZIKV 835	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC	835-857	prM
	ZIKV 911c	CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC	911-890	
	ZIKV 860-FAM	CGGCATACAGCATCAGGTGCATAGGAG	860-886	
2	ZIKV 1086	CCGCTGCCCAACACAAG	1086-1102	E
	ZIKV 1162c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	1162-1139	
	ZIKV 1107-FAM	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA	1107-1137	
3	ZIKV 4481	CTGTGGCATGAACCCAATAG	4434-4453	NS2b
	ZIKV 4552c	ATCCCATAGAGCACCCTCC	4524-4505	
	ZIKV 4507c-FAM	CCACGCTCCAGCTGCAAAGG	4479-4460	

*ตำแหน่งของยีนเป้าหมายของไวรัสซิกาสายพันธุ์ MR766 (GenBank accession number AY632535)

การสกัดสารพันธุกรรมของไวรัสซิกา

สกัดสารพันธุกรรมโดยใช้วิธี Spin column หรือโดยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ นำตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมา ปัสสาวะ และไวรัสควบคุมผลบวกชนิดละ 150 ไมโครลิตร มาสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสด้วยชุดสกัด QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN, Germany) ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสารกำกับชุดน้ำยาโดยปรับเพิ่มปริมาตร lysis buffer และ absolute ethanol ตามสัดส่วนปริมาตรตัวอย่าง ได้ตัวอย่างอาร์เอ็นเอ 40 ไมโครลิตร กรณีสกัดสารพันธุกรรมด้วยเครื่องอัตโนมัติ EZ1 Advance XL (QIAGEN, Germany) ใช้ชุดสกัด EZ1 DSP Virus Kit (QIAGEN, Germany) โดยผสมตัวอย่างปัสสาวะ 300 ไมโครลิตร กับ buffer AVL (QIAGEN, Germany) 100 ไมโครลิตร สำหรับตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมา และไวรัสควบคุมบวกใช้ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมกับ buffer AVE (QIAGEN, Germany) 250 ไมโครลิตร แล้วนำเข้าเครื่องได้ตัวอย่างอาร์เอ็นเอปริมาตร 60 ไมโครลิตร

การตรวจสอบสารพันธุกรรมไวรัสซิกาด้วยวิธี real - time RT - PCR

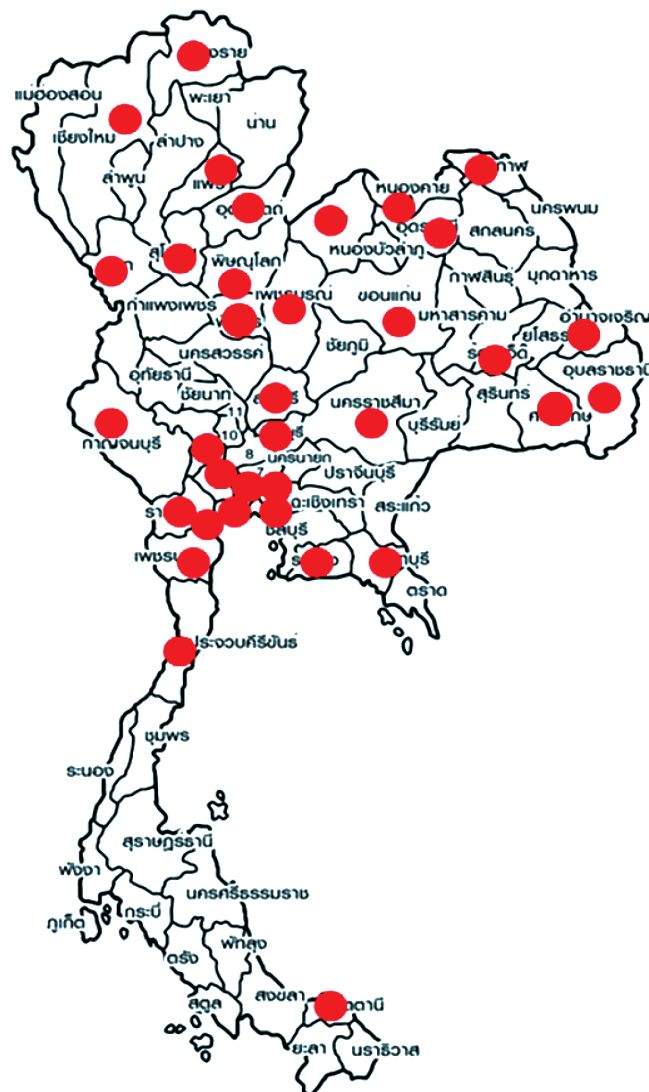
ตรวจสอบสารพันธุกรรมไวรัสซิกาด้วยวิธี real - time RT - PCR โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบจำนวน 3 ชุด ซึ่งจำเพาะต่อยีน prM, E และ NS2b^(8, 9) ในช่วงเดือนมกราคมถึงกรกฎาคม พ.ศ. 2559 ตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 1 และชุดที่ 2 ซึ่งจำเพาะต่อยีน prM และ E ตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2559 ถึงธันวาคม พ.ศ. 2563 ตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 2 และชุดที่ 3 ซึ่งจำเพาะต่อยีน E และ NS2b วิธีตรวจสอบโดยย่อดังนี้ นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำยาของชุด QuantiTect Probe RT - PCR Kit (QIAGEN, Germany) ประกอบด้วย 2x Ready Mix 12.5 ไมโครลิตร Enzyme mix 0.25 ไมโครลิตร 100 μ M ไพรเมอร์ 2 ชนิดของชุดที่ 1 หรือชุดที่ 2 หรือชุดที่ 3 ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร 25 μ M โพรบของชุดที่ 1 หรือชุดที่ 2 หรือชุดที่ 3 ปริมาตร 0.15 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปราศจาก RNase 1.6 ไมโครลิตร นำหลอดทดลองเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง ABI7500 (Applied Biosystems, USA) ตั้งโปรแกรมดังนี้ 50 °C 30 นาที 95 °C 15 นาที และ 45 รอบของ 95 °C 15 วินาที และ 60 °C 60 วินาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาวิเคราะห์ผลบวกเมื่อพบ amplification curve ลักษณะ S - curve ชัดเจนและเครื่องแสดงค่า Cycle threshold (Ct) น้อยกว่า 40 ผลลบเมื่อไม่พบ amplification curve หรือเครื่องไม่แสดงค่า Ct หรือมี amplification curve ไม่เป็น S - curve หรือได้ค่า Ct มากกว่าหรือเท่ากับ 40

ผล

ผลการตรวจสอบสารพันธุกรรมไวรัสซิกาด้วยวิธี real - time RT - PCR โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปี พ.ศ. 2559 - 2563 ดังแสดงในตารางที่ 2 ตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมา และปัสสาวะ จำนวน 12,820 ตัวอย่าง เก็บจากผู้ป่วยเข้าเกณฑ์สอบสวนโรคและผู้สัมผัสรวม 9,559 ราย พบผลบวก 918 ตัวอย่าง จาก 588 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.16 และ 6.15 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับจำนวนผู้ป่วยยืนยันโรคติดเชื้อไวรัสซิกาของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2559 - 2563 รายงานโดยกองโรคติดต่อภายในโดยแมลง กรมควบคุมโรค จำนวนรวม 2,632 ราย^(5, 10, 11) ผู้ป่วยไวรัสซิกา 588 ราย มีภูมิลำเนาขณะป่วยอยู่ใน 35 จังหวัด ซึ่งกระจายทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ดังแสดงในภาพที่ 1 จังหวัดที่พบผู้ป่วยไวรัสซิกามากที่สุด 3 ลำดับแรก ได้แก่ กรุงเทพมหานคร จำนวน 101 ราย บึงกาฬ จำนวน 93 ราย และนนทบุรี จำนวน 75 ราย

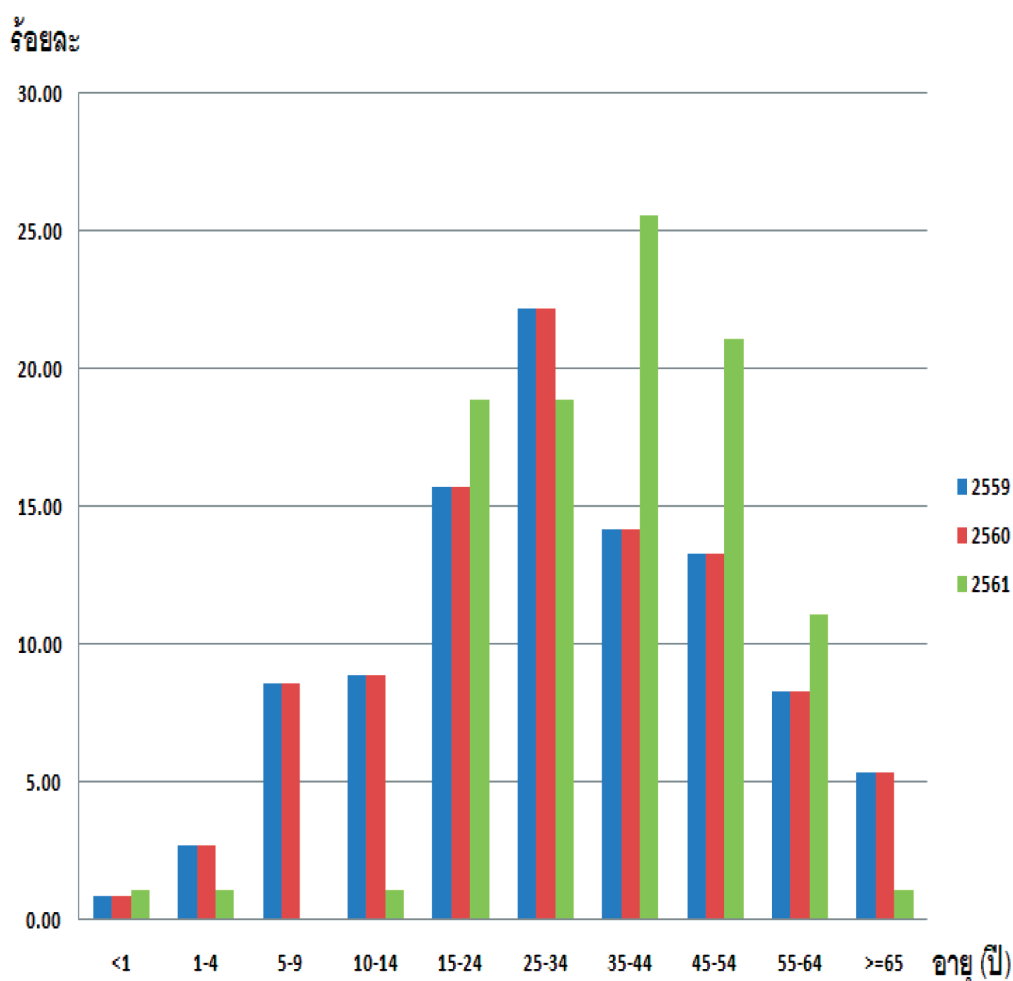
ตารางที่ 2 ผลตรวจสารพันธุกรรมไวรัสซิกาผู้ป่วยเข้าเกณฑ์สอบสวนโรคและผู้สัมผัสด้วยวิธี real-time RT-PCR แสดงจำนวนผลบวกแยกรายปี พ.ศ. 2559-2563 เปรียบเทียบกับจำนวนผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสซิกาของประเทศไทยที่รายงานโดยกรมควบคุมโรค

ปี พ.ศ.	จำนวนผู้ป่วย ส่งตรวจ	จำนวนผู้ป่วยให้ผลบวก (ร้อยละ)	จำนวนตัวอย่าง ส่งตรวจ	จำนวนตัวอย่างให้ ผลบวก (ร้อยละ)	จำนวนผู้ป่วยของ ประเทศไทย
2559	6,800	360 (5.29)	8,723	599 (6.68)	1,121
2560	1,498	128 (8.54)	2,015	180 (8.93)	577
2561	718	94 (13.09)	1,037	132 (12.73)	600
2562	235	5 (2.13)	446	6 (1.35)	190
2563	308	1 (0.32)	599	1 (0.17)	144
รวม	9,559	588 (6.15)	12,820	918 (7.16)	2,632



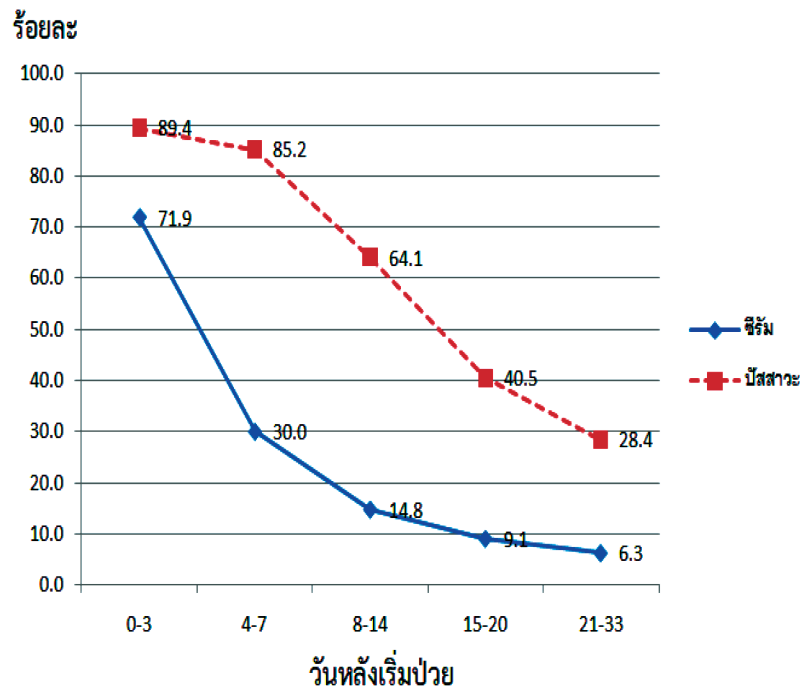
ภาพที่ 1 แผนที่ประเทศไทย จุดสีแดงแสดงจังหวัดที่พบผู้ป่วยไวรัสซิกาจากการตรวจด้วยวิธี real-time RT-PCR ปี พ.ศ. 2559-2563 รวม 35 จังหวัด

ผลวิเคราะห์ผู้ป่วยไวรัสซิกา 556 ราย ของปี พ.ศ. 2559 – 2561 แบ่งตามกลุ่มอายุพบว่า ผู้ป่วยไวรัสซิกาส่วนใหญ่มีอายุอยู่ในช่วง 25 – 34 ปี (จำนวน 130 ราย, 23.38%) รองลงมา คือกลุ่มอายุ 15 – 24 ปี (จำนวน 89 ราย, 16.01%) และ 35 – 44 ปี (จำนวน 89 ราย, 16.01%) ซึ่งมีลักษณะเดียวกันในช่วงปี พ.ศ. 2559 และ 2560 และมีแนวโน้มผู้ป่วยมีอายุสูงขึ้น ในปี พ.ศ. 2561 กลุ่มอายุที่มีผู้ป่วยสูงสุดอยู่ในช่วง 35 – 44 ปี (จำนวน 23 ราย) รองมาคือ 45 – 54 ปี (จำนวน 19 ราย) ดังแสดงในภาพที่ 2 สำหรับปี พ.ศ. 2562 มีผู้ป่วยที่ทราบอายุเพียง 4 ราย อยู่ช่วงอายุ 25 – 34, 35 – 44, 45 – 54 และ 55 – 64 ปี ช่วงอายุละ 1 คน ปี พ.ศ. 2563 ผู้ป่วยไวรัสซิกา 1 ราย อายุ 51 ปี



ภาพที่ 2 ร้อยละของผู้ป่วยไวรัสซิกา ตรวจด้วยวิธี real-time RT-PCR แบ่งตามกลุ่มอายุ ปี พ.ศ. 2559–2561

ผลวิเคราะห์ข้อมูลของผู้ป่วยที่ตรวจพบผลบวกด้วยวิธี real-time RT-PCR ของปี พ.ศ. 2559 จำนวน 382 ราย โดยแบ่งตามชนิดตัวอย่างปัสสาวะและซีรัม จำนวน 404 และ 294 ตัวอย่าง วิเคราะห์ที่ระยะเวลาเก็บตัวอย่างต่างๆ นับจากวันเริ่มป่วย พบผลบวกในตัวอย่างชนิดปัสสาวะมากกว่าในซีรัม ทุกระยะเวลาของการเก็บตัวอย่าง หากเก็บตัวอย่างในช่วง 3 วันแรกหลังเริ่มป่วย พบผลบวกในปัสสาวะและซีรัมสูงสุดเท่ากับร้อยละ 89.4 และ 71.9 ในช่วง 4 – 7 วันหลังเริ่มป่วย พบผลบวกในปัสสาวะและซีรัมลดลงเป็นร้อยละ 85.2 และ 30.0 หลังจากนั้น ร้อยละผลบวกลดลงตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ผลบวกจากการตรวจสอบสารพันธุกรรมไวรัสซิกาโดยวิธี real-time RT-PCR ในตัวอย่างปัสสาวะและซีรัมจำนวน 404 และ 294 ตัวอย่าง วิเคราะห์ตามระยะเวลาการเก็บตัวอย่างนับจากวันเริ่มป่วย

วิจารณ์

แต่เดิมเชื้อไวรัสซิกาไม่เป็นที่รู้จักมากนัก ผู้ติดเชื้อไวรัสซิกาแสดงอาการไม่รุนแรงจึงไม่ใช่โรคสำคัญที่จำเป็นต้องเฝ้าระวังในระบบการแพทย์และสาธารณสุข ต่อมาปี พ.ศ. 2558 เกิดการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสซิกาในประเทศบราซิลและโคลัมเบีย มีการค้นพบความสัมพันธ์ของการติดเชื้อไวรัสซิกากับอัตราทารกแรกเกิดศีรษะเล็กผิดปกติ ซึ่งเป็นที่น่าวิตกกังวลสำหรับหญิงตั้งครรภ์ หลังจากนั้นก็มีผู้วิจัยเผยแพร่ผลการศึกษาเพิ่มมากขึ้น พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อในสารคัดหลั่งหลายชนิดคือ ซีรัมหรือพลาสมา น้ำลาย ปัสสาวะ น้ำคร่ำ และน้ำอสุจิ โดยพบอัตราผลบวกในปัสสาวะมากกว่าในซีรัมหรือพลาสมา^(12, 13, 14, 15) นำไปสู่การเพิ่มชนิดตัวอย่างตรวจจากเดิมตรวจเฉพาะซีรัมหรือพลาสมาผู้ป่วยเท่านั้น เปลี่ยนเป็นตรวจเพิ่มในตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะ ในการศึกษาที่ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะและซีรัมในภาพที่ 3 พบว่าร้อยละผลบวกในตัวอย่างปัสสาวะสูงกว่าซีรัมในทุกช่วงของระยะเวลาการเก็บตัวอย่างนับจากวันเริ่มป่วย โอกาสพบผลบวกสูงสุดเมื่อเก็บตัวอย่างได้เร็วภายใน 3 วันหลังเริ่มป่วย อย่างไรก็ตามมีผู้ป่วยหลายรายที่พบผลบวกเฉพาะในซีรัมหรือพลาสมา และผู้ป่วยหลายรายที่พบผลบวกเฉพาะในปัสสาวะ (ข้อมูลไม่แสดง) ดังนั้นตัวอย่างส่งตรวจในระยะ 7 วันแรกหลังเริ่มป่วย ควรเป็นซีรัมหรือพลาสมา น้ำลาย และปัสสาวะ ในขณะที่หลัง 7 วันแล้ว ให้เก็บเฉพาะปัสสาวะเท่านั้น

ในปี พ.ศ. 2559 มีรายงานระบาดของเชื้อไวรัสซิกาในกลุ่มประเทศลาตินอเมริกาและแคริบเบียนอย่างต่อเนื่อง อีกทั้งยังพบความเชื่อมโยงกับการเกิดทารกแรกเกิดศีรษะเล็ก และอาการปลายประสาทอักเสบ ทำให้องค์การอนามัยโลกประกาศภาวะฉุกเฉินด้านสาธารณสุขระหว่างประเทศ (Public Health Emergency of International Concern; PHEIC) ตามกฎอนามัยระหว่างประเทศ ค.ศ. 2005 เมื่อวันที่ 1 กุมภาพันธ์ 2559 ประเทศไทยโดยกระทรวงสาธารณสุขจึงประกาศให้โรคติดเชื้อไวรัสซิกาเป็นภาวะฉุกเฉินทางสาธารณสุขระดับที่ 3 มีมาตรการป้องกันควบคุม และเฝ้าระวังโรคติดเชื้อไวรัสซิกาอย่างเป็นระบบและมีประสิทธิภาพ จัดตั้งศูนย์ปฏิบัติการภาวะฉุกเฉิน (Emergency Opera-

tion Center; EOC) มีการประชุมติดตามสถานการณ์และมาตรการการป้องกันกรณีโรคติดเชื้อไวรัสซิกาเป็นประจำทุกสัปดาห์ เมื่อพบผู้ติดเชื้อรายแรกได้มีระบบติดตามผู้สัมผัสเพื่อเก็บตัวอย่างส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการมากขึ้น ทำให้มีตัวอย่างส่งตรวจที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขมากถึง 8,723 ตัวอย่าง กระทรวงสาธารณสุขโดยกองโรคติดต่อ นำโดยแมลง กรมควบคุมโรค ได้รายงานผู้ป่วยยืนยันโรคติดเชื้อไวรัสซิกาในประเทศไทยปี พ.ศ. 2559 จำนวน 1,121 ราย⁽⁵⁾ ต่อมาองค์การอนามัยโลกได้ประกาศยกเลิกภาวะฉุกเฉินดังกล่าวในวันที่ 18 พฤศจิกายน 2559 กระทรวงสาธารณสุข ปรับมาตรการดำเนินการภาวะฉุกเฉินเป็นมาตรการดำเนินงานระยะยาว ตั้งแต่วันที่ 25 มกราคม 2560⁽¹⁶⁾ เน้นดูแลหญิงตั้งครรภ์ควบคู่กับการป้องกันโรคไข้เลือดออก มีห้องปฏิบัติการเปิดบริการตรวจไวรัสซิกาเพิ่มมากขึ้นทั่วประเทศ ทำให้ในปี พ.ศ. 2560–2563 มีตัวอย่างส่งตรวจที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ลดลงโดยมีตัวอย่างส่งตรวจจำนวน 2,015, 1,037, 446 และ 599 ตัวอย่าง ในปี พ.ศ. 2560–2563 ตามลำดับ ตามที่กองโรคติดต่อ นำโดยแมลง รายงานจำนวนผู้ป่วยยืนยันโรคติดเชื้อไวรัสซิกาของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2559–2563^(5, 10) ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าผู้ป่วยไวรัสซิกาที่ตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข คิดเป็นร้อยละ 22.34 ของทั้งประเทศไทย (588/2,632) นอกจากนี้ผลการศึกษายังแสดงให้เห็นว่า กลุ่มอายุที่พบมากในผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสซิกาแตกต่างจากผู้ป่วยไข้เลือดออกเดงกี กล่าวคือผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสซิกาพบมากในกลุ่มผู้ใหญ่มากกว่าเด็ก ซึ่งพบผลบวกสูงสุดในกลุ่มอายุ 25–34 ปี ดังแสดงในภาพที่ 2 ในขณะที่โรคไข้เลือดออกเดงกีพบในกลุ่มเด็กมากกว่า ดังรายงานของกรมควบคุมโรคที่ระบุว่า ปี พ.ศ. 2558–2563 พบผู้ป่วยไข้เลือดออกเดงกีสูงในกลุ่มเด็กวัยเรียนอายุ 5–14 ปี โดยกลุ่มอายุที่มีอัตราป่วยสูงสุด คือ 10–14 ปี⁽¹⁷⁾ ซึ่งเป็นข้อมูลระบาดวิทยาที่มีประโยชน์ในการคัดกรองกลุ่มผู้ป่วยได้อีกทางหนึ่ง

สรุป

คณะผู้วิจัยได้ตรวจตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมา และปัสสาวะของผู้ป่วยเข้าเกณฑ์สอบสวนโรคไวรัสซิกาและผู้สัมผัส จำนวน 9,559 ราย 12,820 ตัวอย่าง พบผลบวก 588 ราย 918 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.15 และ 7.16 โดยพบมากในกลุ่มอายุ 25–34 ปี และมีการกระจายของผู้ป่วยใน 35 จังหวัด ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สำนักระบาดวิทยา สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1–12 กรมควบคุมโรค ศูนย์ประสานงานการตรวจวิเคราะห์และเฝ้าระวังโรคทางห้องปฏิบัติการ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความร่วมมือในการจัดส่งตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร โดย Dr. Louis R Macareo ที่ให้ความอนุเคราะห์ไวรัสซิกาควบคุม

เอกสารอ้างอิง

1. Hayes EB. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis* 2009; 15(9): 1347–50.
2. World Health Organization. WHO Director – General summarizes the outcome of the Emergency Committee regarding clusters of microcephaly and Guillain – Barré syndrome. [online]. 2016; [cited 2016 Apr 12]; [2 screens]. Available from: URL: <https://www.who.int/news/item/01-02-2016-who-director-general-summarizes-the-outcome-of-the-emergency-committee-regarding-clusters-of-microcephaly-and-guillain-barr%C3%A9-syndrome>.

3. สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องเพิ่มเติมชื่อโรคติดต่อที่ต้องแจ้งความ. [ออนไลน์]. 2559; [สืบค้น 12 เม.ย. 2564]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://apps.doe.moph.go.th/boe/zika.php>.
4. พจมาน ศิริอารยาภรณ์, โรม บัวทอง, อาทิตยา วงศ์คำมา. แนวทางการดำเนินงานเฝ้าระวัง และสอบสวนโรคติดเชื้อไวรัสซิกาในกลุ่มเสี่ยง. ใน: วรยา เหลืองอ่อน, นพรัตน์ มงคลกลางกูร, บรรณาธิการ. คู่มือการป้องกันควบคุมโรคติดเชื้อไวรัสซิกา สำหรับบุคลากรทางการแพทย์และสาธารณสุข ปี 2559. นนทบุรี: สำนักโรคติดต่ออุบัติใหม่ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2559. หน้า 26 - 32.
5. สำนักโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. สถานการณ์โรคติดเชื้อไวรัสซิกาประเทศไทย ประจำสัปดาห์ที่ 52/2561 ณ วันที่ 28 ธันวาคม 2561. [ออนไลน์]. 2561; [สืบค้น 1 มี.ค. 2564]: [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: <https://ddc.moph.go.th/uploads/ckeditor/6f4922f45568161a8cdf4ad2299f6d23/files/Zika%20Fever/2561/Zika%2052.pdf>.
6. Faye O, Faye O, Dupressoir A, Weidmann M, Ndiaye M, Sall AA. One - step RT - PCR for detection of Zika virus. J Clin Virol 2008; 43(1): 96 - 101.
7. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serological properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerg Infect Dis 2008; 14(8): 1232 - 9.
8. สุมาลี ชะนะมา, ภัทร วงษ์เจริญ, ศิริรัตน์ แนนขุนทด, ลัดดาวัลย์ มีแผนดี, อริสรา โปษณเจริญ, พงศ์ศิริ ตาลทอง, และคณะ. การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีสำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสซิกา. ว กรมวิทย์ พ 2564; 63(2): 359 - 69.
9. สุมาลีชะนะมา, เกรียงศักดิ์ฤทธศาสตร์. แนวทางการตรวจโรคติดเชื้อไวรัสซิกาทางห้องปฏิบัติการ. ใน: วรยา เหลืองอ่อน, นพรัตน์ มงคลกลางกูร, บรรณาธิการ. คู่มือการป้องกันควบคุมโรคติดเชื้อไวรัสซิกา สำหรับบุคลากรทางการแพทย์และสาธารณสุข ปี 2559. นนทบุรี: สำนักโรคติดต่ออุบัติใหม่ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2559. หน้า 43 - 50.
10. กองควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. สถานการณ์โรคติดเชื้อไวรัสซิกา ประเทศไทย สัปดาห์ที่ 52/2562 (ข้อมูล ณ วันที่ 27 ธันวาคม 2562). [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 17 พ.ค. 2564]: [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://drive.google.com/drive/folders/1fPpUqVU66mcZ_CL-PYB1S1WiqcOMVD4un.
11. กองควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. สถานการณ์โรคติดเชื้อไวรัสซิกา ประเทศไทย ข้อมูล ณ วันที่ 31 ธันวาคม 2563. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 17 พ.ค. 2564]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://drive.google.com/drive/folders/1_yKIIdHmKWAdl24MGDqdZwrK7-WSMTky.
12. Atkinson B, Hearn P, Afrough B, Lumley S, Carter D, Aarons EJ, et al. Detection of Zika virus in semen. Emerg Infect Dis 2016; 22(5): 940.
13. Reusken C, Pas S, GeurtsvanKessel C, Mogling R, van Kampen J, Langerak T, et al. Longitudinal follow - up of Zika virus RNA in semen of a traveller returning from Barbados to the Netherlands with Zika virus disease, March 2016. Euro Surveill 2016; 21(23): pii=30251. (4 pages).

14. Bingham AM, Cone M, Mock V, Heberlein – Larson L, Stanek D, Blackmore C, et al. Comparison of test results for Zika virus RNA in urine, serum, and saliva specimens from person with travel – associated Zika virus diseases – Florida, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016; 65(18): 475 – 8.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Interim guidance for Zika virus testing of urine – United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016; 65(18): 474.
16. หนังสือกระทรวงสาธารณสุขที่ สธ 0436.2/279 วันที่ 25 มกราคม 2560 เรื่อง ขอปรับมาตรการป้องกันการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสซิกา (Zika virus disease) จากมาตรการระยะฉุกเฉินเป็นมาตรการระยะยาว. นนทบุรี: สำนักโรคติดต่ออุบัติใหม่ กรมควบคุมโรค; 2560.
17. กองโรคติดต่ออันตรายโดยแมลง สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1 – 12 สถาบันป้องกันควบคุมโรคเขตเมือง. รายงานพยากรณ์โรคไข้เลือดออก ปี 2563. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 18 พ.ค. 2564]: [77 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://direct.disaster.go.th/site7/cms-download_content.php?did=32461

Epidemiology of Zika Virus Disease in Thailand, during 2016-2020

Sumalee Chanama¹ Pattara Wongjaroen¹ Sirirat Naemkhunthot¹ Laddawan Meephaendee¹
Arisara Posanacharoen¹ Pongsiri Tanthong¹ Husneeyah Vateh¹ Sarinee Chumnanraksa¹
Wararat Jamfa¹ and Areerat Sa-ngasang²

¹National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Nonthaburi 11000

²Retired Government Official, 690/25 Bang Kraso, Amphoe Mueang, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Zika disease is an important mosquito-borne disease in Thailand and the most appropriate laboratory diagnostic test for the disease is the ZIKV RNA detection in serum and/or urine by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The objective of this study was the epidemiological survey for Zika disease in Thailand between 2016 and 2020, employing laboratory diagnostic test. A total of 12,820 serum and urine specimens collected from 9,559 patients were tested for Zika virus (ZIKV) by real-time RT-PCR using 3 sets of primer/probe specific to prM, E and NS2b genes. The results showed that 918 samples were positive (7.16%). The highest positive rate (23.38%) was in the age group 25-34 year old while both 15-24 and 35-44 age group showed the same positive rate (16.01%). The confirmed ZIKV cases were distributed in 35 provinces of Thailand. The top 3 provinces were Bangkok, Bungkan and Nonthaburi, respectively.

Keyword: Zika virus, Zika virus disease, Epidemiology

Comparison of Efficacy of Crocodile Blood Extract against Inhibition of Cell Viability in Hepatocellular Carcinoma and Human Cholangiocarcinoma Cell Lines

Rassameepen Phonarknguen¹ Kanjana Assawasuparerk² and Thanakorn Rawangchue³

¹The Monitoring and Surveillance Center for Zoonotic Disease in Wildlife and Exotic Animals,

²Department of Pre-Clinical and Applied Animal Science, ³The Center for Veterinary Diagnosis, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Phutthamonthon, Nakhon Pathom 73170, Thailand

ABSTRACT Crocodile (*Crocodylus siamensis*) blood extracts (CE) consisting of natural active peptides, which are used in cancer therapy. This study investigated the activity of CE and their effects on cell viability of hepatocellular carcinoma (HepG2) and human cholangiocarcinoma (HuCCA) cell lines by MTT assay. A range from 100 to 1,600 µg/mL of CE decreased the viability of HepG2 and HuCCA cells as compared with control group, while CE statistically reduced cell viability of HepG2 more than HuCCA cells ($p < 0.001$). The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of CE on HepG2 and HuCCA cells dose suggested to approximately 120.36 µg/mL and 846.28 µg/mL, respectively. The treatment of CE could induce nuclear morphological changes apoptotic cells, nuclear chromatin condensation and fragmentation by Hoechst 33342 staining. In conclusion, CE could inhibit cell viability and induce apoptosis in HepG2 and HuCCA cells and it could reduce cell viability of HepG2 cells more than HuCCA cells. This study indicated that CE had more promising treatment of hepatocellular carcinoma than cholangiocarcinoma *in vitro* study.

Keywords: Crocodile blood extract, Cell viability, Apoptosis, Hepatocellular carcinoma, Cholangiocarcinoma

Corresponding author E-mail: thanakhorn.raw@mahidol.ac.th

Received: 9 February 2021

Revised: 12 June 2021

Accepted: 13 July 2021

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) and cholangiocarcinoma (CCA) are two main histological types of liver cancer.⁽¹⁾ Liver cancer originated from either the liver or structure within liver, such as blood vessels and bile duct. HCC and CCA are malignant cancer. These cancers are crucial public health problem worldwide. The incidence of the cancer can find throughout the world. It is relatively common in developing countries.^(2, 3) In particular, the incidence of cancer is very high in Thailand. The highest incidence is in the northeast of Thailand, where chronic infection with hepatitis B (HBV) and the liver fluke, *Opisthorchis viverrini* is the major risk factor for the progression of liver cancer.⁽³⁾ Both HCC and CCA are highly incurable disease.⁽¹⁾ Curative option in the cancer presently remains rather unclear. Moreover, resection of cancer, liver transplantation, radiotherapy and chemotherapy are still a matter strong debate with many reasons for the best treatment. One of the treatments for HCC and CCA is chemotherapy by 5-fluorouracil (5-FU), which however is rather ineffective.⁽⁴⁾ The combined treatment of chemotherapy with radiotherapy in HCC and CCA causes severe side effects without significantly improving the prognosis of a patient.⁽⁵⁾ Therefore, alternative therapies without side effects have been widely sought after. Natural products have been a source of medication efficacious drugs.⁽⁶⁾ Crocodile blood from Siamese Crocodile (*Crocodylus siamensis*) has bioactive compounds such as hemoglobin, plasma, serum and white blood cell. These compounds have been suggested to contain numerous types of antimicrobial agents.^(7, 8, 9) Antimicrobial agents have been reported to be a propitious anticancer remedy. Previous research suggested that some antimicrobial substances show anticancer properties which these substances can reduce cancer cell viability.⁽¹⁰⁾ Therefore, antimicrobial substances are being vastly studied to define whether they can function as anticancer drugs.⁽¹¹⁾ White blood cells extract from Siamese crocodile are considered a prime source of natural active peptides, which are used in the treatment of cancer. Previous studies found that the crocodile leukocyte peptide could inhibit human cervical cancer cells (HeLa), human lung cancer,^(12, 13, 14) human colon cancer cells (Caco-2)^(13, 14) human prostate cancer cells (LNCaP and PC-3) and human breast cancer cells (MCF-7).⁽¹⁴⁾ However, effect of crocodile blood extract on hepatocellular carcinoma and human cholangiocarcinoma cells has not formerly been determined. In this research, we evaluated the effect of crocodile blood extract on hepatocellular carcinoma (HepG2) and human cholangiocarcinoma (HuCCA) cell viability *in vitro*. To our knowledge, this is the first report of crocodile blood extract to inhibit of HepG2 and HuCCA cells. In addition, this is comparison of the efficacy of crocodile blood extract against hepatocellular carcinoma and human cholangiocarcinoma cell inhibition.

Material and Methods

Chemical and reagents

Crocodile blood was obtained from a farm in Kanchanaburi province. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) was purchased from Invitrogen-Gibco (Grand Island, NY, USA). Fetal

bovine serum (FBS) was purchased from Hyclone USA. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 5-fluorouracil (5-FU), Hoechst 33342 and Dimethylsulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma Inc., USA. Other common chemicals and reagents were received from the Monitoring and Surveillance Center for Zoonotic Diseases in Wildlife and Exotic Animals, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University Thailand.

Cell culture and cell lines

Human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) was received from the Monitoring and Surveillance Center for Zoonotic Diseases in Wildlife and Exotic Animals, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University. Human cholangiocarcinoma cell line (HuCCA) was provided by Associate Professor Dr. Adisak Wongkajornslip, the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University. HepG2 and HuCCA cells were cultured in DMEM added 10% FBS, Penicillin (100IU/mL) and streptomycin (100 µg/mL). Both cells were kept at 37 °C in an incubator with a humidified atmosphere of 95% and 5% (v/v) CO₂.

Crocodile blood extract (CE) preparation

Crocodile blood extracts were prepared as formerly explained.^(9, 15) Concisely, the crocodile blood extracts were sonicated with a High Intensity Ultrasonic Processor (Sonic, VC 500) (pulse on 5s, pulse off 10s, 40% amplitude, at 4 °C for 20 min) and centrifuged with refrigerator centrifuge HERMLE Z383K at 4 °C 12,000 rpm for 20 min. The supernatant was dried using vacuum chamber and freeze drier. Next, the extracts were dissolved in 1x PBS (pH 7.4). The protein concentrations were measured by BCA protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

The research protocol was conducted by National Research Council (NRC), Thailand and was approved by a committee of Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Thailand, animal use license no: U1-01313-2558.

Treatment of cell lines with CE and cytotoxicity analysis

HepG2 and HuCCA cells were seed into 96 well plates and incubated under 5% CO₂ at 37 °C for 24 h. After that both cells were treated with different concentration of ether CE or 5-FU (100, 200, 400, 800, 1,600 µg/mL), control (0 µg/mL) for 48 h. Later moving the media, the 100 µL of MTT solution was added in each well and incubated for 4 h at 37 °C.⁽¹⁶⁾ After 4 h, the media was forsaken and added serum-free media. Then, DMSO 100 µl was added to each well to solubilize the purple formazan yield and incubated for 5 min in the dark at room temperature. Absorbance was measured at 490 nm using a microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA). The results were used to assess 50% inhibition concentration (IC₅₀) or concentration that cause 50% loss of cell viability. The IC₅₀ was calculated by GraphPad Prism program version 8.0.1 (244) Software. The cytotoxicity was measured by The MTT assay. The experiments were done three independent trials.

Analysis of apoptosis by nuclear staining

The nuclear condensation and fragmentation indicative of apoptosis was evaluated by Hoechst 33342 (Sigma, USA) nuclear staining. After incubation with CE for 48 h, the culture media were removed, the cells were washed two times with cold phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with cold methanol and acetic acid (3/1 v/v) at 4 °C overnight. Afterward, the cells were stained with Hoechst 33342 for 30 min the dark at room temperature. Next, cells were washed with PBS two times and assessed under a fluorescent microscope (Nikon, NIS-Elements).

Statistical analysis

Data of cell viability were presented as mean $\pm$ SD from three independent experiments. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism program version 8.0.1 (244) Software. Two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post-test were used to compare the differences between treatments and control group. All data were considered statistically significant at p -values < 0.05 .

Results

Cytotoxicity of CE on HepG2 and HuCCA cells

After treatment with CE for 48 h, the viabilities of HepG2 and HuCCA cells were decreased in a concentration-dependent manner from 100–1,600 $\mu\text{g/mL}$ as compared with control group. CE could decrease cell viability of HepG2 cells more than HuCCA cells (Figure 1). In addition, the effect of CE on HepG2 and HuCCA cell viability were compared with treatment 5-FU for 48 h. The results showed that CE could reduce HepG2 cell viability similar effect to the 5-FU treatment. At the CE dose 1,600 $\mu\text{g/mL}$, the inhibitory effect on cell viability was 1.99 times more than 5-FU at the same dose (Figure 2A). Whereas, HuCCA cells treated with CE found that CE could decrease HuCCA cell viability lower than 5-FU treatment (Figure 2B). The average 50% inhibitory concentrations (IC_{50}) of CE on HepG2 and HuCCA cells were 120.36 $\mu\text{g/mL}$ and 846.28 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Meanwhile, IC_{50} of 5-FU on HepG2 and HuCCA cells were 77 $\mu\text{g/mL}$ and 103 $\mu\text{g/mL}$ (Table 1).

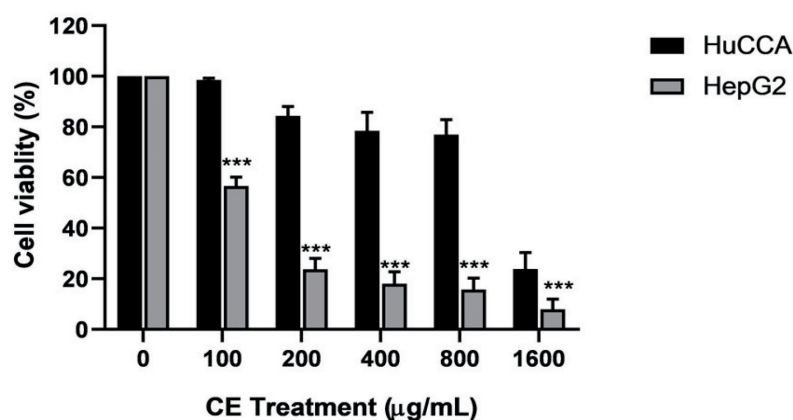


Figure 1 Comparison the cell viability of HepG2 and HuCCA cells after treatment with CE at various concentration for 48 h. All values are presented in mean $\pm$ SD, *** $p < 0.001$.

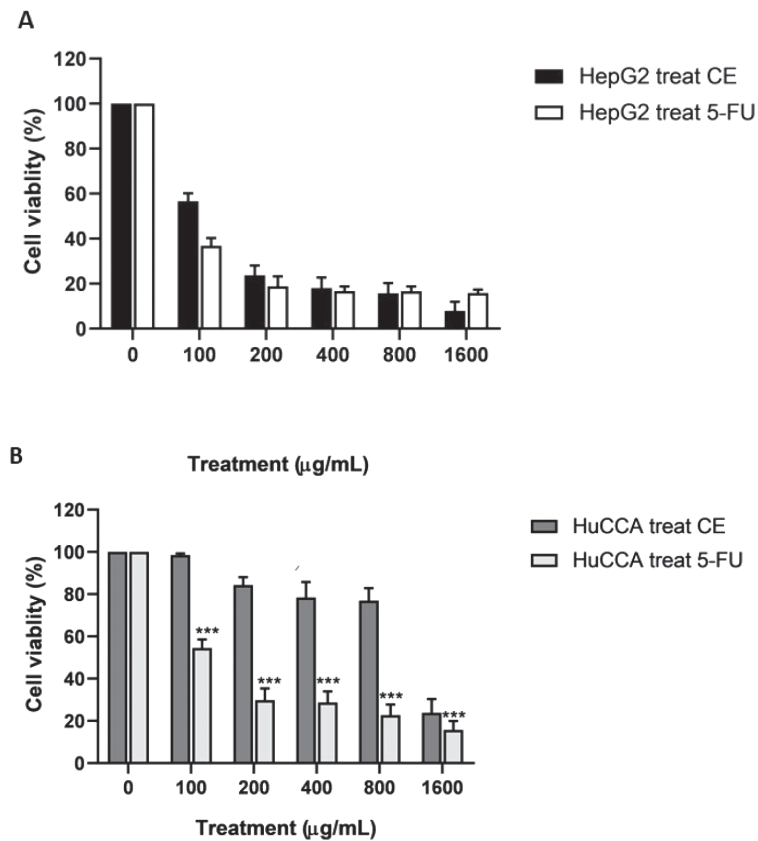


Figure 2 Cell viability of HepG2 and HuCCA cells after treatment with CE at various concentration for 48 h compared with 5-FU. (A) Cell viability of HepG2 cells. (B) Cell viability of HuCCA cells. All values presented in mean $\pm$ SD. *** $p < 0.001$.

Table 1 The average 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of CE and 5-FU on HepG2 and HuCCA cells.

Cell	Treatment	IC ₅₀ µg/mL
HepG2	CE	120.36
	5-FU	77
HuCCA	CE	846.28
	5-FU	103

CE induced HepG2 and HuCCA cells apoptosis with characteristic morphological changes

The nuclear morphology changes of treated cells were determined by Hoechst 33342 staining. The results showed chromatin condensation and fragmentation which refer to nuclear damage were presented in treated cells (Figure 3B and 3D) whereas round nuclei were observed in the control cells (Figure 3A and 3C). This result suggested that CE could lead HepG2 and HuCCA cells to under apoptosis.

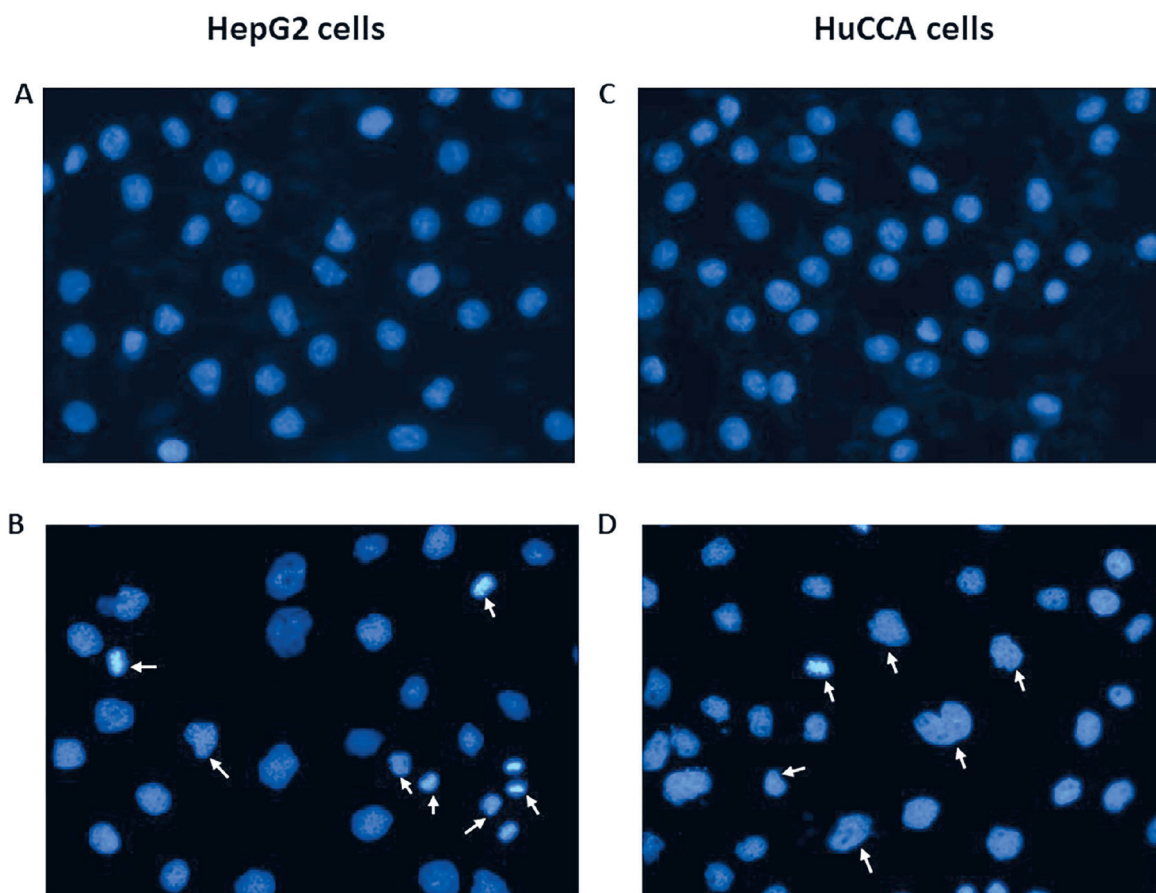


Figure 3 Detection of nuclear morphological changes in HepG2 (A-B) and HuCCA cells (C-D) following CE treatment for 48 h by Hoechst 33342 staining, as observed by fluorescence microscopy at 40x magnification. Control group (A, C) and CE treatment group (B, D). Arrow indicate chromatin condensation and fragmentation.

Discussion

Hepatocellular carcinoma and human cholangiocarcinoma are an important public health problem worldwide. These cancers are relatively common in developing countries. In Thailand, high incidence of hepatocellular carcinoma and human cholangiocarcinoma are especially found in the northeast region. These cancers are highly mortal disease because the cancer is characterized by a poor prognosis and poor response to contemporary therapeutics.^(3, 17) Recently, it has been reported that treatment of hepatocellular carcinoma and human cholangiocarcinoma with chemotherapy and radiotherapy cause severe side effects without improving the prognosis of the patients.⁽⁵⁾ The discovery and development of an effective treatment control of the cancer are desired. The use of natural products for cancer treatment has received a great deal of concentration toward their various health benefits and notable lack of toxicity and side effects. Crocodile blood has a broad range of biological properties. The crocodile blood peptides have antimicrobial potential.^(9, 18, 19, 20) Additionally, extracts from crocodile (*Croccodylus siamensis*) leukocytes have been reported

anticancer activity^(11, 14) against human lung cancer (LU-1), prostate cancer (LNCaP, PC-3), breast cancer, colorectal cancer (CaCo-2) and HeLa cells^(11, 14) While, showed non toxicity to normal cells such as Vero cells and HaCaT cells.⁽¹⁴⁾ The effect of CE on HepG2 and HuCCA cells have not formerly reported and this is the first study that we examined its effects on HepG2 and HuCCA cells. The results indicated that treatment with CE could decrease cell viability of HepG2 and HuCCA cells. Notably, CE showed decrease cell viability of HepG2 cells by 2.08 times higher than HuCCA cells. Thus, the data demonstrated that CE shows a broad spectrum of antiproliferation against HepG2 and HuCCA cells. Moreover, the data showed that CE and 5-FU displays the similar potentiality on the decrease in HepG2 cell viability at the same dosage. However, CE treatment reduced the viability of HuCCA cells by 1.84 times less than 5-FU treatment. This study indicated that apoptosis was induced following treatment with CE. HepG2 and HuCCA cells were likely adjusted through apoptosis by which nuclear morphological changes consist of chromatin condensation and fragmentation. Hence, the CE treatment of HepG2 and HuCCA cells could reduce cell viability due to increase apoptotic cells. Mechanism of apoptosis in HepG2 and HuCCA cells by CE also awaits further study.

Conclusion

In conclusion, our study indicated that CE could inhibit the viability of HepG2 and HuCCA cells by the induction of apoptotic cells. Furthermore, CE could decrease cell viability of HepG2 cells more than HuCCA cells. Therefore, CE has more promising remedy of hepatocellular carcinoma than cholangiocarcinoma *in vitro*, which can be used for information further study *in vivo*.

Acknowledgements

This research was financially supported by Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Thailand. We are grateful to the Monitoring and Surveillance Center for Zoonotic Disease in Wildlife and Exotic Animals Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Thailand.

References

1. Srivatanakul P, Sriplung H, Deerasamee S. Epidemiology of liver cancer: an overview. Asian Pac J Cancer Prev 2004; 5(2): 118-25.
2. Srivatanakul P, Parkin DM, Jiang YZ, Khlat M, Kao-lan UT, Sontipong S, et al. The role of infection by *Opisthorchis viverrini*, hepatitis B virus, and aflatoxin exposure in the etiology of liver cancer in Thailand. A correlation study. Cancer 1991; 68(11): 2411-7.
3. Srivatanakul P. Epidemiology of liver cancer in Thailand. Asian Pac J Cancer Prev 2001; 2(2): 117-21.
4. Hejna M, Pruckmayer M, Raderer M. The role of chemotherapy and radiation in the management of biliary cancer: a review of the literature. Eur J Cancer 1998; 34(7): 977-86.

5. Sirica AE. Cholangiocarcinoma: molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy. *Hepatology* 2005; 41(1): 5-15.
6. Battle TE, Arbiser J, Frank DA. The natural product honokiol induces caspase-dependent apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. *Blood* 2005; 106(2): 690-7.
7. Preecharram S, Daduang S, Bunyatratchata W, Araki T, Thammasirirak S. Antimicrobial activity from Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum. *Afr J Biotechnol* 2008; 7(17): 3121-8.
8. Preecharram S, Jearranaiprepame P, Daduang S, Termsiripong Y, Somdee T, Fukamizo T, et al. Isolation and characterisation of crocosin, an antibacterial compound from crocodile (*Crocodylus siamensis*) plasma. *Anim Sci J* 2010; 81(3): 393-401.
9. Pata S, Yaraksa N, Daduang S, Termsiripong Y, Svasti J, Araki T, et al. Characterization of the novel antibacterial peptide Leucrocine from crocodile (*Crocodylus siamensis*) white blood cell extracts. *Dev Comp Immunol* 2011; 35(5): 545-53.
10. Hoskin DW, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778(2): 357-75.
11. Patathananon S, Thammasirirak S, Daduang J, Chung JG, Termsiripong Y, Daduang S. Bioactive compounds from crocodile (*Crocodylus siamensis*) white blood cells induced apoptotic cell death in HeLa cells. *Environ Toxicol* 2016; 31(8): 986-97.
12. Ou Y, Ho WS. Crocodile blood extract induces the apoptosis of lung cancer cells through PTEN activity. *Oncol Rep* 2016; 36(3): 1457-66.
13. Maraming P, Klaynongsruang S, Boonsiri P, Maijaroen S, Daduang S, Chung JG, et al. Antitumor activity of RT2 peptide derived from crocodile leukocyte peptide on human colon cancer xenografts in nude mice. *Environ Toxicol* 2018; 33(9): 972-7.
14. Phosri S, Jangpromma N, Chang LC, Tan GT, Wongwiwatthanakul S, Maijaroen S, et al. Siamese crocodile white blood cell extract inhibits cell proliferation and promotes autophagy in multiple cancer cell lines. *J Microbiol Biotechnol* 2018; 28(6): 1007-21.
15. Merchant ME, Leger N, Jerkins E, Mills K, Pallansch MB, Paulman RL, et al. Broad spectrum antimicrobial activity of leukocyte extracts from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 110(3-4): 221-8.
16. Bridges CC, Battle JR, Zalups RK. Transport of thiol-conjugates of inorganic mercury in human retinal pigment epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 221(2): 251-60.
17. Bragazzi MC, Cardinale V, Carpino G, Venere R, Semeraro R, Gentile R, et al. Cholangiocarcinoma: epidemiology and risk factors. *Transl Gastrointest Cancer* 2012; 1(1): 21-32.
18. Yaraksa N, Anunthawan T, Theansungnoen T, Daduang S, Araki T, Dhiravisit A, et al. Design and synthesis of cationic antibacterial peptide based on Leucrocine I sequence, antibacterial peptide from crocodile (*Crocodylus siamensis*) white blood cell extracts. *J Antibiot (Tokyo)* 2014; 67(3): 205-12.

19. Anunthawan T, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW, Klaynongsruang S. Cationic amphipathic peptides KT2 and RT2 are taken up into bacterial cells and kill planktonic and biofilm bacteria. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1848(6): 1352-8.
 20. Barksdale SM, Hrifko EJ, van Hock ML. Cathelicidin antimicrobial peptide from Alligator mississippiensis has antibacterial activity against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Dev Comp Immunol* 2017; 70: 135-44.
-

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดเลือดจระเข้ ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมนุษย์

รัศมีเพ็ญ โพธิ์นาคนเงิน¹ กาญจนา อัสวศุภฤกษ์² และธนกร ระวังชื่อ³

¹ศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจากสัตว์ป่า สัตว์ต่างถิ่น และสัตว์อพยพ ²ภาควิชาปรีคลินิกและสัตวศาสตร์ประยุกต์

³ศูนย์ตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พุทธมณฑล นครปฐม 73170

บทคัดย่อ สารสกัดเลือดจระเข้ (Crocodile blood extract) ประกอบด้วยเปปไทด์ธรรมชาติซึ่งถูกใช้ในการรักษามะเร็ง การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดเลือดจระเข้ต่อการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมนุษย์ด้วยวิธี MTT assay ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดเลือดจระเข้ขนาด 100 ถึง 1,600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลดการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งตับได้มากกว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ค่าความเข้มข้นของสารสกัดเลือดจระเข้ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ 50% (IC_{50}) ต่อเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมนุษย์ คือ 120.36 และ 846.28 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเลือดจระเข้จะเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสโดยทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียส เช่น มีการหดตัวและการแตกของสายโครมาติน ด้วยการย้อม Hoechst 33342 สรุปผลการศึกษาได้ว่า สารสกัดเลือดจระเข้สามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมนุษย์ได้โดยสารสกัดเลือดจระเข้จะยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งตับได้มากกว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมนุษย์ การศึกษาครั้งนี้ยังชี้ให้เห็นว่าสารสกัดเลือดจระเข้มีแนวโน้มในการรักษามะเร็งตับมากกว่ามะเร็งท่อน้ำดีที่ได้จากการทดลองในหลอดทดลอง

คำสำคัญ: สารสกัดเลือดจระเข้, การมีชีวิตอยู่ของเซลล์, อะพอพโทซิส, มะเร็งตับ, มะเร็งท่อน้ำดี

The Acute and Sub-Chronic Oral Toxicity Testing of *Cordyceps militaris* in Wistar Rats

Kittigan Suwannasaroj Passaraporn Srimangkornkaew Pakamon Yottharat
and Aunchalee Sirimontaporn

National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand

ABSTRACT *Cordyceps militaris* consists of Cordycepin, Adenosine, Polysaccharides and other compounds. For many countries including Thailand used *C. militaris* as an ingredient of a dietary supplement for many years. Whereas, toxicological testing data of *C. militaris* has less been to conduct. This study was conducted for the toxicity assessment of *C. militaris* by acute and sub-chronic oral toxicity testing in Wistar rats. The evaluation of *C. militaris* for acute oral toxicity in Wistar rats were performed at dose level 300 and 2,000 mg/kg body weight according to OECD Guidelines for the testing of chemicals 423, Acute Oral Toxicity –Acute Toxic Class Method. The results in all animals were not shown signs of toxic effects, moribund and mortality. Thus, *Cordyceps militaris* was classified in GHS (Globally Harmonised System for Classification and labeling of Chemicals) category 5 or unclassified, the LD₅₀ cut off at 5,000 mg/kg body weight to infinity (∞). The sub-chronic oral toxicity of *C. militaris* was performed and the methodology was modified from OECD Guideline for testing of chemicals 408, Repeated Dose 90-Days Oral Toxicity Study in Rodent. The assessment and evaluation of toxic effects were investigated at the dose levels 5, 20 and 80 mg/kg body weight of *C. militaris* in Wistar rats and the result conclude that, the no observed adverse effect level (NOAEL) of *C. militaris* was considered to be 80 mg/kg body weight per day for Wistar rats.

