

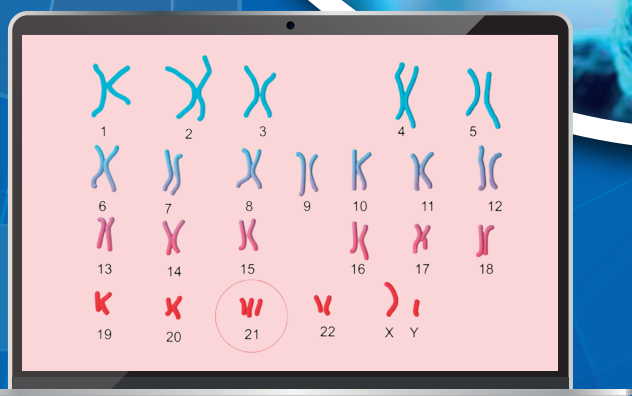
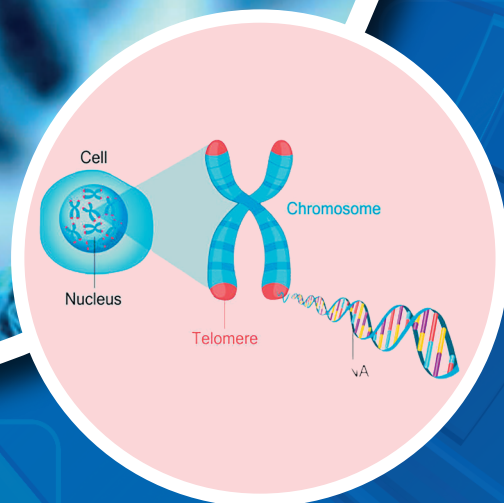
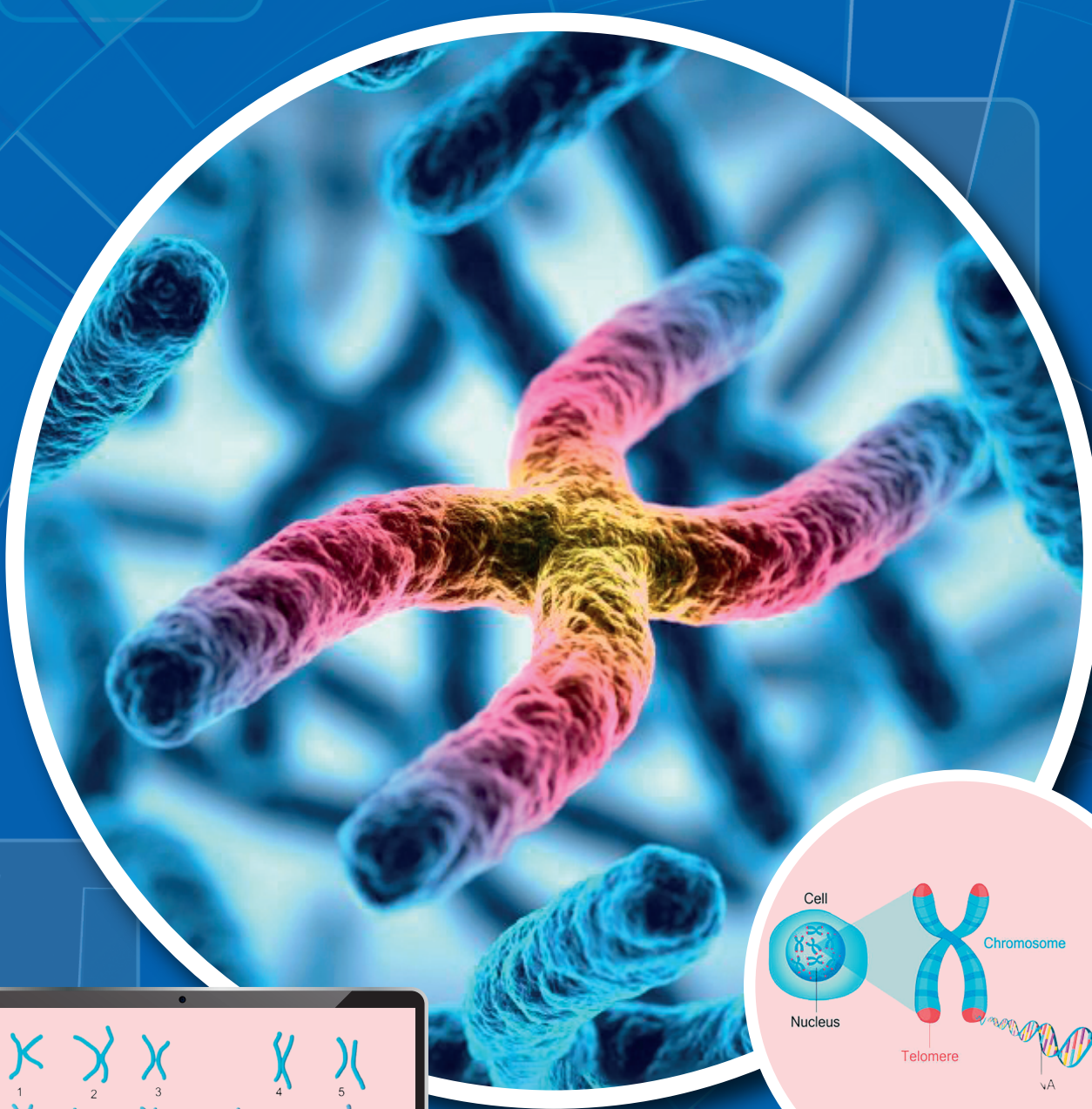


กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

วารสาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 64 ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม 2565 • Vol. 64 No. 1 January - March 2022



ISSN 0125-684X

E-ISSN 2697-4525

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข	
ที่ปรึกษาด้านบริหาร	นพ.ศุภกิจ ศิริลักษณ์	นพ.พิเชฐ บัญญัติ
	นพ.บัลลังก์ อุปพงษ์	นพ.ปิยะ ศิริลักษณ์
ที่ปรึกษาด้านวิชาการ	นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท	ดร.สุมล ปวีตรานนท์
	ดร.ปนัดดา ชิลวา	ดร.เดือนถนนอม พรหมชาติแก้ว
	ดร.บุษราวรรณ ศรีวรรณะ	
บรรณาธิการบริหาร	ดร.ประไพ วงศ์สินคณม้น	
บรรณาธิการ	ดร.อภิวัฏ ธวัชสิน	
รองบรรณาธิการ	นางสิริภากร แสงกิจพร	ดร.อุรุยากร จันทร์แสง
	ดร.นวลจันทร์ วิจิษณ์จินดา	
คณะบรรณาธิการ	ศ.เกียรติคุณ ดร.ไพโรจน์ พุฒินะ	มหาวิทยาลัยมหิดล
	ศ.ดร.นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล	มหาวิทยาลัยมหิดล
	ดร.ดนัย ทิวาเวช	มหาวิทยาลัยนเรศวร
	ภญ.สุวรรณา จารุสุข	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
	ศ.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
	ศ.ดร.พรพิมล กองทิพย์	มหาวิทยาลัยมหิดล
	รศ.ดร.ศรีสุรางค์ ตันติมาวานิช	มหาวิทยาลัยมหิดล
	ดร.สุณี ศิริวิชยกุล	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
	รศ.ดร.ภญ.ชนิตรา ธวัจจิตต์	มหาวิทยาลัยมหิดล
	รศ.ดร.ภญ.พินทิพย์ พงษ์เพชร	นักวิชาการอิสระ
	ดร.สลักจิต ชูติพงษ์วิเวท	นักวิชาการอิสระ
	ดร.อุษาวดี ถาวระ	นักวิชาการอิสระ
	นายสุธน วงษ์ชีรี	นักวิชาการอิสระ
	นางวิชชุตา จริยะพันธุ์	นักวิชาการอิสระ
	ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา	นักวิชาการอิสระ
	รศ.ดร.นวลฉวี เวชประสิทธิ์	นักวิชาการอิสระ
	ดร.วันทนา ปวีณกิตติพร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
	ดร.ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ฝ่ายจัดการ	นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
	นางสาวประสาน จุลวงษ์	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
	นางสาวอภิมน จิรพงศ์ธร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
	นายนาวิ ศรีวรมย์	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
	นางสาวภาวณี สุขเจริญ	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 64 ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม 2565