Keywords: *Cordyceps militaris*, Acute oral toxicity, Sub-chronic oral toxicity, OECD Guidelines 423, OECD Guidelines 408

Corresponding author E-mail: kittigan.suw@mahidol.edu

Received: 22 February 2021

Revised: 11 July 2021

Accepted: 17 July 2021

Introduction

The *Cordyceps militaris* has several bioactive compounds such as cordycepin, adenosine, polysaccharides, amino acid, sterols, cordycepic acid and multivitamins.^(1, 2, 3, 4) These compounds exhibit various beneficial biological activities such as anticancer,⁽⁵⁾ immunomodulatory, antioxidant,⁽⁶⁾ antifibrotic,⁽⁷⁾ renal protective,⁽⁸⁾ anti-inflammatory,⁽⁹⁾ antiangiogenic^(9, 10) and anti-diabetic.⁽¹¹⁾ Thus, *C. militaris* is one of the most important fungi in traditional Chinese medicine that using for the treatment of asthma, bronchial and lung inflammation⁽¹²⁾ including longevity promoting herbs.^(13, 14) *C. militaris* has been sold as dietary supplements through online marketing and television in many countries including Thailand. Consequently, the safety assessment in animals should be evaluated before initial use in humans. However, the toxicity study of *C. militaris* has less been conducted.^(4, 15, 16, 17) Therefore, the purpose of this study is to estimated acute oral toxicity of *C. militaris* in Wistar rats complied with OECD Guidelines for the testing of chemicals 423, Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method.⁽¹⁸⁾ Then, sub-chronic oral toxicity of *C. militaris* in Wistar rats was performed to confirm the edible safety and evaluate the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) for long term use. The methodology of this study modified form OECD Guideline for testing of chemicals 408, Repeated Dose 90-Days Oral Toxicity Study in Rodent.⁽¹⁹⁾

Materials and Methods

Cordyceps militaris powder

Cordyceps militaris powder has a bright orange color which storage at room temperature, away from heat, sunlight, oxygen and moisture. The constituent of *Cordyceps militaris* powder had cordycepin and adenosine for 0.289 and 0.037 % wt/wt, respectively and the stability was one year after manufacture date. The level of microbial contaminants monitored by laboratory of Quality Control Office, National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand for aerobic plate count and coliform were less than 300 cfu/g and 3 MPN/g, respectively.

Preparation of the Dose

For acute oral toxicity, the *C. militaris* powder were calculated at 300 and 2,000 mg/kg body weight and freshly mixed with distilled water as vehicle prior to administration. In the sub-chronic oral toxicity, the 3 dose levels (low, medium and high dose) of *C. militaris* were 5, 20 and 80 mg/kg body weight and freshly mixed with distilled water prior to administration. The constant volume was not exceeded 1 ml per 100 g of animal body weight.

Preparation of Animals:

The 50 males and 50 females of Wistar rats were used for sub-chronic oral toxicity but the acute oral toxicity used only 12 females of Wistar rats. The Wistar rats was *Rattus norvegicus*

species, Mlac: WR stain and body weight range $200 \text{ g} \pm 20$ which were obtained from Office of Laboratory Animal Production, National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand.

Animals Husbandry Conditions

The animals were husbandry under standard conditions 12 hours light, 12 hours dark at temperature $22 \pm 3^\circ\text{C}$ and 30–70% relative humidity which were housed in stainless steel cages with food (082, Perfect Companions, Thailand) and 5–7 ppm chlorinated water ad libitum. All the animals were quarantined 1 day and acclimatized at least 5 days prior to the study. Guidelines of “Guide for the care and use of laboratory animals” were strictly followed throughout the study.⁽²⁰⁾ The study was approved by National Laboratory Animal Center Animal Care and Use Committee (NLAC-ACUC), Mahidol University, Thailand, code RA2017-37 and RA2017-38 for acute and sub-chronic oral toxicity testing, respectively.

Administration of Dose

The acute oral toxicity: The test substance at the dose level 300 and 2,000 mg/kg body weight was administered orally to the animal in a single dose by gavage using stainless steel stomach tube and all animals were kept for over-night (15–18 hours) fasting (feed but not water) prior to administration. The *Cordyceps militaris* was administered orally to 3 animal of group 1 at 300 mg/kg body weight, if no animals or one animal was shown evidence of toxicity, moribund state or mortalities, new three animals of group 2 were repeated at 300 mg/kg body weight. After that, three animals in group 3 were administrated with the next dose level (2,000 mg/kg body weight) if no animals or one animal was shown evidence of toxicity, moribund state or mortalities new 3 animals of group 2 were repeated again at 2,000 mg/kg body weight. The animal was observed after administration for toxic effect at first 30 minutes with special attention given during the first 4 hours, periodically during the first 24 hours. The time between treatment groups was determined until confident of previously dose animals, 24 hours for this study.

The sub-chronic oral toxicity: The 50 male and 50 female of Wistar rats were used and randomized into 5 groups (10 animal per sexes/20 animal per group). In group 1 – control group (vehicle control; distilled water), group 2 – low dose, group 3 – middle dose and group 4 – high dose (5, 20 and 80 mg/kg body weight of *Cordyceps militaris*, respectively) and group 5 – recovery group (once daily for 90 days at 80 mg/kg body weight of *Cordyceps militaris* and no administrated by gavage for the following 14 days). The dosage of administration to each animal was calculated based on the body weight of animal prior to administrate at a constant volume not exceed 1 ml per 100 g body weight.

Observation

The observations were included changes in skin and fur, eye and mucous membranes, respiratory, circulatory, autonomic and central nervous systems, somatomotor activity and be-

haviour pattern daily. Addition will be directed to observations of tremors, convulsions, gasping, cyanosis, vocalization, salivation, diarrhoea, lethargy, sleep and coma. The data of animal body weights, feed and drinking water consumption were measured and recorded weekly throughout the termination period.

Necropsy Examination, Hematological and Clinical Biochemistry Analysis

On the last day of each group for the study, the animals were kept overnight (15 - 18 hours) fasting and then euthanized using CO₂ inhalation.⁽²¹⁾ Blood samples were collected via cardiac puncture and were separated 2 tubes which first tube for hematological (200 µl) and second tube has EDTA tube for clinical biochemistry analysis (800 µl). Hematological analysis was analyzed using automated analyzer (Procyte DxTM, IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA) following the parameters: Red blood cell count (RBC), Hemoglobin (HGB), Hematocrit (HCT), Mean corpuscular volume (MCV), Mean corpuscular hemoglobin (MCH), Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), Reticulocyte count (RET), Reticulocyte hemoglobin (RET - He), Platelet (PLT), Mean platelet volume (MPV), Plateletcrit (PCT), White blood cell count (WBC), Neutrophil (NEUT), Lymphocyte (LYMPH), Monocyte (MONO), Eosinophil (EO) and Basophil (BASO). For the clinical biochemistry analysis was measured by using an automated blood analyzer (Cobas[®] c311, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) that the parameters consisted of Sodium (Na), Potassium (K), Chloride (Cl), Glucose (SGLU3), Cholesterol (CHO2L), Triglyceride (TRIGL), Uric acid (UA2), Blood urea nitrogen (U - BUN), Creatinine (CREA2), Total protein (TP2), Albumin (ALB2), Globulin (GLO), High - density lipoprotein (HDL C4), Low - density lipoprotein (LDL C3), Alanine amino transferase (ALT L), Aspartate amino transferase (AST L) and Alkaline phosphatase (ALP2S).

Organ Weighting

After blood samples collection, all animals were sacrificed. The positions, shapes, sizes and colours of internal organs were evaluated. The organs was measured by using an electronic balance 4 digits (Mettler - Toledo, Columbus, Ohio, USA) and converted the weights to relative organ weights by calculating in the relative weights per 100 g animal body weight.

Analysis of Result:

Quantitative results were expressed as mean $\pm$ standard deviation. The Kolmogorov-Smirnov and Levene's test⁽²²⁾ were statistically analyzed the data for normality and homogeneity of variances. For parametric statistics, all data of vehicle control group and each treatment group were compared by 2-sided Dunnett or Dunnett's T3 test, using ANOVA analysis. On the other hand of non-parametric statistics, Mann Whitney U test was selected for comparison all data of the vehicle control group and each treatment group. A significantly differences were considered at 0.05 levels with SPSS[®] Statistic software version 18.0.0.

Results

The acute oral toxicity of *Cordyceps militaris* in Wistar rats

All tested animals were normally for consumed feed and drinking water including clinical observations and health examinations. Body weights were continued to gain throughout the study and the body weight change was shown as percentage which within range 11.49 – 20.01%. In the necropsy examinations result of all animals were not found any lesion.

The sub-chronic oral toxicity of *Cordyceps militaris* in Wistar rats

Feed, Drinking Water Consumptions and Body Weights

The feed and drinking water consumptions data as consecutive data were shown normal in all animals by means of the result were transient change and no effect on animal health, represented in Figure 1-4. The body weights of all animals were continued to gain throughout the study and the data are presented in Figure 5 and Figure 6 for male and female animals, respectively.

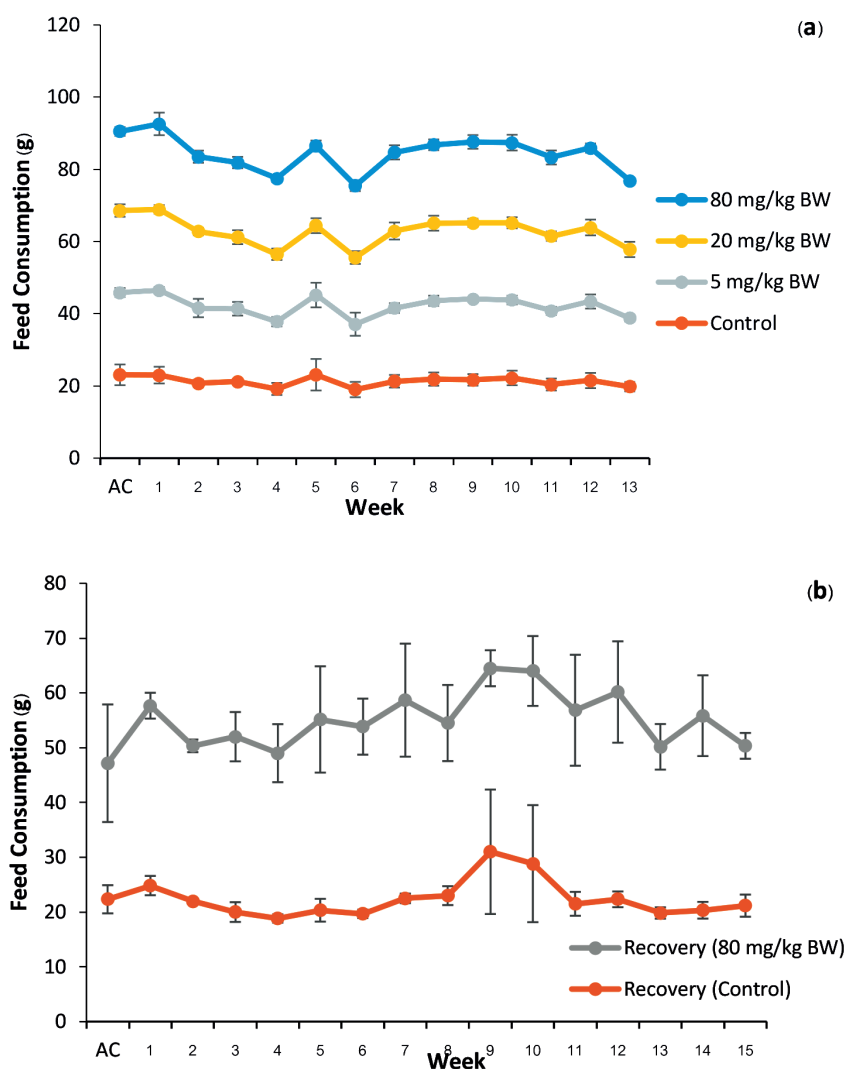


Figure 1 Effect of *Cordyceps militaris* on Feed consumption in male rats treated for 90 days.

(a) Control group, Treatment group (5, 20 and 80 mg/kg BW) (b) Recovery group

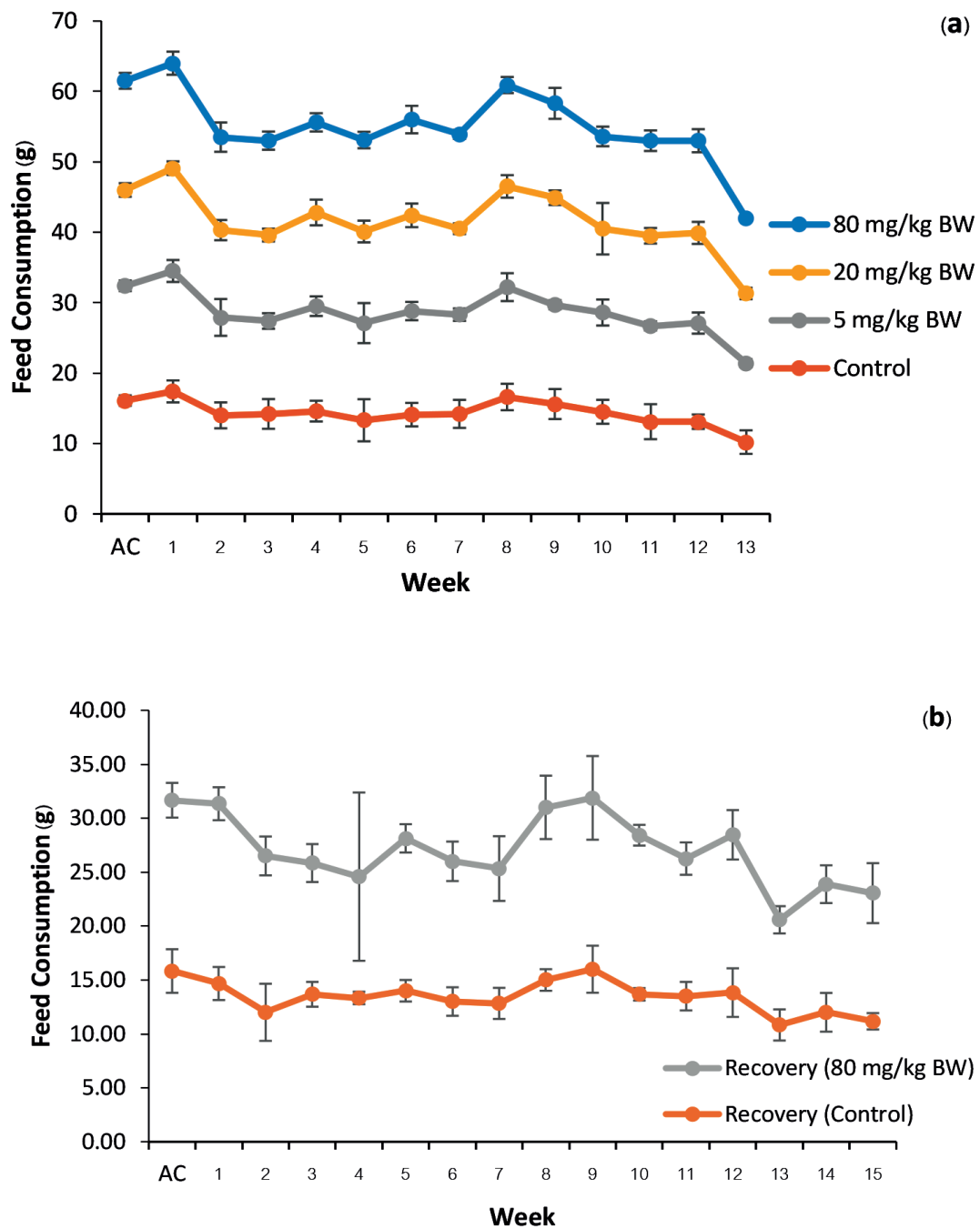


Figure 2 Effect of *Cordyceps militaris* on Feed consumption in female rats treated for 90 days. (a) Control group, Treatment group (5, 20 and 80 mg/kg BW) (b) Recovery group

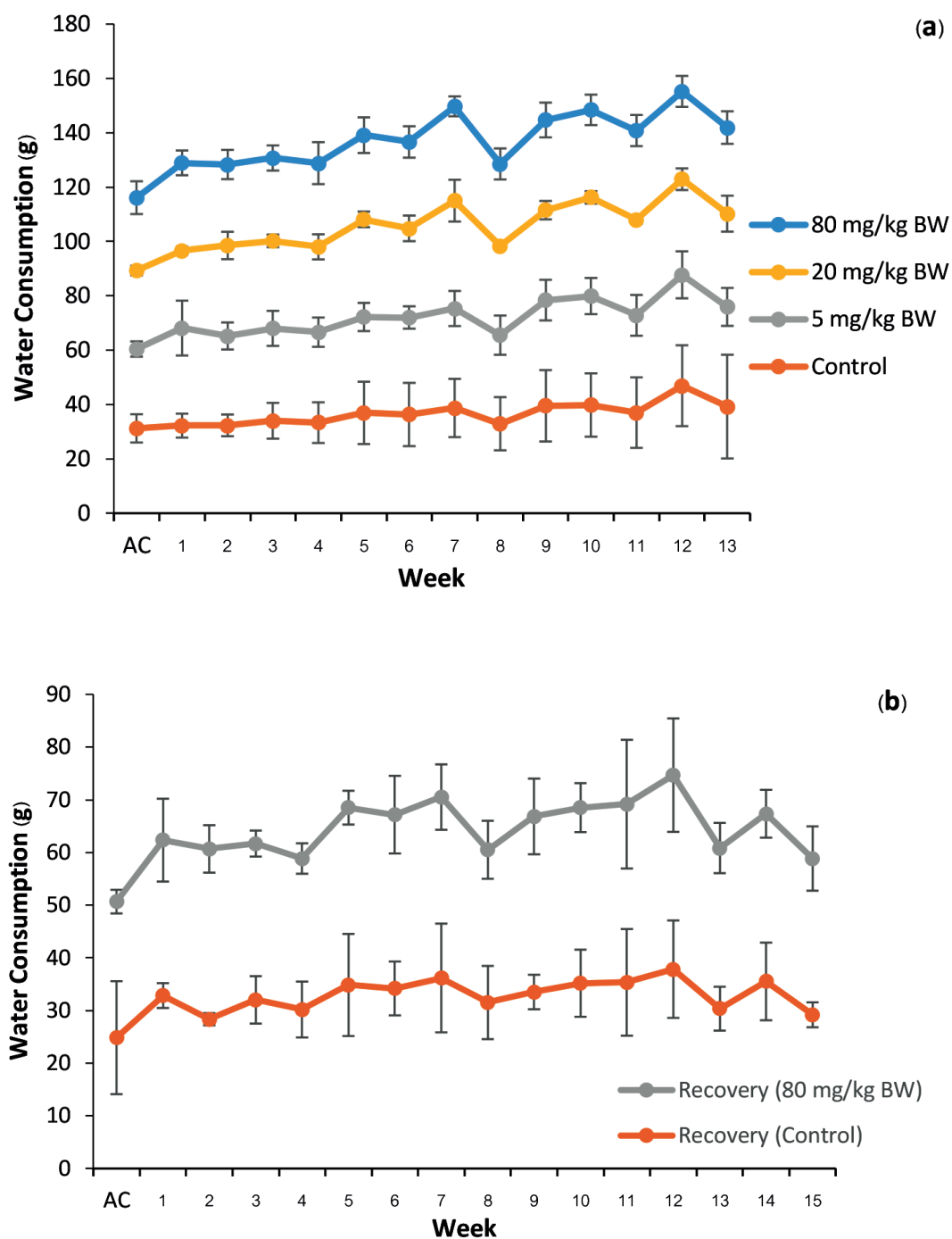


Figure 3 Effect of *Cordyceps militaris* on Water consumption in male rats treated for 90 days
 (a) Control group, Treatment group (5, 20 and 80 mg/kg BW) (b) Recovery group

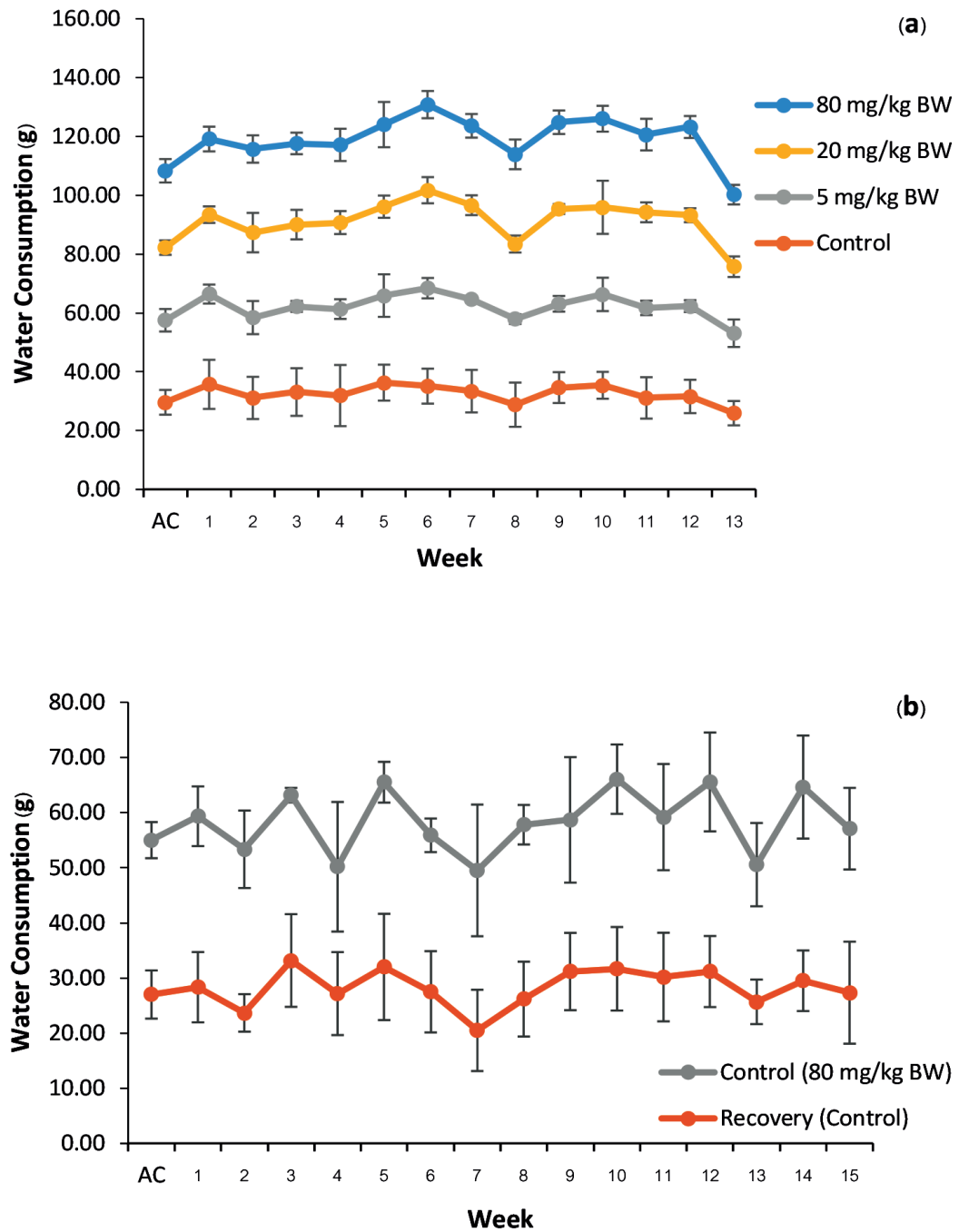


Figure 4 Effect of *Cordyceps militaris* on Water consumption in female rats treated for 90 days
(a) Control group, Treatment group (5, 20 and 80 mg/kg BW) (b) Recovery group

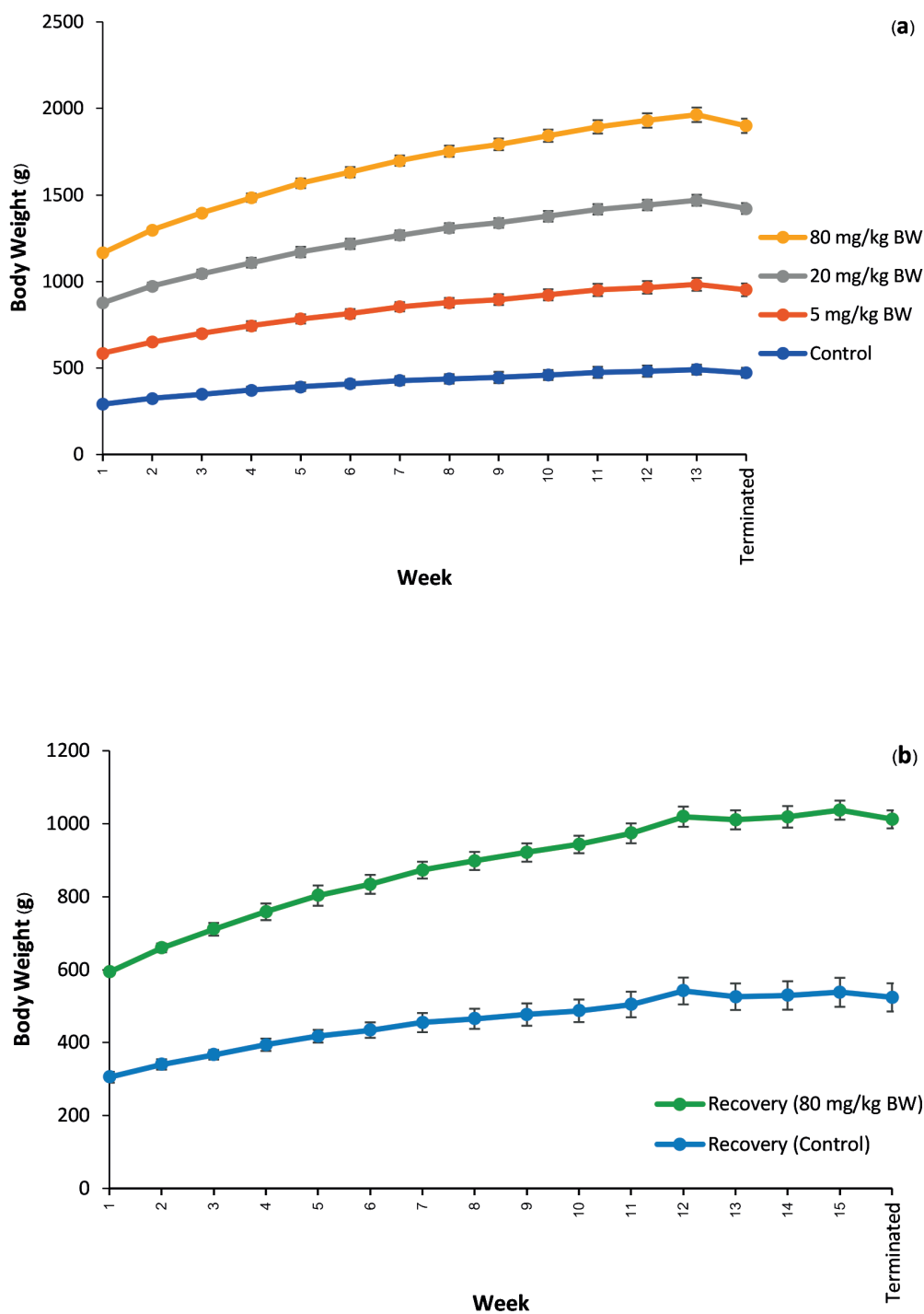


Figure 5 Effect of *Cordyceps militaris* on body weight in male rats treated for 90 days. (a) Control group, Treatment group (5, 20 and 80 mg/kg BW) (b) Recovery group

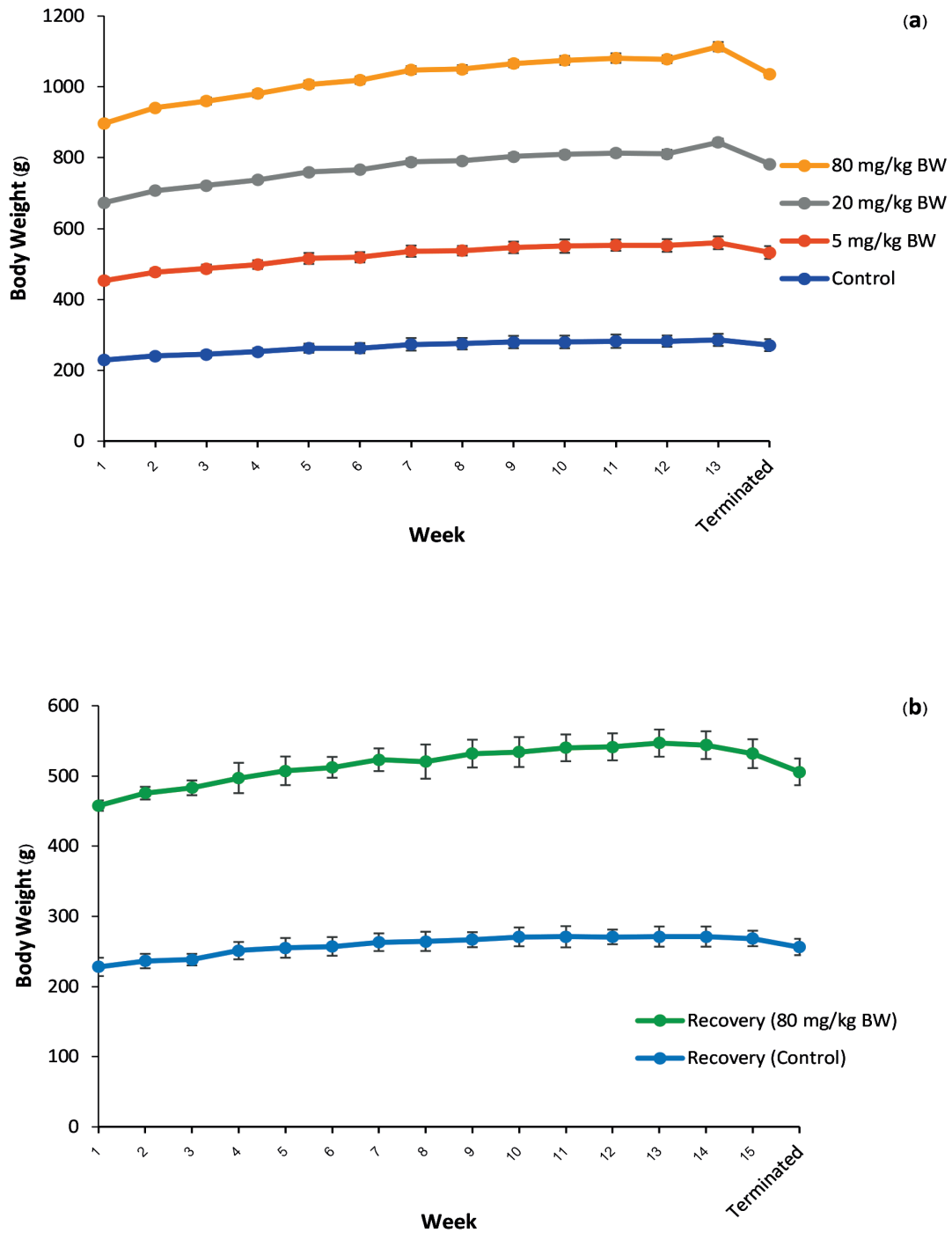


Figure 6 Effect of *Cordyceps militaris* on body weight in female rats treated for 90 days. (a) Control group, Treatment group (5, 20 and 80 mg/kg BW) (b) Recovery group

Observations

All animals were observed according to dosing period for 90 days and recovery period for 14 days which were no change in skin, fur/coat, eyes and mucous membrane, posture and response to handling. The health examinations such as respiratory pattern, social interaction, mobility and activity were normal. Moreover, all animal were not shown any neurological signs.

Necropsy Examination:

For macroscopic finding, petechial hemorrhage of the thymus was observed in control, all treatment group and control recovery group of male as well as in control and high dose group of female. Only one male in control group was observed with a subcutaneous mass on the ventral side of the neck. For abdominal cavity, in medium dose group, 1 of 10 male was observed with oval, yellow, firm, fat nodule (0.5×0.5 cm.) based on the right side and in low dose group, 1 of 10 female was observed with round, smooth, slightly firm, peritoneal fat mass (0.6×0.6 cm) adhesive with abdominal fat at right side based between right kidney and ovary. Besides, the accessory lobe of spleen was found in 2 of 10 females. For microscopic finding, there were no significant difference of severity grading mean between control group (Distilled water) and high dose group (80 mg/kg body weight). In addition, the other lesions which have been well known to occur spontaneously in Wistar rats of the same age were observed.

Hematological and Clinical Biochemistry Analysis

The all result of hematological and clinical biochemistry analysis that shown in Table 1 and 2, respectively. The summary result can be described following the group of dosing:

Low dose group (5 mg/kg BW); the means of WBC and LYMPH for male animal and the means of MPV and WBC for female animal were significantly different higher than control group ($p < 0.05$) but the mean of NEUT and BASO for female animal were significantly different lower than control group ($p < 0.05$). The mean of CREA2 in male animal was significantly different lower than control group ($p < 0.05$).

Medium dose group (20 mg/kg BW); the means of HGB and PCT for male animal were significantly different lower than control group ($p < 0.05$). For the female animal, the means of Na, CREA2, TP2, ALB2, GLO and ASTL were significantly different higher than control group ($p < 0.05$) but the male animal has only the means of CREA2, UA2 and SGLU3 were significantly different higher than control group ($p < 0.05$).

High dose group (80 mg/kg BW); the means of MPV and LYMPH were significantly different higher than control group ($p < 0.05$) for both sexes animal and the mean of WBC that was significantly different higher than control group ($p < 0.05$) only in male animal. Besides that, the male animal had significantly different lower than control group ($p < 0.05$) for the means of NEUT and EO. For the female animal, the means of Na, U - BUN, CREA2 were significantly different

higher than control group ($p<0.05$) and the means of SGLU3 and LDLC3 were significantly different lower than control group ($p<0.05$).

Recovery group (control and 80 mg/kg BW); the means of PCT and NEUT were significantly different lower than control group ($p<0.05$) except the mean of RET – He was significantly different higher than control group ($p<0.05$) for male animal. In female animal, the means of MPV and EO were significantly different higher than control group ($p<0.05$). The mean of UA2 was significantly different lower than control group ($p<0.05$) for male animal but the mean of K in female animal was significantly different higher than control group ($p<0.05$).

Thus, all significantly different parameters of hematological and clinical biochemistry analysis were no treatment related effect except the mean of LDLC3 in high dose group (80 mg/kg body weight) of female animal was treatment related effect. Effects on LDL levels tended to significant decrease with the dose given, in the high dose group including HDL levels were not found to be significantly low. Therefore does not affect for the occurrence of Atherosclerosis which was according to the information from many journal that found of higher LDL and lower HDL levels are high risk of Atherosclerosis.^(23, 24, 25)

Table 1 Hematological Analysis of control and *Cordyceps militaris* treated rat for 90 days

Sex	Parameters	Control	Mean of parameters ± standard deviation			Recovery	
			5	20	80	Control	80
			mg/kg BW	mg/kg BW	mg/kg BW		mg/kg BW
Male	RBC (106/ μ l)	9.91±0.58	9.84±0.36	9.47±0.20	9.86±0.37	9.63±0.36	9.58±0.23
	HGB (g/dl)	17.3±0.68	17.2±0.35	16.7±0.48a	17.1±0.52	16.7±0.32	16.7±0.33
	HCT (%)	54.7±2.58	54.0±1.35	52.5±1.92	53.6±1.94	52.2±1.46	52.2±1.50
	MCV (fl)	55.2±1.20	54.9±1.63	55.4±1.33	54.5±1.15	54.2±1.01	54.5±1.32
	MCH (pg)	17.5±0.48	17.5±0.51	17.6±0.33	17.4±0.37	17.4±0.35	17.5±0.38
	MCHC (g/dl)	31.7±0.35	31.9±0.35	31.8±0.31	32.0±0.25	32.0±0.34	32.0±0.38
	RET (%)	2.78±0.50	2.66±0.37	2.85±0.31	2.51±0.24	2.23±0.44	2.07±0.20
	RET – He (pg)	19.4±0.39	19.4±0.51	19.5±0.25	19.2±0.40	19.3±0.46	19.4±0.23b
	PLT (103/ μ l)	916±123.75	910±52.83	820±76.25	908±102.71	855±48.20	883±75.43
	MPV (fl)	7.1±0.19	7.3±0.15	6.9±0.24	7.4±0.20a	6.9±0.23	7.1±0.23
	PCT (%)	0.65±0.08	0.66±0.04	0.57±0.05a	0.67±0.07	0.59±0.02	0.62±0.06b
	WBC (106/ μ l)	6.46±1.02	7.99±1.47a	6.40±1.20	8.18±1.28a	6.02±0.81	9.46±1.19
	NEUT (%)	13.3±2.69	9.0±2.17a	12.6±2.73	9.0±2.16a	14.7±3.51	9.6±1.24b
	LYMPH (%)	80.8±3.17	85.4±2.66a	80.8±2.60	85.7±2.35a	77.2±2.79	85.4±1.19
	MONO (%)	4.9±2.38	4.8±1.37	5.6±1.78	4.7±1.44	7.0±1.19	4.2±0.94
	EO (%)	0.8±0.28	0.7±0.25	0.9±0.30	0.5±0.19a	1.1±0.53	0.8±0.22
	BASO (%)	0.2±0.12	0.0±0.07a	0.1±0.09	0.1±0.07	0.0±0.09	0.0±0.05

Table 1 Hematological Analysis of control and *Cordyceps militaris* treated rat for 90 days (Continued)

Sex	Parameters	Control	Mean of parameters ± standard deviation			Recovery	
			5	20	80	Control	80
			mg/kg BW	mg/kg BW	mg/kg BW		mg/kg BW
Female	RBC (106/ μ l)	9.19±0.30	9.38±0.50	9.20±0.62	9.65±0.65	8.96±0.47	9.36±0.71
	HGB (g/dl)	17.0±0.44	17.1±0.76	17.1±1.02	17.9±0.86	16.7±0.73	17.2±0.88
	HCT (%)	52.9±1.48	52.9±2.55	53.3±3.67	56.0±3.20	51.1±2.51	53.0±2.88
	MCV (fl)	57.6±1.25	56.4±1.05	57.9±1.08	58.1±2.14	57.1±0.90	56.8±1.97
	MCH (pg)	18.5±0.35	18.3±0.41	18.6±0.41	18.6±0.63	18.6±0.41	18.4±0.59
	MCHC (g/dl)	32.2±0.30	32.3±0.34	32.1±0.39	31.9±0.36	32.6±0.30	32.5±0.34
	RET (%)	3.25±0.42	3.30±0.65	3.41±0.42	3.41±0.94	2.40 ±0.17	1.77±0.57
	RET – He (pg)	20.3±0.44	20.2±0.58	20.6±0.61	20.5±0.60	20.1±0.49	20.4±0.57
	PLT (103/ μ l)	896±101.35	931±112.41	846±94.82	924±130.19	889±141.48	934±80.48
	MPV (fl)	6.9±0.20	7.3±0.28a	6.9±0.15	7.4±0.28a	6.8±0.11	7.1±0.43b
	PCT (%)	0.62±0.08	0.68±0.11	0.59±0.07	0.68±0.10	0.60±0.10	0.67±0.10
	WBC (106/ μ l)	5.60±0.75	7.28±1.52a	4.91±1.42	5.83±1.03	4.76±0.65	6.74±1.29
	NEUT (%)	8.2±2.29	6.2±1.21	9.1±2.91	6.0±1.60	10.2±0.91	8.6±2.16
	LYMPH (%)	87.1±2.07	87.9±3.00	85.9±2.96	88.7±1.88a	84.8±1.17	85.8±2.43
	MONO (%)	4.0±0.92	5.3±2.22	4.5±1.28	4.7±1.35	4.3±0.43	5.0±1.05
	EO (%)	0.6±0.26	0.5±0.31	0.5±0.33	0.5±0.33	0.6±0.17	1.7±2.62b
	BASO (%)	0.1±0.10	0.1±0.08	0.0±0.10	0.1±0.10	0.1±0.11	0.1±0.09

Note: ^aThe mean difference is significant at the 0.05 levels of control group^bThe mean difference is significant at the 0.05 levels of control recovery group**Table 2** Clinical Biochemistry Analysis of control and *Cordyceps militaris* treated rat for 90 days

Sex	Parameters	Control	Mean of parameters ± standard deviation			Recovery	
			5	20	80	Control	80
			mg/kg BW	mg/kg BW	mg/kg BW		mg/kg BW
Male	TP2 (g/dl)	7.82±0.19	7.91±0.36	8.47±1.17	8.73±1.00	7.47±1.04	6.42±0.27
	CHO2L (mg/dl)	82.0±8.15	79.4±9.03	81.5±17.96	82.3±15.40	69.8±10.86	67.8±13.02
	TRIGL (mg/dl)	128.2±23.03	118.0±27.91	133.1±36.74	128.8±26.61	91.0±17.93	99.0±35.81
	ALTL (U/l)	94.0±62.01	69.3±20.38	96.3±40.29	86.7±26.02	76.5±17.96	70.0±24.39
	ASTL (U/l)	98.6±33.19	92.6±17.80	114.4±26.51	109.1±24.75	103.6±20.31	83.6±22.10
	ALP2S (U/l)	88±12.04	78±14.63	97±21.27	85±16.24	61±6.40	62±5.52
	ALB2 (g/dl)	5.41±0.10	5.39±0.12	5.95±0.71	5.96±0.65	4.54±0.32	4.27±0.11
	GLO (g/dl)	2.41±0.13	2.46±0.15	2.79±0.47	2.76±0.38	2.33±0.13	2.15±0.17
	CREA2 (mg/dl)	0.38±0.03	0.30±0.02a	0.43±0.05a	0.40±0.04	0.37±0.05	0.34±0.03

Table 2 Clinical Biochemistry Analysis of control and *Cordyceps militaris* treated rat for 90 days (Continued)

Sex	Parameters	Control	Mean of parameters ± standard deviation			Recovery	
			5	20	80	Control	80
			mg/kg BW	mg/kg BW	mg/kg BW		mg/kg BW
	U - BUN (mg/dl)	23.0±1.57	25.2±4.20	23.9±2.88	22.6±2.12	18.9±1.68	19.8±3.62
	UA2 (mg/dl)	6.5±0.85	5.9±1.11	8.6±1.23a	8.0±2.08a	6.6±0.97	5.2±0.45b
	SGLU3 (mg/dl)	334.5±52.00	323.0±48.07	439.1±86.04a	336.1±60.02	326.5±29.91	289.5±37.63
	HDLC4 (mg/dl)	63.0±5.41	58.5±5.26	65.5±15.78	62.7±12.50	48.1±7.31	60.0±22.87
	LDLC3 (mg/dl)	6.7±1.76	6.6±1.55	8.2±1.98	5.1±1.86	7.2±2.08	7.0±2.31
	Na (10 ⁻³ mol/l)	153.35±1.45	155.45±4.38	171.63±20.34	165.92±8.79	137.52±7.54	132.06±5.42
	K (10 ⁻³ mol/l)	10.24±1.07	10.15±0.66	11.50±1.74	10.60±1.31	8.85±1.03	8.15±0.53
	Cl (10 ⁻³ mol/l)	101.68±1.59	102.19±3.43	116.83±15.44	109.31±6.17	89.84±5.27	85.68±4.43
Female	TP2 (g/dl)	7.88±0.20	8.09±0.44	8.83±0.53a	8.21±0.61	6.83±0.32	7.19±0.70
	CHO2L (mg/dl)	113.0±13.69	109.1±30.17	102.0±19.12	94.4±23.07	74.9±12.76	70.5±16.14
	TRIGL (mg/dl)	96.2±33.40	91.1±28.95	82.8±34.04	75.2±18.53	65.1±22.74	60.0±16.17
	ALTL (U/l)	46.8±6.19	48.4±12.14	51.7±8.49	48.5±10.51	53.4±15.88	53.6±13.67
	ASTL (U/l)	76.9±8.04	80.1±12.78	91.8±9.55a	86.8±12.17	88.0±15.29	86.0±12.15
	ALP2S (U/l)	41±6.77	46±9.08	44±7.57	40±6.60	35±5.86	35±7.73
	ALB2 (g/dl)	5.65±0.15	5.84±0.30	6.24±0.51a	5.85±0.41	4.74 ±0.20	4.98±0.43
	GLO (g/dl)	2.23±0.09	2.25±0.20	2.59±0.26a	2.36±0.23	2.09±0.15	2.21±0.28
	CREA2 (mg/dl)	0.42±0.03	0.40±0.03	0.48±0.04a	0.46±0.04a	0.42±0.03	0.43±0.05
	U - BUN (mg/dl)	20.9±2.64	23.2±2.61	21.5±2.12	24.1±2.33a	21.8±4.77	21.9±3.66
	UA2 (mg/dl)	4.3±0.93	4.8±0.99	4.3±0.65	4.2±1.39	3.4±0.48	3.4±0.59
	SGLU3 (mg/dl)	235.6±33.47	282.4±58.12	168.0±51.39	184.5±32.60a	197.5±46.66	153.8±63.27
	HDLC4 (mg/dl)	89.1±9.87	88.0±20.50	85.3±14.49	70.8±29.04	60.1±8.61	58.4±12.65
	LDLC3 (mg/dl)	9.2±3.06	8.4±7.78	6.0±1.94	4.3±1.85a	5.6±2.87	4.7±2.50
	Na (10 ⁻³ mol/l)	152.66±1.09	153.46±1.60	163.64±8.09a	158.69±4.34a	137.64±7.31	137.10±8.36
	K (10 ⁻³ mol/l)	9.74±1.10	9.50±1.44	10.92±1.26	10.13±1.12	8.82±0.55	9.19±1.66b
	Cl (10 ⁻³ mol/l)	104.02±1.36	101.96±2.55	112.29±6.56	106.59±2.31	93.24±5.27	93.08±6.34

Note: ^aThe mean difference is significant at the 0.05 levels of control group^bThe mean difference is significant at the 0.05 levels of control recovery group

Organ Weighting

For the female animal, the mean weight of right adrenal gland in medium dose group (20 mg/kg BW) was significantly different lower than control group ($p<0.05$) and the mean weight of heart and left adrenal gland in high dose group (80 mg/kg BW) were significantly different higher than control group ($p<0.05$). The organ's weight was calculated in the relative weights per 100 g animal body weight that showed the relative weight was not related with dose level what used in this study and the result of organ weight for male and female animals were represented in Table 3.

Table 3 Organ's Weight in relation to body weight of Wistar rats treated with *Cordyceps militaris* treated rat for 90 days

Sex	Parameters	Control	Mean of parameters ± standard deviation			Recovery	
			5	20	80	Control	80
			mg/kg BW	mg/kg BW	mg/kg BW		mg/kg BW
Male	Liver	2.6552±0.15	2.6419±0.09	2.7351±0.14	2.5923±0.14	2.5526±0.06	2.4729±0.13 ^b
	Kidney Rt.	0.2587±0.01	0.2598±0.01	0.2607±0.02	0.2540±0.02	0.2603±0.01	0.2423±0.03
	Kidney Lt.	0.2533±0.01	0.2570±0.01	0.2529±0.02	0.2458±0.02	0.2546±0.01	0.2391±0.02
	Heart	0.2839±0.02	0.2792±0.01	0.2560±0.07	0.2735±0.01	0.2838±0.01	0.2862±0.01
	Lung	0.3799±0.03	0.3634±0.04	0.3704±0.06	0.3369±0.04	0.3358±0.08	0.3907±0.05
	Spleen	0.1824±0.01	0.1766±0.02	0.1827±0.02	0.1700±0.02	0.1785±0.01	0.1746±0.03
	Brain	0.4744±0.03	0.4589±0.04	0.4705±0.02	0.4578±0.03	0.4394±0.02	0.4420±0.02
	Adrenal Rt.	0.0080±0.00	0.0083±0.00	0.0076±0.00	0.0075±0.00	0.0076±0.00	0.0083±0.00
	Adrenal Lt.	0.0088±0.00	0.0086±0.00	0.0085±0.00	0.0085±0.00	0.0089±0.00	0.0087±0.00
	Testis Rt.	0.3943±0.03	0.4009±0.04	0.3937±0.03	0.3762±0.03	0.3636±0.05	0.3905±0.04
	Testis Lt.	0.3895±0.02	0.4024±0.04	0.3985±0.03	0.3868±0.03	0.3701±0.04	0.3985±0.03
	Thymus	0.0714±0.02	0.0674±0.01	0.0564±0.02	0.0663±0.01	0.0578±0.01	0.0689±0.01
Female	Liver	2.5012±0.12	2.6613±0.14	2.6077±0.16	2.5907±0.18	2.5796±0.17	2.4362±0.21
	Kidney Rt.	0.2873±0.01	0.2948±0.02	0.2908±0.02	0.2824±0.02	0.2954±0.01	0.2783±0.01
	Kidney Lt.	0.2741±0.02	0.2875±0.02	0.2789±0.01	0.2750±0.02	0.2806±0.01	0.2746±0.01
	Heart	0.3272±0.02	0.3404±0.03	0.3334±0.02	0.3546±0.04 ^a	0.3461±0.01	0.3397±0.02
	Lung	0.5054±0.07	0.5261±0.03	0.5386±0.10	0.5373±0.05	0.5073±0.09	0.5353±0.10
	Spleen	0.2403±0.03	0.2347±0.03	0.2400±0.02	0.2555±0.03	0.2535±0.03	0.2440±0.02
	Brain	0.7573±0.04	0.7735±0.06	0.8040±0.04	0.7969±0.04	0.8002±0.05	0.7758±0.04
	Uterus	0.1765±0.03	0.2319±0.09	0.2734±0.11	0.2378±0.08	0.1579±0.01	0.2169±0.07
	Adrenal Rt.	0.0169±0.00	0.0153±0.00	0.0142±0.00 ^a	0.0168±0.00	0.0170±0.00	0.0168±0.00
	Adrenal Lt.	0.0157±0.00	0.0172±0.00	0.0145±0.01	0.0186±0.00 ^a	0.0170±0.00	0.0174±0.00
	Ovary Rt.	0.0179±0.00	0.0173±0.00	0.0172±0.00	0.0166±0.00	0.0170±0.00	0.0181±0.00
	Ovary Lt.	0.0165±0.00	0.0184±0.00	0.0170±0.00	0.0168±0.00	0.0188±0.00	0.0184±0.00
	Thymus	0.0948±0.01	0.0887±0.02	0.0786±0.01	0.0929±0.02	0.0809±0.01	0.0943±0.01

Note: ^aThe mean difference is significant at the 0.05 levels of control group^bThe mean difference is significant at the 0.05 levels of control recovery group

Discussion

The *C. militaris* possesses extensive bioactive compounds which has been used as an ingredient in dietary supplement for many years but the safety data of *C. militaris* have not been conducted enough. In compliance with OECD Guidelines for the testing of chemicals 423, Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method of *C. militaris* at dose level 300 and 2,000 mg/kg body weight, all tested animals were not shown signs of toxic, moribund and mortality including the health observation, feed and drinking water consumptions was normal. For the body weights were continued to gain throughout the testing period.

In gross findings, there was petechial hemorrhage scattered in the thymus parenchyma that was no gross evidence of necrosis. Thus, this lesion in these animals likely resulted from necropsy technique. Accessory spleens are rare findings in rodents and may be congenital or a consequence of traumatic injury⁽²⁶⁾ caused by bisection of spleen. For the abdominal fat was considered to be non-adverse since it appears small in incidence and minimum in severity that can occasionally be seen spontaneously.

In our study, the analyzed parameters of the hematological analysis and clinical biochemistry analysis were mostly similar tendency to the histological control data of Wistar rat (Mlac:WR) including previous study that studies the toxicity study of *C. militaris*⁽⁶⁾ except some parameters such as Neutrophils (NEUT), Lymphocytes (LYMPH), Red Blood Cells (RBC), Hemoglobin (HGB) for the hematological analysis and Alanine amino transferase (ALT), Glucose (SGLU3) and Potassium (K) for the clinical biochemistry analysis. The fluctuation of data could be occurred due to age, gender, species, dose level of test item and other factors.

Thus, the toxicity level assessment of the *C. militaris* can be summarized no related effects at any dose level and no side effects or abnormalities after repeated oral administrations for 90 days. The sub chronic oral toxicity according to OECD Guidelines for the testing of chemicals 408, Repeated Dose 90 - Day Oral Toxicity Study in Rodents of *C. militaris* at dose level 5, 20, 80 mg/kg body weight. The all data result such as clinical signs of toxicity, body weight, food and water consumptions, necropsy examination, etc were not shown toxic of *C. militaris* in Wistar rats.

Conclusion

The acute oral toxicity of *C. militaris* in Wistar rats at 300 and 2,000 mg/kg body weight was not shown signs of toxic, moribund and mortalities in all animals. Thus, *C. militaris* was classified in GHS category 5 or unclassified, the LD₅₀ cut off at 5000 mg/kg body weight to infinity (∞). For the sub-chronic oral toxicity result that the no observed adverse effect level (NOAEL) of *Cordyceps militaris* was considered to be 80 mg/kg body weight per day for Wistar rats. All result of this study were within only the test conditions which described earlier.

Acknowledgement

This study was supported equipment, facility including animals from National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand. The author would like to acknowledge Milton Biotech Limited, Sangkha Santi Suk Road, Krathumrai, Nong Chok, Bangkok, Thailand for supporting *Cordyceps militaris* powder product which used as a test item during this research. There is no conflict of interest with research and not for commercial gain.

References

1. Buenz EJ, Bauer BA, Osmundson TW, Motley TJ. The traditional Chinese medicine *Cordyceps sinensis* and its effects on apoptotic homeostasis. *J Ethnopharmacol* 2005; 96(1-2): 19-29.
2. Wen TC, Lei BX, Kang JC, Li GR, He J. Enhanced production of mycelial culture using additives and cordycepin by submerged in *Cordyceps militaris*. *Food Ferment Ind* 2009; 35(8): 49-53.
3. Li HC, Sun P, Feng CQ. The research of cordycepin as an active component in *Cordyceps*. *J Jinggangshan Univ (Nat Sci)* 2010; 31(2): 93-6.
4. Jhou BY, Fang WC, Chen YL, Chen CC. A 90 - day subchronic toxicity study of submerged mycelial culture of *Cordyceps militaris* in rats. *Toxicol Res* 2018; 7(5): 977-86.
5. Park C, Hong SH, Lee JY, Kim GY, Choi BT, Lee YT, et al. Growth inhibition of U937 leukemia cells by aqueous extract of *Cordyceps militaris* through induction of apoptosis. *Oncol Rep* 2005; 13(6): 1211-6.
6. Ng TB, Wang HX. Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine. *J Pharm Pharmacol* 2005; 57(12): 1509-19.
7. Nan JX, Park EJ, Yang BK, Song CH, Ko G, Sohn DH. Antifibrotic effect of extracellular biopolymer from submerged mycelial cultures of *Cordyceps militaris* on liver fibrosis induced by bile duct ligation and scission in rats. *Arch Pharm Res* 2001; 24(4): 327-32.
8. Zhao-Long W, Xiao-Xia W, Wei-Ying C. Inhibitory effect of *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* on human glomerular mesangial cell proliferation induced by native LDL. *Cell Biochem Funct* 2000; 18(2): 93-7.
9. Won SY, Park EH. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *J Ethnopharmacol* 2005; 96(3): 555-61.
10. Yoo HS, Shin JW, Cho JH, Son CG, Lee YW, Park SY, et al. Effects of *Cordyceps militaris* extract on angiogenesis and tumor growth. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25(5): 657-65.
11. Choi SB, Park CH, Choi MK, Jun DW, Park S. Improvement of insulin resistance and insulin secretion by water extracts of *Cordyceps militaris*, *Phellinus linteus* and *Paecilomyces tenuipes* in 90% pancreatectomized rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004; 68(11): 2257-64.

12. Lin XX, Xie QM, Shen WH, Chen Y. Effects of fermented *Cordyceps* powder on pulmonary function in sensitized guinea pigs and airway inflammation in sensitized rats. *China J Chin Mater Med* 2001; 26(9): 622-5.
13. Panda AK, Swain KC. Traditional uses and medicinal potential of *Cordyceps sinensis* of Sikkim. *J Ayurveda Integr Med* 2011; 2(1): 9-13.
14. Kim YO, Kim HJ, Abu-Taweel GM, Oh J, Sung GH. Neuroprotective and therapeutic effect of *Cordyceps militaris* on ischemia-induced neuronal death and cognitive impairments. *Saudi J Biol Sci* 2019; 26(7): 1352-7.
15. Zhou X, Yao Y. Unexpected nephrotoxicity in male ablactated rats induced by *Cordyceps militaris*: the involvement of oxidative changes. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 786528. (9 pages).
16. Zhu SJ, Pan J, Yang JJ, Zhou A. Immune activation and toxicity evaluation of fresh *Cordyceps militaris* extracts by high-pressure processing. *Food Agr Immunol* 2015; 26(5): 645-58.
17. Kwack SJ, Lee BM. Subacute oral toxicity study of a new type of Cordyceps, *Paecilomyces sinclairii*, in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Res* 2009; 25(2): 101-6.
18. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). Test no. 423: acute oral toxicity – acute toxic class method, OECD guidelines for the testing of chemicals. [online]. 2001; [cited 2021 Feb 16]; [14 screens]. Available from: URL: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071001-en.pdf?expires=1613451653&id=id&accname=guest&checksum=0023ABD857B31C6E4DF95A0FAA33E582>.
19. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). Test no. 408: repeated dose 90-days oral toxicity study in rodents, OECD guidelines for the testing of chemicals. [online]. 1998; [cited 2021 Feb 16]; [10 screens]. Available from: URL: https://www.oecd.org/env/ehs/testing/E408_1998.PDF
20. Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies, National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, DC: The National Academies Press; 2011.
21. Office of Animal Care and Use. Guidelines for euthanasia of rodent fetuses and neonates. [online]. 2013; [cited 2019 Jun 18]; [3 screens]. Available from: URL: https://oacu.oir.nih.gov/system/files/media/file/2021-02/b4_rodent_euthanasia_pup.pdf.
22. Mooi E, Sarstedt M. Hypothesis testing & ANOVA. In: A concise guide to market research. 3rd ed. Berlin, Germany: Springer-Verlag GmbH; 2011. p. 113-160.
23. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J* 2017; 38(32): 2459-72.

24. Assmann G, Gotto AM. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109(23 Suppl 1): III8-14.
 25. Fruchart JC, Nierman MC, Stroes ESG, Kastelein JJP, Duriez P. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation* 2004; 109(23 Suppl 1): III15-9.
 26. Hobbie K, Elmore SA, Kolenda-Roberts HM. NTP nonneoplastic lesion atlas: spleen - accessory spleen. [online]. [cited 2021 Jun 13]; [2 screens]. Available form: URL: https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/immune/spleen/accessory/spleen-accessory-spleen-pdf_508.pdf.
-

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเรื้อรัง ทางปากของถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) ในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar

กฤติกาญจน์ สุวรรณสโรช ภัสสรารณ์ ศรีมังกรแก้ว ภคณ ยศพรรรัตน์ และอัญชลี สิริมนตาภรณ์
ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม 73170

บทคัดย่อ *Cordyceps militaris* ประกอบด้วย Cordycepin, Adenosine, Polysaccharides และสารประกอบอื่นๆ สำหรับหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทยนำ *C. militaris* มาใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในช่วงหลายปีที่ผ่านมา ในขณะที่ยังไม่มีข้อมูลการทดสอบทางพิษวิทยาของ *C. militaris* อย่างเพียงพอ การศึกษาในครั้งนี้จัดทำขึ้นเพื่อประเมินความเป็นพิษของ *C. militaris* โดยการทดสอบความเป็นพิษทางปากแบบเฉียบพลันและแบบกึ่งเรื้อรังในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar สำหรับการประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันที่ขนาด 300 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง ตามวิธีการมาตรฐาน OECD Guideline หมายเลข 423 ผลการทดสอบในสัตว์ทดลองทุกตัวพบว่า ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ และการตายในสัตว์ทดลอง ดังนั้น *C. militaris* จัดอยู่ในระบบการจัดกลุ่มสารเคมี การติดฉลาก และการแสดงรายละเอียดบนเอกสารข้อมูลความปลอดภัยสากลหมวดที่ 5 หรือไม่ระบุประเภท มี LD₅₀ ที่ 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลองขึ้นไป หลังจากนั้น ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของ *C. militaris* ทางปากแบบกึ่งเรื้อรังและวิธีการทดสอบได้มีการประยุกต์จากวิธีการมาตรฐาน OECD Guideline หมายเลข 408 การประเมินความเป็นพิษทำการศึกษาที่ขนาด 5, 20 และ 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง ผลการทดสอบสรุปได้ว่า ปริมาณที่มากที่สุดที่ได้รับต่อเนื่องเป็นเวลานาน โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายใดๆ ต่อร่างกายต่อวันในสัตว์ทดลอง คือ 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง

คำสำคัญ: ถั่งเช่าสีทอง, การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน, การทดสอบความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง, OECD Guidelines หมายเลข 423, OECD Guidelines หมายเลข 408

การพัฒนาชุดทดสอบพาราควอตแบบขั้นตอนเดียว

จินตนา กรดเต็ม¹ ศรีนยา ฤทธิเนียม¹ ธรรมวุฒิ ชูมาก¹ และลักขิกา ทองเรืองศรี²

¹ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง ตรัง 92000

²โรงพยาบาลปะเหลียน อำเภอปะเหลียน ตรัง 92120

บทคัดย่อ พาราควอต (paraquat) เป็นสารกำจัดวัชพืชที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและมีฤทธิ์อันตรายร้ายแรงต่อคนและสัตว์ ตั้งแต่ปีงบประมาณ พ.ศ. 2541 ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง ได้จัดทำชุดน้ำยาทดสอบพาราควอตแบบ 2 ขั้นตอน และสนับสนุนให้โรงพยาบาลใช้ตรวจตัวอย่างผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะได้รับสารพิษพาราควอต หลังจากนั้นปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 ได้พัฒนาชุดทดสอบพาราควอตแบบขั้นตอนเดียวในรูปแบบแคปซูล โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความสะดวกในการใช้งาน โดยลดขั้นตอนการทดสอบจาก 2 ขั้นตอน ให้เหลือเพียงขั้นตอนเดียว และนำมาใช้ตรวจพิสูจน์หาพาราควอตเชิงคุณภาพในตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะ ผลการศึกษาพบว่าชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้มีความจำเพาะกับสารพาราควอต โดยมีค่าขีดจำกัดของการตรวจพบพาราควอตในตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะ เท่ากับ 0.7, 1.0 และ 2.0 ug/ml ตามลำดับ ผลการประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบ พบว่ามีค่าความไว ความจำเพาะ และความถูกต้อง ร้อยละ 100 เมื่อทดสอบอายุการใช้งานพบว่าชุดทดสอบนี้สามารถเก็บไว้ที่สภาวะอุณหภูมิห้องได้นาน 1 เดือน และเก็บไว้ในตู้เย็นความเย็นได้นาน 5 เดือน ผลจากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าชุดทดสอบพาราควอตแบบขั้นตอนเดียวที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้งานได้ง่ายและสะดวก ทราบผลรวดเร็วเหมาะที่จะนำไปใช้ตรวจพิสูจน์พาราควอตในตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะได้

คำสำคัญ: พาราควอต, ชุดทดสอบ, สารกำจัดวัชพืช

Corresponding author E-mail: jintana.k@dmsc.mail.go.th

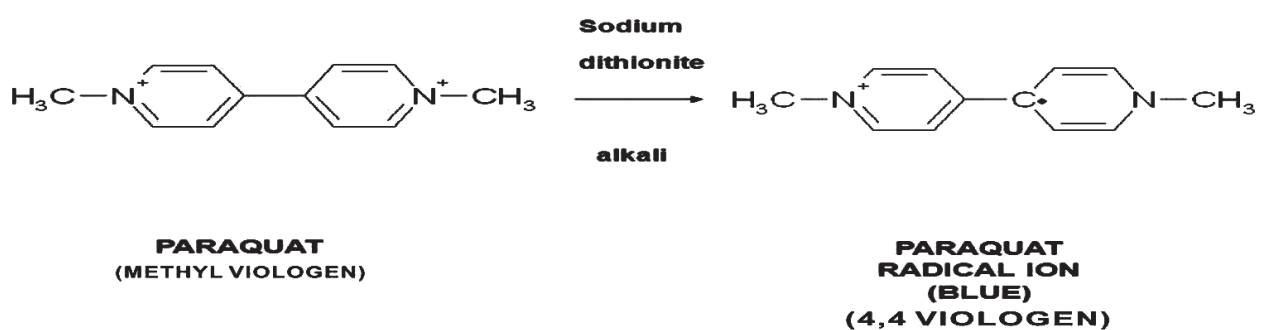
Received: 17 March 2021

Revised: 16 July 2021

Accepted: 30 July 2021

บทนำ

พาราควอต (paraquat) หรือยาฆ่าหญ้าเป็นสารเคมีกำจัดวัชพืชในกลุ่ม dipyridilium มีชื่อทางเคมีว่า 1,1' dimethyl 4,4' bipyridinium หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าเมทิลไวโอลเจน (methyl viologen) ผลิตภัณฑ์ที่วางจำหน่ายในท้องตลาดใช้ชื่อทางการค้า เช่น กรัสม็อกโซน^(1, 2) มีฤทธิ์อันตรายร้ายแรงและมีพิษเฉียบพลันสูงต่อมนุษย์ ไม่มียาถอนพิษ ถ้ากินเข้าไปเพียงปริมาณเล็กน้อยก็ทำให้เสียชีวิตได้⁽³⁾ ในภาคเกษตรกรรมมีการใช้พาราควอตอย่างแพร่หลายกับพืชไร่หลายชนิด ซึ่งในแต่ละปีมีผู้ป่วยหลายรายที่ได้รับพิษจากพาราควอตและเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสาเหตุส่วนใหญ่เนื่องมาจากผู้ป่วยเจตนากินและนิยมใช้เพื่อฆ่าตัวตาย⁽⁴⁾ หรือกรณีประทุษร้ายหรือเกิดจากรู้เท่าไม่ถึงการณ์โดยนึกว่าเป็นเครื่องดื่มที่มีสี ผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษชนิดนี้โดยตรงและไม่ได้รับการตรวจพิสูจน์แพทย์อาจจะไม่สามารถช่วยเหลือผู้ป่วยได้ทันทั่วทั้งที่ อาการพิษร้ายแรงมักพบในผู้ป่วยที่จงใจกินเพื่อฆ่าตัวตาย ถ้าได้รับสัมผัสสารที่มีความเข้มข้นสูงจะเกิดอาการระคายเคืองผิวหนัง ทางเดินหายใจ เนื้อเยื่อภายในปากและตา ส่วนอาการพิษแบบเฉียบพลันอาจรุนแรงถึงเสียชีวิตภายใน 2-3 วัน เนื่องจากเกิดพังผืดที่ปอดและเกิดอาการพิษต่อไต⁽⁵⁾ ขนาดที่เป็นพิษหรือปริมาณที่ทำให้ตายในผู้ใหญ่เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว⁽⁶⁾ ข้อมูลทางพิษวิทยามีรายงานการศึกษาในมนุษย์ มีค่า Oral LD₅₀ human เท่ากับ 40-60 มิลลิกรัม/กิโลกรัม⁽²⁾ หรือระดับที่เป็นพิษ ถ้ากินเข้าไปขนาดมากกว่า 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะทำให้เกิดพิษ เช่น อาเจียนทันที ท้องเสีย ปวดท้อง มีแผลในทางเดินอาหาร ไตวาย ตับวาย ตับอ่อนอักเสบ กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ ความดันโลหิตต่ำ หหมดสติ และชัก ผู้ป่วยจะตายภายใน 1-4 วัน จากภาวะช็อกเนื่องจากหัวใจล้มเหลว หรือถ้ากินพาราควอตที่เป็นสารละลายความเข้มข้นประมาณ 20% เพียง 10-20 มิลลิลิตร ในผู้ใหญ่ หรือ 4-5 มิลลิลิตร ในเด็ก⁽⁵⁾ หรือได้รับเพียง 1-2 ช้อนชา ก็สามารถทำให้ตายได้⁽⁷⁾ สำหรับผลกระทบเรื้อรังต่อสุขภาพ ทำให้ก่อโรคมะเร็งปอดและโรคสมองเสื่อม⁽⁵⁾ จากการทบทวนวรรณกรรมมีรายงานการตายอันเนื่องมาจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ซึ่งมีพาราควอตเป็นสาเหตุสำคัญจากอุบัติเหตุหรือจงใจฆ่าตัวตายในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิกประมาณ 300,000 คนต่อปี และมีรายงานพบผู้ป่วยหญิงอายุ 18 ปี จำนวน 1 ราย ได้รับพาราควอตสาเหตุมาจากผู้ป่วยจงใจกินพาราควอตเพื่อฆ่าตัวตาย⁽⁸⁾ อวัยวะภายในถูกทำลายจนหมดและเสียชีวิตในเวลาต่อมา⁽⁹⁾ ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจึงพอสรุปได้ว่าความเป็นพิษและอันตรายจากพาราควอตมีความรุนแรงมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการนำไปใช้ในทางที่ผิดหรือใช้อย่างไม่ระมัดระวัง ดังนั้นจะเห็นว่าพาราควอตยังคงส่งผลกระทบต่อคนหรือผู้บริโภคโดยตรง ห้องปฏิบัติการพิษวิทยา ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง ได้เปิดให้บริการทดสอบหาพาราควอตหรือเมทิลไวโอลเจน ด้วยใช้หลักการทางเคมีและทำปฏิกิริยารีดอกซ์ต่อกันของสารเคมี 2 ชนิด ที่มีความจำเพาะ เกิดปฏิกิริยาของสารไดไฮโอไนท์ในสภาพต่างเพื่อเปลี่ยนให้อยู่ในรูป reduced form หรือ free radical เกิดสารละลายสีน้ำเงินหรือสีฟ้าของ paraquat radical ion หรือ 4,4 viologen โดยมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังแสดงในภาพที่ 1^(1, 3)



ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาทางเคมีที่ใช้ในการทดสอบหาพาราควอต

ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2541 ห้องปฏิบัติการพิษวิทยา ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง ได้พัฒนาชุดน้ำยาทดสอบเอกลักษณ์ของพาราควอตโดยใช้หลักการเดิม ทั้งนี้เพื่อเตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการฯ ให้สามารถใช้งานได้ทันทีโดยไม่ต้องหาสารเคมี และเพื่อสนับสนุนให้ห้องปฏิบัติการชันสูตรของโรงพยาบาลในเขตรับผิดชอบ สามารถนำไปใช้ตรวจตัวอย่างหรือสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยที่สงสัยว่าได้รับพาราควอตโดยจงใจและไม่จงใจฆ่าตัวตาย โดยไม่ต้องส่งตัวอย่าง สิ่งส่งตรวจที่ใช้ตรวจ เช่น น้ำล้างกระเพาะเศษอาหาร ปัสสาวะ และตัวอย่างของกลางที่สงสัยว่าปนเปื้อนสารพาราควอต มีความไวตั้งแต่ 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ขึ้นไป จากนั้นได้ถ่ายทอดเทคโนโลยี เรื่องการใช้ชุดน้ำยาทดสอบพาราควอตโดยเตรียมตัวอย่างทดสอบพร้อมชุดทดสอบส่งให้กับห้องปฏิบัติการชันสูตรของโรงพยาบาลในเขตจังหวัดตรัง พบว่าเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชันสูตรของโรงพยาบาลมีศักยภาพสามารถรายงานผลได้ถูกต้องและไม่แตกต่างจากผลทดสอบของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง⁽⁹⁾ แต่เนื่องจากชุดน้ำยาทดสอบดังกล่าวเป็นแบบ 2 ขั้นตอนการใช้งานค่อนข้างยุ่งยาก ไม่สะดวก และทำให้เสียเวลา ต่อมาในปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 จึงได้ศึกษาค้นคว้าข้อมูลเพื่อให้การทดสอบพาราควอตมีขั้นตอนที่ง่ายขึ้นพัฒนาชุดทดสอบพาราควอตแบบขั้นตอนเดียวในรูปแบบแคปซูล⁽¹⁰⁾ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดขั้นตอนการทดสอบจาก 2 ขั้นตอน เป็นขั้นตอน 1 และใช้งานง่าย สะดวก และรวดเร็ว สามารถนำไปใช้ตรวจพิสูจน์พาราควอตในตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะได้

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิด 4 ตำแหน่ง, ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 และ 1,000 มิลลิลิตร, ปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 20–200 ไมโครลิตร, ขนาด 100–1,000 ไมโครลิตร และขนาด 10 มิลลิลิตร, แคปซูลยา เบอร์ 0, กระดาษกรองชนิดแผ่น ยี่ห้อ Whatman Cat No. 3001–917 เพื่อใช้เตรียมกระดาษเทียบผลบวก, ถังพลาสติกสำหรับบรรจุชุดทดสอบ และเครื่องซีลชนิดสุญญากาศ, โถดูดความชื้น (Desicator)

สารมาตรฐาน

พาราควอต Paraquat dichloride hydrate, (CHEM SERVICE) ความบริสุทธิ์ 99.5%, ไกลโฟเสท (Glyphosate), (Dr. Ehrenstorfer) ความบริสุทธิ์ 98.7%, 2,4-ดี (2,4-D Sodium salt), (Dr. Ehrenstorfer) ความบริสุทธิ์ 98.5%

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ทุกชนิดเป็น AR grade ได้แก่ Sodium dithionite (Merck), Disodium tetraborate (Merck), Sodium bicarbonate (Merck), Sodium chloride (Merck), Hydrochloric acid (conc., 37%), Methanol (Merck), Sodium azide (Merck), Pepsin from hog (Fluka), Silica blue

วิธีการ

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานพาราควอต (paraquat) 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Stock standard): ชั่งสารมาตรฐาน Paraquat dichloride hydrate 0.0107 กรัม ละลายด้วย 5% เมทานอล ปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐานพาราควอต (paraquat) 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$: ปิเปตสารมาตรฐานพาราควอต 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

สารละลายมาตรฐานไกลโฟเสท ความเข้มข้น 1,000 µg/ml (Stock standard): ชั่งสารมาตรฐานไกลโฟเสท 0.0102 กรัม ละลายด้วยเมทานอล และปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร

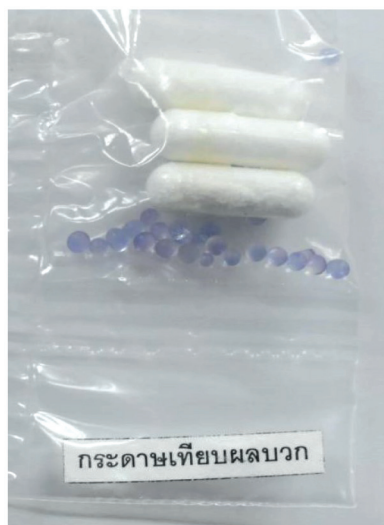
สารละลายมาตรฐาน 2,4-ดี-โซเดียม 1,000 µg/ml (Stock standard): ชั่งสารมาตรฐาน 2,4-ดี-โซเดียม 0.0112 กรัม ละลายด้วยเมทานอล และปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร

การเตรียมชุดทดสอบพาราควอตชนิดแคปซูล

เตรียมแคปซูลชุดทดสอบ: ผสมสาร Disodium tetraborate, Sodium bicarbonate และ Sodium dithionite ให้เข้ากันและบรรจุในแคปซูล⁽¹⁰⁾

เตรียมกระดาศเทียบผลบวก 1.0 µg/ml: ปิเปตสารมาตรฐานพาราควอต 500 µg/ml ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดบนกระดาศทรงขนาดประมาณ 3 × 1 เซนติเมตร ใช้เป็นตัวเทียบผลบวก (การนำไปใช้งาน ใส่กระดาศเทียบผลบวกลงในหลอด เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร จะทำให้มีความเข้มข้นของพาราควอตเท่ากับ 1 µg/ml)

นำแคปซูลชุดทดสอบจำนวน 3 แคปซูล และกระดาศเทียบผลบวกจำนวน 1 ชิ้น บรรจุในถุงพลาสติกพร้อมสารดูดความชื้น (Silica blue) และปิดสนิทด้วยเครื่องซีลชนิดสุญญากาศ ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ชุดทดสอบพาราควอตชนิดแคปซูล สำหรับทดสอบ 1 ตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำดื่ม ได้แก่ ตัวอย่างน้ำดื่มที่บรรจุสนิทและจำหน่ายในท้องตลาด (ได้รับหมายเลขทะเบียนการผลิตจากคณะกรรมการอาหารและยา)

ตัวอย่างน้ำล้างกระเพาะเทียม เตรียมโดยละลาย Sodium chloride 2.0 กรัม และ Pepsin (Pepsin from hog) 3.2 กรัม ในน้ำกลั่นเติม Hydrochloric acid (conc.) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น⁽¹¹⁾

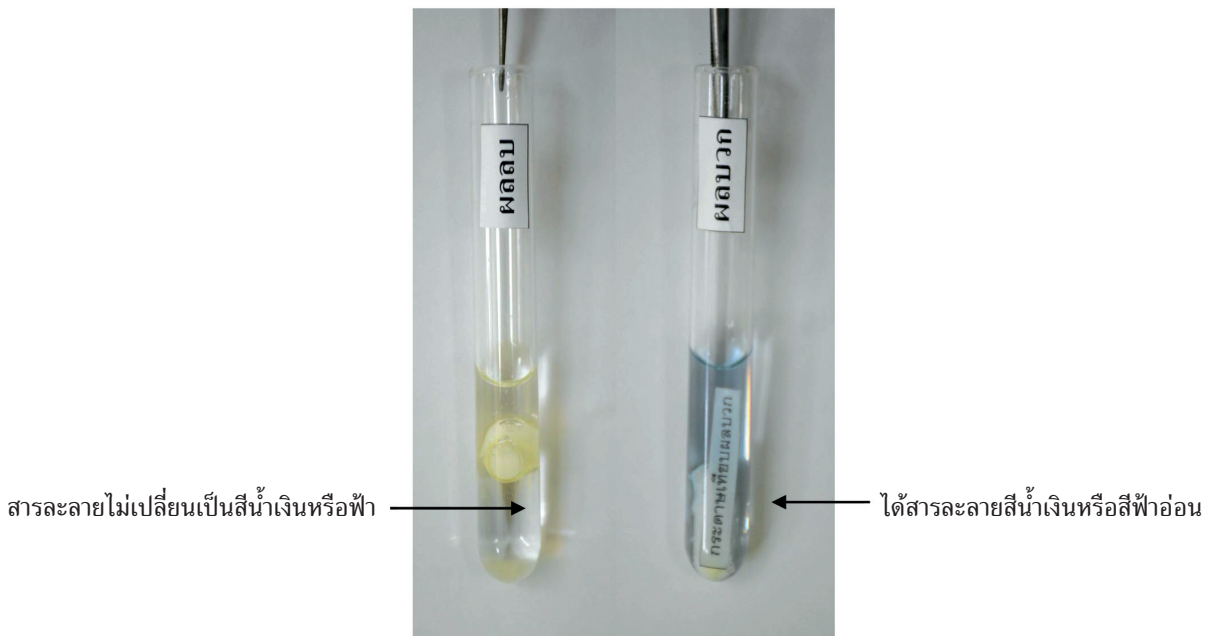
ตัวอย่างปัสสาวะ ได้แก่ ตัวอย่างปัสสาวะของผู้ที่ไม่ได้รับประทานยาชนิดใดเลยในระยะ 1 สัปดาห์ เติมน้ำกลั่น 0.1% Sodium azide เพื่อเป็นสารกันบูด

การทดสอบ

ปิเปตตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะใส่หลอดทดสอบ 5 มิลลิลิตร ปิเปตน้ำกลั่นใส่หลอดทดสอบ 2 หลอด หลอดละ 5 มิลลิลิตร คีบกระดาษเทียบผลบวกลงในหลอดเทียบผลบวกหลอดที่ 1 และหลอดที่ 2 เป็นหลอดเทียบผลลบ เติมชุดทดสอบพาราควอตชนิดแคปซูล หลอดละ 1 แคปซูล ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที หรือตั้งทิ้งไว้จนแคปซูลละลายและเขย่า สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

การอ่านผล/แปลผล

ผลลบ (-) คือ สารละลายไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินหรือสีฟ้าอ่อน ผลบวก (+) คือ สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินหรือสีฟ้าอ่อน ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การแปลผลการทดสอบพาราควอต

การทดสอบความใช้ได้ของชุดทดสอบ^(12, 13, 14)

การหาความจำเพาะ (Specificity)

เตรียมตัวอย่างน้ำดื่ม ที่มีความเข้มข้นพาราควอต 2 µg/ml ไกลโฟเสท 2 µg/ml และ 2,4-ดี 2 µg/ml เตรียมตัวอย่างน้ำล้างกระเพาะเทียม ที่มีความเข้มข้นพาราควอต 2 µg/ml ไกลโฟเสท 2 µg/ml และ 2,4-ดี 2 µg/ml และเตรียมตัวอย่างปัสสาวะที่มีความเข้มข้นพาราควอต 2 µg/ml ไกลโฟเสท 2 µg/ml และ 2,4-ดี 2 µg/ml จากนั้นเติมสารมาตรฐานพาราควอต ไกลโฟเสท และ 2, 4-ดี ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ปริมาตรขวดละ 200 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะตามลำดับ จะได้ตัวอย่างน้ำดื่มที่มีความเข้มข้นพาราควอต 2 µg/ml ไกลโฟเสท 2 µg/ml และ 2, 4-ดี 2 µg/ml เตรียมชนิดละ 3 ขั้ว รวม 9 ขวด ตัวอย่างน้ำล้างกระเพาะเทียมที่มีความเข้มข้นพาราควอต 2 µg/ml ไกลโฟเสท 2 µg/ml และ 2, 4-ดี 2 µg/ml เตรียมชนิดละ 3 ขั้ว รวม 9 ขวด และตัวอย่างปัสสาวะที่มีความเข้มข้นพาราควอต 2 µg/ml ไกลโฟเสท 2 µg/ml และ 2, 4-ดี 2 µg/ml เตรียมชนิดละ 3 ขั้ว รวม 9 ขวด ทดสอบด้วยชุดทดสอบพาราควอตชนิดแคปซูล ตัวอย่างละ 3 ขั้ว

การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจพบพาราควอต (Limit of detection: LOD)

วิเคราะห์ blank matrix จำนวน 10 ข้าง เตรียมตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 2.0, 3.0 และ 5.0 µg/ml ตามลำดับ ปิเปตสารมาตรฐานพาราควอตความเข้มข้น 100 µg/ml ปริมาตร 30, 50, 70, 100, 200, 300 และ 500 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรจนถึงขีดด้วยน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะ ตามลำดับ รวมตัวอย่างน้ำดื่ม 70 ขวด น้ำล้างกระเพาะเทียม 70 ขวด และปัสสาวะ 70 ขวด ทดสอบด้วยชุดทดสอบพาราควอตชนิดแคปซูล ความเข้มข้นละ 10 ข้าง⁽¹³⁾

การทดสอบหาค่าขีดจำกัดของการตรวจพบพาราควอต ในตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะ ดำเนินการโดยทดสอบความเข้มข้นละ 10 ข้าง นำผลที่ได้จากการทดสอบที่ให้ผลบวกทั้ง 10 ข้าง ของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบพาราควอตของแต่ละตัวอย่าง มาคำนวณหาค่าขีดจำกัดของการตรวจพบพาราควอต (LOD) ในตัวอย่างได้ดังนี้⁽¹³⁾ ค่าความถูกต้องหรือจำนวนข้างของตัวอย่างทดสอบที่ให้ผลบวก/ผลลบ (No. of positive/negative) ต้องได้ผลบวกทั้ง 10 ข้าง และคำนวณหาอัตราการตอบสนองเชิงบวก หรือ Positive response rate (%) โดยการนำจำนวนข้างของตัวอย่างทดสอบคูณจำนวนข้างของตัวอย่างที่ให้ผลบวก ต้องได้เท่ากับ 100% จากนั้นนำค่าขีดจำกัดของการตรวจพบพาราควอตที่ได้ในตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะ ทำการพิสูจน์ 10 ข้าง เพื่อความแม่นยำ

การทดสอบความแม่นยำ (Precision)

เตรียมตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะ (sample blank) จำนวนตัวอย่างละ 10 ข้าง ทดสอบด้วยชุดทดสอบพาราควอตชนิดแคปซูล

เตรียมตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะ ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า LOD ของตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างละ 10 ขวด เตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้นสูงกว่าค่า LOD จำนวนตัวอย่างละ 10 ขวด และความเข้มข้นต่ำกว่าค่า LOD จำนวนตัวอย่างละ 10 ขวด ดังนี้

เตรียมตัวอย่างน้ำดื่ม ที่ความเข้มข้น 0.3, 0.7 และ 1.0 µg/ml ปิเปตสารมาตรฐานพาราควอตความเข้มข้น 100 µg/ml ปริมาตร 30, 70 และ 100 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรจนถึงขีดด้วยน้ำดื่ม เตรียมความเข้มข้นละ 10 ข้าง รวม 30 ขวด ทดสอบด้วยชุดทดสอบพาราควอตชนิดแคปซูล

เตรียมตัวอย่างน้ำล้างกระเพาะเทียมที่ความเข้มข้น 0.7, 1.0 และ 1.5 µg/ml โดยปิเปตสารมาตรฐานพาราควอตความเข้มข้น 100 µg/ml ปริมาตร 70, 100 และ 150 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรจนถึงขีดด้วยน้ำล้างกระเพาะเทียม เตรียมความเข้มข้นละ 10 ข้าง รวม 30 ขวด ทดสอบด้วยชุดทดสอบพาราควอตชนิดแคปซูล

เตรียมตัวอย่างปัสสาวะที่ความเข้มข้น 1.5, 2.0 และ 3.0 µg/ml โดยปิเปตสารมาตรฐานพาราควอตความเข้มข้น 100 µg/ml ปริมาตร 150, 200 และ 300 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรจนถึงขีดด้วยปัสสาวะ เตรียมความเข้มข้นละ 10 ข้าง รวม 30 ขวด ทดสอบด้วยชุดทดสอบพาราควอตชนิดแคปซูล

ผลการศึกษานำมาคำนวณหาความไว ความจำเพาะ และความถูกต้อง จากสูตร^(13, 14) ดังนี้

ค่าความไว (Sensitivity, %) = (True positive sample/all positive samples) × 100

ค่าความจำเพาะ (Specificity, %) = (True negative sample/all negative samples) × 100

ค่าความถูกต้อง (Accuracy, %) = [(True positive sample + True negative sample)/Total samples] × 100

การทดสอบความคงตัวของชุดทดสอบ (Stability)

การเตรียมชุดทดสอบ

เตรียมชุดทดสอบจำนวน 8 รุ่น ได้แก่ รุ่นที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 โดยแต่ละรุ่นห่างกัน 1 สัปดาห์ จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิห้อง และในโถดูดความชื้น เปรียบเทียบเป็นรายสัปดาห์ รวม 2 เดือน จากนั้นทดสอบจนกว่าชุดทดสอบเริ่มเสื่อม โดยเปรียบเทียบเป็นรายเดือน (เดือนที่ 3-6) รวม 6 เดือน นำไปทดสอบเทียบกับกระดาษเทียบผลบวกที่ความเข้มข้น 1 µg/ml

ผล

การหาความจำเพาะของชุดทดสอบพาราควอตชนิดแคปซูล ในตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะ พบว่าวิธีดังกล่าวมีความจำเพาะสูงโดยให้ผลบวกกับพาราควอตเพียงชนิดเดียว และไม่พบปฏิกิริยาผลบวกที่เกิดจาก Dithionite กับไกลโฟเสท และ 2, 4-ดี ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการศึกษาค่าความจำเพาะของชุดทดสอบพาราควอตชนิดแคปซูล

ชนิดตัวอย่าง	สารมาตรฐาน		
	พาราควอต (positive/negative)	ไกลโฟเสท (positive/negative)	2, 4-ดี (positive/negative)
น้ำดื่ม 2.0 µg/ml	3/0	0/3	0/3
น้ำล้างกระเพาะเทียม 2.0 µg/ml	3/0	0/3	0/3
ปัสสาวะ 2.0 µg/ml	3/0	0/3	0/3
หลอดเทียบผลบวก	1/0	-	-
หลอดเทียบผลลบ	0/1	-	-

การศึกษาค่าขีดจำกัดของการตรวจพบพาราควอต (LOD) โดยทดสอบตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะ ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 2.0, 3.0 และ 5.0 µg/ml และทดสอบด้วยชุดทดสอบพาราควอตชนิดแคปซูล พบว่า ค่า LOD ในตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะเท่ากับ 0.7, 1.0 และ 2.0 µg/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาค่าขีดจำกัดของการตรวจพบพาราควอต (LOD) ในตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะ

ความเข้มข้น พาราควอต (µg/ml)	No. of positive/negative			Positive response rate (%)		
	น้ำดื่ม	น้ำล้าง กระเพาะเทียม	ปัสสาวะ	น้ำดื่ม	น้ำล้าง กระเพาะเทียม	ปัสสาวะ
0.0	0/10	0/10	0/10	0	0	0
0.3	0/10	0/10	0/10	0	0	0
0.5	0/10	0/10	0/10	0	0	0
0.7	10/0	0/10	0/10	100	0	0
1.0	10/0	10/0	0/10	100	100	100
2.0	10/0	10/0	10/0	100	100	100
3.0	10/0	10/0	10/0	100	100	100
5.0	10/0	10/0	10/0	100	100	100
LOD (µg/ml)	0.7	1.0	2.0			

การศึกษาความแม่นยำ

การทดสอบตัวอย่าง 3 ชนิด คือ น้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะที่ให้ผลบวกจริงชนิดละ 20 ตัวอย่าง และผลลบจริงชนิดละ 20 ตัวอย่าง ผลการศึกษาไม่พบผลบวกหลง (False positive) และผลลบหลง (False negative) ในตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด โดยมีค่าความไว ค่าความจำเพาะ และค่าความถูกต้อง เท่ากับร้อยละ 100 ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาความแม่นยำ (Precision) ของชุดทดสอบพาราควอตชนิดแคปซูล ในตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะ

จำนวนตัวอย่าง	ทดสอบด้วยชุดทดสอบพาราควอตชนิดแคปซูล		
	ตรวจพบ	ตรวจไม่พบ	รวม
ผลบวก 20 ตัวอย่าง	20 (TP)	0 (FP)	20
ผลลบ 20 ตัวอย่าง	0 (FN)	20 (TN)	20
รวม	20	20	40
ค่าความไว (Sensitivity)	$= TP \times 100 / (TP + FN)$		$= 100\%$
ค่าความจำเพาะ (Specificity)	$= TN \times 100 / (FP + TN)$		$= 100\%$
ค่าความถูกต้อง (Accuracy)	$= (TP + TN) \times 100 / \text{Total sample}$		$= 100\%$

การศึกษาความคงตัวของชุดทดสอบ

โดยเก็บชุดทดสอบพาราควอตชนิดแคปซูลรุ่นที่ 1 ถึงรุ่นที่ 8 แบ่งเก็บที่ 2 สภาวะ ได้แก่ เก็บที่อุณหภูมิห้อง และเก็บในโถดูดความชื้น ผลการศึกษาพบว่าชุดทดสอบสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 1 เดือน ส่วนชุดทดสอบเก็บในโถดูดความชื้นได้นาน 5 เดือน โดยที่ยังให้ผลการทดสอบถูกต้อง ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาความคงตัวของชุดทดสอบพาราควอตชนิดแคปซูล ในสภาวะเก็บที่อุณหภูมิห้องและเก็บในโถดูดความชื้นนาน 6 เดือน

รุ่นที่	ชุดทดสอบพาราควอตชนิดแคปซูล							
	เก็บที่อุณหภูมิห้อง		เก็บในโถดูดความชื้น					
	เดือนที่ 1 (สัปดาห์ 1-4)	เดือนที่ 2 (สัปดาห์ 1-4)	เดือนที่ 1 (สัปดาห์ 1-4)	เดือนที่ 2 (สัปดาห์ 1-4)	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4	เดือนที่ 5	เดือนที่ 6
1	+	-	+	+	+	+	+	-
2	+	-	+	+	+	+	+	-
3	+	-	+	+	+	+	+	-
4	+	-	+	+	+	+	+	-
5	+	-	+	+	+	+	+	-
6	+	-	+	+	+	+	+	-
7	+	-	+	+	+	+	+	-
8	+	-	+	+	+	+	+	-

วิจารณ์

การพัฒนาชุดทดสอบพาราควอตในรูปแบบแคปซูลมีวัตถุประสงค์เพื่อลดขั้นตอนการทดสอบให้เหลือเพียงขั้นตอนเดียว และเพื่อใช้ตรวจพิสูจน์หาพาราควอตเชิงคุณภาพในตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะ พบว่าวิธีมีความจำเพาะพบปฏิกิริยาที่เกิดจากสารไดไฮโดรอินท์ ให้ผลบวกกับพาราควอตเพียงชนิดเดียวและไม่พบปฏิกิริยาที่เกิดจากสารไดไฮโดรอินท์ กับไกลโฟเสท และ 2,4-ดี ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิด เป็นสารกำจัดวัชพืชเหมือนกัน แต่มีโครงสร้างโมเลกุลและน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน จึงสามารถใช้แทนไดควอตได้ ทั้งนี้เนื่องจากหน่วยงานไม่สามารถมาตรฐานดังกล่าว เมื่อนำค่าขีดจำกัดของการตรวจพบพาราควอตที่ระดับ LOD ในตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.7, 1.0 และ 2.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ โดยทดสอบตัวอย่างละ 10 ข้ว พบว่าได้สารละลายสีฟ้าทุกหลอด ตรวจพบร้อยละ 100 จากนั้นได้ประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบโดยการศึกษาความแม่นยำในตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะ ที่ให้ผลบวกจริงตัวอย่างละ 20 ตัวอย่าง และผลลบจริงตัวอย่างละ 20 ตัวอย่าง พบว่าไม่พบผลบวกหลงและผลลบหลง ได้ค่าความไว ความจำเพาะ และความถูกต้องร้อยละ 100 ทั้ง 3 ตัวอย่าง จากการศึกษาดังกล่าวพบว่าวิธีมีความถูกต้องและเชื่อถือได้ เนื่องจากมาตรฐานพาราควอตที่ใช้เตรียมตัวอย่างมีใบรับรอง เครื่องมือที่ใช้ เช่น ปีเปตอัตโนมัติ ขวดวัดปริมาตร ผ่านการสอบเทียบ ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยาก และ Blank matrix ไม่มีสิ่งรบกวนอื่นใด จึงทำให้ค่าที่ได้มีความถูกต้องสูง และในปีงบประมาณ พ.ศ. 2566 ผู้วิจัยมีแผนพัฒนาตรวจหาปริมาณพาราควอตในตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะ ด้วยเครื่องมือพิเศษ High performance liquid chromatography สำหรับผลการศึกษาความคงตัวของชุดทดสอบ (Stability) ได้เตรียมชุดทดสอบและเปรียบเทียบโดยแบ่งชุดทดสอบแต่ละรุ่นการผลิตเก็บที่อุณหภูมิห้อง และเก็บในโถดูดความชื้น พบว่าชุดทดสอบเก็บที่อุณหภูมิห้องเก็บได้ไม่นาน อาจเนื่องจากสารเคมีที่ใช้เตรียมชุดทดสอบ เช่น Sodium dithionite มีความเสถียรปานกลางเป็นสารดูดความชื้นได้ง่าย⁽¹⁵⁾ เพื่อป้องกันความชื้นโดยเก็บชุดทดสอบในโถดูดความชื้นทั้งนี้เพื่อให้มีอายุการใช้งานนาน จะเห็นว่าชุดทดสอบเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 1 เดือน ส่วนชุดทดสอบที่เก็บในโถดูดความชื้นสามารถเก็บได้นาน 5 เดือน จากการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยต้องการเปรียบเทียบสารเคมีที่ใช้เตรียมในแต่ละรุ่นมีความแตกต่างกันหรือไม่ เนื่องจากสารเคมีบางชนิดขึ้นได้ง่าย แต่จากการเปรียบเทียบการเตรียมชุดทดสอบ จำนวน 8 รุ่น พบว่าไม่แตกต่าง เพราะฉะนั้นการศึกษา Stability ควรศึกษาหรือเตรียมชุดทดสอบพร้อมกันในครั้งเดียว

การพัฒนาชุดทดสอบพาราควอตแบบขั้นตอนเดียวในรูปแบบแคปซูล ใช้หลักการทางเคมี (Dithionite test) ทำปฏิกิริยาระหว่างพาราควอตกับ Sodium azide ในสภาพต่าง ซึ่งจากการเตรียมชุดทดสอบได้ผลสมสารที่ทำให้เป็นต่าง รวมในแคปซูลดังกล่าว⁽¹⁰⁾ ได้แก่ Sodium dithionite, Disodium tetraborate และ Sodium bicarbonate ซึ่งสารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติทางเคมีเป็นต่าง ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8.5, 9.2 และ 8.6 ตามลำดับ^(15, 16, 17) จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่า วิธีมีค่าความถูกต้องเท่ากับ 100% แต่ด้วยข้อจำกัดของชุดทดสอบสามารถใช้ตรวจตัวอย่างที่มีลักษณะใสและไม่ขุ่น สำหรับตัวอย่างที่มีสีเข้มให้ตรวจด้วยเครื่องมือพิเศษ เช่น Ion exchange, High performance liquid chromatography เป็นต้น ส่วนตัวอย่างปัสสาวะของคนปกติสามารถตรวจหาพาราควอตด้วยวิธีนี้ได้ สีไม่รบกวนผลทดสอบ ได้ค่าความถูกต้องเท่ากับ 100% สำหรับตัวอย่างที่มีตะกอนให้ปั่นแยกตะกอนนำส่วนใสไปทดสอบทำให้การสังเกตสีของปฏิกิริยาชัดเจนขึ้น อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาการเกิดสีฟ้าหรือสีน้ำเงินของพาราควอตหรือ เมทิลไวโอเลเจนกับสารไดไฮโดรอินท์ ในสภาวะต่างๆจะไม่คงตัวและจะจางหายไปในเวลาไม่นานเมื่อถูกแสง พาราควอตก็จะถูก reoxidized กลับมาสู่ oxidized form ที่ไม่มีสีได้โดยง่าย⁽³⁾ ดังนั้นจึงต้องสังเกตปฏิกิริยาการเกิดสีภายใน 5 นาที หลังจากทดสอบ สำหรับตัวเทียบผลบวกผู้วิจัยได้เลือกใช้กระดาศเทียบผลบวกที่มีความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ เนื่องจากเป็นค่าความไว หรือค่าขีดจำกัดของการตรวจพบพาราควอต ในตัวอย่างน้ำล้างกระเพาะเทียม กรณีที่สนับสนุนชุดทดสอบพาราควอตให้กับโรงพยาบาลเพื่อใช้ตรวจตัวอย่างผู้ป่วยซึ่งส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างน้ำจากกระเพาะอาหาร จึงเป็นที่มาของการเลือกใช้กระดาศเทียบผลบวกที่มีความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ หลังจากพัฒนาชุดทดสอบดังกล่าวแล้วเสร็จ

ยังไม่มีตัวอย่างจริง มีเพียงแต่ได้เตรียมตัวอย่างทดสอบ (unknown) และเตรียมชุดทดสอบพาราควอตชนิดแคปซูล ส่งให้กับโรงพยาบาลที่เข้าร่วมโครงการรวม 20 แห่ง ทั้งนี้เพื่อให้เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชั้นสูตรของโรงพยาบาล มีทักษะ และเตรียมความพร้อมทางห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญยิ่ง แม้ว่าจะมีประกาศแบนพาราควอต จากประกาศ ในพระราชกฤษฎีกาเบกษา ซึ่งมีผลบังคับใช้ตั้งแต่ 1 มิถุนายน 2563 เป็นต้นไป⁽¹⁸⁾ แต่เมื่อวันที่ 25 กันยายน 2563 มีรายงานจากศูนย์ฉลาดข้อมูลนิธิต่อผู้บริโภค มีการตรวจพบพาราควอตในตัวอย่างปุ๋ยยี่ห้อ 33 จากตัวอย่าง 24 ตัวอย่าง ใน 6 จังหวัดภาคเหนือ⁽¹⁹⁾ แสดงว่าประเทศไทยยังคงมีการนำพาราควอตมาใช้งานหรืออาจจะมีการลักลอบเข้ามาและ นำมาใช้ในทางที่ผิด การเตรียมความพร้อมทางห้องปฏิบัติการและมีชุดทดสอบพาราควอตชนิดแคปซูล พร้อมใช้งาน ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ การใช้งานง่าย สะดวก เหลือเพียงขั้นตอนเดียว ทราบผลเร็วภายใน 5 นาที อีกทั้งสามารถ นำไปทดสอบตัวอย่างน้ำในภาคสนามกรณีเร่งด่วนหรือเผื่อระวัง ป้องกันการปนเปื้อนของสารพาราควอตได้ รวมทั้ง พกพาสะดวก ซึ่งแตกต่างกับชุดน้ำยาทดสอบพาราควอตแบบเดิมชนิด 2 ขั้นตอน วิธีการทดสอบต้องเติมน้ำยา ชนิด A และผงเคมี B การใช้งานค่อนข้างยุ่งยาก ไม่สะดวก และทำให้เสียเวลา การตรวจพิสูจน์พาราควอตให้รวดเร็วจึงมีความ สำคัญเป็นอย่างยิ่งโดยเฉพาะผู้ป่วยที่ได้รับโดยการกิน หากตรวจพบว่าได้รับสารพิษพาราควอตแพทย์สามารถช่วยเหลือ ผู้ป่วยและให้ยาแก้พิษได้ทันที

สรุป

การพัฒนาชุดทดสอบพาราควอตแบบขั้นตอนเดียวในรูปแบบแคปซูล พบว่าวิธีนี้มีความถูกต้อง ใช้งานง่าย ลดขั้นตอนการทดสอบเหลือเพียงขั้นตอนเดียว สะดวก รวดเร็ว และเหมาะสมที่จะนำไปใช้ตรวจพิสูจน์พาราควอต ในตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำล้างกระเพาะเทียม และปัสสาวะได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นายวิชัย ปราสาททอง ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7 ขอนแก่น ที่ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะรวมทั้งข้อคิดเห็นต่างๆ ขอขอบคุณนายวรศักดิ์ อินทร์ชัย ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา, นายวัชรชัย รุจิโรจน์กุล ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี และนายราเมศ กรณีย ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ที่สนับสนุนสารมาตรฐานสำหรับงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณนางลักขณา ทองเรืองศรี โรงพยาบาลปะเหลียน ที่ช่วยตรวจทานต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

1. Watts M. Paraquat. Penang, Malaysia: Pesticide Action Network Asia and the Pacific. [online]. 2010; [cited 2021 Jun 25]; [44 screens]. Available from: URL: http://www.thaipan.org/sites/default/files/fileinter/monograph_paraquat_0.pdf.
2. พรพนธ์ พิเดช. เทคนิคการวิเคราะห์และความรู้เบื้องต้นสำหรับห้องปฏิบัติการพิษวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2530. หน้า 224-227.
3. Wikipedia, the free encyclopedia. Viologen. [online]. 2020; [cited 2021 Jun 10]; [5 screens]. Available from: URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Viologen#Mechanism_of_action.
4. Addo E, Poon-King T. Leucocyte suppression in treatment of 72 patients with paraquat poisoning. Lancet 1986; 327(8490): 1117-20.
5. ดาริกา วอทอง. พาราควอต. [ออนไลน์]. 2561; [สืบค้น 21 พ.ค. 2564]; [5 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://www.summacheeva.org/occtox/paraquat>.

6. Paraquat. In: Flanagan RJ, Braithwaite RA, Brown SS, Widdop B, de Wolff FA. Basic analytical toxicology. Geneva: World Health Organization; 1995. p. 195–196.
7. Raghu K, Mahesh V, Sasidhar P, Reddy PR, Venkataramaniah V, Agrawal A. Paraquat poisoning: a case report and review of literature. *J Family Community Med* 2013; 20(3): 198–200.
8. Reihani H, Zarmehri B. Multi-organ failure due to paraquat poisoning: case report and review of literature. *Asia Pac J Med Toxicol* 2016; 5: 98–100.
9. อุดมศักดิ์ สุตมาตร, จินตนา ปานทอง, ธรรมชนก พิทักษ์. การประเมินประสิทธิผลชุดทดสอบพาราควอตของห้องปฏิบัติการชันสูตรของโรงพยาบาลในจังหวัดตรัง. *ว กรมวิทย์ พ* 2542; 41(3): 343–8.
10. Clarke EGC, Moffat AC, Pharmaceutical Society of Great Britain. Department of Pharmaceutical Sciences. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. 2nd ed. London: The Pharmaceutical Press; 1986. p. 24–25.
11. United States Pharmacopeial Convention. USP 42–NF 37: The United States pharmacopeia and the national formulary. Rockville, MD: United States Pharmacopeia Convention; 2019. p. 6168.
12. AOAC International. Guidelines for standard method performance requirements: Annex C. In: AOAC official method of analysis. [online]. 2016; [cited 2021 May 24]; [2 screens]. Available from: URL: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf.
13. Annex D – notes on qualitative analysis. In: Eurachem Guide. The fitness for purpose of analytical methods – a laboratory guide to method validation and related topics: 2nd ed. [online]. 2014; [cited 2021 May 20]; [3 screens]. Available from: URL: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf.
14. National Association of Testing Authorities. General accreditation guidance – validation and verification of quantitative and qualitative test methods. [online]. 2018; [cited 2021 Jun 8]; [31 screens]. Available from: URL: <https://nata.com.au/files/2021/05/Validation-and-Verification-of-Quantitative-and-Qualitative-Test-Methods.pdf>.
15. Merck KGaA. Sodium dithionite. [online]. 2021; [cited 2021 Jun 21]; [1 screen]. Available from: URL: https://www.merckmillipore.com/TH/en/product/Sodium-dithionite,MDA_CHEM-106505?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F.
16. Merck KGaA. Disodium tetraborate. [online]. 2021; [cited 2021 Jun 21]; [1 screen]. Available from: URL: https://www.merckmillipore.com/TH/en/product/di-Sodium-tetraborate,MDA_CHEM-106306?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F.
17. Merck KGaA. Sodium hydrogen carbonate. [online]. 2021; [cited 2021 Jun 21]; [1 screen]. Available from: URL: https://www.merckmillipore.com/TH/en/product/Sodium-hydrogen-carbonate,MDA_CHEM-106329?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F.
18. ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่อง บัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย ฉบับที่ 6 (พ.ศ. 2563). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 117 ง (วันที่ 19 พฤษภาคม 2563). หน้า 56.
19. มูลนิธิเพื่อผู้บริโภค. ผลัดซื้อตรวจพบสารพาราควอตในน้ำปู ร้อง กก.วัตถุอันตรายแบนทันที. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 21 พ.ค. 2564]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://www.consumerthai.org/consumers-news/food-and-drug/4511-paraquatcrappaste.html>.

Development of One-Step Paraquat Test Kit

Jintana Krodtem¹ Sarinya Rittinium¹ Thammawut Chumark¹ and Laksika Thongruangsri²

¹Regional Medical Sciences Center 12/1 Trang, Department of Medical Sciences, Amphoe Muang, Trang 92000

²Palian Hospital, Amphoe Palian, Trang 92120, Thailand

ABSTRACT Paraquat is a herbicide that is widely used and has serious harmful effects on humans and animals. Science 1998, The Regional Medical Sciences Center 12/1 Trang set up a 2-step paraquat test kit and supported to hospitals used for testing specimens derived from the patients that were suspected to be exposed to paraquat. In 2019, the one-step paraquat test kit was developed in capsule form in order to reduce process and time for testing in drinking water, simulated gastric content and urine samples. The results showed that the test kit could be used for testing paraquat with highly specific reaction. The limit of detection of paraquat in drinking water, simulated gastric content and urine samples were 0.7, 1.0 and 2.0 µg/ml, respectively. The test kit showed the perfect performance of sensitivity, specificity, and accuracy at 100 percent. The test kit could be stored at room temperature for 1 month and in a desiccator for 5 months. In conclusion, the one-step paraquat test kit developed in this study is easy to use with quick result and suitable for testing in drinking water, simulated gastric content and urine samples.

Keywords: Paraquat, Test kit, Herbicide

การวิเคราะห์ปริมาณรังสีกระเจิงและการป้องกันอันตรายจากรังสีเมื่อถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่

วสัน บุตรพา

โรงพยาบาลนครปฐม อำเภอมืองนครปฐม นครปฐม 73000

บทคัดย่อ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณรังสีกระเจิง (Scatter radiation) จากเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ (Portable X-ray) ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น Mobile Art Evolution และ FUJI FILM แบบ Full DR รุ่น FDR GO Plus ของโรงพยาบาลนครปฐม โดยการวิเคราะห์ปริมาณรังสีกระเจิง ทิศทางและระยะที่ปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงานด้านรังสี และบุคคลทั่วไปจากการถ่ายภาพรังสีด้วยเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ ดำเนินการวิเคราะห์ทิศทางที่ 0, 45, 90, 135, 180, 225, 270 และ 315 องศา ที่ระยะห่าง 0.5, 1.5, 3.0 และ 4.0 เมตร โดยวัดจากพื้น 80 เซนติเมตร ซึ่งเทียบได้กับตำแหน่งของ Gonad ของคนสูง 175 เซนติเมตร และใกล้เคียงความสูงของเตียงผู้ป่วย ใช้เทคนิคถ่ายภาพรังสีเอกซเรย์ปอดท่านอนหงาย (Chest AP Supine) ใช้แผ่นรับภาพรังสีขนาด 14 × 17" ตั้งค่าเทคนิค 85 kVp, 1.6 mAs 70 kVp, 0.63 mAs สำหรับผู้ป่วยเด็ก และใช้เทคนิคถ่ายภาพรังสีกระดูกเชิงกราน (Pelvic AP) ตั้งค่าเทคนิค 85 kVp, 3.2 mAs ที่ระยะ 100 เซนติเมตร โดยใช้เครื่องสำรวจรังสี (Survey meter) ผลการทดลองพบว่าปริมาณรังสีกระเจิงแปรผันกับระยะห่างจากตัวผู้ป่วย แต่ไม่ขึ้นกับทิศทางผู้ปฏิบัติงานด้านรังสีและประชาชนทั่วไป ที่ได้รับปริมาณรังสีกระเจิงไม่เกินค่าขีดจำกัดการได้รับรังสี ไม่เกิน 20 mSv/yr และไม่เกิน 1 mSv/yr ตามลำดับ เพื่อความปลอดภัยในการปฏิบัติงาน ผู้ปฏิบัติงานควรอยู่ห่างจากหลอดเอกซเรย์ที่ระยะมากกว่า 4 เมตร และมุมที่ปลอดภัย คือ 0 องศา และควรสวมเสื้อตะกั่วป้องกันรังสี

คำสำคัญ: รังสีกระเจิง, การป้องกันอันตรายจากรังสี, เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่

Corresponding author E-mail: wasan.buthpa@gmail.com

Received: 27 October 2020

Revised: 23 July 2021

Accepted: 5 August 2021

บทนำ

ปัจจุบันงานด้านรังสีวินิจฉัยมีความสำคัญในการช่วยแพทย์วินิจฉัยโรค ซึ่งในแต่ละวันมีผู้เข้ารับบริการทางรังสีของกลุ่มงานรังสีจำนวนมาก เช่น เครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ เอกซเรย์ทั่วไป เอกซเรย์แบบฟลูโอโรสโคปี เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ที่เป็นเครื่องมือในงานด้านรังสีวินิจฉัยที่ใช้รังสีในการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นในทางการแพทย์ใช้ในการเอกซเรย์ส่วนต่าง ๆ สำหรับผู้ป่วยที่มีอาการหนักหรือเคลื่อนย้ายลำบาก ใช้ในการเอกซเรย์ที่หอผู้ป่วย ห้องผ่าตัดและสถานที่อื่น ๆ เป็นระบบ DR สามารถดูภาพทางรังสีจากจอคอมพิวเตอร์จากเครื่องได้ ทำให้รักษาผู้ป่วยเบื้องต้นได้รวดเร็วและปลอดภัยทำให้อัตราการเสียชีวิตและพิการน้อยลง ในการให้บริการต้องคำนึงถึงปริมาณรังสีที่เหมาะสมและความปลอดภัยของผู้ป่วย เจ้าหน้าที่ และบุคลากรรอบข้าง ต้องคำนึงถึง International Commission on Radiological Protection (ICRP)⁽¹⁾ ได้กำหนดเป้าหมายการป้องกันรังสีเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด deterministic effects อีกทั้งลดโอกาสการเกิด stochastic effects รังสีเอกซ์มีผลทำให้เกิดทั้ง 2 กรณีให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้และพิจารณารังสีไปใช้ในปริมาณน้อยที่สุด โดยก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด การป้องกันอันตรายจากรังสีจำเป็นต้องมีการจัดเตรียมปัจจัย เช่น การจัดสถานที่ให้เหมาะสม การวางแผนการก่อสร้าง การติดตั้งอุปกรณ์และที่สำคัญคือ ความพร้อมของบุคลากรและเครื่องมือ อุปกรณ์ป้องกัน เช่น เสื้อตะกั่ว ไทรอยด์ชิลด์ บุคลากรที่ปฏิบัติงานเกี่ยวกับรังสีจะต้องมีความรู้เกี่ยวกับการป้องกันอันตรายจากรังสีและวิธีป้องกันอันตรายจากรังสี และสามารถปฏิบัติงานได้ถูกต้องตามขั้นตอนอย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนั้นจะต้องมีเครื่องมือที่ช่วยในการป้องกันอันตรายจากรังสี เพื่อให้ทำงานได้อย่างความปลอดภัยและสะดวกยิ่งขึ้น บุคลากรที่ปฏิบัติงานทางด้านรังสีควรได้รับปริมาณรังสีให้น้อยที่สุดโดยยึดหลัก 3 ประการ ให้ระยะห่างมากที่สุดที่สามารถปฏิบัติงานได้ ใช้เวลาในการเอกซเรย์น้อยที่สุด และใช้ฉากกั้น⁽²⁾ ได้แก่ เสื้อตะกั่ว ไทรอยด์ชิลด์

กลุ่มงานรังสีวิทยา โรงพยาบาลนครปฐม เป็นหน่วยงานด้านรังสีวินิจฉัย มีการให้บริการเครื่องเอกซเรย์แบบเคลื่อนที่ ณ หอผู้ป่วยในแต่ละวันเป็นจำนวนมาก เพื่อหาระยะและตำแหน่งที่ปลอดภัยแก่ผู้ปฏิบัติงาน เจ้าหน้าที่ประจำตึกและบุคคลบริเวณใกล้เคียง ได้รับปริมาณรังสีน้อยที่สุดในการถ่ายภาพเอกซเรย์จากเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ เจ้าหน้าที่แม้จะใส่เครื่องป้องกันแล้ว อาจไม่เพียงพอในการป้องกันอันตรายต่อเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานและผู้ป่วย ซึ่งมีการกำหนดปริมาณรังสีสูงสุดที่ยอมรับได้สำหรับเจ้าหน้าที่ใช้เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ในการวินิจฉัย โดยค่า effective dose เฉลี่ยในระยะเวลา 5 ปี ไม่เกิน 20 millisieverts per year (mSv/yr) ถือว่าปลอดภัยจากรังสี⁽³⁾

การศึกษานี้เป็นการวัดปริมาณรังสีกระเจิงเพื่อหาระยะ ทิศทาง และตำแหน่งอันตรายจากรังสีรอบ ๆ เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ เพื่อป้องกันปริมาณรังสีกระเจิงที่เจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงาน เจ้าหน้าที่ประจำตึก และบุคคลบริเวณใกล้เคียงซึ่งจะได้รับขณะทำการถ่ายภาพรังสี

วัสดุและวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น Mobile Art Evolution หมายเลขเครื่อง: 0162s90607 kV 125 mA/mAs เครื่องมือทดสอบคุณภาพเครื่องเอกซเรย์ 1. RTI Model Barracuda 320 mAs 2. เครื่องสำรวจปริมาณรังสี Victoreen รุ่น 451P ตรวจสอบเมื่อวันที่ 19 ต.ค. 2559 หมายเลขทดสอบ 4059010596

เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ยี่ห้อ FUJI FILM แบบ Full DR รุ่น FDR GO Plus หมายเลขเครื่อง: MQ000128A028 kV 133 mA/mAs maximum 320 mAs เครื่องมือทดสอบคุณภาพเครื่องเอกซเรย์ 1. RaySafe Model:X2 R/F S/N 266644 2. Fluke (Survey meter) Model:451P-DE-SI-RYR S/N 0000007930 ตรวจสอบเมื่อวันที่ 24 ก.พ. 2563 หมายเลขทดสอบ 2001230147(4063001922)

เครื่องสำรวจรังสี (Survey meter) ผลิตภัณฑ์ของ Fluke รุ่น 451P-DE-SI-RYR Serial Number: 6608 ผลิตโดยบริษัท Fluke Biomedical ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้รับการสอบเทียบวันที่ 11 ตุลาคม 2562 จากห้องปฏิบัติการสอบเทียบเครื่องวัดรังสีมาตรฐานทุติยภูมิ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 เครื่องสำรวจรังสี (Survey meter) ยี่ห้อ Fluke รุ่น 451P-DE-SI-RYR S/N: 6608

กล่องเหล็กที่ใส่เครื่องสำรวจรังสี ขนาด 29 × 39 × 16 เซนติเมตร เปรียบเทียบเมื่อถ่ายภาพรังสีเมื่อผู้ป่วยนอนเตียง stretcher ที่มีพื้นเหล็ก

วิธีการศึกษา

วิธีการวัดปริมาณรังสีกระเจิงเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ วัดปริมาณรังสี (Radiation output) ของเครื่องเอกซเรย์ FUJI FILM และ SHIMADZU (จากผลการทดสอบเครื่องเอกซเรย์ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม) การตรวจสอบปริมาณรังสีของเครื่องเอกซเรย์ทั่วไปคือ การตรวจสอบความถูกต้อง ความแม่นยำ และความเที่ยงตรงเป็นสิ่งที่จำเป็น หากเครื่องเอกซเรย์ที่ใช้งานไม่ได้มาตรฐาน ปริมาณรังสีที่ผู้ป่วยจะได้รับอาจจะมากเกินไปจนเกินความจำเป็น เครื่องเอกซเรย์ทั่วไปเป็นเครื่องมือที่ใช้รังสีเอกซ์น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องมือทางการแพทย์อื่นๆ ที่ใช้รังสีเอกซ์ แต่ก็ยังมีความเสี่ยงต่อตัวผู้ป่วย การทดสอบค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดรังสีเอกซ์จึงจำเป็นต้องทำการทดสอบ ได้แก่ ค่ากิโลโวลต์สูงสุด (Kilovoltage peak: kVp) เวลาในการฉาย (Exposure time) และปริมาณรังสี (Radiation output) ในการตรวจสอบเครื่องเอกซเรย์วินิจัยทั่วไปที่ใช้อุปกรณ์วัดปริมาณรังสีในการทดสอบ ได้แก่

ค่ากิโลโวลต์สูงสุด (Kilovoltage peak: kVp) เครื่องวัดค่ากิโลโวลต์แบบ Non-Invasive X-ray Beam Analyzer การตั้งค่าเครื่องเอกซเรย์ ตั้งค่าเทคนิคการฉายรังสี โดยเลือกค่าที่ใช้ในการถ่ายภาพรังสีให้กับผู้ป่วย เช่น 80 kV 20 mAs ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม ตั้งค่าเทคนิคที่ 80 kV 10 mAs วางเครื่องวัดค่ากิโลโวลต์ให้รับรังสีปฐมภูมิตามคู่มือการใช้งาน ปรับขนาดของลำรังสีให้ครอบคลุมหัววัด ฉายรังสี อย่างน้อย 5 ครั้ง ซึ่งศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม ฉายรังสี 6 ครั้ง ในการสอบเทียบเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ทั้ง 2 เครื่อง บันทึกความต่างศักย์ตลอดที่อ่านได้จากเครื่องวัด ทำซ้ำโดยการปรับเปลี่ยนค่ากิโลโวลต์ไปที่ค่าที่ต้องการจะทดสอบ

การวิเคราะห์

สมการคำนวณความผิดพลาดความซ้ำ (kV) ไม่เปลี่ยนค่า mA ค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation)

$$\%CV = \frac{SD}{X} \times 100$$

เมื่อ SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$\bar{X}$ คือ ค่าเฉลี่ยของค่ากิโลโวลต์ที่ได้จากการวัด