Vol. 64 No. 1 January - March 2022

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดสำหรับกลุ่มอาการดาวน์และโครโมโซมผิดปกติที่พบบ่อย
โดยวิธี **Molecular Karyotyping** 1
สิริภากร แสงกิจพร ชเนนทร์ วนาภิรักษ์ อาริรัตน์ ขอไชย ชลดา ยอดทัพ สาวิตรี ดั่งเรือง
ณัฏชา ปาณะจันทน์ พัทธวรรณ นพพรพงศ์ อัจฉราพร คำบัว พัทธวรรณ บุญชู
และ สมชาย แสงกิจพร
- การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HIV-1 จากตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษซับ
โดยตรง ด้วยวิธี **real-time PCR** 14
วิโรจน์ พวงทับทิม รัชณีกร ใจเชื้อ นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา และ อาชวินทร์ ไรจนวิวัฒน์
- การพัฒนาและทดสอบสำหรับคัดกรองสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส
เพื่อค้นหาสารต้านมะเร็ง 25
ภาณุพันธ์ ปัญญาใจ ปฐมาพร ปรีกษากร พันธธิดา ดริยวง ฉัตรภรณ์ ใจมา และ ปณิดดา เทพอัศธร
- การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์
ตกค้างในไข่และผลิตภัณฑ์ 48
วีรวิทย์ วิทยานันท์ และ ธรณิศวรร ไซมมงคล

บทความทั่วไป

- เว็บไซต์และแอปพลิเคชันการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการของสำนักยา
และวัตถุเสพติด 67
ศิริพร เหล่ามานะเจริญ มาศวลัย ลิขิตธนเศรษฐ์ และ อังคณา กริชพิทักษ์เงิน

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 64 ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม 2565

Vol. 64 No. 1 January - March 2022

CONTENTS

Page

Original Articles

- Prenatal Diagnosis of Down Syndrome and Common Chromosomal Disorders Using Molecular Karyotyping** 1

Siripakorn Sangkitporn, Chanane Wanapirak, Areerat Khorchai, Chonlada Yodtup, Sawitree Duangruang, Natcha Panajamnong, Phatcharaphon Nopprang, Acharaporn Dambua, Patcharaporn Boonchu, and Somchai Sangkitporn

- HIV-1 Diagnosis from Direct Dried Blood Spot Sample Using real-time PCR** 14

Wiroj Puangtabtim, Ratchaneekorn Jaisue, Nuanjun Wichukchinda, and Archawin Rojanawiwat

- Development of Tyrosine Kinase Inhibitor Screening Assay for Anti-cancer Agents** 25

Parnuphan Panyajai, Patamaporn Pruksakorn, Pantida Treeyoung, Chattraporn Jaima, and Panadda Dhepakson

- Method Development and Validation for the Determination of Fipronil and Its Metabolite Residues in Eggs and Products** 48

Weerawut Wittayanan and Thoranit Chaimongkol

General Articles

- Proficiency Testing Website and Application of the Bureau of Drug and Narcotic** 67

Siriphorn Laomanacharoen, Masvalai Likitthanasrate, and Angkana Kritpitakngoen



บรรณาธิการแถลง



วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ฉบับที่ 1 ปีที่ 64 พุทธศักราช 2565 ซึ่งอยู่ในช่วงวันคล้ายวันสถาปนา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ครบรอบ 80 ปี ในวันที่ 10 มีนาคม 2565 ดังนั้นจึงได้มีการเปลี่ยนโลโก้หน้าปกของวารสาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เพื่อเป็นการเฉลิมฉลองวาระสำคัญนี้ทั้ง 4 ฉบับ ตลอดปี 2565 นอกจากนี้ยังได้มีการออกแบบ หน้าปกให้สอดคล้องกับวันดาวน์ซินโดรมโลก (World Down Syndrome Day) ในวันที่ 21 มีนาคม ของทุกปี ที่ตั้งขึ้นโดย Down Syndrome International หรือ (DSI) ซึ่งเป็นองค์กรที่มีจุดประสงค์เพื่อการพัฒนาชีวิตของผู้ที่เป็น ดาวน์ซินโดรมซึ่งเกิดจากการมีโครโมโซมแท่งที่ 21 เกินมาเป็น 3 แท่ง รวมทั้งส่งเสริมให้เกิดความเข้าใจ การยอมรับ และเกิดความเท่าเทียมกันในสังคม นอกจากนี้ยังได้มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของการนำเสนอบทความในฉบับแบบใหม่ โดยการแบ่งข้อความเป็นแบบหน้าละ 2 คอลัมน์ เพื่อให้ผู้อ่านสามารถอ่านได้ง่ายสบายตามากขึ้นมากกว่าแบบเดิม หวังว่าผู้อ่านจะสามารถสังเกตเห็นความแตกต่างเหล่านี้ได้

ในฉบับนี้ยังคงมีเนื้อหาบทความวิชาการที่ให้ความรู้และน่าสนใจหลายเรื่อง ได้แก่ การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด สำหรับกลุ่มอาการดาวน์และโครโมโซมผิดปกติที่พบบ่อยโดยวิธี Molecular Karyotyping การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HIV-1 จากตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษซับโดยตรงด้วยวิธี real-time PCR การพัฒนาระบบทดสอบสำหรับ คัดกรองสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนสเพื่อค้นหาสารต้านมะเร็ง การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของ วิธีวิเคราะห์สารฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์ตกค้างในไข่และผลิตภัณฑ์ และ เว็บไซต์และแอปพลิเคชันการทดสอบความชำนาญ ทางห้องปฏิบัติการของสำนักยาและวัตถุเสพติด

กองบรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบคุณผู้สนับสนุนทุกท่านที่ส่งบทความมาให้พิจารณา ตีพิมพ์เผยแพร่องค์ความรู้และงานวิจัย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปฏิบัติงานด้านการพัฒนาวิทยาศาสตร์การแพทย์ และสาธารณสุขของประเทศ ขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านในการพิจารณาบทความ (peer review) ที่ให้ข้อเสนอแนะ ในการปรับปรุงแก้ไขบทความวิจัยต่าง ๆ ให้ความถูกต้องทางวิชาการและอ่านได้เข้าใจง่ายขึ้น และขอขอบพระคุณทุกท่าน ที่มีส่วนในการจัดทำวารสารฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี กองบรรณาธิการหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวารสารฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ สำหรับผู้อ่านทุกท่านในการเสริมสร้างองค์ความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์และสาธารณสุข และโปรดติดตามความรู้ และงานวิจัยจากวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ฉบับต่อไป ซึ่งจะเผยแพร่ภายในเดือนมิถุนายน 2565

ดร.อภิวัฏ ธวัชสิน

บรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คำแนะนำสำหรับผู้นิพนธ์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์รับตีพิมพ์เผยแพร่บทความ เพื่อสนับสนุนและส่งเสริมการสร้างสรรค์ความรู้ใหม่ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่เกี่ยวกับชีววัตถุ เครื่องมือแพทย์ เครื่องสำอาง ยาที่เป็นเภสัชเคมีภัณฑ์ อาหารและเครื่องดื่ม สมุนไพร ยาเสพติด วัตถุอันตราย รังสี โรคติดต่อ โรคไม่ติดต่อ พะหะนำโรค การประเมินความเสี่ยง การวิจัยทางคลินิก ระบบบริหารจัดการคุณภาพ และอื่น ๆ โดยกำหนดตีพิมพ์วารสารปีละ 4 ฉบับ เป็นรายไตรมาส ได้แก่ 1) ฉบับเดือนมกราคม-มีนาคม 2) ฉบับเดือนเมษายน-มิถุนายน 3) ฉบับเดือนกรกฎาคม-กันยายน และ 4) ฉบับเดือนตุลาคม-ธันวาคม