X_i คือ ค่ากิโลโวลต์ที่วัดได้ครั้งที่ i

ค่ากิโลโวลต์ที่วัดได้ต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกิน 2% (Coefficient of Variation < 0.02 for high frequency และ three phase)

ค่ากิโลโวลต์ที่วัดได้ต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกิน 5% (Coefficient of Variation < 0.05 for single phase full wave และ half wave)

ความแม่นยำ (Accuracy) เครื่องวัดค่ากิโลโวลต์แบบ Non-Invasive X-ray Beam Analyzer การตั้งค่าเครื่องเอกซเรย์ ปรับตั้งค่ากิโลโวลต์ที่แผงควบคุมที่ต้องการวัด ตั้งค่า mA และ time คงที่

วิธีการ วางเครื่องวัดค่ากิโลโวลต์ไว้ภายใต้รังสีปฐมภูมิ ระยะจากจุดโฟกัสของหลอดเอกซเรย์ถึงเครื่องวัด ตามคู่มือการใช้งาน ปรับขนาดของลำรังสีให้ครอบคลุมหัววัดรังสี ทำการฉายรังสี บันทึกค่ากิโลโวลต์ที่ตั้งและค่าที่วัดได้ ทำซ้ำโดยการปรับเปลี่ยนค่ากิโลโวลต์ไปที่ค่าที่ต้องการจะทดสอบ

การวิเคราะห์ นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาความผิดพลาดตามสมการดังต่อไปนี้

$$\%ERROR = \frac{kV_m - kV_s}{kV_m} \times 100$$

เมื่อ kVs คือ ค่าความต่างศักย์หลอดที่ตั้ง

kVm คือ ค่าความต่างศักย์หลอดที่ได้จากการวัด

เวลาในการฉายรังสี (Exposure time) ความทำซ้ำ (Reproducibility) จากการวัด ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation: CV) ต้องมีค่าไม่เกิน 5% ค่าความแม่นยำ (Accuracy) จากการวัด ต้องมีค่าความผิดพลาดไม่เกิน $\pm 10\%$ ของค่าที่ตั้ง

ปริมาณรังสี (Radiation output)

ความเป็นเชิงเส้น (Linearity) โดยใช้เครื่องวัดปริมาณรังสีแผ่นตะกั่วกันรังสีกระเจิง โดยตั้งค่าเครื่องเอกซเรย์ เช่น 80 kV 0.05 s หรือ 0.1 s คงที่ เปลี่ยนค่า mA หรือเปลี่ยนค่า mAs

วิธีการ ตั้งหัววัดในบริเวณพื้นที่รังสีปฐมภูมิ ระยะจากจุดโฟกัสหลอดเอกซเรย์ตามคำแนะนำการใช้เครื่องวัด ตั้งโหมดการวัดแบบการวัดปริมาณรังสีรวม (Integrate) วางแผ่นตะกั่วลดทอนรังสีกระเจิงจากบริเวณพื้นที่วางหัววัด ปรับขนาดของลำรังสีให้คลุมพื้นที่ขนาดของหัววัด วัดค่าปริมาณรังสีที่ค่า mA หรือ mAs เท่าที่สามารถวัดได้ในทางปฏิบัติ

$$\text{การวิเคราะห์ คำนวณค่าปริมาณรังสีต่อค่าเทคนิคที่ตั้ง} \quad \frac{\mu\text{Gy}}{\text{mAs}} ; X$$

โดยการหารค่าปริมาณรังสีที่วัดได้ด้วยค่า mAs ที่ตั้ง จับคู่ค่า X ของ mA หรือ mAs ที่อยู่ติดกัน คำนวณหาความสัมพันธ์ความเป็นเชิงเส้น

$$\% \text{ สัมประสิทธิ์ความเป็นเชิงเส้น} = \frac{X_2 - X_1}{X_2 + X_1} \times 100$$

ความซ้ำ (Reproducibility) โดยใช้เครื่องวัดค่าเวลาหรือเครื่องวัดรังสีชนิด Non-Invasive ที่สามารถวัดค่าเวลาการฉายรังสีได้โดยตั้งค่า kV, mA และ time คงที่ เช่น 80 kV 200 mA และ 0.05 s หรือ 0.1 s

วิธีการ ตั้งเครื่องวัดในบริเวณพื้นที่รังสีปฐมภูมิ ระยะจากจุดโฟกัสหลอดเอกซเรย์ตามคำแนะนำการใช้ เครื่องวัดปรับขนาดของลำรังสีให้คลุมพื้นที่ขนาดของหัววัด ฉายรังสีอย่างน้อย 5 ครั้ง โดยตั้งค่าเวลาที่ใช้งานประจำ

การวิเคราะห์ นำผลที่ได้มาคำนวณตามสมการค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

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

เมื่อ SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$\bar{X}$ คือ ค่าเฉลี่ยของค่ากิโลโวลต์ที่ได้จากการวัด

X_i คือ ค่าที่วัดได้ครั้งที่ i

ค่าปริมาณรังสีที่วัดได้ต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกิน 5% (Coefficient of Variation < 0.05)⁽⁴⁾

ความเป็นเชิงเส้นแบ่งการตรวจสอบเป็น 2 กรณี คือ

กรณีเครื่องเอกซเรย์ตั้งค่าแบบมิลลิแอมแปร์ (mA linearity) สัมประสิทธิ์ความเป็นเชิงเส้น ต้องมีค่าไม่เกิน 10%

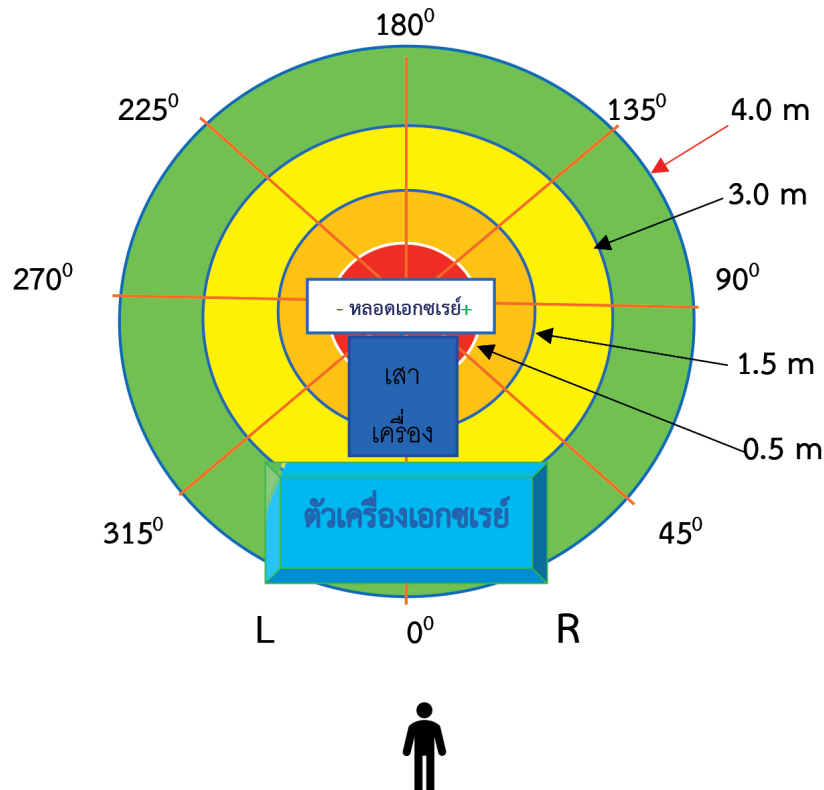
กรณีเครื่องเอกซเรย์ตั้งค่าแบบผลคูณระหว่างกระแสกับเวลา (mAs linearity) สัมประสิทธิ์ความเป็นเชิงเส้นต้องมีค่าไม่เกิน 20%⁽⁵⁾

การวัดปริมาณรังสีกระเจิง ยกหัวหลอดเอกซเรย์ไปด้านหลังโดยหัวบออยู่ทางซ้าย หัวบออยู่ทางขวา กำหนดระยะทางจากต้นกำเนิดรังสีถึงจุดวัดปริมาณรังสีกระเจิงที่ระยะ 0.5, 1.5, 3.0 และ 4.0 เมตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยรอบหัวหลอดเอกซเรย์ตามมุม 360 องศา ที่ 0, 45, 90, 135 และ 180, 215, 270 และ 315 องศา ตามลำดับ นำกล้องหลักที่ใส่เครื่องสำรวจรังสี (Survey meter model) ขนาด 29 × 39 × 16 เซนติเมตร วางบนโต๊ะไม้ที่มีความสูง 80 เซนติเมตร เทียบได้กับตำแหน่งของ Gonad ของคนสูง 175 เซนติเมตร และใกล้เคียงความสูงของเตี๊ยมผู้ป่วย กำหนดค่าเทคนิคที่ใช้จริงในการถ่ายภาพเอกซเรย์ปอดท่านอน (Chest AP Supine) ในผู้ป่วยเด็ก 70 kVp, 0.63 mAs และผู้ป่วยผู้ใหญ่ 85 kVp, 1.6 mAs การถ่ายภาพเอกซเรย์กระดูกสะโพก (Pelvic) 85 kVp, 3.2 mAs ซึ่งค่าเทคนิคทั้ง 3 ค่า เป็นค่าเทคนิคที่ใช้ในการถ่ายภาพทางรังสีจากเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ของโรงพยาบาลนครปฐม ที่ให้รายละเอียดของภาพและผู้ป่วยได้รับปริมาณรังสีน้อย วัดปริมาณรังสีกระเจิงของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น Mobile Art Evolution และ FUJI FILM แบบ Full DR รุ่น FDR GO Plus โดยวัดตำแหน่งที่กำหนดตำแหน่งละ 3 ครั้ง ดังแสดงในภาพที่ 3

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำค่าปริมาณรังสีกระเจิงที่ได้จากการวัด 3 ครั้ง ของแต่ละจุดที่กำหนดมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรมสำเร็จรูป Data analysis ของ EXCEL 2010 ประกอบด้วย ค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีกระเจิง และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

คำนวณหาปริมาณรังสีกระเจิงที่ได้รับต่อปี (mSv/yr) คือปริมาณรังสีกระเจิง (mSv) × จำนวนเวลาที่ทำการเอกซเรย์/วัน × จำนวนวัน/สัปดาห์ × 52 สัปดาห์/ปี



ภาพที่ 2 ตำแหน่งที่ทำการวัดปริมาณรังสีกระเจิง



A



B

ภาพที่ 3 การวัดปริมาณรังสีกระเจิงของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ FUJI FILM (A) และ SHIMADSU (B)

ผล

ผลจากการวัด Radiation output และปริมาณรังสีกระเจิง

ปริมาณรังสี (Radiation output)^(4,5) ผลจากการสอบเทียบเครื่องเอกซเรย์ทั่วไปเพื่อทดสอบความต่างศักย์ของหลอด (ค่ากิโลโวลต์, kV) ศูนย์วิทยศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม ของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ SHIMADZU และ FUJI FILM โดยตั้งค่าเทคนิคคงที่ คือ 80 kV 10 mAs ที่ระยะ 50 เซนติเมตร ฉายรังสี 6 ครั้ง ผลค่าเฉลี่ย (Avg) เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ SHIMADZU และ FUJI FILM เท่ากับ 79.64 kVp และ 81.02 kVp ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.05 และ 0.20 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 ความทำซ้ำการวัด

ค่าปริมาณรังสี (Radiation Output) ในการวัดทดสอบของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม ผลที่ได้คือ เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ SHIMADZU ให้ค่าเทคนิค 80 kV 10 mAs โดยไม่เปลี่ยน mAs ผลที่ได้จากการวัดปริมาณรังสี (mR) ปริมาณรังสีต่ำสุดเท่ากับ 244.93 ปริมาณรังสีสูงสุดเท่ากับ 245.37 ผลค่าเฉลี่ย (Avg) เท่ากับ 245.22 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.15 ค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation) เท่ากับ 0.06 ดังแสดงในตารางที่ 1 เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ FUJI FILM ผลที่ได้จากการวัดปริมาณรังสี (mR) ปริมาณรังสีต่ำสุดเท่ากับ 204.50 ปริมาณรังสีสูงสุดเท่ากับ 224.2 ผลค่าเฉลี่ย (Avg) เท่ากับ 220.00 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 7.76 ค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation) เท่ากับ 3.53 ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ (80 kV, 10 mAs, ระยะ 50 เซนติเมตร)

ครั้งที่		1	2	3	4	5	6	CV%	SD	Avg
ค่าความต่างศักย์	S	79.61	79.66	79.66	79.69	79.55	79.69	0.07	0.05	79.64
	F	81.30	80.80	80.80	81.00	81.20	81.020	0.25	0.20	81.02
ปริมาณรังสี	S	244.93	245.29	245.28	245.22	245.2	245.37	0.06	0.15	245.22
	F	223.10	223.90	224.20	224.30	204.50	220.00	3.53	7.76	220.00

หมายเหตุ S = SHIMADZU , F = FUJI FILM

ผลจากการสอบเทียบเครื่องเอกซเรย์ทั่วไปเพื่อทดสอบความต่างศักย์ของหลอด (ค่ากิโลโวลต์, kV) เพื่อหาค่าความแม่นยำ (Accuracy) ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม โดยตั้งค่าเทคนิคที่ 16 mAs โดยเปลี่ยนค่า kV ของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ SHIMADZU ค่าเทคนิค 3 ค่า ที่ 60, 70, 80 kV ผลค่าความต่างศักย์ที่วัดเท่ากับ 60.17, 69.43, 78.94 kVp ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 ผลของค่าเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% CV) ค่าความต่างศักย์ (kV) ของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ SHIMADZU คือ -1.33 % ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่ากระแสไฟฟ้าผ่านหลอดเอกซเรย์สูงสุด (16 mAs, ระยะ 50 เซนติเมตร) ของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ SHIMADZU

ครั้งที่	1	2	3	Max
Set kV	60.00	70.00	80.00	80.00
ความต่างศักย์ของหลอด (kV)	60.17	69.43	78.94	78.94
ร้อยละค่าความต่างศักย์ (%kv Diff)	0.28	-0.82	-1.33	-1.33

ผลจากการสอบเทียบเครื่องเอกซเรย์ทั่วไปเพื่อทดสอบความต่างศักย์ของหลอด (ค่ากิโลโวลต์, kV) เพื่อหาค่าความแม่นยำ (Accuracy) ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม โดยตั้งค่าเทคนิคที่ 16 mAs โดยเปลี่ยนค่า kV ของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ FUJI FILM ค่าเทคนิค 4 ค่า ที่ 60, 70, 80, 90 kV ผลค่าความต่างศักย์ที่วัดได้เท่ากับ 60.90, 70.10, 80.60 และ 91.05 kVp ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 ผลของค่าเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% CV) ค่าความต่างศักย์ (kV) ของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ SHIMADZU คือ 1.67% ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่ากระแสไฟฟ้าผ่านหลอดเอกซเรย์สูงสุด (16 mAs, ระยะ 50 เซนติเมตร) ของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ FUJI FILM

ครั้งที่	1	2	3	4	Max
Set kV	60.00	70.00	80.00	90.00	90.00
ความต่างศักย์ของหลอด (kV)	60.90	70.10	80.60	91.50	91.50
ร้อยละความต่างศักย์ (%kv Diff)	1.50	0.14	0.75	1.67	1.67

ผลการตรวจสอบปริมาณรังสี (Radiation output)

ค่ากระแสผ่านหลอดเอกซเรย์หรือความเป็นเชิงเส้น (Linearity) ในการวัดทดสอบของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ SHIMADZU ให้ค่าเทคนิค 80 kV แล้วเปลี่ยนค่า mAs ที่ 1, 1.6, 20 mAs ผลที่ได้จากการวัดปริมาณรังสี (mR) เท่ากับ 245.28, 240.92 และ 240.15 ตามลำดับ กระแสผ่านหลอดเอกซเรย์ (Linearity) เท่ากับ 0.90 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบปริมาณรังสี (80 kV ระยะ 50 เซนติเมตร) ของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ SHIMADZU

ครั้งที่	1	2	3	Max
ค่าเทคนิค mA	10	16	20	20
ค่าเทคนิค mAs	1	1.6	2	2
ความต่างศักย์ของหลอด (kV) เปลี่ยนค่า mA	79.66	78.94	78.90	78.90
ความแม่นยำความต่างศักย์ของหลอดเปลี่ยนค่า mA	79.66	78.94	78.90	78.90
ร้อยละความต่างศักย์ (%kv Diff)	-0.43	-1.33	-1.37	-1.37
ปริมาณรังสี (mR)	245.28	385.47	480.30	480.30
mR/mAs		245.28	240.92	240.15
ค่ากระแสผ่านหลอดเอกซเรย์ (Linearity)	0.90	0.90	0.16	0.90

หมายเหตุ: การวัดความเป็นเชิงเส้น (Linearity) โดยเปลี่ยนค่า mAs ให้คงค่า kV เพื่อวัดค่า Dose การคำนวณให้จับคู่กันโดยใช้ค่า mR/mAs ที่ติดกัน

ค่ากระแสผ่านหลอดเอกซเรย์หรือความเป็นเชิงเส้น (Linearity) ในการวัดทดสอบของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ FUJI FILM ให้ค่าเทคนิค 80 kV แล้วเปลี่ยนค่า mAs ที่ 10 และ 16 mAs ผลที่ได้จากการวัดปริมาณรังสี (mR) เท่ากับ 220 และ 325 ค่ากระแสผ่านหลอดเอกซเรย์ (Linearity) เท่ากับ 3.97 ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการตรวจสอบปริมาณรังสี (80 kV ระยะ 50 เซนติเมตร) ของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ FUJI FILM ครั้งที่ 12 Max

ครั้งที่	1	2	Max
ค่าเทคนิค mAs	10.00	16.00	16.00
ความต่างศักย์ของหลอด (kv) เปลี่ยนค่า mA	81.02	80.60	80.60
ความแม่นยำของความต่างศักย์ของหลอด เปลี่ยนค่า mA	81.02	80.60	80.60
ร้อยละความต่างศักย์ (%kv Diff)	1.28	0.75	1.28
ปริมาณรังสี(mR)	220.00	325.00	325.00
mR/mAs	22.00	20.32	20.32
ค่ากระแสด้านหลอดเอกซเรย์ (Linearity)	3.97	3.97	3.97

หมายเหตุ: การวัดความเป็นเชิงเส้น (Linearity) โดยเปลี่ยนค่า mAs ให้คงค่า kv เพื่อวัดค่า Dose การคำนวณให้จับคู่กันโดยใช้ค่า mR/mAs ที่ติดกัน

ผลค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีกระเจิง ผลค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดปริมาณรังสีกระเจิงของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ตามระยะ 0.5, 1.5, 3.0 และ 4.0 เมตร ตามลำดับ โดยรอบหัวหลอดเอกซเรย์ตามมุม 360 องศา ที่ 0, 45, 90, 135, 180, 215, 270 และ 315 องศา ตามลำดับ ตั้งค่าเทคนิค 85 kVp, 3.2 mAs, 85 kVp, 1.6 mAs และ 70 kVp, 0.63 mAs ดังแสดงในตารางที่ 6 ช่วงปริมาณรังสีกระเจิงของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ SHIMADZU และ FUJI FILM จะมากถ้าอยู่ใกล้หัวหลอดเอกซเรย์และค่าเทคนิคที่มากกว่า และความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรังสีกระเจิงกับระยะทางที่เพิ่มขึ้นของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ SHIMADZU และ FUJI FILM บริเวณตำแหน่งที่ได้รับปริมาณรังสีกระเจิงน้อยที่สุดของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ทั้ง 2 เครื่อง คือ ที่ระยะ 1.5 เมตร ขึ้นไป ที่ตำแหน่ง 0 องศา

ค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีกระเจิงที่สูงสุด

ผลจากการวัดค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีกระเจิงของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ SHIMADZU ทั้ง 3 ค่าเทคนิค วัดค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีกระเจิงมากที่สุด คือ ตำแหน่งมุม 180 องศา และเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ FUJI FILM วัดค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีกระเจิงที่สูงสุดของค่าเทคนิค 85 kV, 3.2 mAs คือ ตำแหน่งมุม 135 องศา ค่าเทคนิค 85 kV, 1.6 mAs และ 70 kV, 0.63 mAs คือ ตำแหน่งมุม 45 องศา

ค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีกระเจิงที่ต่ำสุด

ผลจากการวัดค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีกระเจิงของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ SHIMADZU ค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีกระเจิงที่ต่ำสุด คือ ตำแหน่งมุม 215, 315, 270 องศา ที่ระยะ 0.5 เมตร ตามลำดับ และที่ตำแหน่ง 0 องศา ที่ระยะ 1.5 เมตร ขึ้นไป เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ FUJI FILM ค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีกระเจิงที่ต่ำสุด คือ ตำแหน่งมุม 180, 90, 215 องศา ระยะ 0.5 เมตร และที่ตำแหน่ง 0 องศา ที่ระยะ 1.5 เมตร ขึ้นไป ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 6 ปริมาณรังสีกระเจิงที่ระยะและมุมต่างๆ ของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่

ระยะทาง มุม (เมตร) (องศา)		ปริมาณรังสีหตุติภูมิ ($\mu\text{Sv/h}$)											
		85 kVp, 3.2 mAS				85 kVp, 1.6 mAS				70 kVp, 0.63 mAS			
		S		F		S		F		S		F	
		ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD
0.5	0	7,800	0	7,867	306	3,347	25	3,533	58	927	25	1,333	58
	45	7,500	520	7,500	1,039	3,150	90	4,200	289	900	90	1,440	392
	90	7,800	520	7,200	900	3,330	52	3,000	275	870	52	1,140	137
	135	8,100	0	8,700	520	3,120	52	3,090	275	930	52	1,650	187
	180	8,400	520	6,900	520	4,020	52	3,930	52	1,020	52	1,260	392
	215	7,200	0	8,400	520	3,300	52	3,180	104	960	52	1,110	104
	270	7,800	520	8,400	520	3,450	52	3,870	180	840	52	1,260	90
	315	8,100	0	8,100	0	3,060	52	3,480	187	960	52	1,470	364
1.5	0	40	0	10	0	19	0	7	0	2	0	2	0
	45	833	58	833	115	350	10	467	32	100	10	160	44
	90	867	58	800	100	370	6	333	31	97	6	127	15
	270	867	58	933	58	383	6	430	20	93	6	140	10
	315	900	0	900	0	340	6	387	21	107	6	163	40
3	0	10	0	3	0	5	0	2	0	1	0	1	0
	45	208	14	208	29	88	3	117	8	25	3	40	11
	90	217	14	200	25	93	1	83	8	24	1	32	4
	135	225	0	242	14	87	1	86	8	26	1	46	5
	180	233	14	192	14	112	1	109	1	28	1	35	11
	215	200	0	233	14	92	1	88	3	27	1	31	3
	270	217	14	233	14	96	1	108	5	23	1	35	3
	315	225	0	225	0	85	1	97	5	27	1	41	10
4	0	6	0	1	0	3	0	1	0	0	0	0	0
	45	117	8	117	16	49	1	66	5	14	1	23	6
	90	122	8	113	14	52	1	47	4	14	1	18	2
	135	127	0	136	8	49	1	48	4	15	1	26	3
	180	131	8	108	8	63	1	61	1	16	1	20	6
	215	113	0	131	8	52	1	50	2	15	1	17	2
	270	122	8	131	8	54	1	60	3	13	1	20	1
	315	127	0	127	0	48	1	54	3	15	1	23	6

ตารางที่ 7 ปริมาณรังสีกระเจิงกับมุมมองของค่าเทคนิคที่กำหนด

เครื่องเอกซเรย์ เคลื่อนที่ ค่าเทคนิค	ระยะทาง (เมตร)	ปริมาณรังสีกระเจิงสูงสุด			ปริมาณรังสีกระเจิงต่ำสุด		
		ณ มุม (องศา)			ณ มุม (องศา)		
		85kVp, 3.2 mAS	85kVp, 1.6 mAs	70kVp, 0.63 mAs	85kVp, 3.2 mAS	85 kVp, 1.6 mAs	70 kVp, 0.63mAs
S	0.5	180	180	180	215	315	270
	1.5	180	180	180	0	0	0
	3.0	180	180	180	0	0	0
	4.0	180	180	180	0	0	0
F	0.5	135	45	45	180	90	215
	1.5	135	45	45	0	0	0
	3.0	135	45	45	0	0	0
	4.0	135	45	45	0	0	0

นำผลค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีกระเจิงโดยใช้ค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีกระเจิงสูงสุดมาคำนวณค่าปริมาณรังสีที่ได้รับจากเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ทั้ง 3 ค่าเทคนิค ที่ใช้ในการวัดค่าปริมาณรังสีกระเจิง โดยทั่วไปแล้วโรงพยาบาลนครปฐมใช้งานเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่เฉลี่ย 0.5 ชั่วโมงต่อวัน (ระยะเวลาเฉลี่ยที่ทำการเอกซเรย์) โดยใช้งาน 5 วันต่อสัปดาห์ และ 52 สัปดาห์ต่อปี จะได้ค่าปริมาณรังสีกระเจิงที่ได้รับต่อปี ปริมาณกระเจิงที่ไม่เกินค่าระดับความปลอดภัยทางรังสีที่กำหนดไว้สำหรับผู้ปฏิบัติหน้าที่ทางรังสีของเครื่องเอกซเรย์ยี่ห้อ SHIMADZU คือ 17, 8, 2 mSv/yr และ FUJI FILM คือ 18, 9, 3 mSv/yr ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 8 ทั้ง 3 ค่าเทคนิค ที่ใช้ในการวัดปริมาณรังสีกระเจิงที่ระยะ 4.0 เมตร

ตารางที่ 8 ปริมาณรังสีกระเจิงสูงสุดและปริมาณรังสีที่ได้รับต่อปี (mSv/yr) ของแต่ละระยะทาง

ระยะทาง (เมตร)	ปริมาณรังสีกระเจิงสูงสุดของแต่ละระยะทาง						ปริมาณรังสีกระเจิงที่ได้รับต่อปีของแต่ละระยะทาง					
	ปริมาณรังสีกระเจิง ($\mu\text{Sv/h}$)						ปริมาณรังสีกระเจิง (mSv/yr)					
	85 kVp, 3.2 mAs	85 kVp, 1.6 mAs	70 kVp, 0.63 mAs	85 kVp, 3.2 mAs	85 kVp, 1.6 mAs	70 kVp, 0.63 mAs	85 kVp, 3.2 mAs	85 kVp, 1.6 mAs	70 kVp, 0.63 mAs	85 kVp, 3.2 mAs	85 kVp, 1.6 mAs	70 kVp, 0.63 mAs
	1 = S	2 = F	1 = S	2 = F	1 = S	2 = F	1 = S	2 = F	1 = S	2 = F	1 = S	2 = F
0.5	8,400	8,700	4,020	4,200	1,020	1,650	1,092	1131	523	546	133	215
1.5	933	967	447	467	113	183	121	126	58	61	15	24
3.0	233	242	112	117	28	46	30	31	15	15	4	6
4.0	131	136	63	66	16	26	17	18	8	9	2	3

วิจารณ์

ผลการทดสอบคุณภาพของเครื่องเอกซเรย์ SHIMADZU และ FUJI FILM คือ ผลของการวัดความซ้ำ (Reproducibility) ของค่าความต่างศักย์ตลอดโดยไม่เปลี่ยนค่า mA มาวิเคราะห์เพื่อค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) เทียบกับค่ามาตรฐานคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽⁶⁾ ความซ้ำของความต่างศักย์ค่ามาตรฐาน คือ $\leq 5\%$ ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ SHIMADZU และ FUJI FILM คือ 0.25% และ 0.07% ผลค่าความแปรปรวนของปริมาณรังสี (%CV) ต่อค่าเทคนิคของเครื่องเอกซเรย์ SHIMADZU และ FUJI FILM เทียบกับค่ามาตรฐานคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽⁶⁾ ค่ามาตรฐาน คือ $\leq 5\%$ ผลที่ได้ คือ 0.06% และ 3.53% นำผลที่ได้จากการวัดมาวิเคราะห์เพื่อค่าความผิดพลาดและความแม่นยำ (kV) เทียบกับค่ามาตรฐานคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽⁶⁾ ค่าความแม่นยำ (Accuracy) มาตรฐาน คือ $\pm 10\%$ ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ SHIMADZU เท่ากับ 1.33% และ FUJI FILM เท่ากับ 1.67% ผลที่ได้มาวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณรังสีต่อค่าเทคนิคของเครื่องเอกซเรย์ SHIMADZU และ FUJI FILM ในส่วนของค่ากระแสผ่านหลอดเอกซเรย์ หรือความเป็นเชิงเส้น (Linearity) เทียบกับค่ามาตรฐานคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽⁶⁾ เครื่องเอกซเรย์ตั้งค่าแบบผลคูณระหว่างกระแสกับเวลา (mAs linearity) สัมประสิทธิ์ความเป็นเชิงเส้นต้องมีค่าไม่เกิน 20% ผลที่ได้ของเครื่องเอกซเรย์ SHIMADZU คือ 0.90% และ FUJI FILM คือ 3.97% จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวแสดงว่าเครื่องเอกซเรย์ทั้ง 2 เครื่อง อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ การตรวจสอบคุณภาพมาตรฐานเครื่องเอกซเรย์นั้นเพื่อให้ได้ภาพทางรังสีที่มีคุณภาพและปริมาณรังสีออกตามค่าเทคนิคที่ได้ถูกต้องตามที่ตั้ง ด้านการป้องกันอันตรายจากรังสี เครื่องเอกซเรย์ทั่วไประบบดิจิทัลจะช่วยลดความเสี่ยงในการถ่ายภาพรังสีซ้ำ อันเนื่องมาจากการให้ปริมาณรังสีมากหรือน้อยเกินไป ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผู้ป่วยได้รับปริมาณรังสีเกินความจำเป็น ประกอบกับผู้ป่วยที่มาเข้ารับบริการถ่ายภาพทางรังสีด้วยเครื่องเอกซเรย์ระบบดิจิทัลมีแนวโน้มสูงขึ้น เนื่องจากการเข้าถึงบริการทางการแพทย์ของประชาชนที่เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดความต้องการการได้รับบริการทางการแพทย์ในระดับมาตรฐาน อันเป็นเรื่องสำคัญที่ระบบการบริการทางการแพทย์ โดยให้ความใส่ใจและบริหารจัดการให้เกิดขึ้นอย่างเต็มประสิทธิภาพ ทั้งนี้ผู้ป่วยย่อมกังวลต่อการได้รับรังสีเอกซ์อันอาจก่อให้เกิดอันตราย เพราะรังสีมีผลกระทบต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นเพื่อป้องกันผู้ป่วยได้รับปริมาณรังสีมากเกินไป และได้รับบริการจากเครื่องเอกซเรย์ที่มีความปลอดภัย การควบคุมมาตรฐานตามเกณฑ์มาตรฐานสากลจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ควรมีการตรวจสอบคุณภาพเครื่องเอกซเรย์โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ให้ได้มาตรฐานอย่างน้อยปีละครั้ง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองวิศาล บุญประสาร, สิริธยาพงศ์ สุวรรณโสภาส ในการทดสอบอุปกรณ์สำหรับการทดสอบเพื่อการตรวจรับรองและควบคุมคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป

เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ FUJI FILM มีค่าเฉลี่ยค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าของหลอดเอกซเรย์สูงที่สุดมากกว่าเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ SHIMADZU เล็กน้อย ดังนั้นผลค่าของการวัดปริมาณรังสีกระเจิงจากเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ FUJI FILM จะมากกว่า SHIMADZU เล็กน้อย ดังนั้นเครื่องแต่ละเครื่องจะได้ผลค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีกระเจิงที่ไม่เท่ากัน เพราะคุณภาพและปริมาณของลำรังสีเอกซ์ ได้แก่ kVp และ mAs ถือว่าเป็นปัจจัยหลัก (Primary factors) และยังมีปัจจัยอย่างอื่นที่ต้องคำนึงถึง เช่น ขนาดของ Focal Spot, SID, OID, Distortion, Central Ray Alignment, Grid, Beam Restriction Generator Output, Tube Filtration และ ชนิดของ Filters⁽⁶⁾

ผลของค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีกระเจิงก็ขึ้นอยู่กับค่าปริมาณรังสีที่ให้เทคนิค พบว่าการให้ค่าเทคนิคมากกว่าก็จะทำให้ผลของค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีกระเจิงมากกว่า เช่น ผลค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีกระเจิงของค่าเทคนิค 85 kVp, 3.2

mAs มากกว่าผลค่าเฉลี่ยประมาณรังสีกระเจิงของค่าเทคนิค 85 kVp, 1.6 mAs ปริมาณรังสีเครื่อง FUJI FILM จะมากกว่า SHIMADZU เล็กน้อย รวมทั้งปริมาณรังสีกระเจิงจึงมากกว่าเล็กน้อย ดังการวัดค่าเฉลี่ยประมาณรังสีกระเจิงของค่าเทคนิค 85 kVp, 3.2 mAs มากกว่าค่าเทคนิค 85 kVp, 1.6 mAs และ 70 kVp, 0.63 mAs ตามลำดับ

เมื่อนำผลค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีกระเจิงมาหาความสัมพันธ์กับมุมมองตำแหน่งที่ประมาณรังสีกระเจิงสูงสุดของเครื่องเอกซเรย์ SHIMADZU ทุกค่าเทคนิคและตำแหน่ง คือ 180 องศา และเครื่องเอกซเรย์ FUJI FILM ปริมาณรังสีกระเจิงสูงสุดทุกระยะทางในค่าเทคนิค 85 kVp, 3.2 mAs และ 70 kVp, 0.63 mAs คือ ตำแหน่ง 135 องศา และค่าเทคนิค 85 kVp, 1.6 mAs ทุกระยะทาง คือ ตำแหน่ง 45 องศา ดังนั้นถ้าอยู่ตำแหน่งดังกล่าวอาจได้รับปริมาณรังสีกระเจิงมากกว่าตำแหน่งอื่น มุมที่เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ทั้ง 2 เครื่อง มีปริมาณรังสีกระเจิงน้อยสุดตั้งแต่ 1.5 เมตร ขึ้นไป คือ มุมที่ 0 องศา สอดคล้องกับผลของ พรนิภา มหาวงษ์, ธารขวัญ ปันตามูล⁽²⁾ ในการศึกษารังสีทุติยภูมิจากการถ่ายภาพเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ เพราะมีเสาเครื่องเอกซเรย์ทำด้วยโลหะสามารถกันรังสีกระเจิงได้ เปรียบได้กับการใช้วัสดุกำบังรังสีเวลาในการเอกซเรย์ เมื่อระยะทางเพิ่มขึ้นค่าเฉลี่ยของปริมาณรังสีกระเจิงจะลดลงตามระยะทางที่มากขึ้น แต่ทุกระยะทางและทุกมุมมองที่กำหนดในการวัดค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีกระเจิงยังค่าได้ทุกตำแหน่ง ดังนั้นค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีกระเจิงไม่ได้ขึ้นอยู่กับมุมมองแต่ขึ้นอยู่กับปริมาณรังสีตามที่ได้กล่าวมาข้างต้น⁽⁴⁾

เมื่อนำผลค่าเฉลี่ยปริมาณรังสีกระเจิงสูงสุดที่ได้รับต่อชั่วโมงของเครื่องเอกซเรย์ SHIMADZU และ FUJI FILM มาคำนวณเพื่อหาปริมาณรังสีกระเจิงที่ได้รับต่อปี (mSv/yr) ซึ่งถ้าทำงานอยู่ตำแหน่งดังกล่าว โดยที่ใช้เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่เฉลี่ย 0.5 ชั่วโมงต่อวัน (ระยะเวลาเฉลี่ยที่ทำการเอกซเรย์) โดยใช้งาน 5 วันต่อสัปดาห์และ 52 สัปดาห์ต่อปี ผลที่ได้ไม่เกินค่ามาตรฐานระดับความปลอดภัยทางรังสี มีค่าดังนี้ เครื่องเอกซเรย์ SHIMADZU และ FUJI FILM คือ 2, 3 mSv ที่ระยะทาง 4 เมตร โดยปริมาณรังสีกระเจิงต่ำสุดและเกณฑ์มาตรฐานระดับความปลอดภัยทางรังสีที่กำหนดไว้ (Dose Limit) คือ ปริมาณรังสีที่ร่างกายได้รับต้องไม่เกิน 5 mSv ต่อปี สำหรับผู้ปฏิบัติงานด้านรังสีและปริมาณรังสีที่ร่างกายได้รับต้องไม่เกิน 1 mSv ต่อปี สำหรับประชาชนทั่วไป⁽⁴⁾ ปริมาณรังสีกระเจิงตามเกณฑ์ระดับความปลอดภัยทางรังสีที่กำหนดไว้ (Dose Limit) ของผู้ปฏิบัติงานที่ระยะ 4 เมตร ดังนั้นในการถ่ายภาพรังสีด้วยเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ผู้ปฏิบัติงานควรยืนห่างจากหัวหลอดเอกซเรย์ประมาณ 4 เมตร ไม่ควรอยู่ตำแหน่งมุม 180 องศา ของเครื่องเอกซเรย์ SHIMADZU ตำแหน่งมุม 135 และ 45 องศา ของเครื่องเอกซเรย์ FUJI FILM ตำแหน่งที่มุม 0 องศา เป็นมุมที่ปริมาณรังสีกระเจิงน้อยสุด เจ้าหน้าที่ประจำตึก ผู้ป่วยหรือผู้ที่ไม่เกี่ยวข้องควรอยู่ห่างเกิน 4 เมตร และไม่ควรรอยู่ในตำแหน่งที่กล่าวมาแล้ว เพราะจากผลการคำนวณปริมาณรังสีต่อปีที่ค่าเทคนิคต่ำสุดค่าปริมาณรังสียังเกินค่ามาตรฐานระดับความปลอดภัยทางรังสี ทั้งนี้ควรปฏิบัติตามหลักการป้องกันอันตรายจากรังสีเป็นต้นด้วยหลัก 3 ประการ คือ ให้ระยะห่างมากที่สุดที่สามารถปฏิบัติงานได้ ใช้เวลาในการเอกซเรย์น้อยที่สุด และใช้ฉากกำบัง⁽²⁾

ในการปฏิบัติงานควรสวมอุปกรณ์ป้องกันอันตรายจากรังสี เช่น เสื้อตะกั่ว ไทรอยซิลด์ แว่นตาตะกั่วกันรังสี เป็นต้น ติดเครื่องวัดปริมาณรังสีทุกครั้งในการปฏิบัติงาน สำหรับเจ้าหน้าที่ประจำตึก ผู้ป่วยที่เดินได้ ญาติ และบุคคลที่อยู่ใกล้เคียงบริเวณที่เอกซเรย์ ควรหลบไปให้ระยะห่างปริมาณรังสีกระเจิง แต่ถ้าหลบไม่ได้ควรสวมอุปกรณ์ป้องกันอันตรายจากรังสี

สรุป

เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ทั้ง 2 เครื่อง ในตำแหน่งมุม 0 องศา มีปริมาณรังสีกระเจิงต่ำสุดเพราะอยู่หลังเสาเครื่องเอกซเรย์ที่ทำจากโลหะทำให้สามารถกันรังสีได้ ในการวัดปริมาณรังสีหรืออาจนำมาปรับใช้ในการป้องกันปริมาณรังสีกระเจิงอาจใช้หลบตำแหน่ง 0 องศา หรือหลังเสา ในกรณีที่อยู่ในห้องผู้ป่วยที่แคบ และออกห่างจากตำแหน่งหัวหลอดเอกซเรย์ไม่ได้ เช่น ห้องแยกผู้ป่วย ห้องผู้ป่วยโควิดที่ไม่สามารถดึงสายให้เกิน 4 เมตร เพื่อหลีกเลี่ยง

การได้รับปริมาณรังสีกระเจิงโดยไม่จำเป็น ปริมาณรังสีกระเจิงที่อยู่ในเกณฑ์ระดับความปลอดภัยทางรังสีที่กำหนดไว้ควรเว้นระยะห่างจากหลอดเอกซเรย์ถึงผู้ปฏิบัติงานต้องไม่น้อยกว่า 4 เมตร สำหรับผู้ปฏิบัติงาน และเจ้าหน้าที่ประจำตึกหรือผู้ที่เกี่ยวข้องมากกว่า 4 เมตร เพื่อจะได้รับปริมาณรังสีกระเจิงน้อยที่สุด โดยต้องมีเครื่องป้องกันรังสี เช่น ใส่อุปกรณ์ป้องกันทั้งผู้ปฏิบัติงานและผู้ที่เกี่ยวข้องที่อยู่บริเวณใกล้เคียง รวมทั้งการใช้สายแฮนด์สวิตช์หรือรีโมทสวิตช์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณนางอนงค์ สิงกางไชย์ นักฟิสิกส์รังสีเชี่ยวชาญ นายกิตตินันท์ แซ่ลิ่ม นักฟิสิกส์รังสี สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำการใช้เครื่องมือ การเก็บและวิเคราะห์ข้อมูลงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจากผู้บริหาร หัวหน้ากลุ่มงานรังสีวิทยา อาจารย์ที่ปรึกษา และผู้ร่วมงานทุกท่าน

เอกสารอ้างอิง

1. International Commission on Radiological Protection (ICRP). General principles for the radiation protection of workers, ICRP Publication 75. Oxford: Pergamon Press; 1997.
2. พรนิภา มหาวงษ์, ธารชัญ ปินตามูล. การศึกษาปริมาณรังสีทุดูดจากการถ่ายภาพเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่. [ภาคนิพนธ์]. ภาควิชารังสีเทคนิค, คณะเทคนิคการแพทย์. นครปฐม: มหาวิทยาลัยมหิดล; 2548.
3. ICRPædia. Dose limits. [online]. 2019; [cited 2021 Jul 17]; [2 screens]. Available from: URL: http://icrpaedia.org/Dose_limits.
4. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. มาตรฐานคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: บริษัท บียอนด์ พับลิชชิง จำกัด; 2562.
5. วิศาล บุญประสาร, สิริยาพวงศ์ สุวรรณโสภาส. อุปกรณ์สำหรับการทดสอบเพื่อการตรวจรับและควบคุมคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป. วารสารรังสีวิทยาศิริราช 2560; 4(2); 115-26.
6. Exposure technique factors. ใน: จงวัฒน์ ชิวกุล. หลักสูตรรังสีเทคนิค. สงขลา: ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. [ออนไลน์]. 2560; [สืบค้น 22 ม.ค. 2564]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://meded.psu.ac.th/binlaApp/radio3/365-302/Exposure_Technique_Factors/index.html.

Analysis of the Scattered Radiation and Protection Practice from Mobile X-ray Units

Wasan Buthpa

Nakhon Pathom Hospital, Amphoe Muang, Nakhon Pathom 73000, Thailand

ABSTRACT This study aimed to compare the scattered radiation from two portable x-ray machines (SHIMADZU Mobile Art Evolution and FUJI FILM FDR Go Plus) at Nakhon Pathom Hospital. The radiation safety distance of staffs was also analyzed. The scatter radiation was measured by a survey meter at the height of 0.8 meter from the floor, representing the gonad level of a 1.75 meter human height. This level is similar to the height of the gurney. The measurements were collected with varying angles of 0, 45, 90, 135, 180, 225, 270 and 315 degrees at various distances of 0.5, 1.5, 3.0 and 4.0 meters from portable x-ray machines. The exposure technique for chest AP supine radiography was 85 kVp, 1.6 mAs for adult patients and 70 kVp, 0.63 mAs for pediatric patients. The exposure technique for pelvic AP was 85 kVp, 3.2 mAs, at 1 m SID. The 14 × 17" DR detector was used for radiographic imaging. The result showed that the amount of scattered radiation was inversely proportion to the distance from the patient, but it did not depend on the direction. In this study, the radiation exposure that the staffs and public received did not exceed the radiation exposure limit of <20 mSv/yr and <1 mSv/yr, respectively. For the safety practice, the staffs should keep the distance more than 4 m, stand at 0 degree from the x-ray tube, and wear lead apron.

Keywords: Scattered radiation, Radiation protection, Mobile X-ray unit

การประเมินสถานะด้านความรู้ ความเข้าใจ ความตระหนัก และการใช้ระบบคุณภาพในการปฏิบัติงานของบุคลากร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

วารลักษณ์ เลิศสุรางคกุล¹ ดวงกมล อัสวตมากร¹ อันวา แก้วเกษ² กมลพรรณ ศรีมยานาง¹
และอาชินทร์ ไรจนวิวัฒน์¹

¹กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

²มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง อำเภอเมือง เชียงราย 57100

บทคัดย่อ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข เป็นหน่วยงานที่มีการนำระบบคุณภาพมาใช้เป็นเครื่องมือในการบริหารจัดการ ตั้งแต่ ปี 2546 โดยประยุกต์ใช้มาตรฐานสากลที่เกี่ยวข้องกับทุกภารกิจ มีการถ่ายทอดระบบคุณภาพลงสู่การปฏิบัติโดยการ จัดทำเป็นมาตรฐานการปฏิบัติงาน เพื่อให้บุคลากรทุกระดับปฏิบัติตาม จากการนำระบบคุณภาพมาใช้เป็นเครื่องมือในระยะเวลา ยาวนานนี้ จึงมีข้อสงสัยว่าบุคลากรปัจจุบันที่ปฏิบัติงานตามมาตรฐานมีความรู้ความเข้าใจ ความตระหนัก และการนำระบบ คุณภาพไปปฏิบัติอยู่ในระดับใด ผู้วิจัยจึงศึกษาสถานะด้านคุณภาพของบุคลากรในด้านต่าง ๆ ได้แก่ ความรู้ความเข้าใจ ความตระหนัก และการนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติ รวมถึงประเมินประสิทธิภาพช่องทางการสื่อสาร โดยใช้วิธีวิจัยเชิงสำรวจ ผลการวิจัยพบว่า บุคลากรมีระดับความรู้ความเข้าใจ และความตระหนักในระดับมาก มีการนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติในระดับ มากที่สุด โดยบุคลากรที่มีระยะเวลาการปฏิบัติงานที่หน่วยงานแตกต่างกัน ไม่พบความแตกต่างของระดับความรู้ความเข้าใจ ความตระหนัก และการนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติ ($p > 0.05$) ในมุมมองการสื่อสาร พบว่าหนังสือเวียนเป็นช่องทางที่บุคลากร รับทราบข้อมูลด้านระบบคุณภาพมากที่สุด และอีเมลเป็นช่องทางที่บุคลากรเห็นว่าสามารถรับทราบข้อมูลที่ง่ายและทั่วถึงที่สุด ผลจากการสัมภาษณ์เชิงลึกได้ข้อเสนอในการพัฒนาคุณภาพอย่างต่อเนื่องที่ควรดำเนินการ คือ การสร้างให้เกิดการ เรียนรู้ด้านระบบคุณภาพอย่างเป็นระบบ ยั่งยืน เป็นปัจจุบัน รวมถึงการเพิ่มช่องทางการเรียนรู้ และสื่อการเรียนรู้ที่ทันสมัย จัดให้มีกระบวนการจัดการความรู้ขององค์กรที่บุคลากรสามารถเรียนรู้ได้ตลอดเวลา อีกทั้งเลือกใช้ช่องทางการสื่อสาร ที่เหมาะสมกับบุคลากรในแต่ละระดับเพื่อให้เกิดการรับรู้ที่มีประสิทธิภาพทั่วทั้งองค์กร

คำสำคัญ: ความรู้ความเข้าใจ, ความตระหนัก, การนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติ

Corresponding author E- mail: waralak.l@dmsc.mail.go.th

Received: 5 May 2021

Revised: 12 July 2021

Accepted: 10 August 2021

บทนำ

ในภาวะที่สภาพแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ไม่ว่าจะเป็นภาวะเศรษฐกิจ สังคม การเมือง และเทคโนโลยี เป็นสาเหตุที่ทำให้ทุกองค์กรจำเป็นต้องปรับตัวให้ทันต่อการเปลี่ยนแปลง และพร้อมเผชิญกับปัญหาทางการแข่งขันในทุก ๆ ด้าน ตามหลักการบริหารที่ดีนั้น องค์กรที่มีประสิทธิภาพ คือ องค์กรที่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลง โดยเลือกใช้วิธีการอย่างถูกต้องและเหมาะสมกับองค์กรนั้น ๆ เพื่อให้ได้มาซึ่งความพึงพอใจสูงสุดของผู้ใช้บริการ อันเป็นสิ่งที่สำคัญในการอยู่รอดขององค์กร ซึ่งจากทิศทางการเปลี่ยนแปลงดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น จึงจำเป็นต้องได้รับความร่วมมือจากบุคคลในองค์กรเป็นหลัก⁽¹⁾

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข เป็นหน่วยงานระดับกองในสังกัดกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีพันธกิจในการวิจัยและพัฒนาให้บริการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการทางด้านโรคติดเชื้อ ด้านโรคไม่ติดต่อ ด้านคุ้มครองผู้บริโภค และให้บริการการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการ รวมทั้งการให้บริการเชื้อ/สารมาตรฐาน การบริหารงานภายในสถาบัน ได้มีการพัฒนาระบบบริหารคุณภาพให้สอดคล้องกับมาตรฐานสากลที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ISO/IEC 17025 สำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ ISO 15189 สำหรับห้องปฏิบัติการขั้นสูง ISO 15190 สำหรับการดำเนินงานด้านความปลอดภัยและการรักษาความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17043 สำหรับการให้บริการทดสอบความชำนาญ AALAC International สำหรับการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง ตลอดจนประยุกต์ใช้มาตรฐาน OECD GLP สำหรับการทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง ซึ่งมาตรฐานเหล่านี้มี ISO 9001 เป็นฐานในการวางระบบบริหารจัดการ ที่ผ่านมาได้พยายามพัฒนาระบบคุณภาพให้เป็นหนึ่งเดียวกันและสอดคล้องกับทุกมาตรฐาน ดังนั้น การปฏิบัติงานทุกกระบวนการทั้งภารกิจหลักและภารกิจสนับสนุน จึงมีมาตรฐานการปฏิบัติงานตลอดจนถึงระบบการบันทึกข้อมูลอย่างครบถ้วนตามเกณฑ์คุณภาพ ซึ่งได้ส่งเสริมให้บุคลากรทุกระดับมีความเข้าใจกับระบบคุณภาพเพื่อการนำไปปฏิบัติได้อย่างถูกต้อง ทำให้เกิดการพัฒนาระบบคุณภาพอย่างต่อเนื่องรวมทั้งตอบสนองความต้องการ ความพึงพอใจของผู้ใช้บริการทั้งภายในและภายนอก⁽²⁾

อย่างไรก็ตามจากข้อเท็จจริงที่ว่าแนวปฏิบัติตามมาตรฐานต่าง ๆ ได้ถูกนำรวมเข้าเป็นแนวปฏิบัติในงานประจำมาเป็นเวลากว่า 10 ปี โดยมีเอกสาร วิธีการ คู่มือ พร้อมใช้ เพื่อให้บุคลากรทุกคนถือปฏิบัติ แต่จากระยะเวลาที่ยาวนานนี้มีบุคลากรเข้าออกหมุนเวียนอยู่ตลอดเวลา เนื่องจากโครงสร้างอายุของบุคลากรที่มีการเกษียณอายุราชการ การโอนย้ายของบุคลากรไปปฏิบัติงานที่หน่วยงานอื่น รวมทั้งมีบุคลากรที่เป็นลูกจ้างมาระยะเวลาสั้นลาออกเนื่องจากได้งานใหม่ หรือประกอบธุรกิจส่วนตัว ซึ่งต้องสรรหาและบรรจุบุคลากรใหม่เข้ามาปฏิบัติงานแทน โดยบุคลากรที่เข้ามาปฏิบัติงานใหม่นี้มีความแตกต่างจากบุคลากรรุ่นเดิมที่ได้ร่วมกันพัฒนาระบบคุณภาพด้วยตนเอง อีกทั้งจากข้อมูลการตรวจประเมินจากองค์กรภายนอก ซึ่งเป็นการตรวจประเมินเพื่อต่ออายุใบรับรอง หรือขยายขอบข่ายการรับรอง โดยมีการดำเนินการตรวจประเมินทุก 2 ปี สรุปผลการตรวจประเมินที่ได้ในปี 2559 และปี 2562 มีบางมาตรฐาน เช่น ISO/IEC 17025 ที่สถาบันได้รับจำนวนข้อบกพร่องเพิ่มมากขึ้น จาก 6 ข้อ เป็น 11 ข้อ และในทุกมาตรฐานมักได้ข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นซ้ำ ๆ จึงมีข้อสงสัยว่าบุคลากรทุกระดับยังคงมีความรู้ความเข้าใจ ความตระหนัก และการนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติอยู่ในระดับใด และสามารถนำไปสู่การพัฒนาอย่างต่อเนื่องได้หรือไม่ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาสถานะความรู้ความเข้าใจ ความตระหนัก การนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติของบุคลากรสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข รวมถึงประเมินประสิทธิภาพช่องทางการสื่อสาร และข้อเสนอแนวทางในการพัฒนาคุณภาพที่เหมาะสมต่อไป

วัตถุประสงค์และวิธีการ

การประเมินสถานะความรู้ความเข้าใจ ความตระหนัก และการนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติของบุคลากรสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขในครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงสำรวจ โดยมีการวางแผนการวิจัย ดังนี้

กลุ่มประชากรที่ศึกษา

ประชากรกลุ่มเป้าหมายที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ คือ บุคลากรทุกประเภท ได้แก่ ข้าราชการ ลูกจ้างประจำ พนักงานราชการ พนักงานกระทรวงสาธารณสุข และลูกจ้างชั่วคราวเงินบำรุง จำนวนทั้งสิ้น 300 คน (ข้อมูล ณ เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2562) ผู้วิจัยเลือกเก็บข้อมูลทั้งหมด 300 ตัวอย่าง ตามจำนวนประชากร เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้อง และครบถ้วนมากที่สุด

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

การวิจัยนี้ใช้แบบสอบถามชนิดกระดาษเป็นเครื่องมือ โดยแนวคิดในการออกแบบสอบถาม เป็นการทวนแนวปฏิบัติตามมาตรฐานต่างๆ ที่ได้นำรวมเข้าเป็นแนวปฏิบัติในงานประจำ และนำมาจัดทำเป็นคู่มือคุณภาพ มาตรฐานการปฏิบัติงานต่างๆ เพื่อให้บุคลากรนำไปปฏิบัติอย่างถูกต้อง และสอดคล้องตามมาตรฐานสากล นำมายกร่างเป็นแบบสอบถาม

ระยะเวลาการศึกษา

ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2562 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2563

การดำเนินงาน

การศึกษานี้ได้ใช้การทบทวนวรรณกรรมจากแนวปฏิบัติตามมาตรฐานต่างๆ ที่จัดทำขึ้นทั้งในส่วนของคู่มือคุณภาพ เอกสารมาตรฐานการปฏิบัติงาน และคู่มือต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการปฏิบัติงาน รวมถึงเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ก่อนที่จะมีการยกร่างเป็นแบบสอบถามขึ้น

การพัฒนาแบบสอบถาม และการตรวจสอบความเที่ยงตรงของเครื่องมือ

จากการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง จึงได้มีการจัดทำร่างแบบสอบถาม โดยแบบสอบถามได้ถูกตรวจสอบคุณภาพโดยการหาความเที่ยงตรงตามเนื้อหา (Content Validity) ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ค่า IOC (Index of Item-objective Congruence) มากกว่า 0.7 ขึ้นไปทุกข้อคำถาม และการหาความเชื่อมั่น (Reliability) โดยผู้วิจัยได้นำแบบสอบถามที่ปรับปรุงแก้ไขจากข้อเสนอแนะของผู้เชี่ยวชาญแล้วนำไปทดลองใช้ (Try out) กับบุคลากรจำนวน 50 คน นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์หาความเชื่อมั่นของแบบสอบถามทั้งฉบับด้วยวิธีการหาค่าสัมประสิทธิ์แอลฟา (Alpha Coefficient) ของครอนบาค (Cronbach) เนื่องจากงานวิจัยนี้มุ่งศึกษาค่าคะแนนของแบบทดสอบ ค่าสัมประสิทธิ์แอลฟาหรือค่าสัมประสิทธิ์ความเที่ยงของเครื่องมือวิจัย จึงมีค่าไม่ต่ำกว่า 0.70 ทุกข้อคำถาม ดำเนินการสำรวจโดยใช้แบบสอบถามที่ได้พัฒนาขึ้นโดยใช้วิธีการแจกแบบสอบถามไปให้กับกลุ่มตัวอย่าง จำนวน 300 คน ได้รับแบบสอบถามกลับคืนมา 285 ฉบับ คิดเป็นร้อยละ 95

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผู้วิจัยได้ตรวจสอบความสมบูรณ์และความถูกต้องของแบบสอบถามที่ได้รับกลับ แล้วนำมาวิเคราะห์หาค่าสถิติ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ ได้แก่ การแจกแจงความถี่ ค่าร้อยละ ค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทดสอบความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) กำหนดค่าความแตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$ ทั้งนี้เมื่อสรุปผลข้อมูลจากแบบสอบถามแล้ว ผู้วิจัยได้คัดเลือกผู้ให้ข้อมูลสำคัญ จำนวน 5 ท่าน ซึ่งใช้วิธีเลือกแบบเฉพาะเจาะจง เพื่อสัมภาษณ์เชิงลึก (In-depth Interview) ถึงสาเหตุและข้อเสนอแนะ หรือแนวทางในการแก้ไขปัญหาสำหรับประเด็น หรือข้อคำถามที่พบว่าบุคลากรมีความไม่เข้าใจ ตระหนัก และมีการนำไปปฏิบัติน้อยที่สุด ลักษณะการสัมภาษณ์เป็นแบบไม่เป็นทางการ

ผล

ข้อมูลทั่วไปจากแบบสอบถาม พบว่าบุคลากรที่เป็นกลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นเพศหญิงมากกว่าเพศชาย โดยมีเพศหญิง ร้อยละ 71.9 มีอายุอยู่ระหว่าง 30-39 ปี คิดเป็นร้อยละ 30.9 มีการศึกษาระดับปริญญาตรี คิดเป็นร้อยละ 48.8 เป็นบุคลากรประเภทพนักงานกระทรวงสาธารณสุข คิดเป็นร้อยละ 51.2 มีระยะเวลาปฏิบัติงานที่หน่วยงาน 20 ปีขึ้นไป คิดเป็นร้อยละ 26.7 ปฏิบัติงานในตำแหน่งผู้ปฏิบัติงาน คิดเป็นร้อยละ 87.0 โดยปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ คิดเป็นร้อยละ 61.4 และมีการปฏิบัติงานสอดคล้องตามมาตรฐาน ISO 15189 คิดเป็นร้อยละ 27.47

ผลการประเมินสถานะความรู้ความเข้าใจ ความตระหนัก และการนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติของบุคลากรสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข พบว่า มีระดับความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับระบบคุณภาพอยู่ในระดับมาก คิดเป็นร้อยละ 48.42 โดยจากคะแนนเต็ม 22 คะแนน มีผู้ได้ผลคะแนนต่ำสุด คือ 9 คะแนน จำนวน 7 คน และคะแนนสูงสุด คือ 22 คะแนน จำนวน 2 คน มีค่าเฉลี่ยของคะแนนอยู่ที่ 16.67 โดยมีค่า 95% CI ของความแตกต่างของคะแนนเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 15.7-17.7 คะแนน ผลการทดสอบความแตกต่างทางสถิติ พบว่าบุคลากรที่มีระยะเวลาปฏิบัติงานในหน่วยงานที่แตกต่างกัน ไม่พบความแตกต่างของระดับความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับระบบคุณภาพ ($p > 0.05$) แต่จากข้อมูลค่าเฉลี่ยคะแนนความรู้ความเข้าใจ เมื่อจำแนกตามระยะเวลาที่ปฏิบัติงานในหน่วยงาน พบว่าผู้ที่ปฏิบัติงานระหว่าง 15-20 ปี มีค่าคะแนนเฉลี่ยมากที่สุด คือ 17.20 คะแนน และผู้ที่ปฏิบัติงานต่ำกว่า 1 ปี มีค่าคะแนนเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 15.61 คะแนน ดังแสดงในตารางที่ 1- 3

ตารางที่ 1 ระดับความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับระบบคุณภาพของบุคลากร (N = 285 คน)

ระดับความรู้ความเข้าใจ	จำนวน (คน)	ร้อยละ
ไม่มีความรู้ความเข้าใจ	0	0.00
มีความรู้ความเข้าใจน้อย	0	0.00
มีความรู้ความเข้าใจปานกลาง	36	12.63
มีความรู้ความเข้าใจมาก	138	48.42
มีความรู้ความเข้าใจมากที่สุด	111	38.95
รวม	285	100

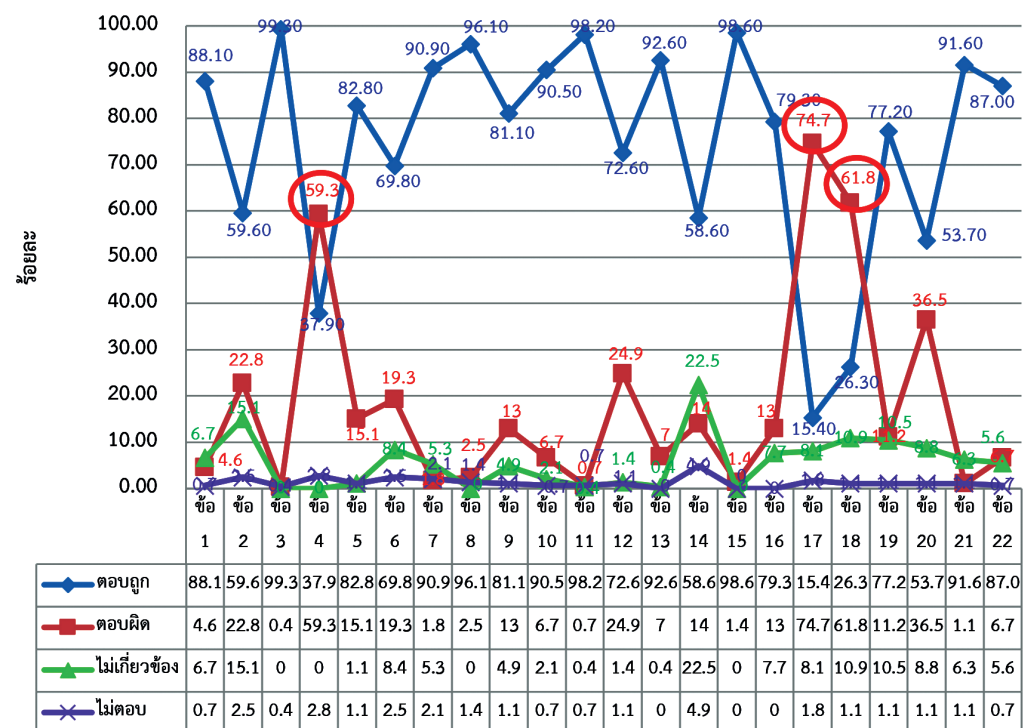
ตารางที่ 2 ผลคะแนนความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับระบบคุณภาพของบุคลากร (N = 285 คน)

คะแนน	ระดับคะแนน (เต็ม 22 คะแนน)				คะแนนเฉลี่ย	SD	95% CI ของความแตกต่างของคะแนนเฉลี่ย
	ต่ำสุด (คะแนน)	จำนวน (คน)	สูงสุด (คะแนน)	จำนวน (คน)			
ความรู้ความเข้าใจ	9	7	22	2	16.67	2.39	15.7-17.7

ตารางที่ 3 คะแนนเฉลี่ยของความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับระบบคุณภาพของบุคลากร จำแนกตามระยะเวลาปฏิบัติงานในหน่วยงาน

ระยะเวลา	จำนวน (คน)	คะแนนเฉลี่ย	SD	F	p-value
ต่ำกว่า 1 ปี	23	15.61	2.98	1.888	0.097
1-5 ปี	63	16.28	2.29		
6-10 ปี	38	16.76	1.88		
10-15 ปี	42	17.02	2.13		
15-20 ปี	39	17.20	1.94		
20 ปีขึ้นไป	72	16.80	2.77		
รวม	277	16.67	2.39		

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยได้ดำเนินการวิเคราะห์ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับระบบคุณภาพของบุคลากร จำแนกรายข้อคำถาม โดยนำเสนอเป็นคำร้อยละ พบว่าคำถามที่ตอบผิดมากที่สุด 3 ลำดับ คือ คำถามข้อ 17 วัสดุอ้างอิง ต้องแสดงความสอกลับได้ไปยังหน่วยตามระบบสากล (SI Unit) เท่านั้น จึงจะถือว่ามีความถูกต้องตามระบบคุณภาพ คิดเป็นร้อยละ 74.7 รองลงมา คือ คำถามข้อ 18 กรณีที่มีลูกค้ามาขอส่งตัวอย่างโดยไม่มีใบนำส่งจะดำเนินการให้ไม่ได้ เนื่องจากไม่ได้กำหนดแนวปฏิบัติในการส่งตรวจตัวอย่างด้วยวาจาไว้ คิดเป็นร้อยละ 61.8 และคำถามข้อ 4 ต้นฉบับ เอกสารคุณภาพที่ใช้ในการปฏิบัติงานเก็บอยู่ที่พื้นที่ใช้งานเพื่อสะดวกในการใช้งาน คิดเป็นร้อยละ 59.3 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ร้อยละความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับระบบคุณภาพของบุคลากรจำแนกตามข้อคำถาม

บุคลากรมีความตระหนักต่อการดำเนินงานระบบคุณภาพอยู่ในระดับมาก โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.13 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.797 ผลการทดสอบความแตกต่างทางสถิติ พบว่าบุคลากรที่มีระยะเวลาปฏิบัติงานในหน่วยงานที่แตกต่างกัน ไม่พบความแตกต่างของระดับความตระหนักเกี่ยวกับระบบคุณภาพ ($p > 0.05$) แต่จากข้อมูลค่าเฉลี่ยความตระหนักของบุคลากร เมื่อจำแนกตามระยะเวลาที่ปฏิบัติงานในหน่วยงานพบว่าผู้ที่ปฏิบัติงานระหว่าง 15-20 ปี มีค่าเฉลี่ยมากที่สุด คือ 4.29 และผู้ที่ปฏิบัติงานต่ำกว่า 1 ปี มีค่าเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 4.13 คะแนน ดังแสดงในตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของบุคลากรที่ตอบแบบสอบถามความตระหนักต่อการดำเนินงานระบบคุณภาพ

รายละเอียดกิจกรรม	N	X	SD	ระดับความตระหนัก
1. ท่านคิดว่างานที่ท่านรับผิดชอบเป็นส่วนหนึ่งในการผลักดันให้นโยบายคุณภาพของสถาบันบรรลุผลสำเร็จ	283	4.25	0.701	มาก
2. ท่านปฏิบัติงานครบถ้วนทุกขั้นตอนตามที่ระบุในมาตรฐานการปฏิบัติงานทุกครั้ง	283	4.17	0.716	มาก
3. ท่านคิดว่าการตรวจติดตามคุณภาพภายในเป็นเครื่องมือหนึ่งในการพัฒนางานอย่างต่อเนื่อง โดยไม่เป็นภาระกับงานประจำ	283	4.04	0.749	มาก
4. ท่านเห็นด้วยว่าการแก้ไขข้อบกพร่องที่เกิดจากการตรวจติดตามคุณภาพภายในในหน่วยงานท่านเป็นหน้าที่และความรับผิดชอบของทุกคนในหน่วยงาน	282	4.31	0.760	มาก
5. ท่านเห็นด้วยหรือไม่ว่าการดำเนินการด้านระบบคุณภาพที่มีประสิทธิภาพต้องเริ่มจากตัวท่านเองก่อน	283	4.41	0.754	มาก
6. ก่อนเริ่มปฏิบัติงานท่านจะตรวจสอบความพร้อมใช้งานของเครื่องมือ อุปกรณ์ทุกครั้ง	283	4.39	0.727	มาก
7. ทุกครั้งที่ท่านพบว่ามีเครื่องมือ อุปกรณ์ชำรุดเสียหาย ท่านจะรายงานหัวหน้าให้ทราบทันที และติดป้ายชี้บ่ง	283	4.37	0.749	มาก
8. ท่านสวมใส่อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคลทุกครั้งถ้าต้องปฏิบัติงานกับเชื้ออันตรายขณะปฏิบัติงาน	279	4.56	0.746	มาก
9. ท่านจะทบทวนผลการดำเนินงานที่ผ่านมาเพื่อนำมาถอดบทเรียนและปรับปรุงการทำงานให้ดีขึ้น	281	4.14	0.737	มาก
10. เมื่อมีกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับระบบคุณภาพท่านจะเข้าร่วมทุกครั้ง	282	3.71	0.773	ค่อนข้างมาก
11. การตรวจวิเคราะห์ทุกครั้ง ไม่จำเป็นต้องมีตัวควบคุมผลบวก (positive control) และตัวควบคุมผลลบ (negative control) เพราะเป็นการสิ้นเปลือง	279	4.27	0.949	มาก
12. เมื่อท่านดำเนินการตรวจวิเคราะห์แล้วพบว่าตัวควบคุมผลบวก (positive control) เป็นลบ ท่านจะออกรายงานผล เพื่อไม่ให้เกินระยะเวลาที่กำหนด	278	4.15	1.204	มาก
รวม		4.13	0.797	มาก

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยของความตระหนักเกี่ยวกับระบบคุณภาพของบุคลากรจำแนกตามระยะเวลาที่ปฏิบัติงานในหน่วยงาน

ระยะเวลา	จำนวน (คน)	ค่าเฉลี่ย	SD	F	p-value
ต่ำกว่า 1 ปี	23	4.13	0.66	0.338	0.890
1-5 ปี	63	4.27	0.43		
6-10 ปี	38	4.21	0.73		
10-15 ปี	41	4.21	0.57		
15-20 ปี	41	4.29	0.42		
20 ปีขึ้นไป	76	4.22	0.58		
รวม	282	1.23	0.55		

บุคลากรมีการนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติในภาพรวมอยู่ในระดับมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 87.31 เมื่อวิเคราะห์ตามกิจกรรม พบว่ามีการปฏิบัติในกิจกรรมการแก้ไขปัญหา ร้อยละ 91.32 มีการปฏิบัติในกิจกรรมการบริหารความเสี่ยง ร้อยละ 86.53 และมีการปฏิบัติในกิจกรรมความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการร้อยละ 84.09 ส่วนภาพรวมการนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติ ผลการทดสอบความแตกต่างทางสถิติ พบว่าบุคลากรที่มีระยะเวลาปฏิบัติงานในหน่วยงานแตกต่างกัน ไม่พบความแตกต่างของระดับการนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติ ($p > 0.05$) แต่จากข้อมูลเมื่อจำแนกตามระยะเวลาที่ปฏิบัติงานในหน่วยงาน พบว่าผู้ที่ปฏิบัติงานระหว่าง 10-15 ปี มีการนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติมีค่าเฉลี่ยมากที่สุด คือ 26.97 และผู้ที่ปฏิบัติงานที่สถาบันต่ำกว่า 1 ปี มีการนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติมีค่าเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 25.30 ดังแสดงในตารางที่ 6 - 7

ตารางที่ 6 จำนวนและร้อยละของบุคลากรที่ตอบแบบสอบถามการใช้ระบบคุณภาพในการปฏิบัติงาน

รายละเอียดกิจกรรม	จำนวน (ร้อยละ)				รวม
	ปฏิบัติ	ไม่ปฏิบัติ	ไม่เกี่ยวข้อง	ไม่ตอบ	
การแก้ไขปัญหา	260.25	19.25	2.63	2.88	285
	(91.32)	(6.77)	(0.95)	(1.02)	(100)
กิจกรรมการบริหารความเสี่ยง	246.64	21.00	13.91	3.45	285
	(86.53)	(7.37)	(4.89)	(1.26)	(100)
ความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ	239.64	17.00	25.36	3.00	285
	(84.09)	(5.96)	(8.9)	(1.05)	(100)
รวม	248.84	19.03	13.97	3.11	285
	(87.31)	(6.70)	(4.91)	(1.11)	(100)

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยในการนำระบบคุณภาพไปใช้ในการปฏิบัติงานของบุคลากรจำแนกตามระยะเวลาที่ปฏิบัติงานในหน่วยงาน

ระยะเวลา	จำนวน (คน)	ค่าเฉลี่ย	SD	F	p-value
ต่ำกว่า 1 ปี	23	25.30	4.70	0.596	0.703
1-5 ปี	64	26.12	4.89		
6-10 ปี	38	25.89	4.28		
10-15 ปี	42	26.97	3.80		
15-20 ปี	41	26.24	4.16		
20 ปีขึ้นไป	76	25.76	4.36		
รวม	284	26.07	4.38		

ในส่วนของการประเมินประสิทธิภาพช่องทางการสื่อสารด้านระบบคุณภาพที่เหมาะสมกับบุคลากรในองค์กรพบว่า ช่องทางที่บุคลากรรับทราบข้อมูลด้านระบบคุณภาพมากที่สุดในปัจจุบัน คือ หนังสือเวียน คิดเป็นร้อยละ 19.77 ส่วนช่องทางที่บุคลากรเห็นว่ารับทราบข้อมูลได้ง่ายและทั่วถึงที่สุด คือ อีเมล คิดเป็นร้อยละ 29.5 ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 จำนวนและร้อยละของช่องทางที่บุคลากรรับทราบข้อมูลด้านระบบคุณภาพได้มากที่สุด (ตอบได้มากกว่า 1 ข้อ) และช่องทางที่เห็นว่ารับทราบข้อมูลด้านระบบคุณภาพที่ง่ายและทั่วถึงที่สุด (ตอบได้เพียง 1 ข้อ)

ช่องทาง	รับทราบข้อมูลมากที่สุด			รับทราบข้อมูลที่ง่ายและทั่วถึงที่สุด		
	จำนวน	ร้อยละ	ลำดับ	จำนวน	ร้อยละ	ลำดับ
ผู้บริหาร	58	5.65		6	2.1	
หนังสือเวียน	203	19.77	1	65	22.8	2
เพื่อนร่วมงาน	163	15.87	3	14	4.9	
การประชุม	159	15.48	4	26	9.1	4
อีเมล	175	17.04	2	84	29.5	1
เอกสารเผยแพร่	56	5.45		10	3.5	
ป้ายประกาศ	74	7.21		16	5.6	5
ไลน์กลุ่ม	129	12.56	5	53	18.6	3
เฟซบุ๊ก	7	0.68		2	0.7	
อื่น ๆ (ระบุ)	3	0.29		9	3.2	
รวม	1,027	100		285	100	

ผลการวิจัยโดยการสัมภาษณ์เชิงลึกถึงสาเหตุและข้อเสนอแนะ หรือแนวทางในการแก้ไข้ปัญหา เพื่อการพัฒนาสถานะด้านคุณภาพของบุคลากร ซึ่งเก็บข้อมูลจากผู้ให้ข้อมูล จำนวน 5 ท่าน ที่เป็นทั้งระดับผู้บริหาร และผู้ปฏิบัติงานโดยใช้วิธีเลือกแบบเฉพาะเจาะจง ลักษณะการสัมภาษณ์เป็นแบบไม่เป็นทางการ ได้ข้อมูลจำแนกตามสถานะด้านคุณภาพ คือ ความรู้ความเข้าใจ ความตระหนัก และการนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติ ดังนี้

ด้านความรู้ความเข้าใจ พบว่าผู้ให้ข้อมูล 4 ใน 5 คน มีความเห็นว่าสาเหตุของปัญหาที่บุคลากรขาดความรู้ความเข้าใจในระบบคุณภาพ เนื่องจากไม่ได้มีหน้าที่รับผิดชอบโดยตรง จึงไม่ได้ให้ความสำคัญ อีกทั้งมองว่างานด้านระบบคุณภาพมีผู้รับผิดชอบหลักอยู่แล้ว และจากข้อมูลมี 3 ใน 5 คน เห็นว่าสาเหตุเกิดจากบุคลากรไม่ได้รับการอบรม หรือทบทวนความรู้ที่เกี่ยวข้องกับระบบคุณภาพอย่างต่อเนื่องและเป็นปัจจุบัน ทั้งนี้จากข้อมูลที่ได้มีผู้ให้ข้อมูล 3 ใน 5 คน เสนอแนวทางในการแก้ไข้ปัญหา โดยดำเนินการให้ความรู้และทบทวนระบบคุณภาพอย่างต่อเนื่องและสม่ำเสมอ

ด้านความตระหนัก พบว่าผู้ให้ข้อมูล 4 ใน 5 คน มีความเห็นว่าสาเหตุของปัญหาที่บุคลากรขาดความตระหนักในการดำเนินงานด้านระบบคุณภาพ เนื่องจากบุคลากรเห็นว่างานประจำและงานคุณภาพเป็นคนละเรื่องกัน มีภาระงานประจำมาก การดำเนินงานด้านคุณภาพเพิ่ม จึงเป็นการคิดแยกส่วนและมองว่าเป็นหน้าที่ของสำนักงานพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการที่ต้องดำเนินการ จึงให้ความสำคัญกับงานคุณภาพน้อยกว่างานประจำที่รับผิดชอบอยู่ ทั้งนี้จากข้อมูลที่ได้มีผู้ให้ข้อมูล 3 ใน 5 คน เสนอแนวทางในการแก้ไข้ปัญหา โดยการเพิ่มช่องทางการเรียนรู้ ด้านระบบคุณภาพให้บุคลากรสามารถเข้ามาเรียนรู้ได้อย่างทั่วถึง และมีผู้ให้ข้อมูล 2 ใน 5 คน เสนอให้วางแนวทางในการปรับทัศนคติใหม่ให้บุคลากรมองงานประจำกับคุณภาพเป็นเรื่องที่ต้องดำเนินการควบคู่กัน เพื่อส่งมอบการบริการที่ดี โดยปลูกฝังทัศนคตินี้ให้กับบุคลากรในทุกระดับ

การนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติ จำแนกตามกิจกรรมได้ข้อมูลดังนี้

กิจกรรมการแก้ไข้ปัญหา พบว่าผู้ให้ข้อมูล 3 ใน 5 คน มีความเห็นว่าสาเหตุของปัญหาที่บุคลากรไม่ปฏิบัติในกิจกรรมการแก้ไข้ปัญหา เนื่องจากไม่ทราบกระบวนการคิดเกี่ยวกับกระบวนการแก้ไข้ปัญหาที่ถูกต้องและเป็นระบบ ทั้งนี้มีผู้ให้ข้อมูล 3 ใน 5 คน เสนอแนวทางการแก้ไข้ปัญหาโดยการจัดอบรมให้ความรู้ และฝึกปฏิบัติอย่างเป็นรูปธรรม เพื่อให้บุคลากรทดสอบการแก้ไข้ปัญหาอย่างเป็นระบบ

กิจกรรมการบริหารความเสี่ยง พบว่าผู้ให้ข้อมูล 4 ใน 5 คน มีความเห็นว่าสาเหตุของปัญหาที่บุคลากรไม่ปฏิบัติในกิจกรรมการบริหารความเสี่ยง เนื่องจากบุคลากรขาดความเข้าใจ และความตระหนักในเรื่องการบริหารความเสี่ยง ซึ่งส่งผลกระทบรวมถึงการดำเนินงานด้านระบบคุณภาพ และระบบอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องด้วย ทั้งนี้มีผู้ให้ข้อมูล 4 ใน 5 คน เสนอแนวทางการแก้ไข้ปัญหา โดยการจัดให้มีการอบรมเรื่องการบริหารความเสี่ยงให้กับบุคลากร อย่างน้อยปีละ 2 ครั้ง เพื่อสร้างให้บุคลากรมีความรู้ความเข้าใจมากขึ้น

กิจกรรมความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ พบว่าผู้ให้ข้อมูล 3 ใน 5 คน มีความเห็นว่าสาเหตุของปัญหาที่บุคลากรไม่ปฏิบัติในกิจกรรมความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเมื่อมีการจัดโครงการเกี่ยวกับความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ จะมีการจำกัดกลุ่มเป้าหมายในการเข้าร่วม เนื่องจากสถานที่และงบประมาณที่จำกัด จึงทำให้การสื่อสารไม่ทั่วถึง ทั้งนี้มีผู้ให้ข้อมูล 3 ใน 5 คน เสนอแนวทางการแก้ไข้ปัญหา โดยการเพิ่มช่องทางการเรียนรู้/ฝึกอบรมด้านระบบคุณภาพและความปลอดภัย เช่น การให้ความรู้ผ่านสื่อต่างๆ การจัดทำเป็นหลักสูตรการเรียนรู้ผ่านทาง e-learning เป็นต้น และมีผู้ให้ข้อมูล 2 ใน 5 คน เสนอว่าหากมีการอบรม/ให้ความรู้ด้านความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ ควรเป็นลักษณะที่มีการจำลองเหตุการณ์จริงและฝึกปฏิบัติจริง เพื่อให้บุคลากรทดลองปฏิบัติได้อย่างถูกต้อง

วิจารณ์

ผลการประเมินสถานะความรู้ความเข้าใจ ความตระหนัก และการนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติของบุคลากร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข พบว่าบุคลากรส่วนใหญ่มีระดับความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับระบบคุณภาพอยู่ในระดับมาก สอดคล้องกับงานวิจัยของไชยวัฒน์ จุมพลพิทักษ์ และณัฏฐ์ กุสิทร์ เรื่องความรู้ความเข้าใจและเจตคติต่อเครื่องมือในการจัดการคุณภาพขององค์กรของพนักงาน บริษัท ฮานา เซมิคอนดักเตอร์ (อยุธยา) จำกัด ที่พบว่าพนักงานมีความรู้ความเข้าใจต่อเครื่องมือในการจัดการคุณภาพขององค์กรโดยรวมอยู่ในระดับมาก⁽¹⁾ เมื่อนำข้อมูลที่ได้นำจัดลำดับความรู้ความเข้าใจ พบว่าคำถามที่ส่วนใหญ่บุคลากรมีความรู้ความเข้าใจน้อย เป็นคำถามที่ลงไปในเชิงเทคนิคและวิชาการที่เป็นเรื่องเฉพาะด้าน เป็นคำถามที่มีผู้รับผิดชอบหลัก/มีผู้ได้รับมอบหมายให้ดำเนินการในเรื่องนั้น ๆ โดยตรง จึงทำให้บุคลากรส่วนใหญ่ไม่ได้ให้ความสำคัญในการทำความเข้าใจในรายละเอียดของเรื่องนั้น ๆ

เมื่อพิจารณาในรายละเอียดพบว่า บุคลากรมีความตระหนักในเรื่องความปลอดภัยในการปฏิบัติงานมาก เนื่องจากการกิจหลักส่วนใหญ่ต้องปฏิบัติงานเกี่ยวกับเชื้อโรคและสารเคมีบุคลากรจึงมีความตระหนักและให้ความสำคัญกับการป้องกันตัวเองจากเชื้ออันตรายที่อาจส่งผลเสียต่อสุขภาพร่างกายขณะปฏิบัติงาน และสอดคล้องกับงานวิจัยของเอกลักษณ์ ธนเจริญพิศาล เรื่องความตระหนักและการยอมรับการนำระบบการจัดการสิ่งแวดล้อม (ISO 14001) มาใช้ในองค์การภาครัฐ: ศึกษากรณีสำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ที่พบว่ากลุ่มตัวอย่างมีความตระหนักต่อระบบการจัดการสิ่งแวดล้อม โดยรวมอยู่ในระดับสูง โดยมีความตระหนักด้านผลกระทบที่มีโอกาสเกิดขึ้นในกิจกรรมการทำงานอยู่ในระดับสูง⁽³⁾ และจากการศึกษาพบว่าบุคลากรมีความตระหนักน้อยกว่าทุกคำถามในเรื่องของการเข้าร่วมกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับระบบคุณภาพ ซึ่งเมื่อพิจารณาจากข้อเท็จจริงพบว่าบุคลากรมีภารกิจ/งานที่รับผิดชอบในหลายๆ ด้าน บางครั้งไม่สามารถเข้าร่วมกิจกรรมได้ทุกคนในแต่ละครั้ง อีกทั้งมีข้อจำกัดในเรื่องงบประมาณและสถานที่ในการจัดกิจกรรม ซึ่งส่งผลให้ต้องจำกัดจำนวนบุคลากรที่เข้าร่วม

บุคลากรมีการนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติอยู่ในระดับมากที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของปวีณา ผลพิภพ เรื่องความรู้ ความเข้าใจ และการปฏิบัติกิจกรรมเกี่ยวกับกระบวนการบริหารความเสี่ยงในโรงพยาบาลของพยาบาลวิชาชีพโรงพยาบาลรัฐแห่งหนึ่งในจังหวัดนนทบุรี ที่พบว่าพยาบาลวิชาชีพมีการปฏิบัติกิจกรรมโดยรวมเกี่ยวกับกระบวนการบริหารความเสี่ยงในโรงพยาบาลอยู่ในระดับมาก⁽⁴⁾ โดยเมื่อแยกวิเคราะห์ตามรายละเอียดในแต่ละกิจกรรม พบว่าในกิจกรรมการแก้ไขปัญหา บุคลากรมีการปฏิบัติค่อนข้างเป็นระบบ แต่ยังมีจุดที่ต้องส่งเสริมและให้ความสำคัญในเรื่องของการระบุปัญหา ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกและเป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก เนื่องจากหากเริ่มต้นมีการระบุปัญหาไม่ถูกต้อง การแก้ไขปัญหาในขั้นตอนต่อไปอาจไม่ถูกต้อง และตรงประเด็นกับปัญหาที่เกิดขึ้นได้ ในกิจกรรมการบริหารความเสี่ยง พบว่าบุคลากรมีการดำเนินการครบทุกขั้นตอน คือ มีการค้นหาความเสี่ยง การประเมินความเสี่ยง การจัดการความเสี่ยง และการประเมินผลแต่จากข้อมูลที่พบผู้รับผิดชอบหลักในเรื่องนี้ควรมีการส่งเสริมให้บุคลากรให้ความสำคัญกับการค้นหาความเสี่ยงมากขึ้น เพราะโดยส่วนใหญ่บุคลากรยังไม่ได้ให้ความสำคัญกับการค้นหาความเสี่ยง แต่มุ่งเน้นในการจัดการความเสี่ยงเมื่อเกิดปัญหาขึ้น และในกิจกรรมความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ พบว่าบุคลากรให้ความสำคัญกับการป้องกันตนเองจากสิ่งปนเปื้อนต่างๆ จากห้องปฏิบัติการ รวมทั้งให้ความสำคัญกับการป้องกันไม่ให้มีสิ่งปนเปื้อนจากห้องปฏิบัติการแพร่กระจายออกไปสู่ภายนอก และจากคำถามพบว่าบุคลากรไม่ปฏิบัติในการเข้าอบรม/รับความรู้ด้านความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ อย่างน้อยปีละ 1 ครั้งมากที่สุด ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความตระหนักต่อการดำเนินงานระบบคุณภาพในเรื่องของการเข้าร่วมกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับระบบคุณภาพ ซึ่งสาเหตุหลักเกิดจากภาระงาน บางครั้งไม่สามารถจัดสรรเวลาในการเข้าร่วมกิจกรรมเหล่านี้ได้ จึงส่งผลให้บุคลากรไม่สามารถเข้าร่วมกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับระบบคุณภาพ หรือเข้ารับการอบรมด้านความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการได้

อย่างสม่ำเสมอทั้งที่มีความสำคัญต่อการปฏิบัติงาน และในด้านการบริหารจัดการที่ผ่านมา จะเห็นได้ว่าโครงการอบรมให้ความรู้ด้านความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการมีการดำเนินการอย่างต่อเนื่องทุกปี โดยมีผู้รับผิดชอบหลักในการดำเนินการ คือ สำนักงานความปลอดภัยและสุขภาพบุคลากร แต่ในบางปีมีการเปลี่ยนหัวข้อและเนื้อหาการอบรมให้สอดคล้องกับสถานการณ์ ซึ่งอาจส่งผลให้บุคลากรไม่สามารถจะเข้าอบรมได้ทั้งหมด รวมทั้งมีปัญหาและอุปสรรคในการดำเนินการ เช่น งบประมาณที่ได้รับจัดสรรในการจัดอบรมมีจำกัดไม่สามารถให้บุคลากรทุกคนเข้ารับการอบรมได้ ซึ่งในประเด็นนี้ผู้บริหาร หรือผู้รับผิดชอบหลักควรต้องพิจารณาหาแนวทาง/วิธีการอื่นๆ ในการส่งเสริมและพัฒนาบุคลากรให้ได้รับความรู้ความเข้าใจอย่างต่อเนื่อง ทั้งในเรื่องระบบคุณภาพและความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลความรู้ความเข้าใจ ความตระหนัก และการนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติ ของบุคลากรจำแนกตามระยะเวลาที่ปฏิบัติงานในหน่วยงาน จากข้อสงสัยที่ว่าระยะเวลายาวนาน และบุคลากรมีการเข้าออกหมุนเวียนอยู่ตลอดเวลา บุคลากรมีความรู้ความเข้าใจ ความตระหนัก และการนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติอยู่ในระดับใด ผลการศึกษาสถานะด้านคุณภาพของบุคลากร ทั้ง 3 ด้าน พบว่า ระยะเวลาที่บุคลากรปฏิบัติงานในหน่วยงานที่แตกต่างกัน ไม่พบความแตกต่างของระดับความรู้ความเข้าใจ ความตระหนัก และการนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติ ($p > 0.05$) สอดคล้องกับงานวิจัยของธนิตดา นิลสดีโส เรื่องปัจจัยที่มีผลต่อความรู้และความคิดริเริ่มในการอนุรักษ์พลังงานของโรงพยาบาลสมิติเวชศรีนครินทร์ ที่พบว่าระยะเวลาในการทำงานไม่มีความสัมพันธ์กับความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับระบบนิเวศและสิ่งแวดล้อมของโลก⁽⁵⁾ และสอดคล้องกับงานวิจัยของสุธาเทพ รุณเรศ เรื่องปัจจัยที่มีผลต่อการตระหนักถึงภัยคุกคามทางไซเบอร์ของผู้ใช้อินเทอร์เน็ตในกรุงเทพมหานคร ที่พบว่าปัจจัยทางด้านประสบการณ์เกี่ยวกับภัยคุกคามทางไซเบอร์ไม่มีผลต่อความตระหนักถึงภัยคุกคามทางไซเบอร์ของผู้ใช้อินเทอร์เน็ต⁽⁶⁾ แต่เมื่อพิจารณาในรายละเอียดของค่าเฉลี่ยที่ได้ในแต่ละด้าน พบข้อมูลว่าบุคลากรที่มีระยะเวลาการปฏิบัติงานต่ำกว่า 1 ปี มีความรู้ความเข้าใจ ความตระหนัก และการนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติต่ำกว่าบุคลากรที่มีระยะเวลาการปฏิบัติงานในกลุ่มอื่น ทั้งนี้เนื่องจากบุคลากรกลุ่มนี้เป็นบุคลากรใหม่ ซึ่งยังไม่ได้มีการฝึกอบรมหรือสร้างความเข้าใจในการปฏิบัติงานตามระบบคุณภาพที่หน่วยงานจัดทำขึ้นอย่างครบถ้วน ทั้งนี้จำเป็นต้องส่งเสริมและพัฒนาบุคลากรกลุ่มนี้ให้มีความรู้ ความเข้าใจ เพื่อสร้างให้เกิดความตระหนัก และนำไปสู่การนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติได้อย่างถูกต้อง เหมาะสมกับงานที่รับผิดชอบ โดยการกำหนดหลักสูตรพื้นฐานที่บุคลากรทุกคนต้องได้รับการพัฒนา รวมทั้งจัดให้มีการประเมินความสามารถของบุคลากร เพื่อให้เกิดกระบวนการพัฒนาที่มีประสิทธิภาพ และจากข้อมูลพบว่าบุคลากรที่มีอายุงานมาก ไม่ได้มีความรู้ความเข้าใจ ความตระหนัก และการนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติมากกว่าบุคลากรที่มีระยะเวลาการปฏิบัติงานในกลุ่มอื่น เนื่องจากบุคลากรกลุ่มนี้ปฏิบัติงานมาเป็นเวลานาน มีภาระงานมาก จึงจะเลย หรือไม่มีเวลาในการทบทวนฟื้นฟูความรู้ด้านระบบคุณภาพมาตรฐานที่เกี่ยวข้องอย่างต่อเนื่อง แต่ให้ความสำคัญกับงานตามภารกิจที่ได้รับมอบหมายมากกว่า จึงส่งผลต่อความรู้ความเข้าใจในรายละเอียดของมาตรฐานต่างๆ ที่มีการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นสถาบันจึงต้องส่งเสริมและฟื้นฟูความรู้ความเข้าใจให้กับบุคลากรกลุ่มนี้ด้วย

จากผลการประเมินประสิทธิภาพช่องทางการสื่อสาร พบว่าช่องทางที่บุคลากรส่วนใหญ่สามารถรับทราบข้อมูลด้านระบบคุณภาพได้มากที่สุด คือ หนังสือเวียน และช่องทางที่บุคลากรส่วนใหญ่คิดว่าสามารถรับทราบข้อมูลด้านระบบคุณภาพที่ง่ายและทั่วถึงที่สุด คือ อีเมล โดยเมื่อนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกัน ทำให้ทราบว่าควรมีการสื่อสารทางอีเมลให้มากขึ้น เนื่องจากเป็นช่องทางที่บุคลากรส่วนใหญ่เห็นว่าสามารถรับทราบข้อมูลด้านระบบคุณภาพที่ง่ายและทั่วถึงที่สุด แต่ทั้งนี้ยังคงต้องมีการสื่อสารผ่านทางหนังสือเวียนด้วย เนื่องจากบุคลากรบางกลุ่มมีความจำเป็นต้องใช้เอกสารที่เป็นลายลักษณ์อักษร รวมทั้งอาจไม่มีความถนัดในการใช้อีเมลในการรับข้อมูลข่าวสาร และพบว่าการสื่อสารทางไลน์เป็นช่องทางที่บุคลากรรับทราบข้อมูลข่าวสารด้านระบบคุณภาพที่ง่ายและทั่วถึงที่สุด เป็นลำดับรองลงมา ดังนั้นจึงควรมีการสื่อสารข้อมูลทางไลน์ให้มากขึ้นในการแจ้งข่าวสารข้อมูลด้านระบบคุณภาพต่างๆ ที่เป็นการแจ้งข้อมูลเบื้องต้นที่ไม่เป็นทางการ

สรุป

การประเมินสถานะด้านคุณภาพของบุคลากรสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ทำให้ทราบสถานะปัจจุบันของบุคลากรเพื่อนำไปสู่การพัฒนาบุคลากรให้เกิดความรู้ความเข้าใจ ความตระหนัก และสามารถนำระบบคุณภาพไปสู่การปฏิบัติได้อย่างถูกต้อง เหมาะสม และยั่งยืน ซึ่งจากงานวิจัยแม้ว่าบุคลากรจะมีระดับความรู้ความเข้าใจ ความตระหนักอยู่ในระดับมาก และการนำระบบคุณภาพไปปฏิบัติอยู่ในระดับมากที่สุด ยังต้องมีการพัฒนาบุคลากรอย่างเป็นระบบและต่อเนื่อง โดยข้อเสนอแนะแนวทางในการพัฒนาที่ได้จากการศึกษา ควรจัดหลักสูตรฝึกอบรมให้ความรู้เกี่ยวกับระบบคุณภาพอย่างต่อเนื่อง หรือทุกครั้งเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงที่กระทบต่อการปฏิบัติงาน เพื่อเป็นการทบทวนและส่งเสริมให้เกิดความรู้ความเข้าใจกับบุคลากรเดิม และสร้างให้เกิดความรู้ความเข้าใจกับบุคลากรใหม่ การสร้างจิตสำนึกให้เข้าใจว่าระบบคุณภาพอยู่ในงานประจำ เพื่อให้เกิดความตระหนักและนำไปสู่การปฏิบัติ ผู้บริหารควรให้การสนับสนุนทั้งในด้านนโยบาย งบประมาณ การสร้างความร่วมมือภายในหน่วยงาน เพื่อเป็นแรงขับเคลื่อนการสร้างความรู้ความเข้าใจด้านระบบคุณภาพให้เกิดขึ้นอย่างเป็นระบบ มีการติดตามประเมินผลอย่างเป็นรูปธรรม เพิ่มช่องทางและจัดทำสื่อการเรียนรู้ในหลายรูปแบบให้ทันกับสถานการณ์ รวมทั้งมีการสื่อสารผ่านช่องทางที่เหมาะสมกับบุคลากรทุกระดับ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ที่สนับสนุนให้ดำเนินการวิจัย นางสาวนภวรรณ เจริญใจ หัวหน้ากลุ่มพัฒนาคุณภาพและวิชาการ ที่ผลักดันและให้คำปรึกษารวมทั้งเป็นผู้เชี่ยวชาญตรวจสอบคุณภาพเครื่องมือวิจัย นายวัฒนพงศ์ วุฒา นางสาวอัจฉริยา อนุกุลพิพัฒน์ เป็นผู้เชี่ยวชาญตรวจสอบคุณภาพเครื่องมือวิจัย พร้อมให้คำแนะนำเป็นอย่างดี และขอขอบคุณบุคลากรสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการตอบแบบสอบถาม รวมทั้งเพื่อนร่วมงานทุกท่านที่ช่วยเหลือและให้กำลังใจจนสามารถดำเนินการได้บรรลุวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

1. ไชยวัฒน์ จุมพลพิทักษ์, ณัฏฐ์ กุลิสร์. ความรู้ความเข้าใจและเจตคติต่อเครื่องมือในการจัดการคุณภาพขององค์กรของพนักงาน บริษัท ฮานา เซมิคอนดักเตอร์ (อยุธยา) จำกัด. ว บริหารธุรกิจศรีนครินทรวิโรฒ 2554; 3(1): 129-43.
2. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. คู่มือคุณภาพสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข รหัส QM-NIH-13 แก้ไขครั้งที่ 13 วันที่ออกเอกสาร 22 ก.ค. 2562. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2562.
3. เอกลักษณ์ ธนเจริญพิศาล. ความตระหนักและการยอมรับการนำระบบการจัดการสิ่งแวดล้อม (ISO 14001) มาใช้ในองค์การภาครัฐ: ศึกษากรณีสำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. [วิทยานิพนธ์]. สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม, คณะพัฒนาสังคมและสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพฯ: สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์; 2554.
4. ปวีณา ผลพิภพ. ความรู้ ความเข้าใจ และการปฏิบัติกิจกรรมเกี่ยวกับกระบวนการบริหารความเสี่ยงในโรงพยาบาลของพยาบาลวิชาชีพโรงพยาบาลรัฐแห่งหนึ่งในจังหวัดนนทบุรี. [วิทยานิพนธ์]. สาขาวิชาบริหารธุรกิจ (การจัดการ), บัณฑิตวิทยาลัย. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิต; 2554.

5. ธนิตา นิลสดี. ปัจจัยที่มีผลต่อความรู้และความคิดริเริ่มในการอนุรักษ์พลังงานของโรงพยาบาลสมิติเวช ศรีนครินทร์. [การค้นคว้าอิสระ]. สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม, คณะพัฒนาสังคมและสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพฯ: สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์; 2555.
 6. สุธาทิ รุณเรศ. ปัจจัยที่มีผลต่อการตระหนักถึงภัยคุกคามทางไซเบอร์ของผู้ใช้อินเทอร์เน็ตในกรุงเทพมหานคร. [การค้นคว้าอิสระ]. สาขาวิชานโยบายและการบริหารเทคโนโลยีสารสนเทศ, วิทยาลัยนวัตกรรม. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2561.
-

Assessment of Knowledge, Understanding, Awareness and Practice on Quality System among Personnel of the National Institute of Health, Thailand

Waralak Lertsupangkakul¹ Daungkamon Asawutmangkul¹ Thunwa Kaewket²

Kamolpan Khruemyanang¹ and Archawin Rojanawiwat¹

¹Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000

²Mae Fah Luang University, Amphoe Muang, Chiang Rai 57100, Thailand

ABSTRACT The National Institute of health (NIH), Thailand is an organization that has been implementing quality systems as a management tools since 2003. All relevant International standards have been adopted in the institutional quality systems. The quality systems have been transferred into practice by using standard operation systems (SOPs) in all work processes which cover all levels of personnel. As the systems have been timely implemented, there is a suspicion on knowledge, understanding, awareness and quality practice of current personnel working in this manner. Therefore, this study aimed to explore the perception of quality of the NIH personnel with additional assessment of communication efficiency by survey design methodology. The results showed that knowledge, understanding and awareness on quality systems were at high level while quality practice was at highest score. Personnel with different duration of services had no statistical difference in the level of knowledge, understanding, awareness and quality practice ($p > 0.05$). In terms of communication efficiency, it was found that circulars were the most effective mean while e-mail was the most simple and thorough channels to receive quality information. The results of in-depth interview indicated the issues to be considered as continuous quality improvement, namely creating systematic learning of quality systems. These included increasing learning channels and up to date learning materials and providing an organizational knowledge management process for self-learning. In addition, the right communication channel should be used to communicate with all levels of personnel in order to achieve effective awareness throughout the organization.

Keywords: Knowledge, Understanding, Awareness, Quality practice

การประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยา ของอาหารพร้อมบริโภคและภาชนะสัมผัสอาหาร ในร้านอาหารสวัสดิการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ณัฐกานต์ ตียศิริพร กมลวรรณ กันแต่ง และภัทราภรณ์ ศรีโหม

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 – 2563 สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร เก็บตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภค จำนวน 110 ตัวอย่าง และภาชนะสัมผัสอาหารจำนวน 160 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 270 ตัวอย่าง จากร้านอาหารสวัสดิการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อตรวจประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยา โดยใช้เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นเกณฑ์มาตรฐาน ผลการตรวจพบว่าอาหารพร้อมบริโภค 6 ประเภท (110 ตัวอย่าง) ไม่ผ่านเกณฑ์ร้อยละ 42.7 สาเหตุมาจาก ยีสต์ จำนวนจุลินทรีย์ และ *Escherichia coli* คิดเป็นร้อยละ 52.9, 20.0 และ 19.0 ตามลำดับ จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* ไม่ผ่านเกณฑ์ คิดเป็นร้อยละ 19.6, 2.1, 1.0, 6.4 และ 0.9 ตามลำดับ ส่วนเชื้อรา *Vibrio cholerae* และ *Vibrio parahaemolyticus* ตรวจไม่พบในทุกตัวอย่าง โดยอาหารประเภทยา-สัมตำ-อาหารปนผักสด-ผลไม้ ไม่ผ่านเกณฑ์สูงสุด (ร้อยละ 80.0) สำหรับภาชนะสัมผัสอาหารจำนวน 160 ตัวอย่าง ไม่ผ่านเกณฑ์ร้อยละ 73.1 สาเหตุหลัก คือ จำนวนจุลินทรีย์ (ร้อยละ 72.5) เมื่อพิจารณาผลตรวจปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 ที่ผ่านเกณฑ์มากกว่าปี พ.ศ. 2562 มีค่า 1.3 เท่า แต่เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ทางสถิติพบว่าไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ดังนั้นเพื่อเป็นการปรับปรุงอาหารพร้อมบริโภคให้มีคุณภาพและความปลอดภัยมากขึ้น ผู้สัมผัสอาหารต้องปฏิบัติตามหลักสุขวิทยาส่วนบุคคลและสุขนิสัยที่ดีในการปรุง ประกอบ และจำหน่ายอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ควรจัดอบรมและตรวจประเมินร้านอาหารสวัสดิการตามหลักการสุขาภิบาลอาหาร รวมทั้งสุ่มตรวจอาหารและภาชนะสัมผัสอาหารอย่างสม่ำเสมอ ส่วนผู้บริโภคควรปฏิบัติตามหลัก “กินร้อน ช้อนกลาง ล้างมือ” และรับประทานอาหารที่ “สุก ร้อน สะอาด”

คำสำคัญ : คุณภาพทางจุลชีววิทยา, อาหารพร้อมบริโภค, ภาชนะสัมผัสอาหาร, อาหารปลอดภัย

Corresponding author E-mail: nutthakan.t@dmasc.mail.go.th

Received: 18 February 2021

Revised: 28 April 2021

Accepted: 30 June 2021

บทนำ

ในปัจจุบันสังคมไทยเปลี่ยนแปลงจากการเกษตรเพื่อการบริโภคมาเป็นเกษตรอุตสาหกรรมและการพาณิชย์ ส่งผลให้รูปแบบการบริโภคอาหารเปลี่ยนจากการปรุงอาหารเพื่อรับประทานเองเป็นการซื้ออาหารปรุงสำเร็จหรือการรับประทานอาหารนอกบ้านมากขึ้น ทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการบริโภคอาหารที่ไม่ได้มาตรฐานมีการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรค⁽¹⁾ โดยเชื้อโรค สิ่งสกปรก และสารพิษต่าง ๆ สามารถปนเปื้อนสู่อาหารได้ทุกขั้นตอนตั้งแต่การเพาะปลูก เลี้ยงสัตว์ การเก็บเกี่ยว การแปรรูป การขนส่ง การปรุงประกอบ ไปจนถึงการจำหน่าย ในขณะที่แหล่งปนเปื้อนของเชื้อก่อโรค แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ แหล่งปนเปื้อนโดยตรง (Primary Sources of Contaminants) ได้แก่ เชื้อโรคที่อาศัยอยู่ในคน อาหาร สัตว์แมลงนำโรค และสิ่งแวดล้อมเป็นต้น แหล่งปนเปื้อนโดยอ้อม (Secondary Sources of Contaminants) ได้แก่ ภาชนะอุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมปรุงรวมทั้งโครงสร้างสถานที่เตรียมปรุงเก็บและบริการอาหาร⁽²⁾ เมื่อคนบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคเข้าสู่ร่างกาย หากเชื้อมีปริมาณมากพอและร่างกายอ่อนแอ อาจทำให้เป็นโรคได้ โดยโรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อ (Food-borne illness) แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก คือ โรคอาหารเป็นพิษ (Food poisoning) มีสาเหตุจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษที่สร้างจากเชื้อก่อโรค เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Clostridium botulinum* กลุ่มที่สอง คือ โรคติดเชื้อจากอาหาร (Food-borne infection) เกิดจากการบริโภคอาหารหรือน้ำที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อก่อโรคแล้วเชื้อเจริญและเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารจนทำให้เกิดการเจ็บป่วยได้ เช่น *Salmonella* spp. และ *Listeria monocytogenes* เป็นต้น^(2, 3) จากรายงานการระบาดในปี พ.ศ. 2560 ของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กล่าวว่ากลุ่มโรคติดต่อทางอาหารและน้ำ ได้แก่ โรคอุจจาระร่วงพบผู้ป่วย 1,038,349 ราย เสียชีวิต 2 ราย อหิวาตกโรคซึ่งเกิดจาก *Vibrio cholerae* พบผู้ป่วย 8 ราย ไม่พบผู้เสียชีวิตและโรคอาหารเป็นพิษ พบผู้ป่วย 110,396 ราย เสียชีวิต 3 ราย ส่วนใหญ่มีสาเหตุจาก *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus* และ *Salmonella* spp. ตามลำดับ⁽¹⁾ ในการควบคุมและป้องกันอาหารให้สะอาดและปลอดภัย โดยใช้วิธีการทางสุขาภิบาลอาหาร คือ การควบคุมปัจจัยสำคัญ 5 ประการ ที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารไม่ปลอดภัย ได้แก่ บุคคล (ผู้สัมผัสอาหาร) อาหาร (เช่น อาหารสด เนื้อสัตว์ ผักสด) ภาชนะอุปกรณ์ (เช่น จาน ช้อน หม้อ กระทะ) สถานที่ (บริเวณที่เตรียม ปรุงประกอบ จำหน่าย และรับประทานอาหาร รวมถึงแผงลอยจำหน่ายอาหาร) และสัตว์แมลงนำโรครวมทั้งสัตว์เลี้ยง⁽⁴⁾

ร้านอาหารสวัสดิการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (โรงอาหาร) ปัจจุบันมีร้านค้าจำนวน 17 ร้าน เป็นร้านจำหน่ายอาหาร ผลไม้ น้ำและเครื่องดื่ม อาหารและเครื่องดื่ม จำนวน 12, 2, 2 และ 1 ร้าน ตามลำดับ ในการกำกับดูแลการดำเนินงานของร้านอาหารสวัสดิการ เพื่อให้อาหารที่จำหน่ายมีคุณภาพ สะอาด และปลอดภัย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ประสานความร่วมมือกับหน่วยงานภาครัฐ เช่น เทศบาลจังหวัดนนทบุรี ในการตรวจติดตามร้านอาหารสวัสดิการตามหลักสุขาภิบาล ขณะที่กรมอนามัยได้จัดอบรมให้ความรู้กับผู้สัมผัสอาหาร เช่น สุขลักษณะการผลิต วิธีการล้างมือที่ถูกต้อง การล้างผักให้ปลอดภัยจากสารพิษตกค้าง เป็นต้น และในปี พ.ศ. 2563 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ดำเนินการตามนโยบายของกระทรวงสาธารณสุข ในการพัฒนาโรงอาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ให้เป็นต้นแบบของโรงอาหารปลอดภัย ใส่ใจสุขภาพ “DMSc. Healthy Canteen” เช่น การทาสีผนังภายในร้านอาหาร เปลี่ยนปล่องดูดควันใหม่ ติดตั้งอ่างล้างมือบริเวณทางขึ้นโรงอาหาร รวมทั้งจัดซื้อตู้อบร้อนสำหรับอบภาชนะ และตู้กรองน้ำดื่ม เป็นต้น งานวิจัยเรื่องนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการบูรณาการเพื่อพัฒนาสุขลักษณะร้านอาหารสวัสดิการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภคและภาชนะสัมผัสอาหาร ของร้านอาหารสวัสดิการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 – 2563 และเป็นการคุ้มครองสุขภาพให้กับผู้มาใช้บริการให้ได้รับประทานอาหารที่สะอาดปลอดภัย รวมทั้งเผยแพร่ข้อมูลให้หน่วยงานที่รับผิดชอบนำไปปรับปรุงและพัฒนาคุณภาพของร้านอาหารสวัสดิการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ให้ดียิ่งขึ้นต่อไป

วัสดุและวิธีการ

จุลินทรีย์มาตรฐาน

จุลินทรีย์มาตรฐานใช้สำหรับการควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ เป็นจุลินทรีย์จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 12 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* DMST 4212 (ATCC 25922), *Bacillus cereus* DMST 5040 (ATCC 11778), *Clostridium perfringens* DMST 16637 (ATCC 13124), *Listeria monocytogenes* DMST 17303, *Saccharomyces cerevisiae* DMST 22805 (ATCC 2601), *Salmonella* Typhimurium DMST 562 (ATCC 13311), *Staphylococcus aureus* DMST 8840 (ATCC 25923), *Vibrio cholerae* non O1/non O139 DMST 2873, *V. cholerae* O1, Eltor, Inaba DMST 28002, *V. cholerae* O1, Eltor, Ogawa DMST 9700, *V. cholerae* O139 DMST 22139, *V. parahaemolyticus* DMST 5665

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่

จำนวนจุลินทรีย์: plate count agar (PCA)

จำนวนยีสต์และรา: petrifilm yeast and mold count plate

E. coli: EC broth, Koser's citrate broth, lactose broth, lauryl sulphate tryptose broth (LST), levine eosin methylene blue (L - EMB) agar, methyl red - Voges Proskauer broth (MR - VP), tryptone broth

B. cereus: mannitol - egg yolk - polymyxin agar (MYP), motility medium, nitrate broth, nutrient agar (NA), phenol red glucose broth (PRG), tyrosine agar (TA), trypticase soy - sheep blood agar (SBA), Voges - Proskauer medium (VP) (modified)

C. perfringens: cooked meat medium (modified) (mCM), lactose - gelatin medium (for *C. perfringens*), motility nitrate medium, spray's fermentation medium (1% salicin และ 1% raffinose) thioglycollate medium (fluid) (TGC), tryptose - sulfite - cycloserine agar (TSC)

L. monocytogenes: agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA), blood agar, CAMP medium, carbohydrate utilization broth (L - rhamnose และ D - xylose), Fraser broth, half Fraser broth, motility agar, oxford agar (OXA), tryptone soya yeast extract agar (TSYEA), Voges - Proskauer (VP) medium

Salmonella spp.: buffered peptone water (BPW), Hektoen enteric agar (HE), lysine indole motile (LIM) หรือ motility indole lysine (MIL) medium, modified semi - solid Rappaport - Vassiliadis (MSRV) agar, Muller - Kauffmann tetrathionate novobiocin broth (MKTn), nutrient agar (NA), Rappaport - Vassiliadis medium with soya (RVS), triple sugar iron agar (TSI), urea agar, xylose lysine deoxycholate agar (XLD)

S. aureus: Baird - Parker agar with egg yolk (BP), brain heart infusion (BHI) broth, trypticase (tryptic) soy broth containing 10% NaCl and 1% sodium pyruvate (TSB 10% NaCl), coagulase plasma (rabbit) with EDTA

V. cholerae และ *V. parahaemolyticus*: alkaline saline peptone water (ASPW), Arginine dihydrolase saline medium (ADH), CHROMagar *Vibrio* (CV), L - lysine decarboxylase saline

medium (LDC), saline medium for detect of indole (Tryptophan saline medium), saline motility indole lysine medium (MIL), saline nutrient agar (SNA), saline triple sugar iron agar (TSI), Thiosulfate citrate bile and sucrose agar (TCBS)

น้ำยาและสารเคมี

Butterfield's phosphate buffered dilution water (BPB), basic fuchsin staining solution Gram stain reagents, 3% hydrogen peroxide solution (H_2O_2), Kovacs' reagent, malachite green staining solution, methyl red solution, nitrite detection reagents, oxidase reagent, ONPG disc, 0.1% peptone water, polyvalent *V. cholerae* O1 และ O139, 0%, 6% และ 10% saline peptone waters, 0.85 % sodium chloride (normal saline), *Salmonella* polyvalent O antisera and monovalent O antisera, *V. cholerae* Inaba antiserum, *V. cholerae* Ogawa antiserum, Voges Proskauer (VP) reagents

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ตู้บ่มเพาะเชื้อ ($25 \pm 1^\circ C$, $30 \pm 1^\circ C$, $35 \pm 1^\circ C$, $36 \pm 1^\circ C$, $37 \pm 1^\circ C$ และ $43 \pm 1^\circ C$) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ อ่างน้ำร้อน ($41.5 \pm 1^\circ C$ และ $45.5 \pm 0.2^\circ C$) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง กล้องจุลทรรศน์ เครื่องนับโคโลนี เครื่องผสม (vortex mixer) ขวดแก้วฝาเกลียว หลอดทดลอง จานเพาะเชื้อ ปิเปต แผ่นกระจกสไลด์ หัวง และเข็มเย็บเชื้อ แท่งแก้วเกลียวเชื้อ และไม้ swab

ตัวอย่างทดสอบ

เก็บตัวอย่างทดสอบจากร้านอาหารสวัสดิการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีรายละเอียดของตัวอย่างทดสอบ จำนวน และช่วงเวลาเก็บตัวอย่าง ดังนี้

อาหารพร้อมบริโภคแบ่งเป็น 6 ประเภท ตามวิธีการประกอบอาหาร ได้แก่ ต้ม-นึ่ง (เช่น แกงจืดเต้าหู้หมูสับ แกงเขียวหวานหมู ไข่ต้ม) ผัด (เช่น ผัดคะน้าหมูสด หอย ข้าวผัดกุ้ง) ทอด-ย่าง (เช่น ปลาสดทอด หมูปิ้ง) ปิ้งสุกแล้ว ผ่านการหยิบจับด้วยมือหรือหั่นผ่านเขียง (เช่น เส้นหมี่แห้งลูกชิ้นหมู ข้าวไก่ทอด น้ำจิ้มแจ่ว ข้าวขาหมู) ยำ-ส้มตำ-อาหารที่ปนผักสด-ผลไม้ (เช่น ยำปลาดุกฟู ส้มตำปูปลาร้า ขนมจีนน้ำยา สับประรด) ขนมหวาน-ขนมอบ (เช่น ขนมสาคูเปียก มะพร้าว ขนมปังหน้าหมูสับไข่เค็ม ขนมเปียะไส้ถั่ว)

ภาชนะสัมผัสอาหารแบ่งเป็น 2 ประเภท ประเภทที่หนึ่ง คือ ภาชนะที่สัมผัสอาหาร ได้แก่ ภาชนะส่วนกลาง หมายถึง ภาชนะที่มีเจ้าหน้าที่ส่วนกลางทำหน้าที่ล้างทำความสะอาด ได้แก่ จาน ชาม แก้วน้ำ ช้อน-ส้อม และตะเกียบ (กรณี ช้อน-ส้อม และตะเกียบ สุ่มตรวจโดยไม่ได้จุ่มในหม้อลวก เนื่องจากต้องการตรวจสอบประสิทธิภาพการล้าง) และ ภาชนะส่วนของร้านค้า หมายถึง ภาชนะของร้านค้าที่ใช้ในการประกอบอาหาร ได้แก่ ท็อปปิ้ง มีด เขียง และถาด ประเภทที่สอง คือ มือผู้สัมผัสอาหาร หมายถึง มือของผู้เตรียม ผู้ปรุง และผู้จำหน่ายอาหาร

ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างตามระยะเวลาการดำเนินงานของโครงการ ได้แก่ โครงการพัฒนาสุขลักษณะร้านอาหาร สวัสดิการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 (เก็บตัวอย่างระหว่างเดือนมกราคม - เดือน พฤษภาคม 2562 เป็นอาหารพร้อมบริโภคจำนวน 50 ตัวอย่าง และภาชนะสัมผัสอาหารจำนวน 87 ตัวอย่าง) และ โครงการพัฒนาโรงอาหารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เพื่อเป็นต้นแบบของโรงอาหารปลอดภัย ใส่ใจสุขภาพ "DMSc. Healthy Canteen" ปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 (เก็บตัวอย่างระหว่างเดือนมิถุนายน - เดือนกรกฎาคม 2563 เป็นอาหารพร้อมบริโภคจำนวน 60 ตัวอย่าง และภาชนะสัมผัสอาหารจำนวน 73 ตัวอย่าง)

การทดสอบ

การทดสอบประกอบด้วยขั้นตอนการสุ่มตัวอย่าง และการตรวจวิเคราะห์ ดังนี้

การสุ่มตัวอย่าง

อาหารพร้อมบริโภค เก็บตัวอย่างน้ำหนัก 300 – 500 กรัม/หน่วย จำนวน 2 หน่วย ส่งตัวอย่างเข้าห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทันที ตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ดังแสดงในตารางที่ 1

ภาชนะสัมผัสอาหาร สุ่มตัวอย่างภาชนะและมือผู้สัมผัสอาหาร ด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ (aseptic technique) ส่งตัวอย่างเข้าห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทันที ตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยภาชนะที่มีจำนวนมากพอ เช่น จาน ชาม แก้วน้ำ ช้อน – ส้อม สุ่มภาชนะชนิดละ X ชิ้น/ตัวอย่าง (เตรียม BPB X มิลลิลิตร ภายหลัง swab แล้ว จะได้อัตราส่วน BPB 1 มิลลิลิตร/ชิ้นภาชนะ) เพื่อตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 3 รายการ กรณีภาชนะที่อาจมีจำนวนน้อย เช่น ทัพพี มีด จะตรวจเชื้อจุลินทรีย์เฉพาะรายการจำนวนจุลินทรีย์ ภาชนะสัมผัสอาหารประเภท เชียง ถาด สุ่ม 1 ชิ้น