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เริ่มเผยแพร่ทางระบบออนไลน์เท่านั้น ตั้งแต่ฉบับเดือนตุลาคม-ธันวาคม 2562 เป็นต้นไป

ประเภทของบทความ

บทความสามารถเขียนได้ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ โดยแบ่งบทความออกเป็นประเภทต่าง ๆ ดังนี้

1. นิพนธ์ต้นฉบับ

เป็นรายงานผลการศึกษาวิจัย พัฒนาเทคโนโลยี หรือพัฒนาระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการที่มีการวางรูปแบบ และดำเนินการศึกษาวิจัยพัฒนาตลอดจนวิเคราะห์ข้อมูลอย่างถูกต้องตามหลักวิชาการ ประกอบด้วย ชื่อเรื่อง ชื่อเรื่องโดยย่อ ชื่อผู้นิพนธ์พร้อมสังกัด บทคัดย่อ คำสำคัญ บทนำ วัสดุและวิธีการ ผล วิจัย วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 25 หน้าขนาดกระดาษ A4

2. รายงานจากห้องปฏิบัติการ

เป็นรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่มีผู้นำตัวอย่างมาส่งตรวจ หรือรายงานผลการดำเนินงานที่เป็นงานประจำ ประกอบด้วย ชื่อเรื่อง ชื่อเรื่องโดยย่อ ชื่อผู้นิพนธ์พร้อมสังกัด บทคัดย่อ คำสำคัญ บทนำ วัสดุและวิธีการ ผล วิจัย วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 25 หน้าขนาดกระดาษ A4

3. บทความปริทัศน์

เป็นบทความที่ได้จากการทบทวนหรือรวบรวมความรู้วิชาการเรื่องใดเรื่องหนึ่งจากตำรา วารสารวิชาการ หรือหนังสือต่าง ๆ ทั้งในและต่างประเทศ นำมาวิเคราะห์วิจารณ์ หรือเปรียบเทียบ เพื่อให้ได้บทความใหม่ที่มีความเห็นของผู้นิพนธ์และทำให้เกิดความชัดเจนในเรื่องนั้น ประกอบด้วย ชื่อเรื่อง ชื่อเรื่องโดยย่อ

ชื่อผู้พิมพ์พร้อมสังกัด บทคัดย่อ คำสำคัญ บทนำ วิธีการสืบค้นข้อมูล เนื้อหา วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 20 หน้าขนาดกระดาษ A4

4. บทความทั่วไป

เป็นบทความทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวกับการพัฒนาระบบงานด้านการแพทย์และสาธารณสุข เช่น รายงานการพัฒนาระบบสนับสนุนการปฏิบัติงาน การพัฒนาระบบเทคโนโลยีสารสนเทศ หรือการพัฒนา ระบบบริหารจัดการคุณภาพตามมาตรฐานสากล เป็นต้น ประกอบด้วย ชื่อเรื่อง ชื่อเรื่องโดยย่อ ชื่อผู้พิมพ์ พร้อมสังกัด บทคัดย่อ คำสำคัญ บทนำ วัสดุและวิธีการ ผล วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสาร อ้างอิง ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 15 หน้าขนาดกระดาษ A4

5. บทความพิเศษ

เป็นบทความที่เป็นความรู้หรือข้อคิดเห็นทั่วไป เกี่ยวกับสถานการณ์ปัจจุบันที่น่าสนใจทางการแพทย์ และสาธารณสุขในระดับประเทศหรือระดับนานาชาติ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการกิจที่เกี่ยวข้องประกอบด้วย ชื่อเรื่อง ชื่อเรื่องโดยย่อ ชื่อผู้พิมพ์พร้อมสังกัด บทคัดย่อ คำสำคัญ บทนำ เนื้อหา วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 15 หน้าขนาดกระดาษ A4

6. กรณีศึกษา

เป็นรายงานเกี่ยวกับการสอบสวนโรคในกลุ่มตัวอย่างขนาดเล็ก หรือการวินิจฉัยผู้ป่วยรายที่น่าสนใจ ที่มีการตรวจทางห้องปฏิบัติการร่วมด้วย ที่อาจอยู่ภายใต้ตัวแปรที่ควบคุมได้ หรือสภาพแวดล้อมที่ไม่สามารถ ควบคุมได้ ประกอบด้วย ชื่อเรื่อง ชื่อเรื่องโดยย่อ ชื่อผู้พิมพ์พร้อมสังกัด บทคัดย่อ คำสำคัญ บทนำ วัสดุ และวิธีการ ผล วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 10 หน้า ขนาดกระดาษ A4

7. จดหมายถึงบรรณาธิการ

เป็นบทความที่ผู้อ่านวารสารกรรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เขียนถึงบรรณาธิการหรือเจ้าของบทความ ที่ตีพิมพ์ในวารสารฯ แล้ว ทั้งนี้เพื่อเสนอแนะหรือแสดงข้อคิดเห็นเกี่ยวกับวารสารฯ หรือบทความนั้น ๆ

8. บทความวิจัยอย่างสั้น

เป็นรายงานวิจัยที่ดำเนินการแล้วเสร็จซึ่งมีประเด็นการศึกษาไม่มาก แต่มีรายละเอียดครบถ้วน ตามหลักเกณฑ์ของงานวิจัย หรือเป็นรายงานการศึกษาวิจัยอย่างย่อโดยอาจเป็นข้อมูลที่ศึกษาเพิ่มเติมจาก รายงานการศึกษาวิจัยที่ได้เคยตีพิมพ์แล้ว หรืออาจเป็นการรายงานผลการศึกษาบางส่วนที่อยู่ในความสนใจ

ของสาธารณะหรือตอบปัญหาที่เกิดขึ้นในขณะนั้น ประกอบด้วย ชื่อเรื่อง ชื่อเรื่องโดยย่อ ชื่อผู้พิมพ์ พร้อมสังกัด บทคัดย่อ (ไม่เกิน 100 คำ) คำสำคัญ บทนำ (อย่างย่อ) วัสดุและวิธีการ (โดยย่อ) ผล วิเคราะห์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 10 หน้าขนาดกระดาษ A4 ทั้งนี้ตาราง และ/หรือภาพรวมกันมีจำนวนทั้งหมดไม่เกิน 2 ตาราง/ภาพ

การพิจารณาบทความ

บทความทุกเรื่องที่ผู้พิมพ์เสนอขอรับตีพิมพ์ต้องไม่เคยตีพิมพ์ หรือกำลังตีพิมพ์ในวารสารอื่น คณะบรรณาธิการที่ได้รับมอบหมายจะตรวจสอบความสมบูรณ์ของบทความในเบื้องต้น ก่อนส่งพิจารณาตรวจสอบ แบบไม่เปิดเผยตัวตน (double-blinded peer review) จากผู้เชี่ยวชาญในสาขาที่เกี่ยวข้อง อย่างน้อย 2 คน โดยบรรณาธิการเป็นผู้พิจารณาคัดเลือกผู้เชี่ยวชาญ และหากจำเป็นอาจคัดเลือกผู้เชี่ยวชาญคนที่ 3 พิจารณาบทความบทความเพิ่มเติม บรรณาธิการหรือรองบรรณาธิการเป็นผู้พิจารณาคำแนะนำของผู้เชี่ยวชาญ ทั้งหมด และแจ้งผลการพิจารณาแก่ผู้พิมพ์ หลังจากผู้พิมพ์แก้ไขอาจส่งให้ผู้เชี่ยวชาญพิจารณาตรวจสอบอีกครั้ง โดยบรรณาธิการเป็นผู้ตรวจสอบบทความขั้นสุดท้ายก่อนส่งตีพิมพ์ ซึ่งกองบรรณาธิการ ขอสงวนสิทธิ์ ในการตรวจแก้ไขต้นฉบับและพิจารณาตีพิมพ์ตามลำดับก่อนหลัง

ความรับผิดชอบ

บทความที่ตีพิมพ์ในวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถือเป็นผลงานทางวิชาการ และเป็น ความเห็นส่วนตัวของผู้พิมพ์ ไม่ใช่ความเห็นของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หรือกองบรรณาธิการ ผู้พิมพ์ ต้องรับผิดชอบต่อบทความของตน

จริยธรรมการวิจัย

กรณีบทความเป็นผลการศึกษาวิจัยในมนุษย์หรือใช้ตัวอย่างใด ๆ จากมนุษย์ การวิจัยนั้น ๆ ต้อง ผ่านการพิจารณาอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของหน่วยงาน และกรณีที่เป็นผล การศึกษาวิจัยที่ใช้สัตว์ทดลอง การวิจัยนั้น ๆ ต้องผ่านการพิจารณาอนุมัติจากคณะกรรมการเลี้ยงและ ใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของหน่วยงานเช่นกัน ถ้าหากไม่มี ต้องชี้แจงด้วย

การเตรียมต้นฉบับ

ภาษาที่ใช้คือ ภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ต้นฉบับภาษาไทย ควรใช้ภาษาไทยให้มากที่สุด คำศัพท์ เฉพาะหรือคำศัพท์ภาษาอังกฤษที่บัญญัติเป็นภาษาไทยแล้ว แต่ยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างแพร่หลาย หรือแปลแล้วเข้าใจยาก ให้ใส่ภาษาอังกฤษกำกับไว้ในวงเล็บ หรืออนุโลมให้ใช้ภาษาอังกฤษได้

ต้นฉบับพิมพ์ด้วยโปรแกรม Microsoft Word for Windows เท่านั้น และต้องไม่มี File protection ตั้งค่ากระดาษขนาด A4 ใช้ตัวอักษร TH Sarabun PSK ขนาด 16 ใส่เลขกำกับทุกหน้าและทุกบรรทัด โดยหน้าที่ 1 ประกอบด้วย ชื่อเรื่อง ชื่อและนามสกุลของผู้นิพนธ์ทั้งหมด หน่วยงานสังกัดของคณะผู้นิพนธ์ ชื่อเรื่องโดยย่อ (Running title) และชื่อพร้อมอีเมลผู้ประสานงาน (Corresponding author) กับคณะกรรมการ หน้าที่ 2 และ 3 เป็นบทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ตามลำดับ ความยาวไม่เกิน 300 คำ และระบุคำสำคัญท้ายบทคัดย่อ

1. ชื่อเรื่องและชื่อเรื่องโดยย่อ มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษที่ชัดเจนและตรงกับประเด็นการศึกษา ไม่ใช่คำย่อ
2. ชื่อผู้นิพนธ์และผู้ร่วมนิพนธ์ ระบุชื่อและนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ไม่ต้องระบุตำแหน่ง และคำนำหน้าชื่อ
3. ชื่อสังกัด/สถานที่ปฏิบัติงาน มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษของหน่วยงานที่ผู้นิพนธ์สังกัด/ปฏิบัติงาน หากมีผู้นิพนธ์หลายรายและอยู่คนละสังกัด ให้กำกับด้วยตัวเลขเป็นตัวยก
4. บทคัดย่อ ต้องเขียนทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ความยาวไม่เกิน 300 คำ เนื้อหาครอบคลุมที่มาของการศึกษา วัตถุประสงค์ ขอบเขตการศึกษา วิธีทำหรือวิธีการรวบรวมข้อมูลที่สำคัญโดยย่อ แสดงผลการศึกษาเฉพาะข้อมูลหลักที่สำคัญและสถิติที่ใช้ (ถ้าจำเป็น) รวมถึงหลักการหรือองค์ความรู้สำคัญที่พบใหม่
5. คำสำคัญ ระบุคำสำคัญทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษไม่เกิน 5 คำ
6. บทนำ ควรกล่าวถึงหลักการเหตุผล ปัญหาหรือสมมุติฐาน ที่นำไปสู่ความจำเป็นที่ต้องศึกษา รวมทั้งวัตถุประสงค์ของการศึกษา การอ้างอิงควรเลือกใช้เฉพาะเอกสารอ้างอิงที่สำคัญและเป็นปัจจุบัน
7. วัสดุและวิธีการ แสดงรายละเอียดทางวิชาการเป็นเชิงพรรณนาที่มากพอเพื่อผู้อ่านที่สนใจสามารถทำงานนี้ซ้ำได้ เช่น กลุ่มตัวอย่างหรือข้อมูลที่ศึกษาวิธีสุ่มเก็บตัวอย่างหรือข้อมูล วิธีวิเคราะห์ตัวอย่างหรือข้อมูล วิธีการคำนวณหรือวิเคราะห์ข้อมูล และสถิติที่ใช้ เป็นต้น ให้ระบุบริษัทและประเทศผู้ผลิตของน้ำยา สารเคมี เครื่องมือรวมถึงรุ่นของเครื่องมือ หรือสายพันธุ์ของจุลชีพในส่วนที่เกี่ยวข้องโดยละเอียด

ทั้งนี้ บทความการศึกษาในมนุษย์หรือใช้ตัวอย่างจากมนุษย์ หรือการศึกษาที่ใช้สัตว์ทดลองให้ระบุชื่อคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ หรือคณะกรรมการการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ที่อนุมัติให้ทำการศึกษา และหมายเลขอ้างอิงที่ได้รับอนุมัติ

8. ผล นำเสนอผลงานตามลำดับ หลีกเลี่ยงการใช้กราฟหรือภาพที่ไม่จำเป็น ถ้ามีตารางข้อมูล กราฟ หรือภาพให้เสนอพร้อมกับคำอธิบายที่มีเนื้อหาชัดเจนครบถ้วน และให้แยกออกจากเนื้อเรื่อง หน้าละ 1 รายการ โดยไม่ต้องใส่กรอบตารางหรือภาพที่ต้องการแสดง ภาพถ่าย (สีหรือขาวดำ) ที่มีความชัดเจนให้บันทึกภาพโดยใช้นามสกุล .jpg หากเป็นภาพวาดควรวาดบนกระดาษขาวอย่างดีด้วยหมึกดำลายเส้นคมและชัดเจน ระบุตำแหน่งที่ต้องการแสดงตารางหรือภาพไว้ในส่วนของเนื้อเรื่อง

9. **วิจารณ์** วิจารณ์สิ่งที่ค้นพบและควรเปรียบเทียบกับงานที่ผู้อื่นทำและเผยแพร่ไว้ก่อนหน้านี้แล้ว หรือวิเคราะห์และสรุปเปรียบเทียบกับสมมติฐานที่วางไว้ ว่าตรงหรือแตกต่างไปหรือไม่ อย่างไร เพราะเหตุใด ทั้งนี้ควรระวังไม่นำส่วนของผลมากล่าวซ้ำในส่วนนี้ หากจำเป็นต้องกล่าวถึงควรเขียนผลในภาพรวมที่สำคัญ และอาจเขียนถึงผลกระทบตามหลักวิชาการที่อาจเกิดขึ้นหรือการนำไปใช้ประโยชน์จากผลการศึกษาวิจัยนี้
10. **สรุป** เน้นสิ่งที่พบใหม่ที่สำคัญจากการศึกษานี้ และเชื่อมโยงการสรุปกับวัตถุประสงค์ ควรอภิปรายข้อจำกัด/ข้อบกพร่อง ข้อดีเด่น ซึ่งนำไปสู่ข้อเสนอแนะในเชิงนโยบาย ในทางการปฏิบัติ และในการวิจัยต่อไป
11. **กิตติกรรมประกาศ** ระบุผู้สนับสนุน และ/หรือแหล่งทุนสนับสนุนการวิจัย
12. **เอกสารอ้างอิง** การอ้างอิงเอกสารในเรื่องนี้ให้ใช้รูปแบบการอ้างอิงในแวนคูเวอร์ (Vancouver Citation Style) โดยใส่ตัวเลขตัวยก ในวงเล็บ วางไว้หลังข้อความหรือหลังชื่อบุคคล การเรียงลำดับเอกสารอ้างอิงเริ่มจาก “(1)” และเรียงเลขอื่น ๆ ต่อไปตามลำดับการอ้างอิงของเนื้อหา ส่วนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่องให้อ้างเฉพาะบทความที่ตีพิมพ์แล้วในสิ่งตีพิมพ์ปฐมภูมิเท่านั้น ผู้นิพนธ์ต้องรับผิดชอบในความถูกต้องของเอกสารอ้างอิง