วิธีการ swab⁽⁵⁾

ภาชนะ ใช้ไม้ swab 1 ไม้/ตัวอย่าง จุ่มลงใน BPB บิดหัวสำลีที่ปลายไม้ให้พอหมาด โดยกดปลายไม้กับด้านข้างภายในหลอด จากนั้น swab ตามวิธี ดังนี้ จาน ชาม แก้วน้ำ ถ้วยกาแฟ swab ส่วนที่สัมผัสอาหารด้านในภาชนะ ต่เกียบ swab โดยรอบจากปลายขึ้นมา 1½ นิ้ว ช้อน – ส้อม swab ส่วนที่สัมผัสอาหารทั้ง 2 ด้าน มีด swab ส่วนที่ใช้ตัดอาหารทั้งสองด้าน เชียง ถาด swab ตรงกลางภาชนะ พื้นที่ 50 ตารางเซนติเมตร (2 × 25 เซนติเมตร หรือ 5 × 10 เซนติเมตร)

มือผู้สัมผัสอาหาร เตรียม BPB 5 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด (1 มือ/หลอด) และใช้ไม้ swab 1 ไม้/มือ/หลอด จุ่มลงใน BPB กดปลายไม้กับด้านข้างภายในหลอด ทำการ swab มือที่สัมผัสอาหารข้างหนึ่ง โดยหงายฝ่ามือขึ้น swab ฝ่ามือและรอบนิ้วทุกนิ้ว หรือ swab ส่วนของมือที่ใช้หยิบจับอาหารหรือสัมผัสอาหาร เพื่อตรวจจำนวนจุลินทรีย์ จากนั้น swab มือที่สัมผัสอาหารอีกหนึ่งข้าง เพื่อตรวจ *E. coli*, *Salmonella* spp. และ *S. aureus* ทั้งนี้ควรทดสอบหลังการล้างทำความสะอาดมือแล้ว

วิธีวิเคราะห์

จำนวนจุลินทรีย์: วิธี APHA, Compendium 2015, Chapter 6&8⁽⁶⁾ จำนวนยีสต์และรา: วิธี AOAC (2019) 997.02⁽⁷⁾ *E. coli*: วิธี US FDA BAM 2017, Chapter 4⁽⁸⁾ *B. cereus*: วิธี US FDA BAM 2012, Chapter 14⁽⁹⁾ *C. perfringens*: วิธี US FDA BAM 2001, Chapter 16⁽¹⁰⁾ *L. monocytogenes*: วิธี ISO 11290 – 1:2017⁽¹¹⁾ *Salmonella* spp.: วิธี ISO 6579 – 1:2017⁽¹²⁾ *S. aureus*: วิธี US FDA BAM 2016, Chapter 12⁽¹³⁾ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus*: วิธี ISO 21872 – 1:2017⁽¹⁴⁾

เกณฑ์ที่ใช้ประเมิน

การประเมินผลการตรวจวิเคราะห์ใช้เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2560)⁽⁵⁾ โดยแสดงเฉพาะประเภทอาหารที่ตรงกับชนิดตัวอย่างที่สุ่มเก็บในงานวิจัยนี้ ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 รายการผักและผลไม้สดแช่เย็นแช่แข็ง ขนมหวาน ขนมอบที่มีไส้หรือไม่มีไส้ และอาหารพร้อมบริโภคทั่วไป

รายการทดสอบ	ผักและผลไม้สดแช่เย็นแช่แข็ง	ขนมหวาน	ขนมอบที่มีไส้หรือไม่มีไส้	อาหารพร้อมบริโภคทั่วไป
จำนวนจุลินทรีย์ CFU/กรัม	น้อยกว่า 1×10^6	น้อยกว่า 1×10^6	น้อยกว่า $1 \times 10^{4(a)}$ น้อยกว่า $1 \times 10^{5(b)}$	น้อยกว่า 1×10^6
จำนวนยีสต์และรา CFU/กรัม	ยีสต์ น้อยกว่า 1,000 รา น้อยกว่า 500	น้อยกว่า 1,000	น้อยกว่า 100 ^(a) น้อยกว่า 500 ^(b)	-
<i>Escherichia coli</i> MPN/กรัม	น้อยกว่า 100	น้อยกว่า 3	น้อยกว่า 3	น้อยกว่า 3 ^(c) น้อยกว่า 10 ^(d)
<i>Bacillus cereus</i> CFU/กรัม	-	น้อยกว่า 100	น้อยกว่า 100	น้อยกว่า 100 ^(e)
<i>Clostridium perfringens</i> CFU/กรัม	-	-	น้อยกว่า 100	น้อยกว่า 100
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 กรัม	ไม่พบ	-	-	ไม่พบ
<i>Salmonella</i> spp./25 กรัม	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
<i>Staphylococcus aureus</i> CFU/กรัม	น้อยกว่า 100	น้อยกว่า 100	น้อยกว่า 10	น้อยกว่า 100
<i>Vibrio cholerae</i> /25 กรัม	-	-	-	ไม่พบ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> /25 กรัม	-	-	-	ไม่พบ ^(f)

- หมายถึง ไม่ได้วิเคราะห์

^(a) ขนมอบที่ไม่มีไส้หรือเติมไส้หรือส่วนผสมอื่นก่อนอบ เช่น คุกกี้ บิสกิต แครกเกอร์ เวเฟอร์ ขนมเปี๊ยะ ขนมโมจิ ขนมไหว้พระจันทร์ ขนมปัง และพาย เป็นต้น

^(b) ขนมอบที่เติมไส้หรือส่วนผสมอื่นหลังอบ เช่น แอแคลร์ แยมโรล ขนมเค้กหน้าต่าง ๆ บิสกิตหรือแครกเกอร์หรือเวเฟอร์ไส้ต่าง ๆ เป็นต้น

^(c) อาหารประเภทข้าวแกง ก๋วยเตี๋ยว ขนมจีน ไส้กรอก ปูอัด ปลาหมึกปรุงรส ซูชิ แซนวิช และอื่น ๆ

^(d) ส้มตำ สลัดมีเนื้อสัตว์เป็นส่วนประกอบ ขนมจีนและแซนวิชที่มีผักสดเป็นส่วนประกอบ อาหารประเภทยำ น้ำตก และลาบ

^(e) รายการทดสอบนี้ตรวจเฉพาะอาหารที่มีข้าวหรือแป้งหรือธัญพืชเป็นส่วนประกอบ

^(f) รายการทดสอบนี้ตรวจเฉพาะอาหารทะเลหรืออาหารที่มีอาหารทะเลเป็นส่วนประกอบ

ตารางที่ 2 เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 รายการภาชนะสัมผัสอาหาร และมือผู้สัมผัสอาหาร

รายการทดสอบ	ภาชนะสัมผัสอาหาร	มือผู้สัมผัสอาหาร
จำนวนจุลินทรีย์ (CFU)	น้อยกว่า 1,000 /ชิ้นภาชนะหรือต่อคู่	น้อยกว่า 500 /มือ
<i>Escherichia coli</i>	-	ไม่พบ /ส่วนหนึ่งของมือ
<i>Salmonella</i> spp.	ไม่พบ /ชิ้นภาชนะหรือต่อคู่	ไม่พบ /ส่วนหนึ่งของมือ
<i>Staphylococcus aureus</i>	ไม่พบ /ชิ้นภาชนะหรือต่อคู่	ไม่พบ /ส่วนหนึ่งของมือ

- หมายถึง ไม่ได้วิเคราะห์

การวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณหาความสัมพันธ์ทางสถิติ (ความแตกต่างของข้อมูล 2 ชุด) โดยใช้ไคสแควร์ (χ^2 -test) สำหรับข้อมูลตารางขนาด 2×2 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05⁽¹⁵⁾

จากสูตรไคสแควร์

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

O คือ ค่าสำรวจ

E คือ ค่าที่คาดหวัง = $\frac{(\text{ผลรวมของแถว})(\text{ผลรวมของสดมภ์})}{(\text{ผลรวมทั้งหมด})}$

df คือ ค่าชั้นแห่งความอิสระ = (จำนวนแถว - 1) (จำนวนสดมภ์ - 1)
= (2 - 1) (2 - 1) = 1

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

- ถ้า χ^2_{cal} ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่า 3.84 ($p < 0.05$) แสดงว่าตัวอย่างอาหารและภาชนะสัมผัสอาหารที่สุ่มเก็บในปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 - 2563 มีผลการตรวจผ่านเกณฑ์⁽⁵⁾ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

- ถ้า χ^2_{cal} ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่า 3.84 ($p > 0.05$) แสดงว่าตัวอย่างอาหารและภาชนะสัมผัสอาหารที่สุ่มเก็บในปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 - 2563 มีผลการตรวจผ่านเกณฑ์ไม่แตกต่างกัน

ผล

ผลการตรวจอาหารพร้อมบริโภคและภาชนะสัมผัสอาหาร จากร้านอาหารสวัสดิการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 - 2563 รวม 270 ตัวอย่าง แบ่งเป็นอาหารพร้อมบริโภค 110 ตัวอย่าง และภาชนะสัมผัสอาหาร 160 ตัวอย่าง ผลตรวจผ่านเกณฑ์⁽⁵⁾ คิดเป็นร้อยละ 57.3 และ 26.9 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาตามช่วงเวลาเก็บตัวอย่างพบว่าปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 และ 2563 เก็บตัวอย่าง 137 และ 133 ตัวอย่าง ผลตรวจผ่านเกณฑ์⁽⁵⁾ คิดเป็นร้อยละ 33.6 และ 45.1 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 และผลการตรวจในปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 ผ่านเกณฑ์มากกว่าปี พ.ศ. 2562 มีค่า 1.3 เท่า ($45.1/33.6$) เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ทางสถิติโดยใช้ไคสแควร์ (χ^2 test) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบ χ^2_{cal} มีค่า 3.77 ซึ่งน้อยกว่า 3.84 ($p > 0.05$) แสดงว่าตัวอย่างอาหารและภาชนะสัมผัสอาหารที่สุ่มเก็บในปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 - 2563 มีคุณภาพทางจุลชีววิทยาไม่แตกต่างกัน⁽¹⁵⁾

อาหารพร้อมบริโภคจำนวน 110 ตัวอย่าง ผลตรวจไม่ผ่านเกณฑ์ร้อยละ 42.7 เนื่องจากจำนวนจุลินทรีย์ยีสต์ และ *E. coli* เกินเกณฑ์กำหนด คิดเป็นร้อยละ 20.0, 52.9 และ 19.0 ตามลำดับ จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ *B. cereus*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. และ *S. aureus* ไม่ผ่านเกณฑ์ คิดเป็นร้อยละ 19.6, 2.1, 1.0, 6.4 และ 0.9 ตามลำดับ ส่วนเชื้อรา *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ตรวจไม่พบในทุกตัวอย่าง เมื่อพิจารณาอาหารพร้อมบริโภคที่แยกได้เป็น 6 ประเภท ตามวิธีการประกอบอาหาร พบว่าอาหารประเภทยำ-ส้มตำ-อาหารที่ป่นผักสด-ผลไม้ ไม่ผ่านเกณฑ์สูงสุด คิดเป็นร้อยละ 80.0 รองลงมา ได้แก่ ขนมหวาน-ขนมอบ ผัด อาหารปรุงสุกแล้วผ่านการหยิบจับด้วยมือหรือหั่นผ่านเขียง ต้ม-นึ่ง ไม่ผ่านเกณฑ์ร้อยละ 50.0, 45.5, 48.8 และ 9.1 ตามลำดับ และอาหารทอด-ย่างตรวจผ่านเกณฑ์ทุกตัวอย่าง ร้อยละ 100.0 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ในอาหารพร้อมบริโภคและภาชนะสัมผัสอาหารที่เก็บจากร้านอาหารสวัสดิการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 – 2563

ตัวอย่างทดสอบ	ปีงบประมาณ พ.ศ.	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์		
		ทั้งหมด	ผ่านเกณฑ์ ⁽⁵⁾ (%)	ไม่ผ่านเกณฑ์ ⁽⁵⁾ (%)
อาหารพร้อมบริโภค	2562	50	26 (52.0)	24 (48.0)
	2563	60	37 (61.7)	23 (38.3)
	รวม	110	63 (57.3)	47 (42.7)
ภาชนะสัมผัสอาหาร	2562	87	20 (23.0)	67 (77.0)
	2563	73	23 (31.5)	50 (68.5)
	รวม	160	43 (26.9)	117 (73.1)
รวม ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562		137	46 (33.6)	91 (66.4)
รวม ปีงบประมาณ พ.ศ. 2563		133	60 (45.1)	73 (54.9)
รวมทั้งหมด		270	106 (39.3)	164 (60.7)

ตารางที่ 4 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ในอาหารพร้อมบริโภคที่เก็บจากร้านอาหารสวัสดิการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 – 2563

ประเภท ของอาหาร พร้อมบริโภค	จำนวนตัวอย่าง											
	ตรวจวิเคราะห์					สาเหตุไม่ผ่านเกณฑ์/จำนวนตัวอย่างที่ตรวจ ⁽⁵⁾ (%)						
	ทั้งหมด	ผ่าน (%)	ไม่ผ่าน (%)	จำนวนจุลินทรีย์	จำนวนยีสต์และรา	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>S. aureus</i>	<i>V. cholerae</i> <i>V. parahaemolyticus</i>
ต้ม-นึ่ง	22	20 (90.9)	2 (9.1)	0	-	1/22 (4.5)	0	1/22 (4.5)	0	0	0	0
ผัด	11	6 (54.5)	5 (45.5)	2/11 (18.2)	-	4/11 (36.4)	2/4 (50.0)	0	0	3/11 (27.3)	0	0
ทอด-ย่าง	12	12 (100.0)	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0
ปรุงสุก ผ่านมือหรือเขียง	29	16 (55.2)	13 (44.8)	4/29 (13.8)	-	8/29 (27.6)	4/28 (14.3)	1/29 (3.4)	1/29 (3.4)	1/29 (3.4)	0	0
ยำ-ส้มตำ- อาหารที่ปน ผักสด-ผลไม้	30	6 (20.0)	24 (80.0)	14/30 (46.7)	ยีสต์ 9/17 (52.9) รา 0	8/30 (26.7)	1/8 (12.5)	0	0	3/30 (10.0)	1/30 (3.3)	0
ขนมหวาน- ขนมอบ	6	3 (50.0)	3 (50.0)	2/6 (33.3)	0	0	3/6 (50.0)	0	-	0	0	-
รวม	110	63 (57.3)	47 (42.7)	22/110 (20.0)	ยีสต์ 9/17 (52.9) รา 0	21/110 (19.0)	10/51 (19.6)	2/97 (2.1)	1/103 (1.0)	7/110 (6.4)	1/110 (0.9)	0

- หมายถึง ไม่ได้วิเคราะห์

ภาชนะสัมผัสอาหารประกอบด้วยภาชนะที่สัมผัสอาหารและมือผู้สัมผัสอาหารรวม 160 ตัวอย่าง ผลตรวจไม่ผ่านเกณฑ์ร้อยละ 73.1 เนื่องจากจำนวนจุลินทรีย์เกินเกณฑ์ร้อยละ 72.5 และตรวจพบ *E. coli* และ *S. aureus* ร้อยละ 2.5 และ 5.0 ตามลำดับ ส่วน *Salmonella* spp. ตรวจไม่พบในทุกตัวอย่าง โดยเมื่อพิจารณาผลตรวจภาชนะสัมผัสอาหารแต่ละประเภท ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 และ 2563 พบว่าภาชนะที่สัมผัสอาหารส่วนกลาง ไม่ผ่านเกณฑ์ร้อยละ 66.7 และ 0 ตามลำดับ ภาชนะที่สัมผัสอาหารส่วนของร้านค้า ไม่ผ่านเกณฑ์ ร้อยละ 70.9 และ 62.5 ตามลำดับ และมือผู้สัมผัสอาหารไม่ผ่านเกณฑ์ร้อยละ 92.3 และ 100.0 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะสัมผัสอาหารที่เก็บจากร้านอาหารสวัสดิการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 - 2563

ประเภทของ ภาชนะสัมผัสอาหาร	ปีงบ ประมาณ พ.ศ.	จำนวนตัวอย่าง							
		ตรวจวิเคราะห์			สาเหตุที่ไม่ผ่านเกณฑ์ ⁽⁵⁾ (%)				
		ทั้งหมด	ผ่าน (%)	ไม่ผ่าน (%)	จำนวน จุลินทรีย์	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>S. aureus</i>	
1. ภาชนะ ที่สัมผัสอาหาร	ส่วนกลาง	2562	6	2 (33.3)	4 (66.7)	4 (66.7)	-	0	1 (16.7)
		2563	5	5 (100.0)	0	0	-	0	0
		รวม	11	7 (63.6)	4 (36.4)	4 (36.4)	-	0	1 (9.1)
	ส่วนของร้านค้า	2562	55	16 (29.1)	39 (70.9)	39 (70.9)	-	0	1 (1.8)
		2563	48	18 (37.5)	30 (62.5)	29 (60.4)	-	0	3 (6.3)
		รวม	103	34 (33.0)	69 (67.0)	68 (66.0)	-	0	4 (3.9)
รวม		114	41 (36.0)	73 (64.0)	72 (63.2)	-	0	5 (4.4)	
2. มือผู้สัมผัสอาหาร	2562	26	2 (7.7)	24 (92.3)	24 (92.3)	2 (7.7)	0	3 (11.5)	
	2563	20	0	20 (100.0)	20 (100.0)	2 (10.0)	0	0	
	รวม	46	2 (4.3)	44 (95.7)	44 (95.7)	4 (8.7)	0	3 (6.5)	
รวม ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562		87	20 (23.0)	67 (77.0)	67 (77.0)	2 (2.3)	0	5 (5.7)	
รวม ปีงบประมาณ พ.ศ. 2563		73	23 (31.5)	50 (68.5)	49 (67.1)	2 (2.7)	0	3 (4.1)	
รวมทั้งหมด		160	43 (26.9)	117 (73.1)	116 (72.5)	4 (2.5)	0	8 (5.0)	

- หมายถึง ไม่ได้วิเคราะห์

วิจารณ์

การตรวจหาจุลินทรีย์ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภคและภาชนะสัมผัสอาหารที่สุ่มเก็บจากร้านอาหารสวัสดิการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 – 2563 พบจุลินทรีย์หลายชนิดที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารพร้อมบริโภคไม่ผ่านเกณฑ์⁽⁵⁾ การตรวจพบจุลินทรีย์แต่ละชนิด มีข้อบ่งชี้ดังนี้ จำนวนจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในอาหารประเภท ผัก อาหารปรุงสุกแล้วผ่านการหยิบจับด้วยมือหรือหั่นผ่านเชียง ยา-สัมผั-อาหารที่ปนผักสด-ผลไม้ และขนมหวาน-ขนมอบ ปกติจำนวนจุลินทรีย์จะไม่ได้เป็นตัวประเมินความปลอดภัยของอาหารโดยตรง แต่ใช้เป็นตัวชี้วัดคุณภาพของอาหาร หากช่วงเวลาในการเก็บอาหารไว้นานจำนวนจุลินทรีย์ก็จะเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย โดยเฉพาะอาหารที่เก็บในตู้เย็นที่ไม่ได้ควบคุมอุณหภูมิ หรือการนำอาหาร เข้า - ออกจากตู้เย็นหลายครั้ง⁽¹⁶⁾ ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปและปนเปื้อนมาจากดินและน้ำ งานวิจัยนี้พบยีสต์ในอาหารประเภท ยา-สัมผั-อาหารที่ปนผักสด-ผลไม้ ซึ่งมีวัตถุดิบบางชนิดไม่ผ่านความร้อนหากผู้ผลิตล้างไม่สะอาดพอ เชื้อยังคงหลงเหลืออยู่⁽¹⁷⁾ การที่มีเชื้อยีสต์อยู่ในอาหารไม่ก่อให้เกิดอันตรายแต่ทำให้อาหารเสื่อมเสียโดยการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ อาหารจะเกิดกลิ่นหมักและมีฟองก๊าซเกิดขึ้น⁽¹⁸⁾ *E. coli* เป็นจุลินทรีย์ที่บ่งชี้การปนเปื้อนอุจจาระของคนหรือสัตว์เลือดอุ่น⁽³⁾ การปนเปื้อน *E. coli* แสดงถึงกระบวนการผลิตและเก็บรักษาไม่ถูกสุขลักษณะเนื่องจาก *E. coli* เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ทนความร้อนผลการตรวจที่เกินเกณฑ์ในอาหารพร้อมบริโภค โดยเฉพาะอาหารที่ผ่านความร้อนก่อนบริโภค (ต้ม-นึ่ง ผัก และอาหารปรุงสุกที่ผ่านการหยิบจับด้วยมือหรือหั่นผ่านเชียง) แสดงให้เห็นว่าอาหารเกิดการปนเปื้อนซ้ำ (recontaminated) ซึ่งมีสาเหตุส่วนใหญ่มาจากการปนเปื้อนข้าม (cross contaminated) จากอาหารดิบสู่ภาชนะ เครื่องมือ เครื่องใช้เครื่องแต่งกาย มือ หรือการไอจามของผู้ประกอบการลงสู่อาหารสุก⁽¹⁹⁾ *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์จึงทนต่อสภาวะแวดล้อมได้ดี พบได้บ่อยในอาหารที่มีแป้งและธัญพืชเป็นส่วนประกอบ โดยในแป้งสาธิตจะมีสปอร์ของ *Bacillus* เฉลี่ย 20 – 30 สปอร์ต่อกรัมอาหาร และมักพบ *Bacillus* ในแป้งที่ผ่านการฟอกสี⁽³⁾ สอดคล้องกับผลตรวจอาหารประเภทขนมหวาน-ขนมอบ ที่ไม่ผ่านเกณฑ์โดยมีสาเหตุหลักมาจาก *B. cereus* โรคอาหารเป็นพิษจากแบคทีเรียชนิดนี้ มักเกิดจากการเก็บอาหารที่ปรุงสุกแล้วในอุณหภูมิที่เย็นไม่เพียงพอเป็นเวลาหลายชั่วโมงและไม่ได้อุ่นร้อนก่อนรับประทาน เช่น การเตรียมอาหารประเภทข้าวครั้งละมากๆ แล้วตั้งทิ้งไว้หรือรอจนกว่าจะจำหน่ายหมด ทำให้ *B. cereus* เจริญพร้อมกับสร้างเอนโทโร톡ซินขึ้นมา อย่างไรก็ตามปริมาณของ *B. cereus* ที่ก่อโรคได้ต้องมีมากกว่า 10^6 เซลล์ต่อกรัมอาหาร^(1, 20) *C. perfringens* พบเกินเกณฑ์ในอาหารประเภท ต้ม-นึ่งและอาหารปรุงสุกที่ผ่านการหยิบจับด้วยมือหรือหั่นผ่านเชียง โดยอาหารประเภทต้ม-นึ่ง ใช้ความร้อนในการประกอบอาหารสูง แต่ *C. perfringens* เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้ในบางสายพันธุ์สปอร์สามารถทนต่ออุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ได้นานเกิน 1 ชั่วโมง นอกจากนี้โรคอาหารเป็นพิษจากแบคทีเรียชนิดนี้มักเกิดจากการที่เก็บอาหารที่ปรุงสุกแล้วในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม (ร้อนหรือเย็น ไม่เพียงพอ) เป็นเวลาหลายชั่วโมง หากความร้อนที่ใช้ทำให้อาหารสุกไม่เพียงพอที่จะทำลายสปอร์ เมื่อตั้งอาหารทิ้งไว้ สปอร์จะงอกและผลิตสารพิษออกมา^(10, 20) *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียที่ถูกทำลายด้วยอุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ การตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้ สาเหตุอาจมาจากการปรุงอาหารด้วยความร้อนที่ไม่สูงพอ หรือเกิดจากการปนเปื้อนข้ามจากภาชนะที่สัมผัสอาหาร เนื่องจาก *L. monocytogenes* สามารถสร้างไบโอฟิล์มยึดเกาะกับพื้นผิวได้ดี ในขณะที่การล้างทำความสะอาดเป็นไปได้ยาก^(3, 20, 21) *Salmonella* spp. เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ของสัตว์ปีกรวมทั้งมนุษย์ โดยออกจากลำไส้มากับอุจจาระ การตรวจพบในอาหารประเภท ผัก อาหารปรุงสุกที่ผ่านการหยิบจับด้วยมือหรือหั่นผ่านเชียง และประเภทยา-สัมผั-อาหารที่ปนผักสด-ผลไม้ สันนิษฐานว่าผู้ปรุงอาหารอาจเป็นพาหะประกอบกับสุขลักษณะส่วนบุคคลไม่ดี และมีการปนเปื้อนข้ามระหว่างอาหารดิบ โดยเฉพาะเนื้อสัตว์ดิบ ไปยังอาหารสุกผ่านทางอุปกรณ์ประกอบอาหาร เช่น มีดและเชียง เป็นต้น^(3, 20) *S. aureus* พบในอาหารประเภท ยา-สัมผั-อาหารที่ปนผักสด-ผลไม้ การตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้แสดงถึงผู้ประกอบการมีสุขลักษณะส่วนบุคคลที่ไม่ดี เนื่องจาก

เป็นเชื้อที่พบได้ตามจมูก มือ แขน ในลิ้น ฝี หนอง เป็นต้น⁽³⁾ ทั้งนี้ การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหาร นอกจากที่ปนเปื้อนมาที่วัตถุดิบแล้ว สาเหตุหลัก คือมาจากผู้ที่สัมผัสอาหารมีสุขลักษณะส่วนบุคคลไม่ดี (ผ่านทาง fecal oral route และทางผิวหนังร่างกาย) การใช้อุปกรณ์ประกอบอาหาร และบริเวณที่ประกอบอาหารไม่สะอาด⁽²²⁾

อาหารพร้อมบริโภคที่ตรวจไม่ผ่านเกณฑ์สูงสุด คือ ยา-ส้มตำ-อาหารที่ปนผักสด-ผลไม้ เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ประกอบอาหารบางชนิดไม่ผ่านความร้อน (เช่น ผักและผลไม้) หรือผ่านความร้อนไม่เพียงพอ (เช่น การลวกเนื้อสัตว์ต่าง ๆ) และการปรุงอาหารประเภทนี้มักมีการหยิบหรือจับอาหารดิบสัมผัสอาหารสุกโดยไม่ได้ล้างมือ ทำให้มีโอกาสที่เชื้อโรคจากวัตถุดิบปนเปื้อนข้ามสู่อาหารปรุงสุกได้มากกว่าอาหารประเภทอื่น⁽¹⁹⁾ สอดคล้องกับงานวิจัยของ ธนชัย พิระธณิษฐ์ และคณะ⁽²³⁾ ที่ตรวจโคลิฟอร์มแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบการปนเปื้อนของโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (SI - 2) ในอาหาร พบว่าอาหารประเภทผลไม้ สลัด ส้มตำ พบการปนเปื้อนโคลิฟอร์มแบคทีเรียสูงกว่าอาหารประเภทอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) อาหารประเภทอื่น ๆ ใช้ความร้อนในการประกอบอาหาร ความร้อนจะช่วยทำลายเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะประเภททอด-ย่าง ผลตรวจจึงผ่านเกณฑ์ร้อยละ 100.0 ส่วนอาหารปรุงสุกแล้วผ่านการหยิบจับด้วยมือหรือหั่นผ่านเขียง การปนเปื้อนอาจเกิดขึ้นได้โดยผ่านมือ เขียง มีด และภาชนะบรรจุอาหารต่าง ๆ ที่ใช้ปะปนกันระหว่างของสุกและของดิบ ทำให้อาหารที่ปรุงสุกดีแล้วปนเปื้อนข้ามด้วยเชื้อนี้ได้อีก หรือเชื้ออาจมาจากผู้ประกอบอาหารเอง เนื่องจากสุขลักษณะส่วนบุคคลไม่ดี

ผลตรวจจุลินทรีย์ในภาชนะสัมผัสอาหารที่ไม่ผ่านเกณฑ์⁽⁵⁾ สาเหตุหลักมาจากจำนวนจุลินทรีย์สอดคล้องกับงานวิจัยของ กิจจา จิตรภิมย์ และคณะ⁽²⁴⁾ ที่ประเมินความสะอาดของภาชนะสัมผัสอาหาร ได้แก่ จาน ช้อน และแก้วน้ำรวม 150 ตัวอย่าง จากร้านและแผงลอยอาหารตามสั่งในตลาดสดคลองเตย กรุงเทพมหานคร และพบว่าภาชนะสัมผัสอาหารส่วนใหญ่ (ร้อยละ 64.0) มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งหมดเกินมาตรฐานสุขาภิบาลอาหาร (มากกว่า 1.0×10^3 CFU/ชิ้นภาชนะ) ผลตรวจจุลินทรีย์ในภาชนะที่สัมผัสอาหารส่วนกลาง เช่น จาน ชาม ช้อน - ส้อม ปิ้งประมาณ พ.ศ. 2563 ผ่านเกณฑ์ร้อยละ 100.0 เนื่องจากมีการปรับเปลี่ยนวิธีการตากแห้ง จากเดิมจะนำภาชนะใส่ตะกร้าคลุมด้วยผ้า แล้วนำไปวางตากให้แห้งในที่โล่ง ต่อมาเปลี่ยนเป็นการใช้เครื่องอบแห้งภาชนะแทน ส่งผลให้ผลการตรวจเชื้อจุลินทรีย์ผ่านเกณฑ์ทุกรายการ แสดงถึงเครื่องอบแห้งมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี และการที่ภาชนะในกลุ่มนี้มีความสะอาดและปลอดภัยนับว่ามีความสำคัญมาก เนื่องจากเป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการรับประทานอาหาร หากมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค จะทำให้เชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายโดยตรง ในขณะที่ภาชนะที่สัมผัสอาหารส่วนของร้านค้า ได้แก่ ท็อปปิ้ง มีด เขียง และถาด ผลตรวจไม่ผ่านเกณฑ์ยังคงสูง นอกจากจำนวนจุลินทรีย์เกินเกณฑ์แล้ว ยังมีสาเหตุจาก *S. aureus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษ หากร้านค้าใช้ภาชนะเหล่านี้ประกอบอาหารที่ไม่ผ่านความร้อนหรืออาหารที่ปรุงสุกแล้ว อาหารนั้นอาจถูกปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ตกค้างจากภาชนะที่ล้างไม่สะอาด ส่งผลให้อาหารมีความเสี่ยงที่จะก่อให้เกิดโรคกับผู้บริโภคได้ ผลตรวจจุลินทรีย์บนมือผู้สัมผัสอาหาร พบ *E. coli* และ *S. aureus* แสดงถึงผู้สัมผัสอาหารมีสุขลักษณะส่วนบุคคลที่ไม่ดี เช่น ล้างมือไม่สะอาดหลังเข้าห้องน้ำ ไอจามปิดปากแล้วไม่ล้างมือ หรือมีพฤติกรรมกร้าว แคะ แกะ เกา เป็นต้น⁽³⁾

เมื่อพิจารณาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภคและภาชนะสัมผัสอาหารที่สุ่มเก็บแล้วพบสัดส่วนของตัวอย่างที่ไม่ผ่านเกณฑ์เรียงตามลำดับจากมากไปน้อย คือมือผู้สัมผัสอาหาร ภาชนะที่สัมผัสอาหารทั้งส่วนกลางและของร้านค้า และอาหารพร้อมบริโภค ไม่ผ่านเกณฑ์ร้อยละ 95.7, 64.0 และ 42.7 ตามลำดับ (ข้อมูลตามตาราง 3 และ 5) สอดคล้องกับผลการตรวจโคลิฟอร์มแบคทีเรียที่มีการปนเปื้อนในมือผู้สัมผัสอาหาร (ร้อยละ 55.0) ภาชนะสัมผัสอาหาร (ร้อยละ 47.0) และอาหาร (ร้อยละ 42.0)⁽²³⁾ ผลการตรวจอาหารพร้อมบริโภคและภาชนะสัมผัสอาหารที่สุ่มเก็บในปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 ผ่านเกณฑ์มากกว่าปี 2562 มีค่า 1.3 เท่า แต่เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ทางสถิติพบว่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) แสดงว่าตัวอย่างอาหารและภาชนะสัมผัสอาหารที่สุ่มเก็บในปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 - 2563 มีคุณภาพทางจุลชีววิทยาไม่แตกต่างกันการปรับปรุงคุณภาพของอาหารให้สะอาดและปลอดภัยต้องอาศัยความร่วมมือจากทุกภาคส่วน คือผู้สัมผัสอาหารต้องมีความรับผิดชอบต่อผู้บริโภคและสังคม ด้วยการ

ปฏิบัติตนอย่างถูกต้องทั้งในเรื่องสุขวิทยาส่วนบุคคลและสุขนิสัยที่ดีในการปรุง ประกอบ และจำหน่ายอาหาร⁽⁴⁾ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ซึ่งมีหน้าที่กำกับดูแลโดยตรง ควรจัดอบรมเรื่องการสุขาภิบาลอาหารแก่ผู้สัมผัสอาหารอย่างต่อเนื่อง มีข้อมูลงานวิจัยสนับสนุนว่าผู้ค้าอาหารที่เคยผ่านการอบรมเรื่องการสุขาภิบาลอาหารจากเจ้าหน้าที่สาธารณสุข มีการปฏิบัติด้านการสุขาภิบาลอาหารระดับดีมากว่าผู้ค้าอาหารที่ไม่เคยผ่านการอบรม เรื่องการสุขาภิบาลอาหาร และการได้รับการอบรมเรื่องการสุขาภิบาลอาหารจะช่วยให้ผู้ค้าอาหารมีทักษะและประสบการณ์นำไปปฏิบัติในการปรับปรุง ประกอบ จำหน่ายอาหารให้ถูกสุขลักษณะยิ่งขึ้น⁽²⁵⁾ และการปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหารของผู้สัมผัสอาหารกับคุณภาพอาหารด้านจุลชีววิทยามีความสัมพันธ์กันในทางบวก กล่าวคือหากปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหารต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานจะส่งผลให้มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภค⁽²⁶⁾ นอกจากนี้กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ควรตรวจประเมินร้านอาหารสวัสดิการตามหลักสุขาภิบาลควบคู่กับการสุ่มตรวจอาหาร น้ำ และเครื่องดื่มเป็นระยะๆ เพื่อเป็นการกระตุ้นให้ผู้สัมผัสอาหารใส่ใจกับคุณภาพของอาหาร และดูแลรักษาสุขลักษณะที่ดีในร้านค้าของตนอย่างสม่ำเสมอ สำหรับผู้บริโภคควรปฏิบัติตามหลัก “กินร้อน ช้อนกลาง ล้างมือ” และเลือกอาหารที่ “สุก ร้อน สะอาด” หลีกเลี่ยงอาหารสุกๆ ดิบๆ การเก็บอาหารไว้ข้ามมื้อควรเก็บในตู้เย็นและอาหารที่เก็บไว้นานเกิน 2 ชั่วโมงต้องนำมาอุ่น ให้ร้อนทั่วถึงก่อนรับประทาน

สรุป

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร เก็บตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภคและภาชนะสัมผัสอาหาร จากร้านอาหารสวัสดิการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อตรวจประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยาระหว่างปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 – 2563 จำนวน 270 ตัวอย่าง แบ่งเป็นอาหารพร้อมบริโภคจำนวน 110 ตัวอย่าง ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่ผ่านเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหารฉบับที่ 3 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ คิดเป็นร้อยละ 42.7 เนื่องจากจำนวนจุลินทรีย์ ยีสต์ และ *E. coli* เกินเกณฑ์กำหนดคิดเป็นร้อยละ 20.0, 52.9 และ 19.0 ตามลำดับ จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ *B. cereus*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. และ *S. aureus* ไม่ผ่านเกณฑ์คิดเป็นร้อยละ 19.6, 2.1, 1.0, 6.4 และ 0.9 ตามลำดับ และตรวจไม่พบ เชื้อรา *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* โดยอาหารประเภทยำ-ส้มตำ-อาหารปนผักสด-ผลไม้ไม่ผ่านเกณฑ์สูงสุด (ร้อยละ 80.0) ตัวอย่างภาชนะสัมผัสอาหาร จำนวน 160 ตัวอย่าง ไม่ผ่านเกณฑ์ คิดเป็นร้อยละ 73.1 สาเหตุจากจำนวนจุลินทรีย์ *E. coli* และ *S. aureus* คิดเป็นร้อยละ 72.5, 2.5 และ 5.0 ตามลำดับ และตรวจไม่พบ *Salmonella* spp. ในทุกตัวอย่าง ผลการดำเนินการเพื่อพัฒนาโรงอาหารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 ส่งผลให้ผลการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ผ่านเกณฑ์มากกว่าปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มีค่า 1.3 เท่า แต่เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ทางสถิติพบว่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ดังนั้นในการปรับปรุงคุณภาพอาหารพร้อมบริโภคให้มีคุณภาพและความปลอดภัยมากขึ้น ต้องอาศัยความร่วมมือจากทุกภาคส่วนในการปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหารเพื่อให้ร้านอาหารสวัสดิการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เป็นต้นแบบของโรงอาหารปลอดภัย ใส่ใจสุขภาพ “DMSc. Healthy Canteen”

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางสาวชนทอง เพ็ชรนอก ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านสุขลักษณะการผลิต (นักวิทยาศาสตร์การแพทย์เชี่ยวชาญ) นางสาวจำเรียง ปุญญะประสิทธิ์ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ และตรวจทานต้นฉบับ และขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาทุกท่านที่ช่วยในงานเตรียมตัวอย่างและตรวจวิเคราะห์อาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร

เอกสารอ้างอิง

1. กองนวัตกรรมและวิจัย กรมควบคุมโรค. แผนงานวิจัยด้านการป้องกัน ควบคุมโรคและภัยสุขภาพ พ.ศ. 2562 – 2564. [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 12 ธ.ค. 2562]; [112 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <http://irem.ddc.moph.go.th/uploads/book/5c779c5c14610.pdf>.
2. สำนักสุขาภิบาลอาหารและน้ำ กรมอนามัย. คู่มือการปฏิบัติงานด้านสุขาภิบาลอาหารและน้ำ เล่ม 5 วิชาการด้านสุขาภิบาลอาหาร (สสอ). [ออนไลน์]. 2556; [สืบค้น 12 ธ.ค. 2562]; [52 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://foodsafety.anamai.moph.go.th/th/handbook/911>.
3. บุษกร อุดรภิชาติ. จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. สงขลา: ศูนย์หนังสือมหาวิทยาลัยทักษิณ; 2552.
4. สำนักสุขาภิบาลอาหารและน้ำ กรมอนามัย. คู่มือหลักสูตรการสุขาภิบาลอาหารสำหรับผู้สัมผัสอาหารและผู้ประกอบการกิจการด้านอาหาร. [ออนไลน์]. 2557; [สืบค้น 5 ธ.ค. 2562]; [115 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: https://foodsafetyold.anamai.moph.go.th/download/D_Media/Handbook/คู่มือหลักสูตรผู้สัมผัสอาหาร.pdf.
5. สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2560). นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2560.
6. Chapter 6: culture methods for enumeration of microorganisms, and Chapter 8: mesophilic aerobic plate count. In: Salfinger Y, Tortorello ML, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 5th ed. Washington, DC: APHA Press; 2015. p. 75 – 87, 95 – 101.
7. AOAC official method 997.02 yeast and mold counts in foods, dry rehydratable film method (Petrifilm™ Method). In: Latimer GW, editor. Official methods of analysis of AOAC International, volume I. 20th ed. Maryland: AOAC International; 2016. p. 19 – 21.
8. Feng P, Weagant SD, Grant MA, Burkhardt W. Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. In: Bacteriological analytical manual (BAM). [online]. 2017; [cited 2019 Aug 2]; [18 screens]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>.
9. Tallent SM, Knolhoff A, Rhodehamel EJ, Harmon SM, Bennett RW. Chapter 14: *Bacillus cereus*. In: Bacteriological analytical manual (BAM). [online]. 2012; [cited 2019 Aug 2]; [10 screens]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-bacillus-cereus>.
10. Rhodehamel EJ, Harmo SM. Chapter 16: *Clostridium perfringens*. In: Bacteriological analytical manual (BAM). [online]. 2001; [cited 2019 Jul 5]; [7 screens]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-clostridium-perfringens>.
11. ISO 11290 – 1:2017. Microbiology of the food chain – horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. – Part 1: detection method. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.
12. ISO 6579 – 1:2017. Microbiology of the food chain – horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: detection of *Salmonella* spp. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.

13. Tallent S, Hait J, Bennett RW, Lancette GA. Chapter 12: *Staphylococcus aureus*. In: Bacteriological analytical manual (BAM). [online]. 2016; [cited 2019 Jul 12]; [6 screens]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-staphylococcus-aureus>.
14. ISO 21872 - 1:2017. Microbiology of the food chain - horizontal method for the determination of *Vibrio* spp. - Part 1: detection of potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.
15. ทัสสนี นุชประยูร, เตมศรี ชำนิจารกิจ, บรรณธิการ. สถิติในวิจัยทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2541. หน้า 79.
16. Health Protection Agency. Guidelines for assessing the microbiological safety of ready - to - eat foods placed on the market. [online]. 2009; [cited 2019 Dec 13]; [34 screens]. Available from: URL: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/363146/Guidelines_for_assessing_the_microbiological_safety_of_ready-to-eat_foods_on_the_market.pdf.
17. นิ่มนวล แก้วเชเนตร. การสำรวจจุลินทรีย์ในสลัดผักพร้อมบริโภค. [วิทยานิพนธ์]. สาขาโภชนาการศึกษาศาสตร์ศึกษา, บัณฑิตวิทยาลัย. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2545.
18. บทที่ 1 การเสื่อมคุณภาพและการเสื่อมเสียของอาหาร. ใน: อรพิน ชัยประสพ. วิชาการถนอมอาหาร (FD323). [ออนไลน์]. 2548; [สืบค้น 8 พ.ย. 2563]; [21 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: [http://old-book.ru.ac.th/e-book/f/FD323\(54\)/FD323-1.pdf](http://old-book.ru.ac.th/e-book/f/FD323(54)/FD323-1.pdf).
19. กมลวรรณ กันแดง, อัจฉรา อยู่คง, รัชฎาพร สุวรรณรัตน์. ความปลอดภัยทางจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภคที่จำหน่าย ณ สถานีขนส่งผู้โดยสารในเขตกรุงเทพมหานคร. ว กรรมวิทย์ พ 2558; 57(3): 269 - 78.
20. สุมณฑา วัฒนสินธุ์. จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2549.
21. นพดล ประเสริฐสินเจริญ, ทิพย์รัตน์ ซาหอมชื่น. ไบโอฟิล์ม มิตร หรือศัตรู. ว วิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์และเทคโนโลยี 2562; 3(1): 24 - 32.
22. Linscott AJ. Food - borne illnesses. Clin Microbiol Newslett 2011; 33(6): 41 - 5.
23. ธนชัย พิธีธรรมศรี, ดุสิต สุจิรารัตน์, ศิราณี ศรีใส. การวิเคราะห์ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์ต่อสภาวะการถนอมอาหารในเขตเทศบาลนครพิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก. ว สารานุกรมสุขศาสตร์ 2558; 45(3): 230 - 43.
24. กิจจา จิตรภิมย์, วลีรัตน์ ภมรพล, วชิระ สิงห์เคนทร์, ฌาน ปัทมะ พलयง. การประเมินความสะอาดของภาชนะสัมผัสอาหารในร้านอาหารตามสั่งในตลาดคลองเตย กรุงเทพมหานคร. ว ความปลอดภัยและสุขภาพ 2559; 9(32): 18 - 30.
25. เตือนใจ ชีวเกียรติยั้งยง. ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับพฤติกรรมสุขาภิบาลอาหารตามเกณฑ์มาตรฐานอาหารสะอาด รสชาติอร่อยของผู้ประกอบการค้าอาหารในเขตรับผิดชอบของศูนย์อนามัยที่ 1 กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. [วิทยานิพนธ์]. สาขาวิชาสุขศึกษา, บัณฑิตวิทยาลัย. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2551.
26. อานงค์ ใจแน่น. การปฏิบัติตามหลักสุขาภิบาลอาหารของผู้สัมผัสอาหารและคุณภาพอาหารทางด้านจุลชีววิทยาในร้านจำหน่ายอาหารพร้อมบริโภค. [วิทยานิพนธ์]. สาขาวิชาโภชนาการศึกษาศาสตร์ศึกษา, บัณฑิตวิทยาลัย. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2552.

Evaluation of the Microbiological Quality of Ready-to-eat Foods and Food Contact Articles in Welfare Restaurants of the Department of Medical Sciences

Nutthakan Tiyasiworn Kamonwan Kantaeng and Patraporn Srimai

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

ABSTRACT Between the fiscal year 2019 and 2020, the Bureau of Quality and Safety of Food collected 270 samples of the ready-to-eat foods (110 samples) and food contact articles (160 samples) from welfare restaurants of the Department of Medical Sciences. This study aimed to evaluate the microbiological quality of the collected samples using the microbiological quality guidelines for food and food contact articles, third edition, Department of Medical Sciences as standard guidelines. The results showed that 42.7% of 110 samples of 6 types of ready-to-eat foods did not pass the criteria and they were caused from yeast, aerobic plate count and *Escherichia coli* as 52.9%, 20.0% and 19.0%, respectively. The pathogenic bacteria, such as *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* were found as 19.6%, 2.1%, 1.0%, 6.4% and 0.9%, respectively. However, mold, *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* were not found in all samples. Thai salad-papaya salad-food with vegetables-fruits did not pass the highest criteria (80.0%). A sum of 73.1% of 160 samples of food contact articles did not pass the criteria and they were mainly caused from aerobic plate count. In comparison, the qualified results of the fiscal year 2020 was 1.3 times greater than that of 2019; however, they were not significant difference ($p>0.05$). In order to improve the quality and safety of ready-to-eat foods, food handlers must have good personal hygiene and good hygienic practices during preparing, cooking and selling food. The Department of Medical Sciences should provide training and assessment of welfare restaurant on food sanitation, including randomly collect sample of food and food contact articles for quality testing. Consumers should follow the principles of “eat hot food, use serving spoon and always wash your hands” and “eat cooked food that is still hot and clean”

Keywords: Microbiological quality, Ready-to-eat foods, Food contact articles, Food safety

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สีอิรีโทรซิน ในอาหารโดยเทคนิค HPLC

จันทร์เพ็ญ โตวิยานนท์ และสุรชาติ วิทยชัยวุฒิมงคล

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ สีอิรีโทรซินอยู่ในกลุ่มสีอินทรีย์สังเคราะห์ชนิดหนึ่ง เป็นสีที่มีความไวต่อแสงและความร้อน จัดเป็นวัตถุเจือปนอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 418 พ.ศ. 2563 ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่องกำหนดหลักเกณฑ์ เงื่อนไข วิธีการใช้ และอัตราส่วนของวัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 2) การศึกษานี้ได้พัฒนาและปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ปริมาณสีอิรีโทรซินในอาหารซึ่งเดิมใช้การสกัดด้วย 1-butanol แล้ววัดปริมาณด้วยเครื่อง spectrophotometer ซึ่งเหมาะสมสำหรับตัวอย่างอาหารที่ละลายน้ำเท่านั้น โดยเปลี่ยนมาเป็นการสกัดตัวอย่างแต่ละกลุ่มอาหาร (อาหารที่ละลายน้ำ, อาหารไม่ละลายน้ำ และอาหารประเภทที่มีไขมัน) แล้วใช้เทคนิค HPLC ในการตรวจวัดปริมาณ จากการทดสอบพบว่าวิธีมีความจำเพาะเจาะจง ถูกต้อง แม่นยำ และความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.10 ถึง 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) มากกว่า 0.9995 แต่ละกลุ่มอาหารมีพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ ขีดจำกัดการตรวจมีค่า 0.06, 0.10 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณมีค่า 0.20, 0.20 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ความเที่ยงตรงแสดงด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD_r) มีค่าไม่เกิน 1.5%, 4.5% และ 2.9% ตามลำดับ ความแม่นยำแสดงด้วยค่าเฉลี่ยของ %recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 96.1 – 99.4, 92.1 – 95.1 และ 83.3 – 96.0 ตามลำดับ วิธีวิเคราะห์นี้สามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณสีอิรีโทรซิน ครอบคลุมในทุกกลุ่มอาหารโดยมีความจำเพาะเจาะจง ถูกต้อง และแม่นยำ

คำสำคัญ: สีอิรีโทรซิน, อาหาร, เทคนิค HPLC

Corresponding author E-mail: janpen.t@dmsc.mail.go.th

Received: 27 October 2020

Revised: 31 May 2021

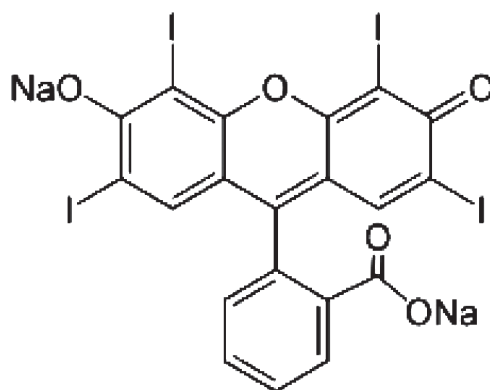
Accepted: 9 July 2021

บทนำ

HPLC หรือ High Performance Liquid Chromatography เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์กลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ระเหย หรือกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ที่สามารถระเหยได้ปานกลาง โดยตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์จะต้องพิจารณาถึงความสามารถในการละลายของสารที่ต้องการวิเคราะห์กับตัวทำละลายอินทรีย์ผสมที่ใช้ก่อน เพื่อป้องกันการไม่ละลายเข้าด้วยกัน หรือการตกตะกอนของตัวทำละลายผสม และไม่ให้เกิดการอุดตันในระบบ รวมทั้งพิจารณาค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของตัวทำละลายอินทรีย์ด้วย (UV cut-off)⁽¹⁾

เทคนิคการแยกองค์ประกอบของสารผสมของเครื่อง HPLC อาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบของสารผสมบนเฟสคงที่ (Stationary phase) ซึ่งอยู่ในคอลัมน์ ภายใต้การพาของเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) คือตัวทำละลายอินทรีย์ผสม เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านเข้าสู่เครื่อง HPLC สารดังกล่าวจะถูกพาเข้าสู่คอลัมน์โดยตัวทำละลายอินทรีย์ผสม เพื่อให้เกิดการแยกสาร (Separation) โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารที่อยู่ภายในคอลัมน์ และความสามารถในการละลายของสารผสม

สีอิริโทรซิน ($C_{20}H_{14}I_2Na_2O_5$) ดังแสดงในภาพที่ 1 หรือ Food Red No.3 ตามการจัดกลุ่มสีของ US. FDA หรือ E 127 ตามการจัดกลุ่มสีของ European Food Safety Authority (EFSA) จัดอยู่ในกลุ่มของสีอินทรีย์สังเคราะห์ สามารถละลายได้ในน้ำและเอทานอล ไวต่อแสงและความร้อน มีเซตสีชมพูเชอร์รี่ถึงแดง⁽²⁾ ในปี ค.ศ. 1989 the EU Scientific Committee for Food (SCF) และ ปี ค.ศ. 1990 the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) ได้มีการประเมินและกำหนดค่า Acceptable Daily Intake (ADI) ของสีอิริโทรซิน เท่ากับ 0-0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน ต่อมาปี ค.ศ. 2011 SCF และปี ค.ศ. 2018 JECFA มีการทบทวนค่า ADI โดยยังคงค่าเดิม⁽³⁾



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสีอิริโทรซิน

สีอิริโทรซินมีค่า ADI ต่ำ แม้ได้รับปริมาณน้อยอาจส่งผลต่อสุขภาพได้ มีรายงานถึงพิษภัยของสีชนิดนี้เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลของสีอิริโทรซินมีไอโอดีนเป็นส่วนประกอบอยู่ร้อยละ 57.6 โดยอาจมีผลกระตุ้นการทำงานของต่อมไทรอยด์ ซึ่งอาจส่งผลทำให้เกิดเนื้องอกที่ต่อมไทรอยด์ได้ หรือทำให้มีอาการไวต่อแสง (phototoxicity) อย่างไรก็ตามจากรายงานความคิดเห็นทางวิทยาศาสตร์ของ EFSA ซึ่งเป็นหน่วยงานของประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป ได้สรุปว่า สีอิริโทรซินถูกดูดซึมเข้าร่างกายได้เล็กน้อย ไม่มีการสะสม และไอโอดีนในสีอิริโทรซินไม่ได้ถูกสลายออกมา ซึ่งสีชนิดนี้นิยมใช้ในอาหารประเภทเชอร์รี่เชื่อม ลูกอม หมากฝรั่ง เป็นต้น สำหรับประเทศไทยอนุญาตให้ใช้ในอาหารไม่กี่ประเภท โดยชนิดอาหารและปริมาณที่ใช้ต้องเป็นไปตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 418) พ.ศ. 2563 ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่องกำหนดหลักเกณฑ์ เงื่อนไข วิธีการใช้ และอัตราส่วนของวัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 2)⁽³⁾ ซึ่งอนุญาตให้ใช้ในหมวดอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยมีเงื่อนไขดังนี้

ตารางที่ 1 หลักเกณฑ์ เงื่อนไข วิธีการใช้ และอัตราส่วนของวัตถุเจือปนอาหารซึ่งอนุญาตให้ใช้ในหมวดอาหาร

หมวดอาหาร	ปริมาณสูงสุดที่อนุญาต (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	เงื่อนไข*
แยม เยลลี่ และมาร์มาเลด	200	TH61
ผลไม้แช่อิ่ม เชื่อม หรือเคลือบด้วยน้ำตาล	200	54
ผัก สาคู ห่วยทะเล ดอก	30	
หมากฝรั่ง	50	
ผลิตภัณฑ์ใช้เคลือบหรือแต่งหน้าขนมและซอสหวาน	100	
ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ทั้งชิ้นหรือตัดแต่ง และผ่านกรรมวิธี	30	4, 16, XS96, XS97
ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บดและผ่านกรรมวิธี	30	4, 290, XS88

เงื่อนไข*

- 4 = ใช้เฉพาะประทับตรา หรือทำเครื่องหมายบนผลิตภัณฑ์เท่านั้น
- 16 = ใช้สำหรับเคลือบหรือตกแต่งผิวในผักและผลไม้ เนื้อสัตว์หรือปลา
- 54 = ใช้สำหรับเชอร์รี่ค็อกเทลและเชอร์รี่ตกแต่งขนมเท่านั้น
- TH61 = สำหรับผลิตภัณฑ์ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 213) พ.ศ. 2543 เรื่อง แยม เยลลี่ และมาร์มาเลด ในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท เท่านั้น
- XS88 = ยกเว้นผลิตภัณฑ์ตาม Standard for Corned Beef (CODEX STAN 88-1981)
- XS96 = ยกเว้นผลิตภัณฑ์ตาม Standard for Cooked Cured Ham (CODEX STAN 96-1981)
- XS97 = ยกเว้นผลิตภัณฑ์ตาม Standard for Cooked Cured Pork Shoulder (CODEX STAN 97-1981)

ในอดีตสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร วิเคราะห์หาปริมาณสีอิริโทรซินในอาหารโดยใช้การสกัดตัวอย่างด้วย 1-butanol แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณโดยเครื่อง spectrophotometer^(4, 5) ซึ่งวิธีดังกล่าวเหมาะกับตัวอย่างอาหารในกลุ่มที่ละลายน้ำ โดยอาหารกลุ่มอื่นๆ จะไม่สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณได้ และแม้ว่าเทคนิค spectrophotometer จะสามารถหาสีอิริโทรซินในตัวอย่างที่ละลายน้ำ แต่ถ้าในตัวอย่างอาหารชนิดนั้นมีการใช้สีอิริโทรซินร่วมกับสีอินทรีย์สังเคราะห์อื่น จะต้องทำการแยกแต่ละสีที่ผสมอยู่ในตัวอย่างให้เป็นสีเดี่ยวด้วยเทคนิค paper chromatography ก่อน แล้วจึงนำแถบสีที่แยกได้มาตรวจวัดปริมาณซ้ำด้วยเครื่อง spectrophotometer ทำให้เพิ่มระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ และใช้ทรัพยากรของห้องปฏิบัติการมากขึ้นไปอีก ดังนั้นทางห้องปฏิบัติการวัตถุเจือปนอาหารจึงพัฒนาและปรับปรุงวิธีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสีอิริโทรซิน ด้วยเครื่อง HPLC⁽⁶⁾ ทำให้ลดระยะเวลาวิเคราะห์ ลดความยุ่งยากและซับซ้อนในกรณีที่ตัวอย่างมีสีอิริโทรซินร่วมกับสีอินทรีย์สังเคราะห์อื่น จากนั้นจึงทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ได้วิธีที่ถูกต้อง แม่นยำ สามารถวิเคราะห์ปริมาณสีอิริโทรซินในหลายกลุ่มอาหารที่เป็นตัวแทนครอบคลุมอาหารทุกประเภทได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐาน : สีอิริโทรซิน (Sigma, USA) ความบริสุทธิ์ 92.4%

สารเคมี HPLC grade ได้แก่ acetonitrile (RCI-Labscan, Thailand), methanol (RCI-Labscan, Thailand) และ iso-propanol (RCI-Labscan, Thailand)

สารเคมี AR grade ได้แก่ ethanol 95% (RCI-Labscan, Thailand), petroleum ether (RCI-Labscan, Thailand), ammonia solution $\geq 25\%$ (Merck, Germany), diethyl ether (Merck, Germany), glacial acetic acid (GAA) $\geq 96\%$ (Merck, Germany), acetone (RCI-Labscan, Thailand), polyamide (Fluka, USA), sand (acid wash) (Sigma-Aldrich, USA), methanol (RCI-Labscan, Thailand), tetrabutyl ammonium hydroxide 30 hydrate (TBAH) purity $\geq 98.0\%$ (Sigma-aldrich, USA), buffer solution pH 5.0 เตรียมโดยเติม TBAH 8.00 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย iso-propanol 100 มิลลิลิตร และเติมน้ำจนครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 5.0 ด้วย GAA, eluting solution (methanol : น้ำ : ammonia solution อัตราส่วน 90 : 5 : 5), ethanolic solution (ethanol 95% : ammonia solution อัตราส่วน 95 : 5)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานสีอิริโทรซิน

ซึ่งสารมาตรฐานสีอิริโทรซิน 0.1000 กรัม ละลายด้วย 50% ethanol เล็กน้อย ปรับปริมาตรด้วยน้ำในขวดวัดปริมาตรสีชา ขนาด 100 มิลลิลิตร ได้สารละลายมาตรฐาน 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องระเหยสุญญากาศ, เครื่องชั่งละเอียด 3 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง, pH meter, ultrasonic bath, คอลัมน์แก้ว ขนาด $\varnothing 1.0 \times 25$ cm, กระดาษกรองชนิด cellulose acetate ที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร ขนาด 47 มิลลิเมตร, syringe filter (Cellulose acetate, 0.45 μm , dia. 13 mm), ชุดกรองสารละลาย และ ชุดกรองตัวอย่าง เครื่อง HPLC (WATERS®), Column : Hypersil BDS C₁₈ (5 μm , 250 $\times$ 4.6 mm), Detector : UV/VIS

การเตรียมตัวอย่าง

แบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างที่ละลายน้ำได้ : ใช้น้ำอัดก๊าซ (sparkling water) ที่ผ่านการทดสอบแล้วไม่พบสีอินทรีย์สังเคราะห์ เป็นตัวแทน sample blank, กลุ่มตัวอย่างที่ไม่ละลายน้ำ : ใช้น้ำมันดอก โดยปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องบดปั่นที่ผ่านการทดสอบแล้วไม่พบสีอินทรีย์สังเคราะห์ เป็นตัวแทน sample blank, กลุ่มตัวอย่างที่มีไขมันสูง : ใช้อูฐขึ้นหมู โดยปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น ที่ผ่านการทดสอบแล้วไม่พบสีอินทรีย์สังเคราะห์ เป็นตัวแทน sample blank

วิธีวิเคราะห์^(7, 8)

ตัวอย่างที่ละลายน้ำได้ : น้ำอัดก๊าซ ชั่งตัวอย่างปริมาณ 10 กรัม ในปิเกอร์ เติมน้ำ 50 มิลลิลิตร ปรับให้เป็นกรดด้วย glacial acetic acid นำไปผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ polyamide ล้างคอลัมน์ด้วย น้ำ และ acetone จากนั้น elute สีอิริโทรซินออกด้วย eluting solution นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศให้เหลือปริมาตรประมาณ 2 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น กรองด้วย syringe filter ชนิด Cellulose Acetate ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ตัวอย่างที่ไม่ละลายน้ำ : ใช้น้ำมันดอก ชั่งตัวอย่างปริมาณ 10 กรัม ในปิเกอร์เติม ethanol-ammonia solution (95 : 5) และน้ำ 150 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน กรองตัวอย่างผ่านสำลีและทำการสกัดตัวอย่างซ้ำจนกว่าสีจากตัวอย่างจะออกหมดด้วยสารผสมเดิม นำตัวอย่างมาระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ เพื่อไล่ ammonia ปรับให้เป็นกรดด้วย glacial acetic acid นำไปผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ polyamide ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำ และ acetone จากนั้น elute สีอิริโทรซินออกด้วย eluting solution นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ให้เหลือปริมาตรประมาณ 2 มิลลิลิตร

ถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น กรองด้วย syringe filter ชนิด Cellulose Acetate ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ตัวอย่างที่มีไขมันสูง: ลูกชิ้นหมู ซึ่งตัวอย่างปริมาณ 10 กรัม ในบีกเกอร์ สกัดไขมันออกด้วย petroleum ether : diethyl ether (อัตราส่วน 1:1) 2-3 ครั้ง แล้วเททิ้ง นำส่วนของตัวอย่างมาเติม ethanol-ammonia solution (95:5) 150 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน กรองตัวอย่างผ่านสำลีและทำการสกัดตัวอย่างซ้ำจนกว่าสีจากตัวอย่างจะออกหมดด้วยสารผสมเดิม นำตัวอย่างมาระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ เพื่อไล่ ammonia ปรับให้เป็นกรดด้วย glacial acetic acid นำไปผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ polyamide ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำ และ acetone จากนั้น elute สีอีริโทรซินออกด้วย eluting solution นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ให้เหลือปริมาตรประมาณ 2 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น กรองด้วย syringe filter ชนิด Cellulose Acetate ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

สภาวะของระบบโครมาโทกราฟี (HPLC)

Mobile phase : 0.01 M TBAH (pH 5.0) : acetonitrile = 45 : 55, Flow rate : 1 ml/min, Detector: UV/VIS ($\lambda = 537$ nm, Temperature 30°C), Injection volume : 20 μl

การตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (System suitability)

ฉีดสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 ซ้ำ คำนวณ %RSD ของ peak area และ retention time (RT) โดยเกณฑ์การยอมรับคือ %RSD (peak area) ≤ 2.5 และ %RSD (RT) ≤ 1

การคำนวณ : ปริมาณสีอีริโทรซิน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) = $\frac{C \times V \times D}{W}$

โดย C = ความเข้มข้นของสีอีริโทรซิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากกราฟมาตรฐาน

V = ปริมาตรที่ปรับ (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

D = dilution factor

การทดสอบความถูกต้องของวิธี

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)

เตรียมสารละลาย mixed standard solution โดยใช้สีอินทรีย์สังเคราะห์ในกลุ่มสีแดง-ชมพู ได้แก่ สีแอลดูรา เรด เอซี, สีปองโซ 4 อาร์ ร่วมกับสีอีริโทรซิน ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย HPLC ตรวจสอบการแยกของสีอีริโทรซินออกจากสีอื่น โดยสีทั้งหมดต้องมีค่า retention time แยกจากกันชัดเจน ซึ่งสีดังกล่าวเป็นสีประเภทสีแดง-ชมพูที่อนุญาตและมักจะถูกใช้ทดแทนสีอีริโทรซินในตัวอย่างอาหาร

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and working range)

เตรียมสารมาตรฐานสีอีริโทรซินที่มีความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ กรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค ทดสอบความเป็นเส้นตรงโดยสร้าง regression line คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ซึ่งต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.9995 และทำ residual plots เพื่อยืนยันความเป็นเส้นตรง

การทดสอบ matrix effect

เตรียม spiked matrix blank (ทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่าง) ให้มีความเข้มข้นที่ระดับต่าง ๆ เหมือนกับสารละลายมาตรฐานที่ทำกราฟมาตรฐาน ความเข้มข้นละ 3 ขั้ว วิเคราะห์ด้วย HPLC และคำนวณค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน ประเมิน matrix effect โดยการ plot ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป matrix blank (แกน x) กับความเข้มข้นของ spiked matrix blank ที่อ่านได้จากกราฟ (แกน y) ทดสอบความเป็นเส้นตรงและทดสอบว่าช่วงของความเชื่อมั่น (confidence interval : CI) ของ slope กลุ่ม 1 หรือไม่ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถ้ากลุ่ม แสดงว่าไม่มี matrix effect ซึ่ง CI ของ slope (b) คำนวณได้จากสมการที่ 1

$$CI_{\text{slope}} = b \pm t(n-2)S_b \quad \dots\dots\dots \text{สมการที่ 1}$$

b = slope

S_b = standard deviation ของ slope คำนวณได้จากสมการที่ 2

t = ค่าที่ได้จากตาราง t (two-tailed ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ (n-2) degree of freedom)

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad \dots\dots\dots \text{สมการที่ 2}$$

$S_{y/x}$ = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ y-intercept คำนวณได้จากสมการที่ 3

x_i = ค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

$\bar{x}$ = ค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฉลี่ย

$$S_{y/z} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{(n-2)}} \quad \dots\dots\dots \text{สมการที่ 3}$$

y_i = ค่าสัญญาณที่อ่านได้จากเครื่องมือวัด

$\hat{y}$ = ค่าสัญญาณที่ควรเป็น คำนวณโดยใช้ method of least square (ได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน)

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitative , LOQ)

วิเคราะห์ sample blank (ทั้ง 3 กลุ่ม) โดยเติมสารมาตรฐานสีอิริโทรีนที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกรัม จำนวน 10 ขั้ว คำนวณค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (s) แล้วนำมาประมาณค่า LOD และ LOQ จากสมการ LOD = 3SD และ LOQ = 10SD

การยืนยันค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

เติมสารมาตรฐานสีอิริโทรีนที่ระดับความเข้มข้น 0.20, 0.20 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อกรัม ในตัวอย่าง sample blank กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 ตามลำดับ จำนวน 10 ขั้ว คำนวณค่าร้อยละของการกลับคืน (%recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เกณฑ์การยอมรับความแม่นยำ : recovery 80-110% และความเที่ยงตรง : Horwitz's equation

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยงตรง (Precision)

ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงตรงของวิธีโดยการวิเคราะห์ตัวอย่าง sample blank ที่เติมสารมาตรฐานสีอิริโทรีน ที่ 3 ระดับความเข้มข้น ซึ่งเป็นจุดต่ำสุด จุดกึ่งกลาง และจุดสูงสุดของช่วงใช้งาน วิเคราะห์ระดับละไม่น้อยกว่า

7 ชั่วโมง คำนวณหาค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) และ ค่าร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation, %RSD_r) ที่แต่ละระดับความเข้มข้น โดยเกณฑ์ยอมรับความแม่นยำ : recovery 80–110% และ เกณฑ์ยอมรับความเที่ยงตรง : Horwitz's equation

กลุ่มที่ 1: ตัวอย่างที่ละลายน้ำได้ และ กลุ่มที่ 2 : ตัวอย่างที่ไม่ละลายน้ำ วิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 0.20 (LOQ), 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

กลุ่มที่ 3: ตัวอย่างที่มีไขมันสูง วิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 (LOQ), 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

การทดสอบความเที่ยงตรง Intermediate precision (%RSD_i) โดยวิเคราะห์ control sample ต่างวัน วันละ 2 ชั่วโมง จำนวน 14 วัน ในตัวอย่างกลุ่มที่ 2 : หน่อไม้ดอง และกลุ่มที่ 3 : ลูกชิ้นหมู ซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มอาหาร ที่อนุญาตให้ใช้สีอีโรซินได้

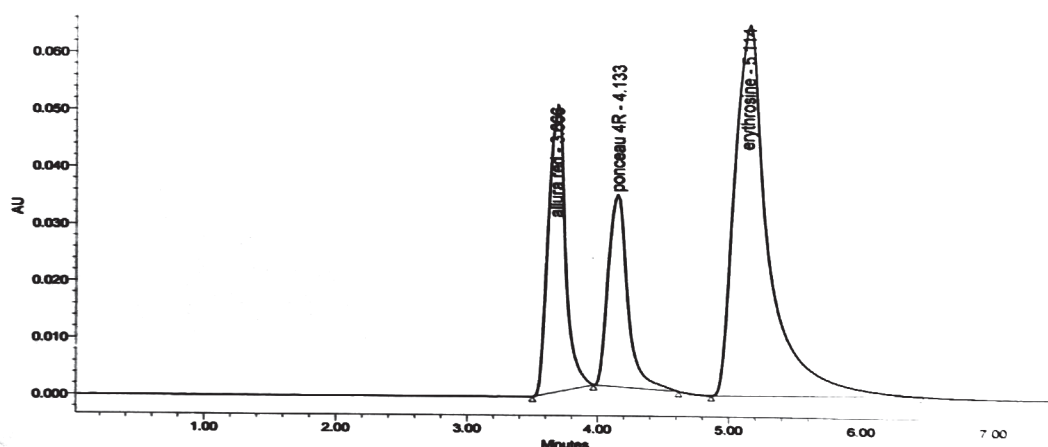
การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (Measurement of uncertainty)

เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้ถูกนำไปใช้มีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น และเป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ โดยคำนึงถึงแหล่งความไม่แน่นอนทุกแหล่ง และ เมื่อรวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมดแล้ว คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95%⁽⁸⁾

ผล

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี

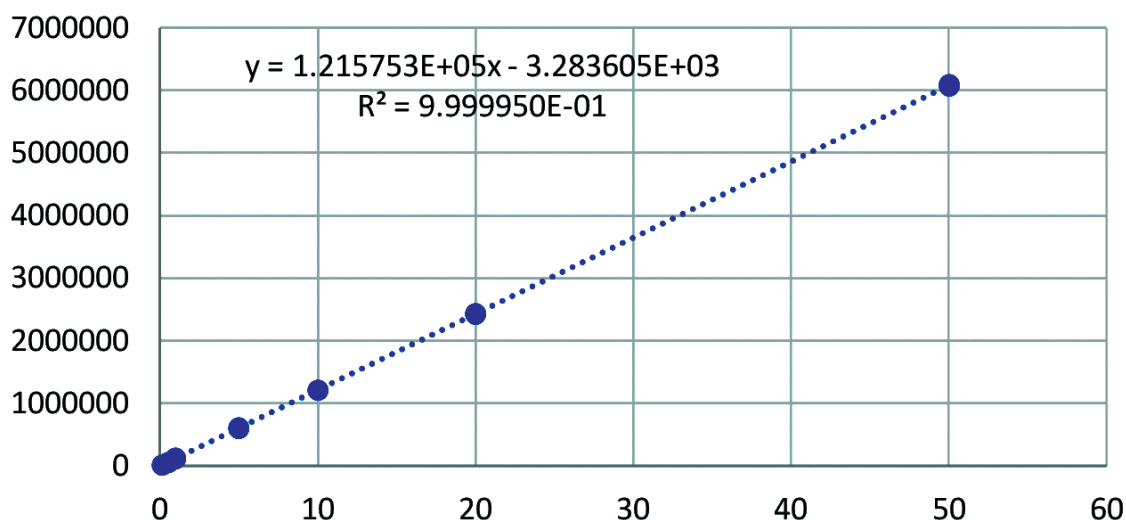
จากการฉีด mixed standard solution พบว่าสามารถแยกสีอีโรซินออกจากสีแอลลูรา เรด เอซี และ สีปองโซ 4 อาร์ ได้โดยไม่มีการรบกวน และมีค่า retention time ของสีแอลลูรา เรด เอซี, สีปองโซ 4 อาร์ และ สีอีโรซิน เท่ากับ 3.666, 4.133 และ 5.114 นาที ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน mix standard solution

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and working range)

ผลการฉีดสารละลายมาตรฐานสีอีโรซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0.1 ถึง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับความเข้มข้นละ 3 ชั่วโมง พบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค ซึ่งคำนวณความเข้มข้น และพื้นที่ใต้พีค ได้ลักษณะของกราฟเป็นเส้นตรงตลอดช่วงที่ทดสอบ และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.999995 และยืนยันความเป็นเส้นตรงด้วย Residual plot ดังแสดงในภาพที่ 3

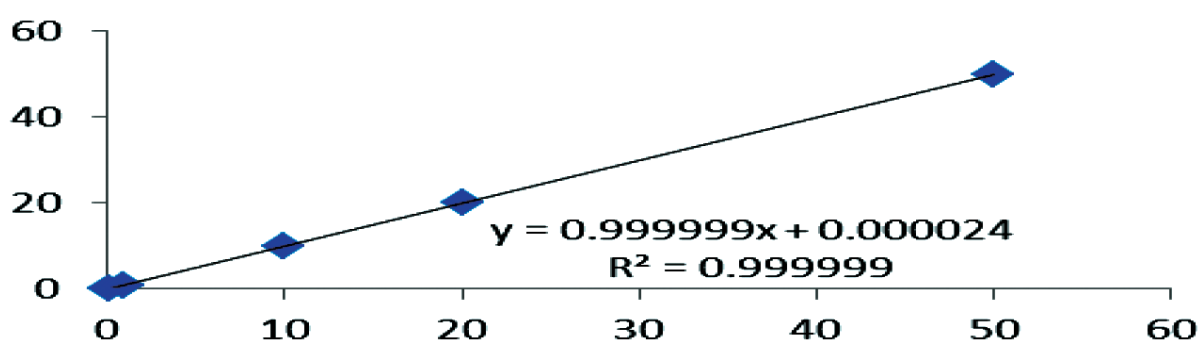


ภาพที่ 3 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสีอิรีโทรซิน

การทดสอบ Matrix effect

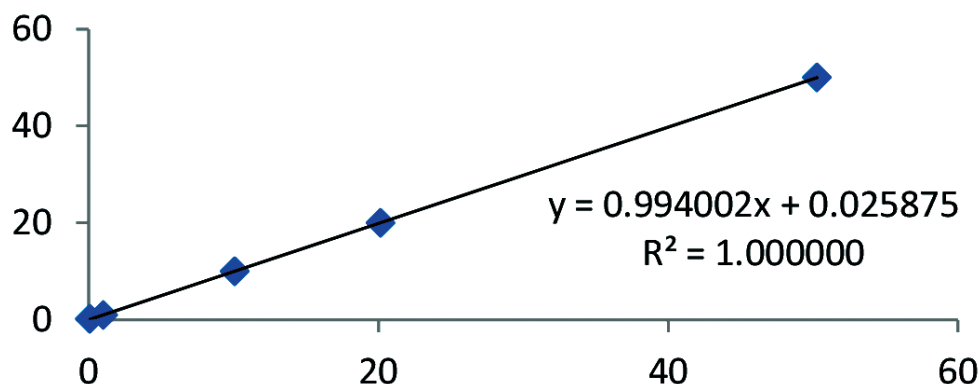
พบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป matrix blank (แกน x) กับความเข้มข้นของ spiked matrix blank ที่อ่านได้จากกราฟ (แกน y) เป็นเส้นตรงตลอดช่วงที่ทดสอบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.999999, 1.000000 และ 0.999999 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4-6

Matrix effect สี Erythrosine กลุ่มที่ 1



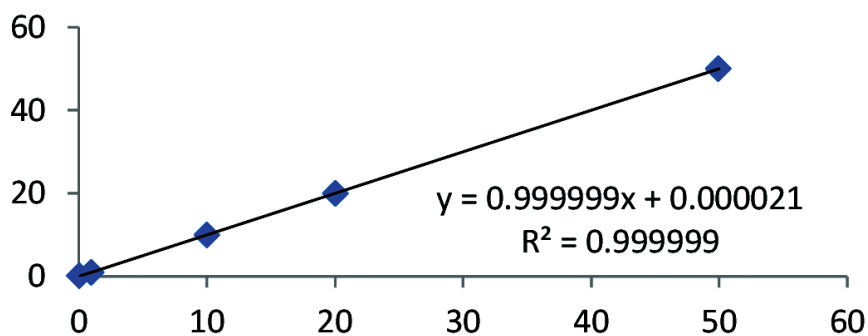
ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานสีอิรีโทรซินกับความเข้มข้นของ spiked matrix blank ของตัวอย่างที่ละลายน้ำได้: น้ำอัดก๊ากซ์

การทดสอบช่วงของความเชื่อมั่น (confidential interval: CI) ของ slope พบว่า slope มีช่วงของความเชื่อมั่นตั้งแต่ 0.9980 ถึง 1.0018 สรุปได้ว่า ไม่มี matrix effect

Matrix effect สี Erythrosine กลุ่มที่ 2

ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานสีอีริโทรซินกับความเข้มข้นของ spiked matrix blank ของตัวอย่างที่ไม่ละลายน้ำ: หน่อไม้ดอง

การทดสอบช่วงของความเชื่อมั่น (confidential interval: CI) ของ slope พบว่า slope มีช่วงของความเชื่อมั่นตั้งแต่ 0.9710 ถึง 1.0166 สรุปได้ว่า ไม่มี matrix effect

Matrix effect สี Erythrosine กลุ่มที่ 3

ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานสีอีริโทรซินกับความเข้มข้นของ spiked matrix blank ของตัวอย่างที่มีไขมันสูง: ลูกชิ้นหมู

การทดสอบช่วงของความเชื่อมั่น (confidential interval: CI) ของ slope พบว่า slope มีช่วงของความเชื่อมั่นตั้งแต่ 0.9980 ถึง 1.0018 สรุปได้ว่า ไม่มี matrix effect

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ

ผลวิเคราะห์ spiked sample blank ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (s) ในตัวอย่างกลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 ได้เท่ากับ 0.016, 0.018 และ 0.024 ตามลำดับ คำนวณค่า LOD ได้เท่ากับ 0.049, 0.055 และ 0.071 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และค่า LOQ ได้เท่ากับ 0.164, 0.183 และ 0.237 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

การยืนยันค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

ผลการวิเคราะห์ sample blank ที่มีการเติมสารมาตรฐานสีอิรีโทซินในตัวอย่าง กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.20, 0.20 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณค่าร้อยละของการกลับคืน (%recovery) อยู่ในช่วง 94.50–97.50%, 88.00–101.00% และ 81.60–84.40% และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.991, 4.325 และ 1.078 ตามลำดับ

การทดสอบความแม่นยำ และความเที่ยงตรง

ผลการวิเคราะห์ sample blank ที่มีการเติมสารมาตรฐานสีอิรีโทซินในตัวอย่าง กลุ่มที่ 1 คือ 0.2, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม กลุ่มที่ 2 คือ 0.2, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มที่ 3 คือ 0.25, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ระดับละ 7 ซ้ำ โดยวิเคราะห์ในสภาวะ repeatability condition พบความแม่นยำที่ประเมินจาก %recovery ทั้ง 3 ระดับ กลุ่มที่ 1 คือ 94.50–97.50%, 94.77–99.46% และ 98.78–99.71% ตามลำดับ, กลุ่มที่ 2 คือ 88.00–101.50%, 93.04–96.33% และ 92.61–96.10% ตามลำดับ กลุ่มที่ 3 คือ 82.00–84.40%, 93.32–97.12% และ 90.07–98.16% ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ %recovery 80–110 และความเที่ยงตรง (%RSD_r) กลุ่มที่ 1 คือ 0.890, 1.457 และ 0.276 ตามลำดับ กลุ่มที่ 2 คือ 4.473, 1.012 และ 1.125 ตามลำดับ กลุ่มที่ 3 คือ 0.984, 1.223 และ 2.881 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2– 4

ตารางที่ 2 ค่า %recovery และ %RSD_r (ค่า LOQ) วิธีวิเคราะห์ปริมาณสีอิรีโทซินในกลุ่มอาหาร
กลุ่มที่ 1 : ตัวอย่างที่ละลายน้ำได้

ครั้งที่	กลุ่ม 1: น้ำอัดก๊าซ		
	ระดับความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)		
	0.2	25	50
1	94.50	94.77	99.24
2	96.00	99.01	98.78
3	97.00	98.92	99.17
4	96.00	98.95	99.55
5	97.50	98.88	99.42
6	96.50	99.42	99.71
7	95.50	99.46	99.60
%recovery เฉลี่ย	96.143	98.490	99.354
SD	0.856	1.435	0.274
%RSD _r	0.890	1.457	0.276
Predicted Horwitz	13.451	6.504	5.860
HORRAT	0.044	0.148	0.031

ตารางที่ 3 ค่า %recovery และ %RSD_r (ค่า LOQ) วิเคราะห์ปริมาณสีอีริโทรซินในกลุ่มอาหาร
กลุ่มที่ 2 : ตัวอย่างที่ไม่ละลายน้ำ

ครั้งที่	กลุ่ม 2: หน่อไม้ดอง		
	ระดับความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)		
	0.2	25	50
1	91.50	93.04	92.61
2	88.00	94.54	94.36
3	101.50	95.70	95.60
4	90.00	96.33	96.10
5	95.00	95.30	95.96
6	90.00	95.98	94.64
7	88.50	94.71	95.60
%recovery เฉลี่ย	92.071	95.083	94.982
SD	4.119	0.962	1.068
%RSD _r	4.473	1.012	1.125
Predicted Horwitz	13.451	6.504	5.860
HORRAT	0.333	0.156	0.192

ตารางที่ 4 ค่า %recovery และ %RSD_r (ค่า LOQ) วิเคราะห์ปริมาณสีอีริโทรซินในกลุ่มอาหาร
กลุ่มที่ 3 : ตัวอย่างที่มีไขมันสูง

ครั้งที่	กลุ่ม 3: ลูกชิ้นหมู		
	ระดับความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)		
	0.25	25	50
1	84.00	96.66	97.99
2	82.00	96.34	97.05
3	83.20	93.32	98.16
4	82.40	95.50	97.80
5	83.20	97.12	93.79
6	84.40	96.63	90.07
7	84.00	96.11	96.72
%recovery เฉลี่ย	83.314	95.956	95.940
SD	0.820	1.174	2.764
%RSD _r	0.984	1.223	2.881
Predicted Horwitz	13.007	6.504	5.860
HORRAT	0.076	0.188	0.492

ผลการทดสอบ Intermediate precision ($\%RSD_i$) โดยทำการวิเคราะห์ control sample (ในตัวอย่างหน่อไม้ดองและลูกชิ้นหมู ซึ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างที่อนุญาตให้ใช้สีอิรีโรซิน) ที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วันละ 2 ซ้ำ จำนวน 14 วัน นำมาวิเคราะห์ด้วยสถิติ one way anova⁽⁹⁾ พบมีค่าเท่ากับ 1.32 และ 1.16 ตามลำดับ และค่า HORRAT เท่ากับ 0.195 และ 0.171 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ HORRAT ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบ Intermediate precision ($\%RSD_i$): ทำการวิเคราะห์ต่างวัน วันละ 2 ซ้ำ

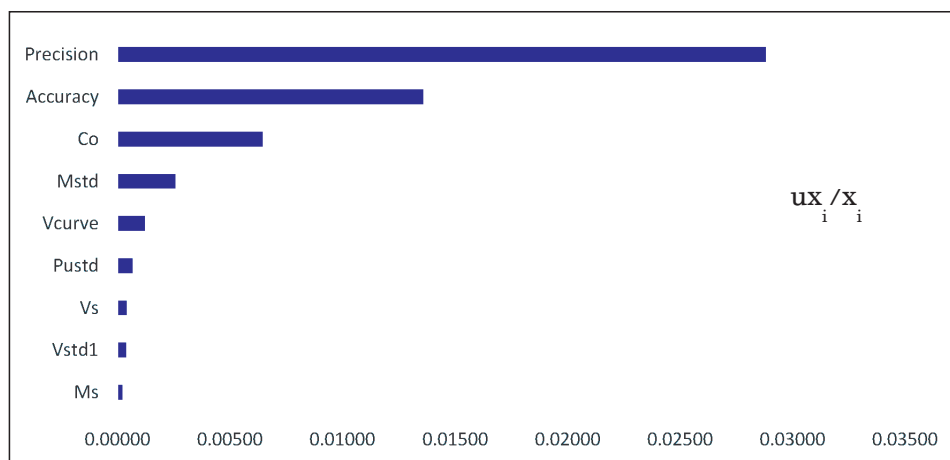
วันที่	ปริมาณสีอิรีโรซิน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)			
	กลุ่ม 2: หน่อไม้ดอง		กลุ่ม 3: ลูกชิ้นหมู	
	1	2	1	2
1	28.219	28.330	28.938	28.794
2	28.502	28.479	28.780	28.994
5	28.848	29.030	29.323	28.560
6	28.460	29.096	29.035	29.189
7	29.067	28.943	28.940	29.139
8	29.070	29.129	28.826	29.121
9	29.161	29.141	28.614	29.037
12	28.724	28.027	28.614	28.198
13	28.309	29.298	29.259	29.574
14	28.938	28.451	28.514	29.358
N =	20		20	
$\%RSD_i$	1.32		1.16	
Expected $\%RSD$	6.779		6.779	
HORRAT	0.195		0.171	
เกณฑ์ยอมรับ HORRAT ≤ 2	Pass		Pass	

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์

ประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์จากค่ารวมของผลกระทบทั้งหมดที่มีต่อผลทดสอบที่เป็นเชิงปริมาณ ได้แก่ ความไม่แน่นอนจากความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน การสอบเทียบเครื่องชั่ง เครื่องแก้วที่ใช้เตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ความเข้มข้นของสารที่อ่านได้จากเครื่อง HPLC การวิเคราะห์ซ้ำจากค่าร้อยละของการคืนกลับ ($\%recovery$) การทดสอบความถูกต้องของวิธี นำมาคำนวณค่าความไม่แน่นอนรวม (combined uncertainty, uc) ซึ่งผลการคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty, U) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า coverage factor (k) เท่ากับ 2 คือ 0.684 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังแสดงในตารางที่ 6 และแสดงแหล่งของความไม่แน่นอนในสัดส่วนที่ต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 7

ตารางที่ 6 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สีอีริโทรซินในอาหาร^(10, 11)

	Value, x_i	Unit	u_{x_i}	u_{x_i}/x_i	สัดส่วนแหล่ง ความไม่แน่นอน (%)
1. Standard					
Pu_{std}				0.00067312722	0.04
$-V_{Pu}$	50	ml	0.0190000000	0.00038000000	
$-P_{Pu}$	0.25	ml	0.0001389020	0.00055560800	0.01
$-V_{std1}$	50	ml	0.0190000000	0.00038000000	0.63
$-M_{std}$	0.0739	g	0.0001909190	0.00258347767	0.14
$-V_{curve}$				0.00121730728	
$-V_{std2}$	50	ml	0.0190000000	0.00038000000	
$-V_{std3-6}$	10	ml	0.0079881162	0.00079881162	
$-P_{std1,4-5}$	5	ml	0.0032198098	0.00064396196	
$-P_{std2}$	0.1	ml	0.0000375932	0.00037593220	
$-P_{std3}$	1	ml	0.0003785829	0.00037858288	
2. Sample					
$-M_s$	10	g	0.0021213200	0.00021213200	0.01
$-V_s$	10	ml	0.0041036569	0.00041036569	0.02
3. C_o read from curve	10.480	ug/ml	0.0676416310	0.00645435410	3.91
4. Precision (%RSD)	1	-	0.0288100000	0.02881000000	77.94
5. Recovery	100	%	1.3574898520	0.01357489852	17.30
relative combined standard uncertainty ($u_{c/c}$) = 0.03263310820 (c = 10.474 mg/kg)					
Standard uncertainty (u_c) = 0.03263310820 $\times$ 10.474 mg/kg = 0.34 mg/kg					
Expanded uncertainty (U), = 0.34 $\times$ 2 = 0.68 mg/kg					
k = 2 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%					
Reported value: 10.47 $\pm$ 0.68 mg/kg					



ภาพที่ 7 ค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งต่างๆ ในความไม่แน่นอนรวม

วิจารณ์

การวิเคราะห์ปริมาณสีอิริโทรซินในอาหาร แต่เดิมมีการวิเคราะห์ปริมาณโดยใช้เครื่อง spectrophotometer และสกัดสีในตัวอย่างโดยใช้ 1-Butanol ซึ่งในการวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น การใช้ 1-butanol ในการสกัดสีออกจากตัวอย่าง วิธีนี้ตัวอย่างจะต้องอยู่ในสถานะที่ละลายน้ำจึงจะสามารถสกัดสีอิริโทรซินออกจากตัวอย่างได้หมด แต่ตัวอย่างบางประเภท เช่น ผลไม้เชื่อมแห้ง หรือเนื้อสัตว์แปรรูป การจะละลายสีอิริโทรซินออกมา จำเป็นต้องมีสารละลายแอลกอฮอล์ผสมกับสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดึงสีดังกล่าวออกจากผลิตภัณฑ์ ซึ่งถ้าสารสกัดมีแอลกอฮอล์ผสมอยู่ เมื่อเติม 1-butanol เพื่อแยกส่วนของสี สารละลายจะรวมเป็นเนื้อเดียวกันไม่สามารถแยกกันได้ ประกอบกับ 1-butanol เป็นสารละลายที่มีกลิ่นฉุนและมีราคาค่อนข้างสูง และจุดอ่อนอีกประการหนึ่งของการวัดโดยเครื่อง spectrophotometer คือเหมาะกับการหาปริมาณสีที่เป็นสีเดียว ๆ เท่านั้น ในกรณีที่ตัวอย่างมีสีผสมมากกว่า 1 สี การตรวจวิเคราะห์สีอิริโทรซินจะมีความซับซ้อนและยุ่งยากมากขึ้น โดยจะต้องนำตัวอย่างดังกล่าวไปทำการแยกผ่าน paper chromatography จากนั้นทำการตัดเฉพาะส่วนที่เป็นสีอิริโทรซินมาละลายและระเหยแห้งในถ้วยระเหยจากนั้นจึงนำมาปรับปริมาตรในปริมาณที่แน่นอน ดังนั้นเพื่อลดปัญหาดังกล่าวไม่ว่าจะเป็นด้านการสกัดตัวอย่างสีอิริโทรซินออกจากตัวอย่าง ปัญหาด้านกลิ่นของสารละลาย ปัญหาเรื่องราคา หรือการสกัดสีออกจากตัวอย่างในกรณีที่ตัวอย่างนั้นมีสีสังเคราะห์ผสมอยู่มากกว่า 1 ตัว และมีสีอิริโทรซินร่วมด้วย สามารถทำการสกัดด้วยวิธีข้างต้นเพียงครั้งเดียวและนำมาฉีดกับเครื่อง HPLC ในอัตราส่วนของสีผสมที่อยู่ในตัวอย่างชนิดนั้น ได้มีการหาสภาวะที่เหมาะสมของ HPLC โดยปรับอัตราส่วนของ mobile phase เพื่อไม่ให้พีคของสีอิริโทรซินถูกรบกวนโดยสีอื่น จนได้อัตราส่วนที่เหมาะสม เนื่องจากสีอิริโทรซินมีความไวต่อแสงและความร้อน จึงปรับเปลี่ยนวิธีการโดยใช้วิธีการระเหยโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแทนการระเหยบนอ่างน้ำร้อน และใช้เครื่องแก้วสีชาหรือทำการป้องกันแสงโดยวิธีอื่น ๆ เช่น การห่อหุ้มภาชนะในการวิเคราะห์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ระหว่างขั้นตอนการวิเคราะห์ เพื่อป้องกันการสลายตัวของสีดังกล่าว

สีอิริโทรซินนิยมใช้ในอาหารประเภทเชอร์รี่เชื่อม ลูกอม หมากฝรั่ง เป็นต้น สำหรับประเทศไทยอนุญาตให้ใช้ในอาหารไม่กี่ประเภท ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 418) พ.ศ. 2563 ประกอบกับทางสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้ทำการเฝ้าระวังอาหารในกลุ่มที่ยังไม่อนุญาตให้ใช้สีอิริโทรซินโดยเก็บตัวอย่างส่งตรวจวิเคราะห์อย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะตัวอย่างในส่วนอายุเด็กกักกันจากการตรวจพบการใช้สีอิริโทรซินที่ผ่านมา และเมื่อได้วิธีที่เหมาะสมแล้วจึงดำเนินการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี โดยห้องปฏิบัติการเดียว⁽¹²⁾ ซึ่งได้ทำการทดสอบในตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ละลายน้ำได้ ตัวอย่างที่ไม่ละลายน้ำ และตัวอย่างที่มีไขมันสูง เพื่อให้เป็นตัวแทนครอบคลุมอาหารทุกชนิด และทดสอบพบว่าวิธีมีความจำเพาะเจาะจง ถูกต้อง แม่นยำ และความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.10–50.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) มากกว่า 0.9995 วิธีนี้ไม่มีผลกระทบจาก matrix effect และแต่ละกลุ่มอาหารมีค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ ค่า LOD เท่ากับ 0.06, 0.10 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ค่า LOQ เท่ากับ 0.20, 0.20 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ความแม่นยำและความเที่ยงตรงอยู่ในเกณฑ์โดย %recovery อยู่ในช่วง 80–110% และค่า HORRAT น้อยกว่า 2 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดเป็นเครื่องวัดระดับคุณภาพของผลการทดสอบ การแสดงค่าความไม่แน่นอนทำให้ค่าที่รายงานนั้นมีความครบถ้วนสมบูรณ์และน่าเชื่อถือ จากการประเมินความไม่แน่นอนของผลการทดสอบสีอิริโทรซินพบค่าความไม่แน่นอนขยายเท่ากับ 0.68 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระดับความเข้มข้น 10.47 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 คิดเป็น relative uncertainty = 6.5% ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวนี้สามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณสีอิริโทรซิน ครอบคลุมในทุกกลุ่มอาหารโดยมีความจำเพาะเจาะจง ถูกต้อง และแม่นยำ

สีอิริโทรซินจัดอยู่ในกลุ่มสีอินทรีย์สังเคราะห์ ซึ่งทางสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารได้ทำการทดสอบความชำนาญกับ FAPAS อย่างต่อเนื่อง แต่ในระยะเวลาหลายปีที่เข้าร่วมทำการทดสอบความชำนาญยังไม่พบว่ามี

การเติมสีอีริโทรซินลงในตัวอย่างที่ทำการทดสอบความชำนาญ ดังนั้นทางผู้วิเคราะห์จึงทำการทดสอบ blind sample ร่วมกับผู้วิเคราะห์คนอื่นอีก 2 คน รวมเป็น 3 คน และนำมาวิเคราะห์ด้วยสถิติ one way anova พบว่าค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และมีความถูกต้องมากกว่า 95%

อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ควรใช้ความระมัดระวัง เนื่องจากคอลัมน์มีขนาดอนุภาคเล็ก ประมาณ 5-10 ไมโครเมตร ดังนั้นเพื่อป้องกันการอุดตันในระบบ การเตรียม mobile phase หรือ สารละลายตัวอย่างที่จะฉีดเข้าเครื่อง HPLC จึงจำเป็นต้องกรองด้วย filter ที่มีขนาด 0.45 ไมโครเมตร นอกจากนี้ควรเลือกใช้สารเคมีที่เป็นเกรด HPLC เพื่อลดผลกระทบที่เกิดขึ้น และกรณีที่ใช้ degasser ด้วยก๊าซฮีเลียม ก๊าซที่ใช้ต้องมีความบริสุทธิ์ ไม่น้อยกว่า 99.999%

สรุป

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์สีอีริโทรซินในอาหารโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย HPLC แล้วนำไปทดสอบความถูกต้องของวิธีให้ครอบคลุมทั้งการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี การทดสอบความเป็นเส้นตรง รวมถึงการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงตรง โดยผลการทดสอบที่ได้ผ่านเกณฑ์ยอมรับทั้งหมด สรุปได้ว่าวิธีนี้มีความถูกต้อง แม่นยำ เฉพาะเจาะจง เหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจหาปริมาณสีอีริโทรซินในทุกกลุ่มอาหาร และการวิเคราะห์สีอีริโทรซินโดยวิธี HPLC ยังมีความสะดวก ช่วยลดขั้นตอนในการทำงาน ทำให้ลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ จึงมีความเหมาะสมและสามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการได้จริง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณนางสาวสุธาทิพย์ วิทย์ชัยวุฒิมงคล หัวหน้าฝ่ายวัตถุเจือปนอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ให้คำแนะนำปรึกษาในการศึกษาวิจัยและเขียนผลงานครั้งนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวัตถุเจือปนทุกท่านที่มีส่วนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. High performance liquid chromatography, HPLC. [ออนไลน์]. [สืบค้น 31 ส.ค. 2562]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : <http://www.env.eng.chula.ac.th/?q=content/high-performance-liquid-chromatography-hplc>.
2. Wikipedia, the free encyclopedia. Erythrosine. [online]. [cited 2019 Aug 31]; [4 screens]. Available from : URL : <https://en.wikipedia.org/wiki/Erythrosine>.
3. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 418 (พ.ศ. 2563) เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์ เงื่อนไข วิธีการใช้ และอัตราส่วนของวัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 2). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 237 ง (วันที่ 9 ตุลาคม 2563). หน้า 18.
4. ทศนีย์ จุฬามรกต. วิธีวิเคราะห์ปริมาณสีอีริโทรซินอย่างง่ายในขนมหวาน. ว กรรมวิทย์ พ 2534; 33(2) : 65-9.
5. Lehmann G, Collet P, Hahn HG, Asworth MRF. Rapid method for detection and identification of synthetic water-soluble coloring matters in foods and drugs. J Assoc Off Anal Chem 1970; 53(6) : 1182-9.
6. Lawrence JF, Lancaster FE, Conacher HB. Separation and detection of synthetic food colors by ion-pair high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 1981; 210(1) : 168-73.

7. Manuals of food quality control 7. Food analysis : general techniques, additives, contaminants and composition. Rome, Italy : Food and Agriculture Organization (FAO); 1986. p. 76-79, 91-92.
8. Department of Medical Sciences and National Bureau of Agriculture Commodity and Food Standards. Compendium of methods for food analysis. Bangkok, Thailand : DMSc. & AFCS; 2003. p.1-55.
9. Magnusson B, Örnemark U, editors. Eurachem guide : the fitness for purpose of analytical methods - a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. Torino : Eurachem; 2014.
10. Ellison SLR, Williams A. EURACHEM/CITAC guide : quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. Teddington, UK : EURACHEM/CITAC; 2012.
11. สุวรรณจารุนุช และคณะ. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550.
12. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.

Method Validation for Determination of Erythrosine in Food by HPLC Technique

Janpen Towiyanon and Suthatip Vitchaivutivong

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

ABSTRACT Erythrosine is one of organic synthetic color, sensitive to light and heat. It is food additive according to the Notification of Ministry of Public Health (No.418) B.E. 2563 issued by virtue of the Food Act B.E.2522 Re: prescribing the principle, conditions, methods and proportion of food additives (No.2). This study developed and improved erythrosine determination in food from 1-butanol extraction and quantified by spectrophotometer which only suitable for water soluble food. We changed the extraction process for 3 groups of food (water soluble food, non-water soluble food and fatty food) then quantified by HPLC. The method proved to be specific, accurate, precise and linearity and range was 0.10 – 50 mg/kg with coefficient of determination (R^2) greater than 0.9995. Validated parameters of each food groups were shown as following: limit of detection (LOD) were 0.06, 0.10 and 0.10 mg/kg respectively, while limit of quantification (LOQ) were 0.20, 0.20 and 0.25 mg/kg respectively. Precision expressed as relative standard deviation ($\%RSD_r$) were within 1.5%, 4.5% and 2.9% respectively. Accuracy expressed as %recovery ranged from 96.1–99.4, 92.1–95.1 and 83.3–96.0 respectively. The method suitable for erythrosine analysis in all food groups which proved to be specific, accurate and precise.

Keywords: Erythrosine, Food, HPLC Technique

การทวนสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบความแรง ผลิตภัณฑ์ Factor VIII ด้วยวิธี Chromogenic Assay

โสมมริสา พวงพรศรี จูฑาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์ และไพศาล พังจุนนท์
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ Factor VIII เป็นไกลโคโปรตีนที่สำคัญในกลไกการแข็งตัวของเลือด ทำหน้าที่เป็น cofactor กระตุ้น Factor IX ให้เป็นรูปแอคทีฟซึ่งสามารถกระตุ้นให้ Factor X อยู่ในรูปแอคทีฟแล้วทำให้เริ่มเกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือด ผู้วิจัยได้ทำการทวนสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII ด้วยวิธี Chromogenic assay ซึ่งเป็นวิธีตามมาตรฐานของตำรายา European Pharmacopeia 10.0 กำหนด ผลทดสอบความเป็นเส้นตรงได้ช่วงการวิเคราะห์ที่เหมาะสมของวิธี คือ 0.000625 – 0.005 IU/มิลลิลิตร การทดสอบความแม่นยำ มีค่า %recovery Geomean อยู่ระหว่าง 84.48–109.35% ผลวิเคราะห์ความเที่ยงทั้งการทดสอบซ้ำในวันเดียวและต่างวัน รวมทั้งผลการทดสอบโดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ให้ผลการทดสอบมีค่าร้อยละความแปรปรวน (%CV) เท่ากับ 11.57, 10.84 และ 7.74 ตามลำดับ และจากการศึกษาความจำเพาะของวิธี โดยทดสอบกับผลิตภัณฑ์พลาสมาชนิดอื่น พบว่าวิธีมีความจำเพาะต่อการทดสอบ Factor VIII นอกจากนี้ได้นำวิธีที่ผ่านการทวนสอบมาทดสอบกับตัวอย่างจริง จำนวน 2 ผลิตภัณฑ์ คือ ผลิตภัณฑ์ A จำนวน 11 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์ B จำนวน 6 ตัวอย่าง พบว่า 2 ผลิตภัณฑ์ มีค่าความแรงผ่านเกณฑ์มาตรฐานยุโรป โดยผลเปรียบเทียบค่าความแรงระหว่างวิธีที่ทวนสอบโดยผู้วิจัยและบริษัทผู้ผลิตพบมีความแตกต่างจากผลิตภัณฑ์ A อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจเกิดจากบริษัทผู้ผลิตใช้วิธีทดสอบและสารอ้างอิงที่แตกต่างจากผู้วิจัย ซึ่งความต่างดังกล่าวไม่พบความแตกต่างกับค่าความแรงของผลิตภัณฑ์ B จากผลการทวนสอบแสดงว่า วิธีทดสอบความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII โดยหลักการ Chromogenic assay ด้วยวิธี microplate มีความเหมาะสม ใช้ได้จริง สามารถนำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการของสถาบันชีววัตถุต่อไป

คำสำคัญ: Factor VIII, วิธีโครโมเจนิก, การทวนสอบวิธี

Corresponding author E-mail: soammarisa.p@dmsc.mail.go.th

Received: 25 March 2021

Revised: 18 June 2021

Accepted: 14 July 2021

บทนำ

โรคฮีโมฟีเลีย คือโรคเลือดออกไหลไม่หยุดหรือเลือดออกง่ายหยุดยาก เป็นโรคทางพันธุกรรมจากความผิดปกติบนโครโมโซมเอกซ์ โรคฮีโมฟีเลีย เอ เกิดจากขาดปัจจัยการแข็งตัวของเลือด Factor VIII อุบัติการณ์ของโรคในประเทศไทยเท่ากับ 1 ต่อ 13,000 – 20,000 ของประชากร อาการของโรคจะมีเลือดออกง่าย โดยอาการจะเป็นๆ หายๆ มาตั้งแต่เด็ก รวมถึง อาการฟกช้ำ เลือดออกในกล้ามเนื้อและข้อต่อ อาการเลือดออกที่คงอยู่นานหลังจากการบาดเจ็บ เล็กน้อยหรือการผ่าตัด และอาจรุนแรงหากมีเลือดออกในอวัยวะที่สำคัญ เช่น ที่สมอง การวินิจฉัยโดยสังเกตจากอาการ การเจาะเลือดตรวจระดับ Factor VIII และการตรวจชิ้นเนื้อหรือการเจาะน้ำคร่ำในระหว่างตั้งครรภ์ โรคฮีโมฟีเลียไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ แต่การดูแลตนเองอย่างดี ทำให้ผู้ป่วยมีสุขภาพดีและมีอายุที่ยืนยาวขึ้น การรักษาผู้ป่วยทำได้โดยให้ Factor VIII ร่วมกับการรักษาตามอาการ ปริมาณยาที่ให้ผู้ป่วยกำหนดตามความรุนแรงของโรคฮีโมฟีเลีย ซึ่งคำนวณจากปริมาณ Factor VIII ที่ระบุบนขวดยา^(1, 2)

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์ Factor VIII ที่ใช้ในประเทศมีทั้งชนิดนำเข้าและผลิตในประเทศ เป็นทั้งชนิดที่ผลิตจากพลาสมามนุษย์และที่ผลิตด้วยเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ ในกระบวนการควบคุมกำกับชีววัตถุของประเทศ ผลิตภัณฑ์ชีววัตถุทุกชนิดต้องผ่านการทดสอบคุณภาพทางกายภาพ เคมี และความแรง เพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนและการขอการรับรองรุ่นการผลิต เพื่อความปลอดภัยของประชาชนในประเทศ

วิธีตรวจความแรง Factor VIII แบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ 1) one-stage assay มีหลักการคือ Factor VIII กระตุ้นปฏิกิริยาทำให้เกิด Factor IX, X ในรูป active form ซึ่งในสภาวะที่มี calcium ions และ phospholipid จะไปทำให้ prothrombin เปลี่ยนเป็น thrombin การหาปริมาณ Factor VIII จะบันทึกเวลาที่เกิดตะกอน (ปฏิกิริยา APTT หรือ activated partial thromboplastin time) เทียบกับค่ามาตรฐาน 2) Chromogenic assay มีหลักการคือ Factor VIII ที่ทำหน้าที่เป็น co-factor และทำให้เกิด Factor X ในรูป active form เช่นเดียวกันหลักการ one-stage assay โดย Factor X นี้สามารถนิวทรัลไลซ์ substrate เปลี่ยนเป็นสารมีสีชื่อ p-nitroaniline ซึ่งสามารถวัดค่าดูดกลืนแสงได้ที่ 405–490 นาโนเมตร โดยปริมาณ Factor VIII จะแปรผันตรงกับค่าดูดกลืนแสง⁽³⁾ ซึ่งจากผลการศึกษาของ Moser KA และ Adcock Funk DM ในปี 2014 แสดงให้เห็นว่า วิธี Chromogenic assay มีความแม่นยำและความแปรปรวนน้อยกว่า และระบุว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหาปริมาณ Factor VIII ทั้งในตัวอย่างผู้ป่วยและในผลิตภัณฑ์ Factor VIII ด้วย⁽³⁾ นอกจากนี้ตามข้อกำหนดมาตรฐานตำรายาสากล European Pharmacopeia 10.0 ได้แนะนำ วิธี Chromogenic assay สำหรับทดสอบเพื่อระบุค่าความแรงที่มีหน่วยเป็น IU (International Unit)⁽⁴⁾ ของผลิตภัณฑ์

ชุดน้ำยาทดสอบ Chromogenic assay ที่มีจำหน่ายทั่วโลกเป็นชนิดที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยเท่านั้น⁽⁵⁾ และสถาบันฯ ยังไม่มีวิธีทดสอบความแรง Factor VIII ดังนั้นการนำวิธีมาใช้ในห้องปฏิบัติการจึงต้องมีการทวนสอบก่อน

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อทวนสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII โดยหลักการ Chromogenic assay ด้วยวิธี microplate เพื่อใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล

วัสดุและวิธีการ

สารอ้างอิง ตัวอย่าง Factor VIII และชุดน้ำยาทดสอบ

สารอ้างอิง Factor VIII STANDARD 13th BRITISH STANDARD FOR BLOOD COAGULATION FACTOR VIII CONCENTRATE, HUMAN NIBSC CODE; 10/188 ความแรง 9.4 IU/ampoule ตัวอย่าง

Factor VIII เข้มข้น 2 บริษัท จากผู้ผลิตในประเทศ (A) และนำเข้า (B) จำนวน 11 และ 6 รุ่นการผลิต ชุดทดสอบ HemosIL® Electrochrome™ Factor VIII จากบริษัท Instrumentation Laboratory, USA

การเตรียม สารอ้างอิง Factor VIII ชุดน้ำยาทดสอบและตัวอย่าง Factor VIII

ละลายสารอ้างอิง Factor VIII ด้วยน้ำกลั่นและตัวอย่าง Factor VIII ด้วยตัวทำละลายของผลิตภัณฑ์ ให้มีความแรงเริ่มต้น 1 IU/มิลลิลิตร สำหรับชุดทดสอบประกอบด้วย Factor reagent และ Chromogenic substrate ให้ละลายตามวิธีที่ระบุในคู่มือการใช้งาน น้ำยา วางสารที่ละลายแล้วทุกตัวที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที

วิธีวิเคราะห์

นำ Factor reagent และ Chromogenic substrate ที่เตรียมมาอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ก่อนเริ่มการทดสอบ เจือจางสารอ้างอิงและตัวอย่าง Factor VIII ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ของชุดทดสอบ เป็น 4 ระดับ ความเข้มข้น คือ 0.000625, 0.00125, 0.0025 และ 0.005 IU/มิลลิลิตร แล้วเติมแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน 96 well cell culture plate จากนั้นบ่มเพลทที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที แล้วเติม Factor reagent ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม บ่มเพลทที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที เมื่อครบเวลาบ่มให้เติม Chromogenic substrate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มเพลทที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม 20% acetic acid เพื่อหยุดปฏิกิริยา อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร หักลบด้วยค่า 490 นาโนเมตร ตามที่ระบุไว้ในคู่มือชุดทดสอบ โดยกลุ่มควบคุมได้เติมสารละลายบัฟเฟอร์แทนการเติมสารละลายตัวอย่าง

การคำนวณ

คำนวณค่าการทดสอบ การทวนสอบความเป็นเส้นตรง ความแม่นยำ ความจำเพาะโดยใช้โปรแกรม Excel คำนวณ กราฟความสัมพันธ์สมการเส้นตรง r^2 ไม่น้อยกว่า 0.95

คำนวณค่าความแรงของตัวอย่าง การทวนสอบความเที่ยง ด้วยวิธี parallel line analysis โดยนำค่าดูดกลืนแสงคำนวณโดยใช้โปรแกรม Gen5 โดยค่าความสัมพันธ์ระหว่างสารอ้างอิงและตัวอย่าง Factor VIII เป็นลักษณะ dose response ความสัมพันธ์แบบเส้นตรง (linearity) และความสัมพันธ์แบบคู่ขนาน (parallelism) ผลการทดสอบจะนำมาหาค่าเฉลี่ยแบบถ่วงน้ำหนัก (weighted geometric mean: WGO-Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: SD) ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (percent coefficient of variation: %CV)

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

ทดสอบตัวอย่าง 3 ชนิด คือ ตัวอย่าง Factor IX (Factor IX ทำหน้าที่ร่วมกับ Factor VIII ในปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือด) ตัวอย่าง Normal human albumin และตัวอย่าง Factor VIII ของบริษัท A โดยการเตรียมตัวอย่าง duplicate และทำ 3 การทดสอบ โดยเตรียมและทดสอบที่เป็นอิสระต่อกัน นำค่าเฉลี่ยของผล เปรียบเทียบความแตกต่างกันทางสถิติ One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and working range)

เจือจางสารอ้างอิง Factor VIII แบบ 2-fold เป็น 4 ระดับความเข้มข้น วิเคราะห์ 6 การทดสอบที่เป็นอิสระต่อกัน คำนวณค่าความแรง back calculation แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าจริงของสารอ้างอิง (expected concentration) และค่าที่ได้จากการทดสอบ (back calculation concentration) และคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient; r^2)

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

เตรียมสารอ้างอิง Factor VIII 2 ระดับความเข้มข้นคือ 0.25 และ 1 IU/มิลลิลิตร จากนั้นให้ spike แต่ละความเข้มข้นปริมาณ 5 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่าง A 0.00125 IU/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มล. เตรียมการทดสอบ duplicate และทำ 3 การทดสอบ นำผลทดสอบวิเคราะห์ค่าความถูกต้องสัมพัทธ์ %recovery Geomean

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

การทดสอบซ้ำ (Repeatability) ในวันและเวลาเดียวกัน (within run precision) โดยการทดสอบตัวอย่าง A จำนวน 6 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน นำผลทดสอบคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ซึ่งต้องมีค่า $\leq 15\%$ การทดสอบซ้ำต่างวัน โดยการทดสอบตัวอย่าง A จำนวน 2 ซ้ำ จากการทดสอบ 3 วัน (between run precision) นำผลทดสอบคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ซึ่งต้องมีค่า $\leq 15\%$ ทดสอบตัวอย่าง A จากผู้วิเคราะห์ 2 คน ๆ ละ 4 ซ้ำ (Reproducibility) นำผลทดสอบคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ซึ่งต้องมีค่า $\leq 15\%$ และเปรียบเทียบทางสถิติ Independent sample T-test

การทดสอบตัวอย่างแฟคเตอร์ VIII

ทดสอบตัวอย่าง Factor VIII จำนวน 2 ผลิตภัณฑ์ คือ ผลิตภัณฑ์ A จำนวน 11 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์ B จำนวน 6 ตัวอย่าง ที่ส่งวิเคราะห์ ปี 2562-2563 โดยทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง เป็นอิสระต่อกันแล้วหาค่าเฉลี่ย

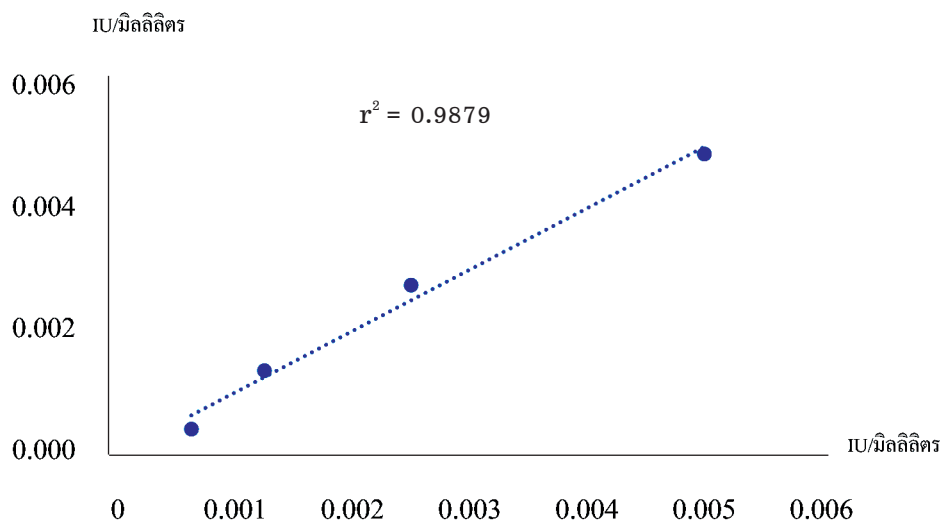
ผล

การทดสอบความจำเพาะของวิธี

ทดสอบตัวอย่าง 3 ชนิด คือ ตัวอย่าง Factor IX ตัวอย่าง Normal human albumin และตัวอย่าง Factor VIII พบว่า ตัวอย่าง Factor IX มีค่า WGO-Mean เท่ากับ 0.00038 ตัวอย่าง Normal human albumin มีค่า WGO-Mean เท่ากับ -0.00052 และตัวอย่าง Factor VIII มีค่า WGO-Mean เท่ากับ 1.165 IU/มิลลิลิตร ผลเปรียบเทียบความแตกต่างกันทางสถิติ One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตัวอย่าง Factor IX ตัวอย่าง Normal human albumin และค่า blank ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า วิธีทดสอบมีความจำเพาะต่อการนำมาวิเคราะห์ Factor VIII

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์

การทดสอบสารอ้างอิง Factor VIII ที่ระดับความเข้มข้น 0.000625, 0.00125, 0.0025, 0.005 IU/มิลลิลิตร ได้ค่า ความแรง $\pm$ SD เท่ากับ 0.00036 ± 0.00023 , 0.00131 ± 0.00026 , 0.00273 ± 0.00023 และ 0.00487 ± 0.00039 IU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้ค่าจริงของสารอ้างอิง (expected concentration) และจากการทดสอบ (back calculation concentration) พบว่า ทั้ง 2 ตัวแปร มีความสัมพันธ์ แนวโน้มไปในแนวทางเดียวกัน โดยมีความสัมพันธ์แบบเชิงเส้น คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient; r^2) เท่ากับ 0.9879 ดังแสดงในภาพที่ 1 ผลทดสอบความเป็นเส้นตรงได้ช่วงการวิเคราะห์ที่เหมาะสมของวิธีคือ 0.000625 - 0.005 IU/มิลลิลิตร



ภาพที่ 1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าจริงของสารอ้างอิง (x) และ ค่าที่ได้จากการทดสอบ (y) ของสารอ้างอิง Factor VIII

การทดสอบความแม่นยำ

ผลทดสอบโดย spike สารอ้างอิง Factor VIII ความเข้มข้น 0.25 และ 1 IU/มิลลิตร มีค่า %recovery Geomean เท่ากับ 109.35% ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 84.48% ดังแสดงในตารางที่ 2 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ผลการทดสอบเป็นไปตามเกณฑ์การทดสอบโดยมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 70-130

ตารางที่ 1 การทดสอบความแม่นยำ spike สารอ้างอิง 0.25 IU/มิลลิตร ลงในตัวอย่าง Factor VIII

การทดสอบ	ตัวอย่าง	spike + buffer	spike + ตัวอย่าง	%recovery	%recovery Geomean
1	0.001662	0.001297	0.002927	97.58	109.35
2	0.001407	0.000949	0.002618	127.53	
3	0.001288	0.000987	0.002325	105.06	

ตารางที่ 2 การทดสอบความแม่นยำ spike สารอ้างอิง 1 IU/มิลลิตร ลงในตัวอย่าง Factor VIII

การทดสอบ	ตัวอย่าง	spike + buffer	spike + ตัวอย่าง	%recovery	%recovery Geomean
1	0.001662	0.004860	0.005435	77.63	84.48
2	0.001407	0.004214	0.005243	91.02	
3	0.001288	0.004366	0.005015	85.34	

การทดสอบความเที่ยง

การทดสอบซ้ำในวันและเวลาเดียวกัน ผลการทดสอบมีค่าความแรงเฉลี่ยเท่ากับ 30.96 IU/มิลลิตร โดยพบว่ามีค่า %CV เท่ากับ 11.57 % ดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งมีค่า %CV น้อยกว่า 15 เป็นไปตามเกณฑ์การทดสอบ

ตารางที่ 3 ผลทดสอบความเที่ยงโดยการทดสอบซ้ำในวันเดียว

ครั้งที่	ค่าความแรง (IU/มิลลิลิตร)
1	32.00
2	31.75
3	31.25
4	37.00
5	27.75
6	27.00
WGO-Mean	30.96
SD	3.58
%CV	11.57

หมายเหตุ: WGO-Mean: weighted geometric mean, SD: standard deviation, %CV: percent coefficient of variation

การทดสอบซ้ำต่างวันและเวลากัน ผลการทดสอบทั้ง 3 วัน มีค่าความแรงเฉลี่ยเท่ากับ 25.43 IU/มิลลิลิตร ค่า SD เท่ากับ 2.76 ค่า %CV เท่ากับ 10.84 ดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งมีค่า %CV น้อยกว่า 15 เป็นไปตามเกณฑ์การทดสอบ