การเขียนเอกสารอ้างอิง

การเขียนเอกสารอ้างอิงให้ใช้รูปแบบดังตัวอย่าง ผู้นิพนธ์ตั้งแต่ 1 ถึง 6 คน ให้ใส่ชื่อทุกคน ถ้ามีมากกว่า 6 คนให้ใส่ชื่อ 6 คนแรกตามด้วย และคณะ หรือ et al กรณีบทความไม่มีชื่อผู้นิพนธ์ให้ใช้ชื่อเอกสารแทนชื่อผู้นิพนธ์

1. การอ้างบทความวารสาร (Article in Journal)

วารสารภาษาไทย

ตัวอย่าง

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

วารสารภาษาอังกฤษ

ตัวอย่าง

Belshe RB, Coelingh K, Ambrose CS, Woo JC, Wu X. Efficacy of live attenuated influenza vaccine in children against influenza B viruses by lineage and antigenic similarity. Vaccine 2010; 28(9): 2149-56.

2. การอ้างอิงหนังสือหรือตำรา (Text/Guideline)

ตัวอย่าง

ธีระพร วุฒยวนิช, บรรณาธิการ. เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์. เชียงใหม่: คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2546.

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

3. การอ้างอิงเฉพาะบทในตำรา (Chapter in the text)

ตัวอย่าง

ทวีศักดิ์ แทนวันดี. การวินิจฉัยโรคตับจากไวรัสทางคลินิก. ใน: สิริฤกษ์ ทรงศิวิไล, บรรณาธิการ. ตับอักเสบจากไวรัส เล่ม 1. กรุงเทพฯ: บางกอกบล๊อค; 2543. หน้า 281-309.

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

4. การอ้างอิงกฎหมาย (Legal material)

ตัวอย่าง

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

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

5. การอ้างอิงสิ่งพิมพ์ขององค์กรหรือหน่วยงาน (Organization as author and publisher)

ตัวอย่าง

กรมสนับสนุนบริการสุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข. แผนยุทธศาสตร์การดำเนินงานสุขภาพภาคประชาชน. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2546.

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

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

6. การอ้างรายงานการสัมมนา/ประชุมวิชาการ (Conference paper/Conference Proceeding)

ตัวอย่าง

วิยะดา เจริญศิริวัฒน์. เอกสารการประชุมสัมมนาเฉลิมพระเกียรติเรื่อง การคัดกรองภาวะพร่องไทรอยด์ฮอร์โมนในทารกแรกเกิดเพื่อป้องกันปัญญาอ่อน. วันที่ 25 พฤศจิกายน 2542. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2542.

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDIN-FO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

7. การอ้างวิทยานิพนธ์ (Dissertation)

ตัวอย่าง

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

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

8. การอ้างสื่ออิเล็กทรอนิกส์ (Electronic material)

วารสารออนไลน์ (Journal on Internet)

ตัวอย่าง

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

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [serial online] 1995. Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1(1): [24 screens]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.

เว็บไซต์ (Website)

ตัวอย่าง

กรมควบคุมโรค. การป้องกันควบคุมโรคไข้หวัดนก Avian Influenza (Bird Flu). [ออนไลน์]. 2548; [สืบค้น 28 ก.ย. 2548]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://www.ddc.moph.go.th/Bird_Flu_main.html.

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

การส่งต้นฉบับและการตอบรับบทความทางออนไลน์

ส่งต้นฉบับไฟล์บทความ ตาราง ภาพ และหนังสืออ้างอิง ผ่านทางระบบออนไลน์ได้ทาง <http://webapp1.dmsc.moph.go.th/journals> ทั้งนี้ผู้นิพนธ์จะต้องสมัครเข้าเป็นสมาชิกในระบบก่อนดำเนินการส่งต้นฉบับ และจะได้รับการตอบรับอัตโนมัติเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการ

คณะกรรมการจะแจ้งผู้ประสานงาน (Corresponding author) ทราบทางอีเมลถึงการตอบรับ หรือปฏิเสธการตีพิมพ์บทความ

การตรวจทานต้นฉบับก่อนเผยแพร่

ผู้นิพนธ์ต้องตรวจพิสูจน์อักษรในลำดับสุดท้าย เพื่อให้ความเห็นชอบในความถูกต้องครบถ้วนของเนื้อหา

ปรับปรุง วันที่ 16 สิงหาคม 2562

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The Bulletin of the Department of Medical Sciences welcomes the medical sciences articles in the areas of biological products, medical devices, cosmetics, pharmaceutical products, food and beverage, medicinal plants, narcotic drugs, hazardous substances, radiation, communicable diseases, non-communicable diseases, vectors of diseases, risk assessment, clinical researches, quality management systems, etc. The Bulletin is quarterly published: 1) January–March, 2) April–June, 3) July–September, and 4) October–December. The manuscripts can be submitted in either Thai or English.

The Bulletin of the Department of Medical Sciences will be published online-only from the issue of October–December 2019 onwards.

Types of journal manuscripts

1. Original article

Original article is the report of a study, technology development, or laboratory quality system development describing research question, details of methods as well as interpretation of results with discussion of possible implications. The manuscript should contain a title, a running title, the authors' names with affiliations, an abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, conclusion, acknowledgements and references. The total length should not exceed 25 pages of A4 paper.

2. Laboratory findings

Laboratory findings are the report of the results of laboratory examinations. The manuscript should contain a title, a running title, the authors' names with affiliations, an abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, conclusion, acknowledgements and references. The total length should not exceed 25 pages of A4 paper.

3. Review article

Review article is an article that summarizes the previously published studies as well as the current state of understanding on certain topics aiming to analyze or compare the concepts and introduce some clear perspectives on that matter. The manuscript should contain a title, a running title, the authors' names with affiliations, an abstract, keywords, introduction, how to review, content, discussion, conclusion, acknowledgements and references. The total length should not exceed 20 pages of A4 paper.

4. General article

General article is a scientific report related to medical and public health system development such as operation support, information technology, quality management, etc. The manuscript should contain a title, a running title, the authors' names with affiliations, an abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, conclusion, acknowledgements and references. The total length should not exceed 15 pages of A4 paper.

5. Special article

Special article is a small article which cannot be categorized to types of articles mentioned above. It can be the author's opinions on any current or up-to-date issues. The manuscript should contain a title, a running title, the authors' names with affiliations, an abstract, keywords, introduction, content, discussion, conclusion, acknowledgements and references. The total length should not exceed 15 pages of A4 paper.

6. Case study

Case study is a report of study involving particular group or situation over a period of time in order to illustrate a principle. The manuscript should contain a title, a running title, the authors' names with affiliations, an abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, conclusion, acknowledgements and references. The total length should not exceed 10 pages of A4 paper.

7. Letter to the editor

Letter to the editor is correspondences from readers to the editor or the authors providing different opinions or suggestions of recently published articles.

8. Short communications

Short communications are short papers that present original and significant material for rapid dissemination. The manuscript should contain a title, a running title, the authors' names with affiliations, an abstract (limited to 100 words), keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, conclusion, acknowledgements and references. The total length should not exceed 10 pages of A4 paper with no more than 2 figures or tables, combined.

Publication process

Each article will be initially reviewed by the Editor and sent to at least 2 selected experts. The identities of both reviewers and authors throughout the review are concealed (double-blinded peer review). Comments from the experts will be considered by the Editor and sent to the author for revision. In some cases, more comments from the third expert is necessary. The editorial board reserves the right to edit any manuscripts for proper publication. The Editor will review the final draft of each article.

Responsibility

Articles published in this Bulletin represent the research activities or opinions of the authors, not the opinion of the editorial board or Department of Medical Sciences. The authors are responsible for its contents.

Research ethics

The clinical research and research involve human specimens must be approved by the Institutional Ethics Committee. The research that involves animals must be approved by the Institutional Animal Care and Use Committee.

Preparation of manuscripts

Both Thai and English manuscripts are acceptable. For Thai manuscript, the author should translate the English vocabulary to Thai as much as possible. In case of no official Thai words, having an English word in the parentheses is preferred. Manuscripts shall be prepared with Microsoft Word for Windows without file protection using 16-pt TH Sarabun PSK. Line numbers should be added on every page. The first page shall carry the title of the article, full names of authors with affiliations, a running title and corresponding author's email address. The second and third page shall carry an abstract both in Thai and English of no more than 250 words. Key words should be added after the abstract. The structure of original articles and laboratory findings should be in the order as following:

1. **Title (and running title):** The title should be short and represent the focus of the study and should not use abbreviations.
2. **Authors:** The full name of each author and email address of corresponding author should be submitted.
3. **Organization:** The organizational affiliation of each author should be in numerical order.

4. **Abstract:** The abstract should be written in both Thai and English, not exceed 250 words, and it should consist of rationales, objectives, methodology, and body of knowledge.
5. **Keywords:** Maximum of 5 keywords in both Thai (effective from the volume of October–December 2019 onwards) and English should be provided.
6. **Introduction:** The introduction should provide the hypothesis or the rationale for the study as well as the objective(s) of the study. Give only pertinent references.
7. **Materials and Methods:** Give the full technical information so that the experiments can be repeated such as group of sample/study, sampling methodology, analysis methodology, statistical analysis, if used, etc. The sources of all materials and apparatus or strains of microorganisms must be provided if they have the potential impact to the study results.

For the clinical research, or research involves human specimens or animals, name of the ethics committee(s) or institutional review board(s) as well as the number/ID of the approval(s) must be stated.

8. **Results:** Present the results as concisely as possible in logical sequence. Avoid unnecessary graphs and figures. The tabular data, graphs, or figures, if needed, should be provided with clear description. Each table or figure should be prepared and described on a separate file. An electronic image should be prepared as .jpg file.
9. **Discussion:** Discuss study findings and provide interpretation of the results. The results may be interpreted in relation to other relevant studies. It should not contain extensive repetition of the results sections. The impact or benefit from the study may be elaborated.
10. **Conclusion:** Emphasize the new and important aspects of the study. Link the conclusions with the goals of the study.
11. **Acknowledgement:** A single-paragraphed acknowledging contributors, helps and financial support received in completing the work.
12. **References:** Use Vancouver styled references. Provide superscript numeric figure in parentheses after referred phrase or referred name (use 1 for the first reference and 2, 3 respectively). Use the same number for the same reference. Never use abbreviation in references except the author's first name initial and the journal title.

Writing references:

1. Journal Article

Example:

Belshe RB, Coelingh K, Ambrose CS, Woo JC, Wu X. Efficacy of live attenuated influenza vaccine in children against influenza B viruses by lineage and antigenic similarity. *Vaccine* 2010; 28(9): 2149–56.

2. Text/Guideline

Example:

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

3. Chapter in the Text

Example:

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465–78.

4. Legal material

Example:

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

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

Example:

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

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

6. Citing Conference Papers/Conference Proceedings

Example:

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6–10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561–5.

7. Dissertation

Example:

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

8. Electronic material

Journal on Internet

Example:

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [serial online] 1995. Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1(1): [24 screens]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.

Website

Example:

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

Manuscripts submission

Register to submit article online at <http://webapp1.dmsc.moph.go.th/journals/>. All documents must be scanned and uploaded as attachments in the online submission system. All submissions will be acknowledged by the Editorial Board. Those unaccepted will also be notified. The Editorial Board reserves the right to edit any manuscripts for proper publication.

Final proof

The author should approve the final edited article in the process to confirm that he or she has read and concurred with of the whole content of the manuscript.

Revised date: August 16, 2019

Prenatal Diagnosis of Down Syndrome and Common Chromosomal Disorders Using Molecular Karyotyping

Siripakorn Sangkitporn,¹ Chanane Wanapirak,² Areerat Khorchai,³ Chonlada Yodtup,¹ Sawitree Duangruang,¹ Natcha Panajamnon,¹ Phatcharaphon Nopprang,¹ Acharaporn Dambua,¹ Patcharaporn Boonchu,¹ and Somchai Sangkitporn¹

¹Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

²Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

³The 50th Anniversary Mahavajiralongkorn Hospital, Ubon Ratchathani 34000, Thailand

ABSTRACT For the prevention and control of Down syndrome and other chromosomal disorders, laboratory procedures for prenatal diagnosis should be established for high-risk pregnancies. A rapid molecular karyotyping assay, BACs-on-Beads (BoBs™), has been developed for diagnosis of Down syndrome and common aneuploidies of chromosomes 13, 18, X and Y as well as nine microdeletion/microduplication syndromes. The study evaluated the performance of BoBs™ assay for prenatal diagnosis of Down syndrome and other chromosomal disorders in amniotic fluid samples (n = 1,004) obtained *via* amniocentesis between the 15th and 22th weeks of gestation in comparison with the gold standard conventional karyotyping. Interpretable results were obtained with BoBs™ assay in detection of 26 chromosome abnormalities comprising 23 aneuploidies (Down syndrome, n = 10; Edwards syndrome, n = 7; Klinefelter syndrome, n = 1; Patau syndrome, n = 1; Triple X syndrome, n = 1; and Turner syndrome n = 3) with 100% agreement with conventional karyotyping and three cases of microdeletion/microduplication syndromes [22q11.2 microdeletion (DiGeorge syndrome), n = 1 and 22q11.2 microduplication, n = 2] missed by conventional karyotyping. The assay has been implemented for prenatal diagnosis service at the National Institute of Health according to ISO 15189:2012. In conclusion, molecular BoBs™ assay provides a rapid and reliable method for detection of common aneuploidies and microdeletion/microduplication syndromes in uncultured prenatal samples and should be helpful in the prevention and control of Down syndrome and other chromosomal disorders in the country.

Keywords: Chromosomal disorders, Down syndrome, Microdeletion/microduplication syndromes, Molecular karyotyping, Prenatal diagnosis

Corresponding author E-mail: siripakorn.s@dmshc.mail.go.th

Received: 25 November 2021

Revised: 1 February 2022

Accepted: 28 February 2022

Introduction

Down syndrome is one of the most common genetic birth defects caused by presence of all or part of a third copy of chromosome 21. The World Health Organization (WHO) predicts Down syndrome prevalence to range from 1 in 1,000 to 1 in 1,100 live births worldwide.⁽¹⁾ Children with Down syndrome usually have a wide range of intellectual impairment accompanied by a variety of congenital anomalies and delayed growth, which require special care in monitoring and treatment of several physiological systems.⁽²⁻⁶⁾

The rate of live births with Down syndrome increases with maternal age: 0.61–1.46, 4.58, 15.7, and 33.50 per 1,000 births for mothers aged < 35, 35–39, 40–44, and 45–49 years, respectively,⁽⁷⁾ however, the majority of children with Down syndrome are born to mothers aged < 35.⁽⁸⁻¹⁰⁾ National public policies including additional financial and welfare support are recommended to provide adequate antenatal care for mothers and reduce economic burden of lifelong medical care for offspring with Down syndrome.⁽¹⁰⁾

Appropriate laboratory procedures for prenatal screening and diagnosis are required in programs for prevention and control of Down and other syndromes of chromosomal abnormalities. Screening tests should be carried out based on maternal age, ultrasound for measurement of nuchal translucency, serum assays and non-invasive prenatal tests.⁽¹¹⁻¹⁴⁾ Pregnant women with high risk of having fetus with Down and other chromosomal abnormality syndromes are usually offered prenatal diagnosis, which consists of fetal karyotyping to analyze numerical and structural changes of all observed chromosomes and is considered the

gold standard.⁽¹⁵⁾ The advantage of this type of karyotyping is that both imbalanced as well as balanced chromosome aberrations are detectable, but suffers from several disadvantages, such as requirement of specialized technique, lengthy duration (10–14 days) of cell culture, possibility of cell culture failure and limitation in detection of chromosome abnormalities ~5 Mb in length, e.g., microdeletion and microduplication.⁽¹⁶⁻²⁰⁾ The lengthy wait for laboratory results imposes high-risk mothers to stress and anxiety prior to genetic counseling and appropriate intervention measures.