ตารางที่ 4 ผลทดสอบความเที่ยงโดยการทดสอบซ้ำต่างวัน

วันที่	ครั้งที่	ค่าความแรง (IU/มิลลิลิตร)
1	1	27.75
	2	20.30
2	1	26.50
	2	24.85
3	1	27.00
	2	27.00
WGO-Mean		25.42
SD		2.76
%CV		10.84

หมายเหตุ : WGO-Mean: weighted geometric mean, SD: standard deviation, %CV: percent coefficient of variation

การทดสอบ Reproducibility โดยวิเคราะห์ 2 คน ผลทดสอบมีค่าความแรงเฉลี่ยเท่ากับ 27.91 IU/มิลลิลิตร ค่า %CV เท่ากับ 7.74 ดังแสดงในตารางที่ 5 และเมื่อนำค่าความแรงเปรียบเทียบความแตกต่างกันทางสถิติโดยใช้ Independent-samples T-Test แสดงให้เห็นว่าผลการทดสอบของนักวิเคราะห์ทั้ง 2 คน ไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$)

ตารางที่ 5 การทดสอบ Reproducibility

ผู้ทดสอบ	ครั้งที่	ค่าความแรง (IU/มิลลิตร)
รายชื่อ 1	1	30.50
	2	28.75
	3	28.00
	4	26.25
รายชื่อ 2	1	26.50
	2	24.85
	3	27.75
	4	31.25
WGO-Mean		27.91
SD		2.16
%CV		7.74

หมายเหตุ: WGO-Mean: weighted geometric mean, SD: standard deviation, %CV: percent coefficient of variation

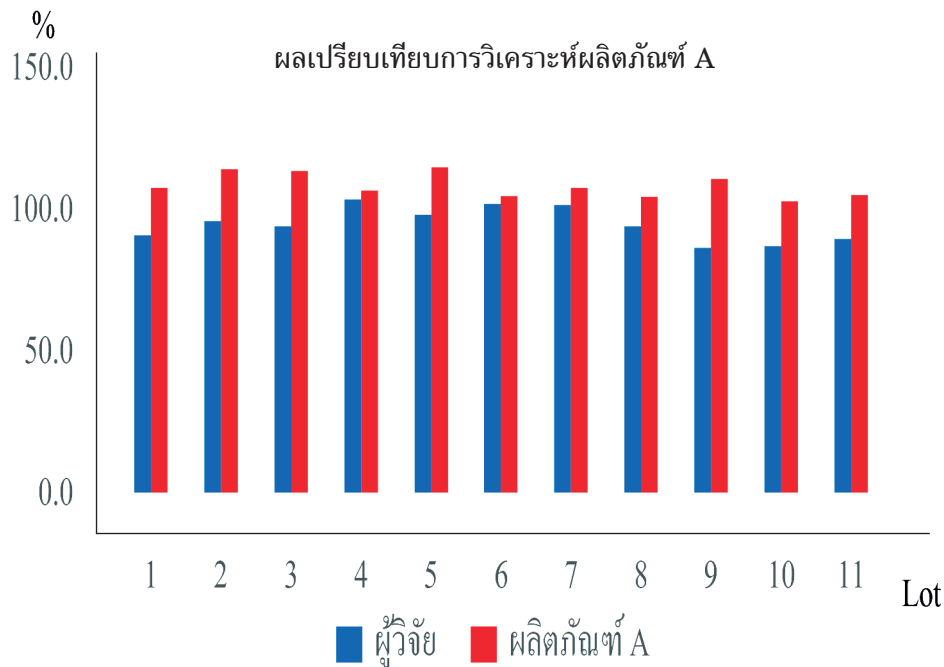
การทดสอบตัวอย่าง Factor VIII

ทดสอบตัวอย่าง Factor VIII จากผลิตภัณฑ์ A และ B โดยวิธีที่ทดสอบนี้มีค่าความแรงอยู่ในช่วง 86.8-102.1% และ 82.2-110.9% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วง 80-120% ของค่าความแรงที่ระบุบนฉลาก จึงแสดงให้เห็นว่าผลผ่านเกณฑ์มาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 6

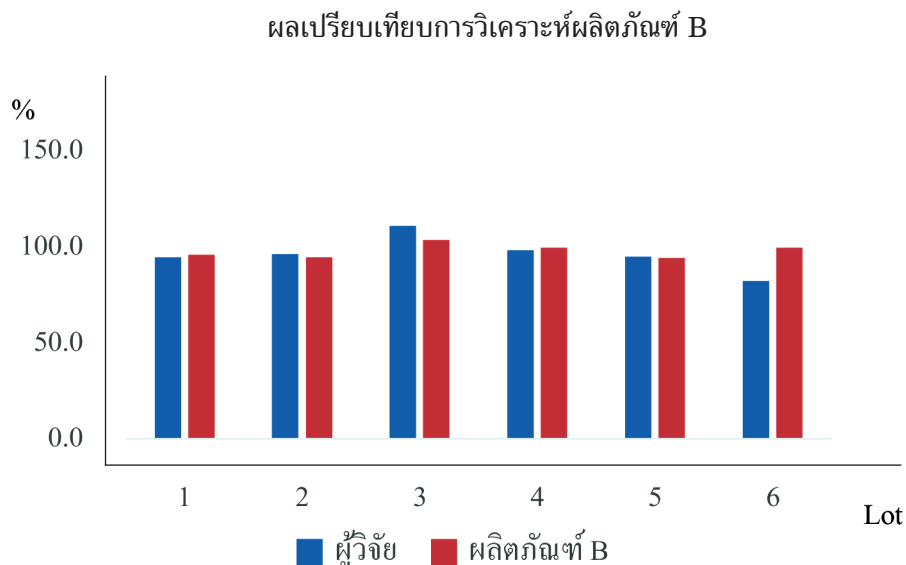
ตารางที่ 6 ผลทดสอบตัวอย่าง Factor VIII จากผลิตภัณฑ์ A และ B

รุ่นการผลิต	ผลิตภัณฑ์ A (%)		ผลิตภัณฑ์ B (%)	
	ผลทดสอบ	ผู้ผลิต	ผลทดสอบ	ผู้ผลิต
1	91.1	108.0	94.3	95.8
2	96.1	114.5	96.0	94.6
3	94.3	114.0	110.9	103.6
4	103.9	107.0	98.0	99.6
5	98.6	115.0	94.8	94.0
6	102.1	105.0	82.2	99.6
7	102.0	108.0		
8	94.4	104.7		
9	86.8	111.0		
10	87.5	103.0		
11	90.0	105.5		
WGO-Mean	94.99	108.62	95.7	97.8
SD	5.97	4.28	9.2	3.7
%CV	6.29	3.94	9.60	3.79

ผลทดสอบผลิตภัณฑ์ A ทั้ง 11 รุ่นการผลิต ได้ค่าต่ำกว่าค่าความแรงที่ทดสอบโดยผู้ผลิต ดังแสดงในภาพที่ 2 ขณะที่ค่าความแรงผลิตภัณฑ์ B ได้ค่าใกล้เคียงกับผู้ผลิต โดยมี 3 รุ่นการผลิต ที่ได้ค่าน้อยกว่า และอีก 3 รุ่นการผลิต ได้ค่ามากกว่า ดังแสดงในภาพที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างผู้วิจัยและผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ A พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ขณะที่เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างผู้วิจัยและผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ B พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$)



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบผลวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ A



ภาพที่ 3 เปรียบเทียบผลวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ B

วิจารณ์

การทวนสอบวิธีทดสอบความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII Chromogenic assay ทุกพารามิเตอร์ ได้แก่ ความจำเพาะ ความแม่นยำ ความเที่ยง ผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐานของตำรายา European Pharmacopeia 10.0 ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบการทดสอบ Chromogenic assay มีความแม่นยำ ความเที่ยง สามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII ในห้องปฏิบัติการชันสูตร

การศึกษาครั้งนี้เลือกผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นที่มีแหล่งผลิตมาจากพลาสมาเหมือนกัน เพื่อยืนยันว่าองค์ประกอบอื่นๆ ผลิตภัณฑ์ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ Factor VIII ผลทดสอบตัวอย่าง Normal human albumin และผลิตภัณฑ์ Factor IX ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการแข็งตัวของเลือด พบว่าค่าดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิดมีค่าใกล้เคียงกับการทดสอบที่ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าของตัวอย่าง Factor VIII จากผลดังกล่าวจึงแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบมีความจำเพาะ

การทวนสอบครั้งนี้เลือกใช้ชุดทดสอบจากผู้ผลิตเดียวซึ่งเป็นบริษัทเดียวกับชุดทดสอบ ที่สถาบันชันสูตรใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพ Factor IX อยู่แล้ว และจากรายงานผลการศึกษา Chromogenic assay โดย Pickering W พบว่าการศึกษาเปรียบเทียบชุดทดสอบชนิด Chromogenic assay จาก 6 บริษัทผู้ผลิต พบว่าทุกชุดทดสอบมีความแปรปรวนน้อย สอดคล้องกับผลการศึกษาของ V. Collazo และคณะ ในปี ค.ศ. 2012 พบว่าชุดทดสอบ Chromogenic assay มีความแม่นยำ (sig 0.6959) และความเที่ยง^(6, 7) จึงเห็นได้ว่าผลการศึกษานี้มีความสอดคล้องและเป็นไปในแนวทางเดียวกับการศึกษาดังกล่าว นอกจากนี้การศึกษาของ Pickering W และคณะ ระบุด้วยว่าการทดสอบผลิตภัณฑ์ Factor VIII โดยเปรียบเทียบค่ากับสารอ้างอิงสากล WHO International standard จะมีค่าความแรงต่ำกว่าเมื่อใช้สารอ้างอิงที่มากับชุดทดสอบ (plasma calibrator) ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์^(6, 8) ดังนั้นจากผู้ผลิต A ใช้วิธีทดสอบแบบ one stage assay และใช้สารมาตรฐานอ้างอิงที่มากับชุดทดสอบ อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ค่าความแรงแตกต่างจากค่าที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้

ข้อจำกัดของการศึกษานี้ พบว่าเป็นการทวนสอบโดยใช้ตัวอย่าง Factor VIII ชนิดที่ผลิตจากพลาสมามนุษย์เท่านั้น และปัจจุบันผลิตภัณฑ์แฟคเตอร์ชนิดรีคอมบิแนนท์ที่มีการนำเข้ามีเพียง 2 บริษัท และไม่มีตัวอย่างนำเข้ามาในช่วงเวลาของการทวนสอบ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในตัวอย่างดังกล่าว นอกจากนี้เนื่องจากสารอ้างอิง Factor VIII มีความคงตัวต่ำ หลังการละลายแล้วไม่สามารถเก็บไว้ใช้สำหรับการทดสอบครั้งอื่นๆ ได้อีก ดังนั้นเพื่อลดค่าใช้จ่ายของการวิเคราะห์และสนับสนุนให้ประเทศพึ่งพาตนเองได้ สถาบันฯ ควรศึกษาการเตรียมสารมาตรฐาน Factor VIII เพื่อใช้เป็น working reference standard ของประเทศในการวิจัยครั้งต่อไป

สรุป

วิธีทดสอบความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII โดยหลักการ Chromogenic assay ด้วยวิธี microplate เป็นวิธีที่มีความแม่นยำ ความเที่ยง ความจำเพาะ เชื่อถือได้ สามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII ในห้องปฏิบัติการของสถาบันชันสูตรต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ดำเนินการโดยใช้งบประมาณของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และขอบคุณ ดร.สุภาพร ภูมิอมร ผู้อำนวยการสถาบันชันสูตร ที่สนับสนุนการดำเนินงานวิจัย และขอบคุณ ดร.วิสุทธนา สมุทรศรี ที่ให้การสนับสนุน ให้คำปรึกษา ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์, บรรณธิการ. โรคเลือดออกง่ายและล้มเลือดอุดตัน: แนวทางการวินิจฉัยและการรักษา. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล; 2559.
2. Bhardwaj R, Rath G, Goyal AK. Advancement in the treatment of haemophilia. *Int J Biol Macromol* 2018; 118(Pt A): 289-95.
3. Moser KA, Adcock Funk DM. Chromogenic factor VIII activity assay. *Am J Hematol* 2014; 89(7): 781-4.
4. 2.7.4 Assay of human coagulation factor VIII. In: *European Pharmacopoeia* 10.0. 10th ed. Strasbourg, France: Council of Europe; 2019. p. 268.
5. A Werfen Company. HemosIL electrochromeTM factor VIII - 49730503. Bedford, MA: Instrumentation Laboratory Company; 2021.
6. Pickering W, Hansen M, Kjalke M, Ezban M. Factor VIII chromogenic assays can be used for potency labeling and postadministration monitoring of N8-GP. *J Thromb Haemost* 2016; 14(8): 1579-87.
7. Collazo V, Alonso C, Frutos G. Validation of an automated chromogenic assay of potency of factor VIII in commercial concentrates. *Int J Lab Hematol* 2013; 35(1): 38-45.
8. Dodt J, Hubbard AR, Wicks SJ, Gray E, Neugebauer B, Charton E, et al. Potency determination of factor VIII and factor IX for new product labelling and postinfusion testing: challenges for caregivers and regulators. *Haemophilia* 2015; 21(4): 543-9

Method Verification of Factor VIII Potency Test by Chromogenic Assay

Soammarisa Paungpornsri Titaporn Pootipinyowat and Paisan Pangjunan

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Factor VIII is an essential blood-clotting glycoprotein which is a cofactor for activating factor IX to an active form and then reacts to factor X for initiating the blood coagulation system. The aim of this study was to verify the potency test of Factor VIII products by chromogenic assay according to the European Pharmacopoeia recommendation. The results of linearity suggested that the appropriate concentrations for this assay were in the range of 0.000625 – 0.005 IU/ml. The percentage recovery geomean of accuracy test was 84.48–109.35%. The coefficient of variation (CV) of precision; within run, between run and reproducibility were 11.57, 10.84 and 7.74, respectively. The analysis of other plasma products by the verified method showed the technique was specific to Factor VIII. In addition, the determination of potency of Factor VIII products (11 lots of product A and 6 lots of product B) by the verified method found that both products complied with the European Pharmacopoeia specifications. The comparable results to the manufacturer's test showed that the potency results were significantly different in product A but not in product B. However, the manufacturer for product A used the method and reference standard which were dissimilar from this study. In conclusion, the potency testing of Factor VIII by chromogenic microplate assay is suitable as a standard method at laboratory of the Institute of Biological Products.

Keywords: Factor VIII, Chromogenic assay, Method Verification

คุณภาพชาสมุนไพรจากการประเมินด้านสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็กน้ำหนักเบา

ขันทอง เพ็ชรนอก และก่อเกียรติ ศาสตร์ินทร์

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ชาสมุนไพรเป็นเครื่องดื่มที่นิยมดื่มกันอย่างกว้างขวาง ส่วนใหญ่ไม่มีคาเฟอีน จึงเหมาะสำหรับผู้สูงอายุ แต่ชาสมุนไพรยังไม่มีข้อกำหนดคุณภาพด้านสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็กน้ำหนักเบา (light filth) ได้แก่ แมลง ชิ้นส่วนแมลง และขนสัตว์ ซึ่งเป็นสิ่งแปลกปลอมที่น่ารังเกียจและเป็นตัวบ่งชี้ถึงสุขลักษณะการผลิต เพื่อประเมินคุณภาพชาสมุนไพร การศึกษาครั้งนี้จึงใช้เกณฑ์ข้อกำหนด Defect Action Levels (DAL) สำหรับผลิตภัณฑ์ Oregano crushed ของ Department of Health and Human Services ซึ่งเป็นหน่วยงานของ US FDA ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นแนวทางในการพิจารณาในการตรวจสอบสิ่งแปลกปลอมประเภท light filth ในชาสมุนไพร จำนวน 100 ตัวอย่าง แบ่งเป็นชนิดใบและชนิดผงบรรจุซอง ชนิดละ 50 ตัวอย่าง ผลการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบสิ่งแปลกปลอมประเภท light filth ในทุกตัวอย่าง พบชาสมุนไพรชนิดใบและชนิดผงไม่ผ่านเกณฑ์ DAL จำนวน 33 และ 44 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 66 และ 88 สาเหตุจากพบชิ้นส่วนแมลง หรือขนหนู เกินเกณฑ์ข้อกำหนด DAL ถึงแม้ว่าขณะนี้ยังไม่มีข้อกำหนดเป็นเกณฑ์ตัดสินสิ่งแปลกปลอมประเภท light filth ในชาสมุนไพร ผู้ผลิตและผู้ส่งออกควรเข้มงวดในเรื่องสุขลักษณะและกรรมวิธีที่ดีในการผลิตเพื่อยกระดับคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพดีสม่ำเสมอให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคต่อไป

คำสำคัญ: การประเมินคุณภาพ, ชาสมุนไพร, สิ่งแปลกปลอมขนาดเล็กน้ำหนักเบา

Correspondence author E-mail: kuntong.p@dmsc.mail.go.th

Received: 2 April 2021

Revised: 12 July 2021

Accepted: 17 July 2021

บทนำ

ชาสมุนไพร หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากส่วนต่างๆ ของพืช นำมาทำให้แห้งและลดขนาดให้เล็กลง โดยการตัด สับ หรือบด เท่านั้น ซึ่งยังอยู่ในสภาพที่สามารถตรวจสอบได้ว่ามาจากพืชสมุนไพรชนิดใด ทั้งนี้อาจมาจากพืชชนิดเดียว หรือผสมกับพืชชนิดอื่นที่กำหนดไว้ในประกาศหรือผสมกับชาในสกุล *Camellia* มีจุดมุ่งหมายเพื่อนำไปบริโภคโดยการดื่มหรือชงกับน้ำเท่านั้น⁽¹⁾

ชาสมุนไพรเป็นเครื่องดื่มที่ปัจจุบันมีความสำคัญและนิยมดื่มกันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะผู้สูงอายุคาดหวัง ประโยชน์เพื่อดูแลรักษาสุขภาพ ซึ่งชาสมุนไพรตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 280) พ.ศ. 2547 มีรายชื่อพืช หรือส่วนต่างๆ ของพืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับชาสมุนไพร ได้แก่ ผลมะตูม ดอกกระเจี๊ยบ เหง้าขิง เหง้าข่า เหง้าและ ต้นตะไคร้แกง ใบหม่อน ดอกคำฝอย ใบบัวบก ใบเตยหอม ดอกเก๊กฮวย ผลหลอฮั่งก้วย เห็ดหลินจือ ใบและต้นเจียวกู่หลาน เถาวัลย์เปรียง ใบหญ้าหวาน รากชะเอมเทศและช่อดอก และใบอาร์ทิโชค เป็นต้น^(2, 3) ชาสมุนไพรส่วนใหญ่ไม่มีคาเฟอีน จึงเหมาะสำหรับผู้สูงอายุหรือผู้ที่แพ้คาเฟอีน และที่สำคัญชาสมุนไพรหลายชนิดมีสรรพคุณทางยา เช่น ช่วยกระตุ้น ระบบประสาท ระบบหมุนเวียนเลือด ต้านอนุมูลอิสระ ลดคลอเรสเตอรอล ต้านการเกิดโรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง มะเร็ง และยังสามารถช่วยให้ระบบการทำงานของร่างกายในหลายๆ ส่วน เช่น ระบบการย่อยอาหาร ระบบขับถ่าย ระบบปัสสาวะ หัวใจทำงานได้ดี และเป็นตัวช่วยล้างไขมันที่เกาะติดอยู่ตามลำไส้^(4, 5, 6)

ชาเป็นพืชเศรษฐกิจที่นำมาทำเป็นเครื่องดื่มและใช้เป็นส่วนหนึ่งของการผลิตชาสมุนไพร ผลผลิตชาส่วนใหญ่ อยู่ในแถบเอเชีย ได้แก่ จีน อินเดีย และศรีลังกา สำหรับประเทศไทยนิยมปลูกในแถบภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ แพร่ น่าน และแม่ฮ่องสอน เป็นต้น ส่วนใหญ่เป็นชาพันธุ์อัสสัม (Assam Tea) และพันธุ์ชาจีน (Chinese Tea) เมื่อแบ่งตามกระบวนการผลิตได้เป็น 1) ชาเขียว (Green tea) จะไม่ผ่านกระบวนการหมัก โดยนำใบชาที่เก็บได้มา ทำการคั่วบนกระทะร้อนแล้วนำไปนวดและอบแห้งในลำดับถัดไป สีของน้ำชาจะมีสีเขียวถึงเขียวอมเหลือง 2) ชาอู่หลง (Oolong tea) จะผ่านกระบวนการหมักเพียงบางส่วน โดยการผึ่งแดดแล้วนำไปผึ่งในร่ม ซึ่งเป็นกระบวนการหมักที่ทำให้ เกิดสารที่มีกลิ่นและสีแตกต่างไปจากชาเขียวโดยน้ำชาจะมีสีเหลืองอมเขียวและสีน้ำตาลอมเขียว 3) ชาดำ (Black tea) เป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักอย่างสมบูรณ์ น้ำชาจะมีสีน้ำตาลแดง คนไทยนำชาพันธุ์ชาอัสสัมมาผลิตเป็นชาดำ ชาเขียว และชาไทย ส่วนพันธุ์ชาจีนนิยมนำมาผลิตเป็นชาอู่หลง ชาเขียว และชาแดง (ชาฝรั่ง) ผลผลิตชาของไทย ปี 2562 ปริมาณ 102,914 ตัน ประเทศที่นำเข้าชามากที่สุด คือ รัสเซีย ปริมาณนำเข้า 150,318 ตัน คิดเป็นมูลค่า 425.6 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ รองลงมา คือ สหราชอาณาจักร และสหรัฐอเมริกา ตามลำดับ ส่วนประเทศผู้นำเข้าผลิตภัณฑ์ชา มากที่สุด คือ สหรัฐอเมริกา ปริมาณนำเข้า 68,777 ตัน มูลค่า 185.7 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ รองลงมา คือ เยอรมนี และ กรีซ ตามลำดับ^(7, 8, 9) ส่วนการส่งออกชาเขียวปริมาณ 1,058 ตัน มูลค่า 9.5 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ ชาดำปริมาณ 2,256 ตัน มูลค่า 9.6 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ และส่งออกผลิตภัณฑ์ชาปริมาณ 7,032 ตัน มูลค่า 24.6 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ ในช่วง 7 เดือนแรกปี 2563 (มกราคม - กรกฎาคม) ไทยส่งออกชาเขียวปริมาณ 492.9 ตัน มูลค่า 4.6 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ⁽¹⁰⁾ และในปีเดียวกันไทยนำเข้าชาปริมาณ 14,334 ตัน มูลค่า 22.1 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ เป็นชาดำปริมาณ 9,283 ตัน นำเข้าจากอินโดนีเซีย เวียดนาม และศรีลังกา ชาเขียวปริมาณ 5,051 ตัน มูลค่า 8.8 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ นำเข้าจากญี่ปุ่น จีน และเวียดนาม นำเข้าผลิตภัณฑ์ชาปริมาณ 1,241 ตัน มูลค่า 22.1 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ นำเข้าจากสหรัฐอเมริกา จีน และ เยอรมนี^(7, 8) แสดงให้เห็นว่าไทยยังมีความจำเป็นต้องนำเข้าชาเพื่อมาบริโภคในประเทศและสำหรับแปรรูปเป็น ผลิตภัณฑ์ชาจำหน่ายในประเทศและส่งออก^(7, 8) จากความตกลงการค้าเสรี (Free Trade Area : FTA) ไทยนำเข้าชา จากอาเซียน โดยเฉพาะอินโดนีเซียและเวียดนามมากที่สุด โดยไทยยกเลิกการเก็บภาษีทั้งในและนอกโควตาจากอาเซียน การยกเลิกภาษีดังกล่าวจะช่วยเพิ่มโอกาสให้ผู้ประกอบการหรือผู้นำเข้าชาของไทยมีทางเลือกในการนำเข้า เพิ่มความ หลากหลายของวัตถุดิบและช่วยลดต้นทุนมากขึ้น^(7, 8) คุณภาพการนำเข้าและส่งออกชาสมุนไพรยังไม่มีเกณฑ์ตัดสิน คุณภาพ ซึ่งประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นผู้นำเข้าชาและผลิตภัณฑ์ชาเป็นอันดับต้นๆ โดยชาสมุนไพรได้รับความนิยม

และมีแนวโน้มเติบโตต่อเนื่องในประเทศสหรัฐอเมริกา⁽¹¹⁾ และจะเข้มงวดกับความสะอาดของผลิตภัณฑ์อาหารในเรื่องสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็กน้ำหนักเบา (light filth) ได้แก่ แมลง ชิ้นส่วนแมลง และขนสัตว์พื้นเพาะ ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงพิจารณาตามเกณฑ์ข้อกำหนด Defect Action Levels (DAL)⁽¹²⁾ ของ Department of Health and Human Services ซึ่งเป็นหน่วยงานของ US FDA ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับผลิตภัณฑ์ Oregano crushed ที่เป็นพืชสมุนไพรและใช้ชงดื่มเช่นชาสมุนไพรได้ เป็นแนวทางในการพิจารณาเกณฑ์ตัดสินคุณภาพ ที่กำหนดให้พบชิ้นส่วนแมลง (insect fragments) ไม่เกิน 300 ชิ้น หรือขนหนู (rodent hairs) ไม่เกิน 2 เส้น ในตัวอย่าง 10 กรัม การตรวจพบแมลง ชิ้นส่วนแมลง และขนสัตว์ จัดเป็นสิ่งแปลกปลอมซึ่งไม่เป็นที่ยอมรับ หรือน่ารังเกียจ เป็นตัวบ่งชี้ถึงระบบควบคุมคุณภาพ และอาจถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการกีดกันทางการค้าสำหรับการส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศ

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างศึกษา

เป็นตัวอย่างชาสมุนไพรที่ผลิตในประเทศไทยและนำเข้าจากต่างประเทศ ส่งตรวจโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา จำนวน 100 ตัวอย่าง แบ่งเป็นชาสมุนไพรชนิดใบและชาสมุนไพรชนิดผงบรรจุซอง ชนิดละ 50 ตัวอย่าง (ชาสมุนไพรชนิดใบผลิตในประเทศไทยและนำเข้า จำนวน 45 และ 5 ตัวอย่าง ส่วนชาสมุนไพรชนิดผงผลิตในประเทศไทยและนำเข้า จำนวน 40 และ 10 ตัวอย่าง) วิเคราะห์ในช่วงเดือนมีนาคม 2559 ถึง เดือนพฤษภาคม 2561

ตรวจสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็กน้ำหนักเบา (light filth)

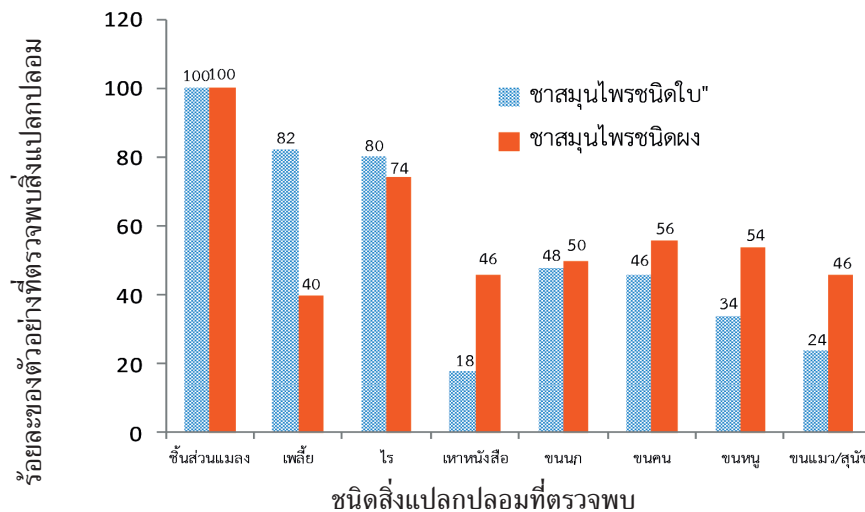
ตรวจวิเคราะห์ตามวิธี AOAC 981.18 Light Filth in Tea⁽¹³⁾ โดยชั่งตัวอย่างชาสมุนไพรจำนวน 10 กรัม นำมาต้มในน้ำเดือดนาน 6 นาที จากนั้นเทลงบน sieve no. 230 (Endecotts Limited, อังกฤษ) แล้วใช้น้ำร้อนฉีดพ่นจนน้ำล้างใส จึงนำสิ่งที่ตกค้างบน sieve ใส่ใน wildman trap flask แล้วปรับปริมาตรด้วย 40% isopropanol ให้ได้ 900 มิลลิลิตร และใส่แท่งกวน (stirring rod) ให้แผ่นยางอยู่ต่ำกว่าระดับผิวของเหลว เติม flotation oil 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนาน 6 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 2 – 3 นาที จึงเติม sequestering agent 300 มิลลิลิตร กวนอย่างเบานาน 1 นาที แล้วเติม 40% isopropanol จนเกือบเต็ม จากนั้นลือกแท่งกวนให้แผ่นยางอยู่ต่ำกว่าชั้นน้ำมันประมาณ 1 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที หมุนแท่งกวนเพื่อให้สิ่งแปลกปลอมหลุดจากแท่งกวน ตั้งทิ้งไว้ 25 นาที แล้วดึงปลายแท่งกวนขึ้นให้แผ่นยางปิดคอ flask ให้แน่น จากนั้นเทชั้นน้ำมันที่อยู่เหนือแผ่นยาง ลงใน beaker ล้างบริเวณคอ flask จนสะอาดด้วย 40% isopropanol จากนั้นเติม flotation oil 30 มิลลิลิตร ทำซ้ำเดิมอีกครั้ง และเก็บของเหลวที่ได้ออกมาครั้งแรก จากนั้นกรองของเหลวทั้งหมดด้วยชุดเครื่องกรอง แล้วนำกระดาษกรองไปตรวจหาสิ่งแปลกปลอมและนับจำนวนภายใต้ widefield zoom stereoscopic microscope (Olympus Optical, ญี่ปุ่น) ที่กำลังขยาย 30 เท่า และตรวจจำแนกชนิดสิ่งแปลกปลอมภายใต้ compound microscope (Olympus Optical, ญี่ปุ่น) ที่กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อตรวจลักษณะโครงสร้างของแมลง ชิ้นส่วนแมลง ขนหนู ขนแมว/สุนัข ขนคน และขนนก โดยเปรียบเทียบกับลักษณะอ้างอิงจากสมุดภาพ⁽¹⁴⁾

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบการตรวจพบชิ้นส่วนแมลง และขนหนูในชาสมุนไพร 2 ชนิด ที่ผลิตภายในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศ โดยคำนวณค่าไคสแควร์ (χ^2 -test) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

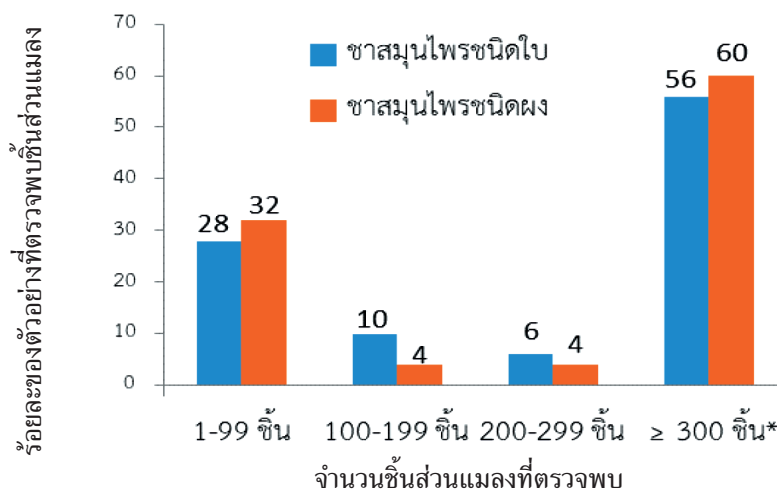
ผล

ผลการตรวจชาสมุนไพร 100 ตัวอย่าง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า พบสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็ก น้ำหนักเบา (light filth) ในทุกตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100 โดยตัวอย่างชาชนิดใบ : ชาชนิดผง พบชิ้นส่วนแมลง 50 : 50 (ร้อยละ 100 : 100) เปลือก (เปลือกอ่อน เปลือกไฟ เปลือกหอย) 41 : 20 (ร้อยละ 82 : 40) ไร 40 : 37 (ร้อยละ 80 : 74) เหาหนังสือ 9 : 23 (ร้อยละ 18 : 46) ขนนก 24 : 25 (ร้อยละ 48 : 50) ขนคน 23 : 28 (ร้อยละ 46 : 56) ขนหนู 17 : 27 (ร้อยละ 34 : 54) และขนแมว/สุนัข 12 : 23 (ร้อยละ 24 : 46) ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ชนิดและจำนวนตัวอย่างที่พบ light filth ในชาสมุนไพร 2 ชนิด

ผลการตรวจวิเคราะห์พบชิ้นส่วนแมลงมากที่สุดในทุกตัวอย่างชาสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด เมื่อจำแนกจำนวนที่ตรวจพบเป็น 4 ช่วง คือ 1 - 99, 100 - 199, 200 - 299 และ ≥ 300 ชิ้น ตามลำดับ พบชิ้นส่วนแมลงในชาสมุนไพรชนิดใบจำนวน 14, 5, 3 และ 28 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 28, 10, 6 และ 56 ตามลำดับ และพบชิ้นส่วนแมลงในชาสมุนไพรชนิดผงจำนวน 16, 2, 2 และ 30 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 32, 4, 4 และ 60 ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าไม่ผ่านเกณฑ์ข้อกำหนด DAL (ชิ้นส่วนแมลงไม่เกิน 300 ชิ้น ในตัวอย่าง 10 กรัม) ในชาสมุนไพรชนิดใบและชนิดผง จำนวน 28 และ 30 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 56 และ 60 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 จำนวนชิ้นส่วนแมลงที่ตรวจพบในตัวอย่างชาสมุนไพร 2 ชนิด, *ชิ้นส่วนแมลงเกินเกณฑ์ข้อกำหนด DAL

ผลการวิเคราะห์ชนิดของแมลง พบว่ามีแมลงหลายชนิด ได้แก่ เพลี้ย (เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไฟ เพลี้ยหอย) ไร และเหาหนังสือ เมื่อจำแนกตามจำนวนแมลงที่พบเป็น 2 ช่วง คือ 1 – 100 และ ≥ 101 ตัว พบเพลี้ยในชาสมุนไพรชนิดใบ 35 และ 6 ตัวอย่าง ในชาสมุนไพรชนิดผง 20 และ 0 ตัวอย่าง พบไรในชาสมุนไพรชนิดใบ 38 และ 2 ตัวอย่าง ในชาสมุนไพรชนิดผง 37 และ 0 ตัวอย่าง พบเหาหนังสือในชาสมุนไพรชนิดใบ 17 และ 0 ตัวอย่าง ในชาสมุนไพรชนิดผง 39 และ 0 ตัวอย่าง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดและจำนวน light filth ที่เป็นแมลงที่พบในชาสมุนไพร 2 ชนิด

สิ่งแปลกปลอมขนาดเล็ก น้ำหนักเบา (light filth)	ชาสมุนไพรชนิดใบ (ตัวอย่าง)	ชาสมุนไพรชนิดผง (ตัวอย่าง)
เพลี้ย (ตัว)		
1-100	35	20
≥ 101	6	0
ไร (ตัว)		
1-100	38	37
≥ 101	2	0
เหาหนังสือ (ตัว)		
1-100	17	39
≥ 101	0	0

พบขนสัตว์ได้แก่ขนนก ขนคน ขนหนู และขนแมว/สุนัข โดยพบในชาชนิดใบ จำนวน 24, 28, 17 และ 12 ตัวอย่าง พบในชาผง จำนวน 25, 28, 28 และ 23 ตัวอย่าง เมื่อจำแนกจำนวน 1, 2 และ ≥ 3 เส้น ตามลำดับ ตามเกณฑ์ข้อกำหนด DAL (พบขนหนูไม่เกิน 2 เส้นในตัวอย่าง 10 กรัม) พบชาสมุนไพรไม่ผ่านเกณฑ์ข้อกำหนด DAL 19 ตัวอย่าง เป็นชนิดใบ 5 ตัวอย่าง และชนิดผง 14 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 10 และ 28 ตามลำดับ ซึ่ง 1 ใน 5 ของตัวอย่างชาสมุนไพรชนิดใบ พบขนหนู 50 เส้น ดังแสดงในตารางที่ 2

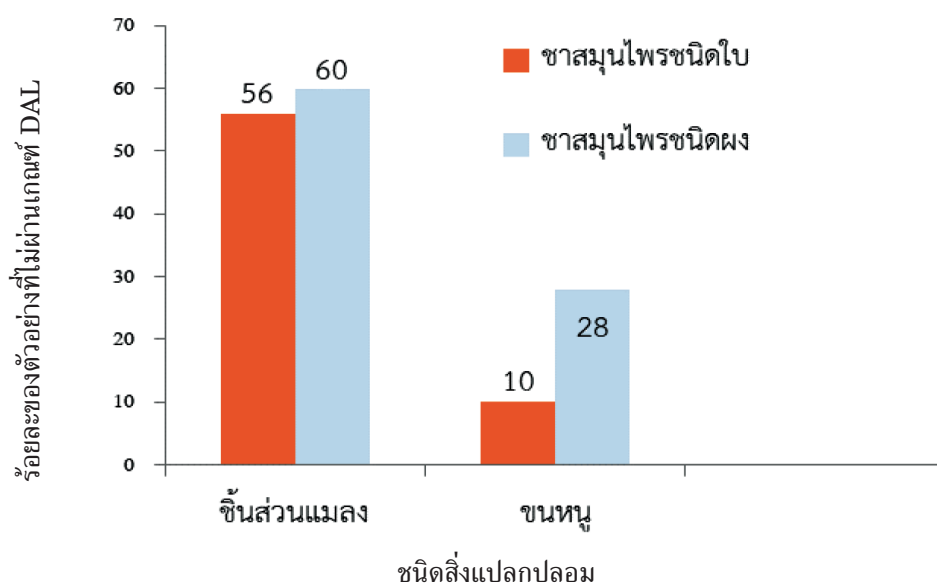
ผลการตรวจวิเคราะห์ชาสมุนไพร 100 ตัวอย่าง พบไม่ผ่านเกณฑ์ข้อกำหนด DAL จำนวน 77 ตัวอย่าง เกิดจากพบชิ้นส่วนแมลงเกิน 300 ชิ้น หรือพบขนหนูเกิน 2 เส้น พบในชาสมุนไพรชนิดใบและชนิดผง 33 และ 44 ตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อนำมาจัดกลุ่มเป็น พบชิ้นส่วนแมลง หรือขนหนู พบในชาสมุนไพรชนิดใบจำนวน 28 และ 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 56 และ 10 ตามลำดับ และพบในชาสมุนไพรชนิดผงจำนวน 30 และ 14 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 60 และ 28 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3

เปรียบเทียบการตรวจพบชิ้นส่วนแมลง และขนหนูในชาสมุนไพร 2 ชนิด ที่ผลิตภายในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศ โดยคำนวณค่าไคสแควร์ (χ^2 -test) พบตัวอย่างชาสมุนไพรชนิดใบในประเทศและนำเข้าไม่มีความแตกต่างกันจากการตรวจพบชิ้นส่วนแมลงหรือขนหนู ($p>0.05$) แต่ชาสมุนไพรชนิดผงในประเทศพบชิ้นส่วนแมลงมากกว่าชานำเข้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนขนหนูของชาในประเทศและนำเข้าไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 จำนวนชนิดสัตว์ ที่ตรวจพบในชาสมุนไพร 2 ชนิด

สิ่งแปลกปลอมขนาดเล็ก น้ำหนักเบา (light filth)	ชาสมุนไพรชนิดใบ (ตัวอย่าง)	ชาสมุนไพรชนิดผง (ตัวอย่าง)
ขนนก (เส้น)		
1	7	10
2	11	5
≥ 3	6	10
ขนคน (เส้น)		
1	17	13
2	5	9
≥ 3	6	6
ขนหนู (เส้น)		
1	12	14
2*	1	7
≥ 3 **	4	7
ขนแมว/สุนัข (เส้น)		
1	10	16
2	2	1
≥ 3	0	6

หมายเหตุ *DAL ระบุพบขนหนูไม่เกิน 2 เส้นในตัวอย่าง 10 กรัม, **พบขนหนู 50 เส้น ใน 1 ตัวอย่าง



ภาพที่ 3 จำนวนตัวอย่างที่เกินเกณฑ์ข้อกำหนด DAL ในชาสมุนไพร 2 ชนิด

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบชาสมุนไพร ที่ผลิตในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศ ที่ไม่ผ่านเกณฑ์ DAL

สิ่งแปลกปลอมขนาดเล็ก น้ำหนักเบา (light filth)	จำนวนตัวอย่าง (ร้อยละ)		χ^2 - test
	พบ	ไม่พบ	
ชิ้นส่วนแมลง (≥ 300 ชิ้น)			
ชาสมุนไพรชนิดใบในประเทศ	27 (60.00)	18 (40.00)	2.92
ชาสมุนไพรชนิดใบนำเข้า	1 (20.00)	4 (80.00)	
รวม	28 (56.00)	22 (44.00)	
ขนหนู (≥ 2 เส้น)			
ชาสมุนไพรชนิดใบในประเทศ	4 (8.89)	41 (91.11)	0.62
ชาสมุนไพรชนิดใบนำเข้า	1 (20.00)	4 (80.00)	
รวม	5 (56.00)	45 (44.00)	
ชิ้นส่วนแมลง (≥ 300 ชิ้น)			
ชาสมุนไพรชนิดผงในประเทศ	31 (77.50)	9 (22.50)	8.30*
ชาสมุนไพรชนิดผงนำเข้า	3 (30.00)	7 (70.00)	
รวม	34 (68.00)	16 (32.00)	
ขนหนู (≥ 2 เส้น)			
ชาสมุนไพรชนิดผงในประเทศ	13 (77.50)	27 (22.50)	2.00
ชาสมุนไพรชนิดผงนำเข้า	1 (10.00)	9 (90.00)	
รวม	14 (28.00)	36 (72.50)	

ค่าไคสแควร์ (χ^2 - test) จากตารางที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 มีค่า 3.84

*ชนิดของชามีความสัมพันธ์กับจำนวนตัวอย่างที่พบสิ่งแปลกปลอมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

วิจารณ์

ตรวจสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็กน้ำหนักเบา (light filth) ในชาสมุนไพร พบชิ้นส่วนแมลงในทุกตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100 ของตัวอย่างทั้งหมด และพบตัวอย่างที่ไม่ผ่านเกณฑ์ข้อกำหนด DAL เนื่องจากพบชิ้นส่วนแมลงเกิน 300 ชิ้น ในชาสมุนไพรชนิดใบและชนิดผงจำนวน 28 และ 30 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 56 และ 60 ตามลำดับ ทั้งนี้ชิ้นส่วนแมลงอาจปลอมปนมากับวัตถุดิบที่เป็นสมุนไพรหรือใบชา โดยแมลงมาเกาะกินน้ำหวานหรืออาหารที่ยอดอ่อน ดอก หรือผลของพืชที่นำมาเป็นวัตถุดิบ⁽¹⁵⁾ เมื่อนำมาอบหรือตากแห้ง ทำให้แมลงหรือชิ้นส่วนแมลงแตกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ กระจายในตัวอย่างเป็นจำนวนมาก

เพลี้ย (เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไฟ และเพลี้ยหอย) เป็นแมลงศัตรูพืชที่ดูดน้ำเลี้ยงจากลำต้น กิ่ง ก้าน ใบอ่อน ยอด ดอก และผลของพืช จึงปลอมปนมากับวัตถุดิบที่ใช้ทำชาสมุนไพรซึ่งเพลี้ยอ่อนและเพลี้ยไฟยังเป็นตัวพาหะถ่ายเชื้อไวรัสไปสู่ต้นพืชและผักได้ด้วย^(16, 17, 18) เมื่อผู้ผลิตนำพืชสมุนไพรหรือใบชาที่มีการปลอมปนจากเพลี้ยมาผลิตเป็นชาสมุนไพร โดยไม่ได้ทำความสะอาด⁽¹⁶⁾ แล้วนำไปอบหรือตากให้แห้ง จึงทำให้แมลงตายและปลอมปนในผลิตภัณฑ์ชาสมุนไพรดังกล่าว ดังนั้นการเลือกเก็บสมุนไพรสดคุณภาพดี ไม่เป็นโรคและไม่ถูกแมลงรบกวน การคัดใบที่ไม่แก่หรืออ่อนเกินไป รวมทั้งการแช่น้ำและล้างน้ำให้สะอาดเป็นวิธีที่ช่วยลดจำนวนของเพลี้ยที่ปลอมปนมากับวัตถุดิบที่นำมาทำสมุนไพร⁽¹⁵⁾ ส่วนไรและเหาหนังสือ จัดเป็นแมลงที่พบในผลิตภัณฑ์เกษตรและพบในโรงเก็บรักษา การควบคุมอุณหภูมิและความชื้นที่ไม่ให้ไรและเหาหนังสือเจริญเติบโตหรือทำลาย รวมทั้งการทำความสะอาดสถานที่เก็บรักษา เป็นสิ่งจำเป็นต่อการลดจำนวนของแมลงได้^(19, 20)

ชนสัตว์ที่ตรวจพบได้แก่ ชนคน ชนหนู ชนแมว/สุนัข และชนนก พบในชาสมุนไพรชนิดผงมากกว่าชนิดใบ กรณีชนคนอาจเกิดจากผู้ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตหรือบรรจุไม่ได้สวมถุงมือหรือตาข่ายคลุมผมในขณะที่ปฏิบัติงาน ส่วนชนหนู ชนแมว/สุนัข และชนนก อาจปนปลอมในขั้นตอนการเก็บเกี่ยว การตากแห้ง การนวดที่ไม่มีการป้องกัน การเหยียบย่ำของสัตว์ ทำให้ชนสัตว์ร่วงหล่นลง เมื่อนำมาผลิตเป็นชาสมุนไพรจึงตรวจพบชนสัตว์ หรือชนสัตว์อาจมีปลอมปนในสถานที่เก็บชาสมุนไพรอยู่แล้ว การตรวจพบชนหนูเกิน 2 เส้น นอกจากจะทำให้ไม่ผ่านเกณฑ์ DAL ยังบ่งชี้ถึงสภาพที่ไม่ถูกสุขลักษณะหรือการใช้วัตถุดิบคุณภาพต่ำ รวมทั้งการป้องกันหรือการจัดการในโรงเรือนหรือโรงเก็บไม่ดีพอ ซึ่งหนูจะก่อให้เกิดความไม่สะอาดจากสิ่งขับถ่ายและเป็นพาหะของโรคต่างๆ มาสู่คน เช่น กาฬโรค (Plague or black death) จากหนูสู่คนโดยหมัดหนู โรคไข้ดีซ่าน (Leptospirosis) เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่ปะปนมากับปัสสาวะหนู โรคท้องร่วง (Salmonellosis) จากเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ที่มีอยู่ในมูลหนู จากการตรวจพบชนสัตว์ในชาสมุนไพรชนิดผงมากกว่าชนิดสมุนไพรชนิดใบ เนื่องจากชาสมุนไพรชนิดผงมีการตัด สับหรือบด ให้มีขนาดเล็ก เมื่อมีการปลอมปนของชนสัตว์จึงทำให้ชนสัตว์ในชาสมุนไพรถูกตัด สับหรือบด เป็นชิ้นเล็ก ๆ กระจายในตัวอย่างเป็นจำนวนมาก ดังนั้นเพื่อให้ได้ชาสมุนไพรที่มีคุณภาพ ผู้ผลิตควรปฏิบัติตาม GMPs พื้นฐานที่เหมาะสม เช่น โรงงานผลิตมีสุขาภิบาลที่ดี มีมาตรการป้องกันแมลงและสัตว์พาหะภายในและภายนอกโรงงานที่เหมาะสม รวมถึงควรมีระบบควบคุมสุขลักษณะส่วนบุคคลที่ดีให้กับผู้เกี่ยวข้องในการผลิต เพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนของสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็กน้ำหนักเบา (light filth) เหล่านี้

ผลการหาค่าความสัมพันธ์ (ความแตกต่าง) ทางสถิติของตัวอย่างชาสมุนไพร 2 ชนิด ที่ผลิตในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศ พบสิ่งแปลกปลอมที่ทำให้ไม่ผ่านเกณฑ์ข้อกำหนด DAL คือ ชิ้นส่วนแมลงเกิน 300 ชิ้น หรือชนหนูเกิน 2 เส้น โดยใช้ไคสแควร์ (χ^2 -test) พบชาสมุนไพรในประเทศตรวจสิ่งแปลกปลอมมากกว่าชาสมุนไพรนำเข้า อาจเพราะชานำเข้ามีการตรวจคุณภาพก่อนที่ส่งออก ส่วนชาสมุนไพรประเทศไทยไม่มีข้อกำหนดคุณภาพด้านสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็กน้ำหนักเบา (light filth) จึงตรวจพบสิ่งแปลกปลอมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยชิ้นส่วนแมลงมาจากแมลงที่กัดกินส่วนใบ ยอด ดอก และผลอ่อนของพืชเป็นอาหาร^(16, 17, 18)

ถึงแม้ว่าขณะนี้ยังไม่มีเกณฑ์ตัดสินคุณภาพด้านสิ่งแปลกปลอมประเภท light filth ในชาสมุนไพร ผู้ผลิต ผู้ส่งออกและหน่วยงานที่ทำหน้าที่กำกับดูแลและควบคุมผลผลิตทางการเกษตรของภาครัฐ จะต้องเข้มงวดยิ่งขึ้นในการป้องกันและควบคุมแมลง ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปเป็นแนวทางประเมินคุณภาพชาสมุนไพร และรวบรวมเป็นข้อมูลเบื้องต้น สำหรับเผยแพร่ให้แก่ผู้ผลิตและผู้ส่งออกชาสมุนไพร ให้นำไปแก้ไข ปรับปรุงสุขลักษณะการผลิต เพื่อยกระดับคุณภาพผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพดีสม่ำเสมอ ให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังสามารถนำไปเป็นแนวทางในการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อรวบรวมเป็นข้อมูลในการจัดทำเกณฑ์มาตรฐานตัดสินคุณภาพของชาสมุนไพรในอนาคต

สรุป

การตรวจพบชิ้นส่วนแมลง หรือชนหนูในผลิตภัณฑ์ชาสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ทำให้ไม่ผ่านเกณฑ์ DAL ที่นำมาใช้ประเมินคุณภาพชาสมุนไพร โดยชิ้นส่วนแมลงและชนสัตว์ อาจปนเปื้อนตั้งแต่การปลูก กระบวนการผลิต ตลอดจนการบรรจุและการเก็บรักษาที่ไม่ได้มาตรฐาน การป้องกันหรือลดจำนวนสิ่งแปลกปลอมต้องมีการควบคุมทุกขั้นตอน ตั้งแต่การปลูกชาต้องมีการป้องกัน ควบคุม และกำจัดแมลงศัตรูต้นชา ขั้นตอนการผลิตและการเก็บรักษาต้องปฏิบัติอย่างถูกสุขลักษณะ และควรปฏิบัติตาม GMPs พื้นฐานที่เหมาะสม เช่น มีสุขาภิบาลโรงงานผลิตที่ดี มีมาตรการ

ป้องกันแมลงและสัตว์พาหะ ภายในและภายนอกโรงงานที่เหมาะสม รวมถึงควรมีระบบควบคุมสุขลักษณะส่วนบุคคลที่ดีให้กับผู้เกี่ยวข้องในการผลิต เพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนของสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็กน้ำหนักเบา (light filth) ข้อมูลจากการศึกษาผู้ผลิตสามารถนำไปควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ให้ได้มาตรฐาน และหน่วยงานที่มีหน้าที่รับผิดชอบนำไปใช้เป็นแนวทางกำหนดเกณฑ์คุณภาพชาสมุนไพรในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. กองควบคุมอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. แนวทางการพิจารณาอาหารประเภท “ชาสมุนไพร” [ออนไลน์]. 2549; [สืบค้น 4 ม.ค. 2564]; [9 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : <http://food.fda.moph.go.th/Rules/dataRules/3-HerbalTea.pdf>.
2. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 280 (พ.ศ. 2547) เรื่อง ชาสมุนไพร. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 121 ตอนพิเศษ 82 ง (วันที่ 26 กรกฎาคม 2547). หน้า 3.
3. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง กำหนดรายชื่อพืชหรือส่วนของพืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับชาสมุนไพร. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 127 ตอนพิเศษ 28 ง (วันที่ 2 มีนาคม 2553). หน้า 12.
4. อนงค์ ศรีโสภ, กาญจนา วงศ์กระจ่าง. การพัฒนาสูตรชาสมุนไพรใบหม่อนผสมสมุนไพรให้กลิ่นหอมที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์กลูโคซิเดส. Thai Journal of Science and Technology 2563; 9(2): 218-29.
5. ภาวดี ช่วยเจริญ. ชาสมุนไพร ทางเลือกของการดื่มชา. [ออนไลน์]. 2558; [สืบค้น 4 ม.ค. 2564]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : <http://research-hcu.hcu.ac.th/wp-content/uploads/2015/02/ชาสมุนไพร-ทางเลือกของการดื่มชา.pdf>.
6. สรรพคุณชาสมุนไพรไทย. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 4 ม.ค. 2564]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : https://www.tungsong.com/samunprai/Interest/Interest_3.html.
7. ประเภทของชา – มหัทศจรยชา. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 12 ม.ค. 2564]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : <https://sites.google.com/site/chamhaserry/-aaiaai>.
8. ประชาชาติธุรกิจออนไลน์. ไทยติดโผผลิตชามากที่สุดอันดับ 4 ของโลก. [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 12 ม.ค. 2564]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : <https://www.prachachat.net/economy/news-291213>.
9. กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ. ตลาดชาและผลิตภัณฑ์ชาของไทย. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 15 ม.ค. 2564]; [7 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : <https://api.dtn.go.th/files/v3/5f48d4a1ef414051e32f1a8e/download>.
10. TNN Online. รัฐมั่นใจศักยภาพชาไทยยังไปต่อได้อีกไกล. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 15 ม.ค. 2564]; [5 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : <https://www.tnnthailand.com/news/local/54909>.
11. สำนักงานส่งเสริมการค้าในต่างประเทศ ณ นครลอสแอนเจลิส. สินค้าสมุนไพรในตลาดสหรัฐ. [ออนไลน์]. 2560; [สืบค้น 25 ม.ค. 2564]; [13 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : <https://www.thaitradeusa.com/home/?p=22709>.
12. Food defect action levels. In : U.S. Food and Drug. Food defect levels handbook. [online]. 2018; [cited 2021 Jan 25]; [16 screens]. Available from : URL : <https://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm056174.htm>.

13. Whitlock LL, Chapter editor. Chapter 16, Extraneous materials : isolation. In : Latimer GW, editor. Official method of analysis of AOAC international. 21st ed. Maryland : AOAC International; 2019. p. 1-6, 30-31.
14. Gentry JW, Harris KL. Microanalytical entomology for food sanitation control. Florida : LithoGraphics Almonte Springs; 1991.
15. สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน). การผลิตสมุนไพรชนิดดี. [ออนไลน์]. 2560; [สืบค้น 19 ม.ค. 2564]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : <https://www.hrdi.or.th/articles/Detail/27>.
16. SV Group – Online Farmer’s Assistant (ผู้ช่วยเกษตรกรออนไลน์). เพลี้ยอ่อน. [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 29 ม.ค. 2564]; [5 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : <https://www.svggroup.co.th/blog/เพลี้ยอ่อน>.
17. SV Group – Online Farmer’s Assistant (ผู้ช่วยเกษตรกรออนไลน์). 5 อันดับเพลี้ยสร้างความเสียหาย. [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 19 ม.ค. 2564]; [14 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : <https://www.svggroup.co.th/blog/5อันดับเพลี้ยสร้างความ>.
18. รักบ้านเกิด.คอม. เพลี้ยหอย (Scale Insects) | รักบ้านเกิด. [ออนไลน์]. 2558; [สืบค้น 29 ม.ค. 2564]; [5 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : <https://rakbankerd.com/agriculture/page.php?id=8557&s=tblplant>.
19. SV Group – Online Farmer’s Assistant (ผู้ช่วยเกษตรกรออนไลน์). ไรภัยร้ายศัตรูพืช. [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 29 ม.ค. 2564]; [9 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL : <https://www.svggroup.co.th/blog/ไรภัยร้ายศัตรูพืช>.
20. พรทิพย์ วิสารทานนท์, อัจฉรา เพชรโชติ. เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรการควบคุมศัตรูผลผลิตผลเกษตร เรื่อง แมลงศัตรูผลผลิตผลเกษตรและแมลงศัตรูธรรมชาติ. วันที่ 9 – 11 กรกฎาคม 2551. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์; 2551.

Quality of Herbal Tea from Light Filth Assessment

Kuntong Pednog and Kokeiat Sarttarin

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 1100, Thailand

ABSTRACT Herbal tea is a very popular drink. Most of them do not contain caffeine, so they are suitable for the elderly. However, herbal tea has no quality requirements for light filth such as insects, insect fragments and animal hairs, which are indicated as nasty contaminants and poor hygiene production. To assess the quality of herbal tea this study uses the Defect Action Levels (DAL) requirements for Oregano crushed products of the Department of Health and Human Services, the US FDA as a guideline for examination of the light filth in herbal tea. 100 samples were divided into leaf type and powder type, containing 50 samples each type. Results under a microscope light filth was found in every sample. Herbal tea leaves and powder were found nonconformance to the DAL criteria in the number of 33 and 44 samples, accounting for 66% and 88% respectively. Although there is no regulation to determine the quality of herbal tea on light filth, but the manufacturers and the exporters should strengthen on good manufacturing practices (GMPs) on processing in every step, in order to raise the quality of the products with good and consistency to the acceptability of consumers.

Keywords: Quality assessment, Herbal tea, Light filth

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	Supakit Sirilak	Phichet Banyati
	Ballang Uppapong	Piya Sirilak
Technical Advisor	Pimjai Naigowit	Sumol Pavitranon
	Panadda Silva	Duanthanorm Promkhatkaew
	Busarawan Sriwanthana	
Editor	Apiwat Tawatsin	
Assistant Editor	Prapai Wongsinkongman	Benjawan Phetsuksiri
	Siripakorn Sangkitporn	
Editorial Board	Pilaipan Puthavathana	Siriraj Hospital, Mahidol University
	Prasert Auewarakul	Siriraj Hospital, Mahidol University
	Danai Tiwaweche	Naresuan University
	Suwantha Charunut	Huachiew Chalermprakiet University
	Salakchit Chutipongvivate	The Association of Medical Technologists of Thailand
	Padet Siriyasatien	Chulalongkorn University
	Pornpimol Kongtip	Mahidol University
	Srisurang Tantimavanich	Mahidol University
	Sunee Sirivichayakul	Chulalongkorn University
	Nuanchawee Wetprasit	Ramkhamhaeng University
	Chanitra Thuwajit	Mahidol University
	Pintip Pongpech	Retired Government official
	Usavadee Thavara	Retired Government official
	Suthon Vongsheree	Retired Government official
	Wichuda Jariyapan	Retired Government official
	Supanee Duangteraprecha	Retired Government official
	Wantana Paveenkittiporn	Department of Medical Sciences
	Piyada Wangroongsarb	Department of Medical Sciences
Administration	Numfon Noiprasert	Department of Medical Sciences
	Prasan Julwong	Department of Medical Sciences
	Aphimon Jiraphongsathorn	Department of Medical Sciences
	Navy Srivarom	Department of Medical Sciences
	Pawinee Sukcharoen	Department of Medical Sciences
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	Thanaaroonkarnpim Co., Ltd.	
	457/6-7 Phra Sumen Road, Bangkok 10200	
	Tel. 0-2282-6033-4	



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

เปิดใจ ใฝ่รู้ คู่คุณธรรม นำหลักวิชาการ มาตรฐานสากล



<https://bit.ly/BullDmsc>