Rapid aneuploidy diagnoses (RAD), such as bacterial artificial chromosomes (BACs)-on-Beads (BoBsTM), fluorescence in situ hybridization (FISH), multiplex ligation-dependent probe amplification and quantitative fluorescence polymerase chain reaction (QF-PCR), have been developed to detect common aneuploidies.^(16, 17, 21) In several countries, implementation of RAD services for all prenatal samples are considered a necessary requirement in optimization of prenatal services.⁽²²⁾ For instance, in the UK, RAD is recommended as a stand-alone approach in a Down syndrome screening program.^(17, 23)

A rapid molecular karyotyping BACs-on-Beads (BoBsTM) assay is a multiplex assay employing beads impregnated with different concentrations of two different fluorochromes to create an array of up to 100 different unique probes to measure DNA copy numbers at chromosome arm resolution, such as DNA gain or loss and genomic rearrangement.⁽²¹⁾ This molecular karyotyping assay has been developed to detect common aneuploidies of chromosomes 13, 18, 21, X and Y, as well as nine common

chromosomal microdeletions/microduplications responsible for Angelman, Cri du Chat, DiGeorge, Langer-Giedion, Miller-Dieker, Prader-Willi, Smith-Magenis, Williams-Beuren, and Wolf-Hirschhorn syndromes, selected based on their relatively high prevalence (1/2,000–1/300,000 population), significant morbidity/mortality, mild or unspecific ultrasound findings, strong genotypic and phenotypic correlation and changes typically too small to be detected by conventional karyotyping.^(24,25) The assay is accepted by European countries, Australia and New Zealand.^(26,27)

The Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand, in collaboration with the Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, has the goal of developing a molecular karyotyping service for rapid detection of Down syndrome in prenatal amniotic fluid samples. In this study, molecular karyotyping BACs-on-Beads (BoBs™) assay was evaluated as a potential rapid and reliable prenatal diagnosis for common aneuploidies of chromosomes 13, 18, 21, X and Y, as well as the nine common chromosomal microdeletions/microduplications. The findings should provide baseline data for development of a prevention and control program for syndromes associated with common chromosomal abnormalities present in the country.

Materials and Methods

Participants and sample collection

Amniotic fluid samples (n = 1,008; 3–5 mL) were obtained from pregnant mothers at 15–22 weeks of pregnancy attending an antenatal clinic, Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital,

Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, from August 2016 through October 2017. All subjects had undergone prenatal diagnosis by amniocentesis and chromosome study with an indication of high risk of having fetus with Down syndrome. All cases have been counseled and informed that amniotic fluid samples would be tested by using two techniques: the conventional one and the molecular karyotyping assay. The samples for the conventional method were sent to the cytogenetic unit of the Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, as usual. The others (3–5 mL of amniotic fluid samples) were stored and transported at 2–8°C within 7 days after collection to the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand.

The study protocol was approved by the Ethics committee, Faculty of Medicine, Chiang Mai University (approval no. 188/2559, research ID 3862, study code OBG-2559-03862). Prior written consent was obtained from all participants.

Molecular karyotyping protocol

DNA was extracted from amniotic fluid using a QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Germany), concentrated and purity determined by measurement of A260 nm:A280 nm (NanoDrop 1000 spectrophotometer; Thermo Scientific, USA). Molecular karyotyping was carried out using a Prenatal-BoBs™ BACs-on-Beads assay (Perkin Elmer, Finland) to detect aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X and Y and nine microdeletion/microduplication regions. In brief, genomic DNA samples and reference DNA (male and female) samples (Promega, USA)

were labeled with biotin, purified based on ultrafiltration (NucleoFast[®] 96 PCR; Macherey-Nagel GmbH & Co., Germany) and hybridized to BoBs[™] beads overnight at 52°C in a 96-well plate (Perkin Elmer, Finland), washed with wash buffer (Perkin Elmer, Finland), and then transferred to a 96-well filter plate (MultiScreen[®] HTS HV Sterile plate; Merck KGaA, Germany). The reactions were washed as described above, incubated at 37°C for 30 minutes with phycoerythrin-labeled streptavidin (Perkin Elmer, Finland), washed as described above, and then fluorescent signals were measured using a Luminex[™] 200 spectrofluorometer (Luminex Corp., USA) (λ_{532} nm excitation, λ_{575} nm emission). Molecular karyotyping results were analysed by BoBsoft 2.0 analysis software (Perkin Elmer, Finland) and reported as fluorescence ratio relative to both normal female and male reference DNA at each chromosome locus of interest, acceptance requiring a coefficient of variation (CV) less than 6%. A sample is defined as normal disomic when fluorescence ratio for a chromosome region has a value within the lower and upper threshold limits (mean fluorescence ratio ± 2 SD) and as having a deletion or duplication at a specific chromosomal locus when fluorescence ratio is below lower or above upper threshold, respectively.

Performance characteristics evaluation

Performance characteristics including accuracy and precision were evaluated. Accuracy is defined as degree of compliance with standard karyotyping method ($n = 1,004$) carried out at the cytogenetic unit of the Department of Anatomy, Faculty of Medicine,

Chiang Mai University. Precision of the assay is defined as between-run variation ($n = 44$) in fluorescence ratio of six chromosome loci (13C, 18C, 21C, 22q11.2 (DiGeorge syndrome, DGS), X and Y) compared to male and female DNA reference samples performed by three different operators in the same laboratory setting.

Statistical analysis

Primary output measure is concordance of any numerical, structural or submicroscopic chromosomal abnormalities between molecular karyotyping assay and conventional karyotyping. Data are presented as numbers and percentages. Maternal age and gestational age were expressed as median, range and interquartile range (IQR). Mean, standard deviation (SD) and percent coefficient of variation (CV) were used to estimate precision.

Results

Participant ages, gestation status and DNA samples

Participants ($n = 1,008$) had a median age of 36 years (range 15–48 years) with a median gestational age of 17 weeks (range 15–22 weeks). DNA concentration and A260 nm:A280 nm values of amniotic fluid samples were 9.7 ± 5.78 ng/ μ L and 2.0 ± 0.4 , respectively.

Molecular karyotyping assay

Molecular karyotyping assay gave conclusive results for 1,004 samples; failure in four samples was due to maternal cells contamination. Among the samples karyotyped by molecular assay, 978 (97.4%) were normal disomic, 23 (2.3%) aneuploidy and 3 (0.3%) microdeletion/microduplication (Table 1). As expected, Down

syndrome was the most common, followed by Edwards, Turner and 22q11.2 microduplication syndrome, while there was only one case each of DiGeorge, Klinefelter, Patau, and Triple X syndromes. For Patau, Edwards, Down and 22q11.2 microduplication syndromes, mean fluorescence ratios of chromosomes 13, 18, 21 and 22q11.2 marker, respectively, were above the upper threshold limit, whereas that of DGS marker in DiGeorge syndrome was below the lower threshold (Figures 1–3, Table 2).

Table 1 Molecular karyotyping assay was compared to conventional karyotyping of amniocentesis samples obtained from mothers attending the Antenatal Clinic, Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand (August 2016–October 2017).

Syndrome	Number of samples (%) (n = 1,004)	Maternal age (years)		Molecular karyotype	Conventional karyotype
		Median	Range/ IQR		
Normal, female	451 (44.9)	36	15–47/35–38	XX	46, XX
Normal, male	527 (52.5)	36	17–48/35–39	XY	46, XY
Down syndrome, female	2 (0.20)	34	30–38	XX,+21	47, XX,+21
Down syndrome, male	8 (0.8)	41	34–46/39–45	XY,+21	47, XY,+21
Edwards syndrome, female	1 (0.1)	38	38	XX,+18	47, XX,+18
Edwards syndrome, male	6 (0.6)	37	27–41/33–40	XY,+18	47, XY,+18
Patau syndrome, male	1 (0.1)	36	36	XY,+13	47, XY,+13
Turner syndrome	2 (0.2)	25	21–29	X	45, X
Mosaic Turner syndrome	1 (0.1)	36	36	X/XX	mos 45, X/46, XX (45%/55%)
Triple X syndrome	1 (0.1)	36	36	XXX	47, XXX
Klinefelter syndrome	1 (0.1)	45	45	XXY	47, XXY
DiGeorge syndrome, female	1 (0.1)	38	38	XX, del(22) (q11.2)	46, XX
22q11.2 microduplication syndrome, female	1 (0.1)	26	26	XX, dup(22) (q11.2q11.2)	46, XX
22q11.2 microduplication syndrome, male	1 (0.1)	27	27	XY, dup(22) (q11.2 q11.2)	46, XY

IQR, Interquartile range

mos, mosaic

del, deletion

dup, duplication

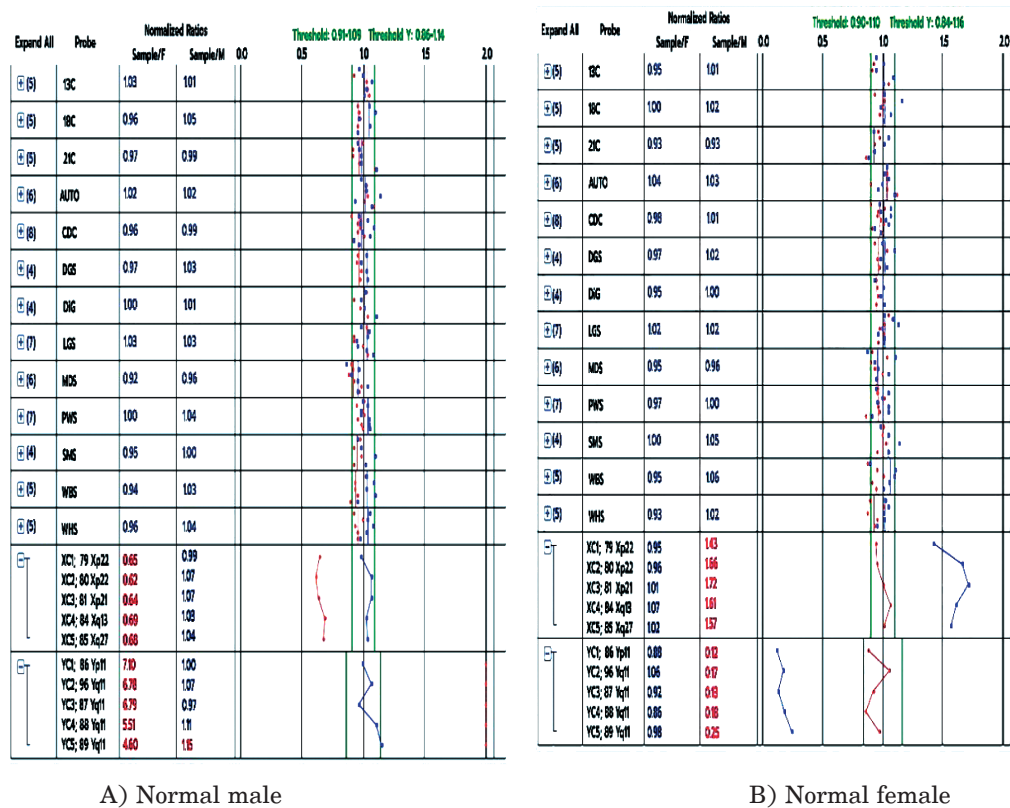


Figure 1 Molecular karyotyping profiles of normal male (A) and normal female (B). Red and blue spot represents sample:reference female and sample:reference male fluorescence ratio respectively.

Performance characteristics of molecular karyotyping

In the accuracy study, all samples showing aneuploidy were in agreement with conventional karyotyping, with no false-positive or false-negative results. Molecular karyotyping assay successfully detected three microdeletion/microduplication syndromes missed in the conventional method, including DiGeorge syndrome (22q11.2 microdeletion syndrome) (n = 1) and 22q11.2 microduplication syndrome (n = 2). Precision of the assay was determined as between-run variations of mean fluorescence ratio of six chromosome loci (13C, 18C, 21C, DGS, XC and YC) in male and female DNA internal control samples. Variability of between-run precision ranged 1.52–7.81% CV, considered satisfactory (Table 3).

Application of molecular karyotyping for prenatal diagnosis

Preliminary molecular karyotyping for prenatal diagnosis of Down syndrome and other chromosomal disorders was implemented at the Hematology Laboratory, Thailand National Institute of Health (Thai NIH) according to ISO 15189, ‘Medical laboratories–particular requirements for quality and competence’.^(28,29) Three medical scientists were trained to perform the analysis according to standard operating procedures. Of 19 samples investigated, 2 Down syndrome fetuses were identified. Performance specifications of the procedure were monitored for each analytical batch using male and female DNA internal quality controls and the findings of the participants in inter-laboratory comparison

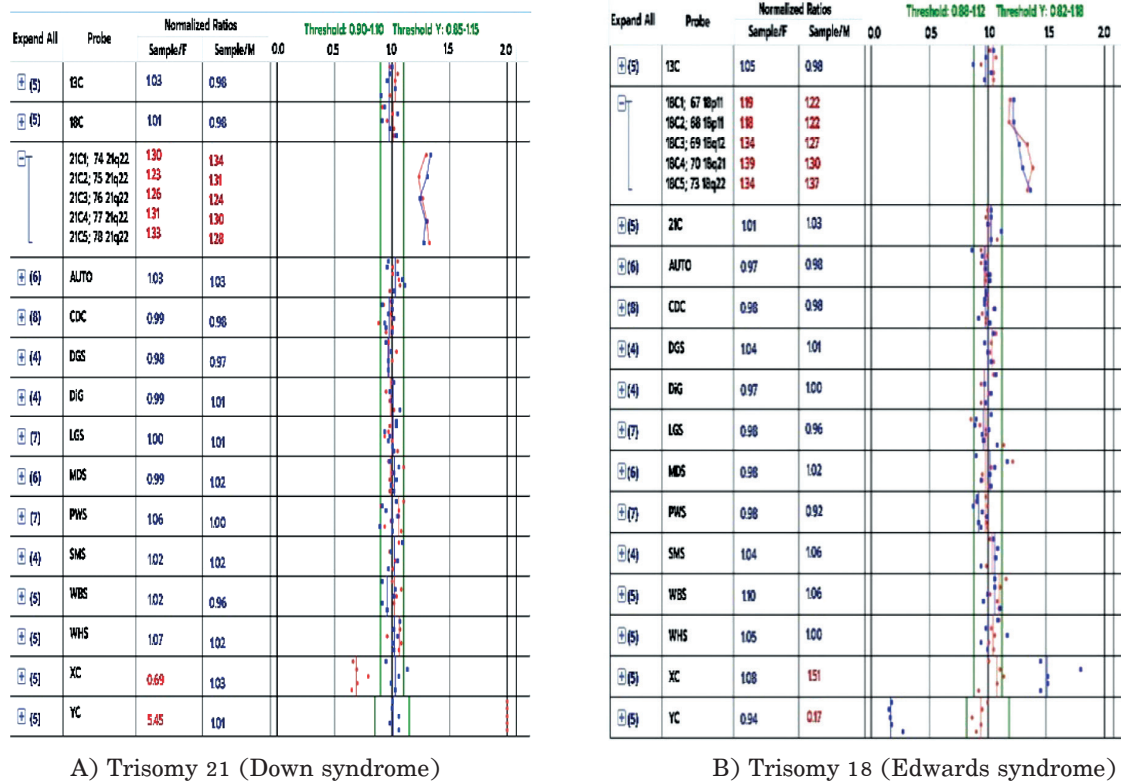
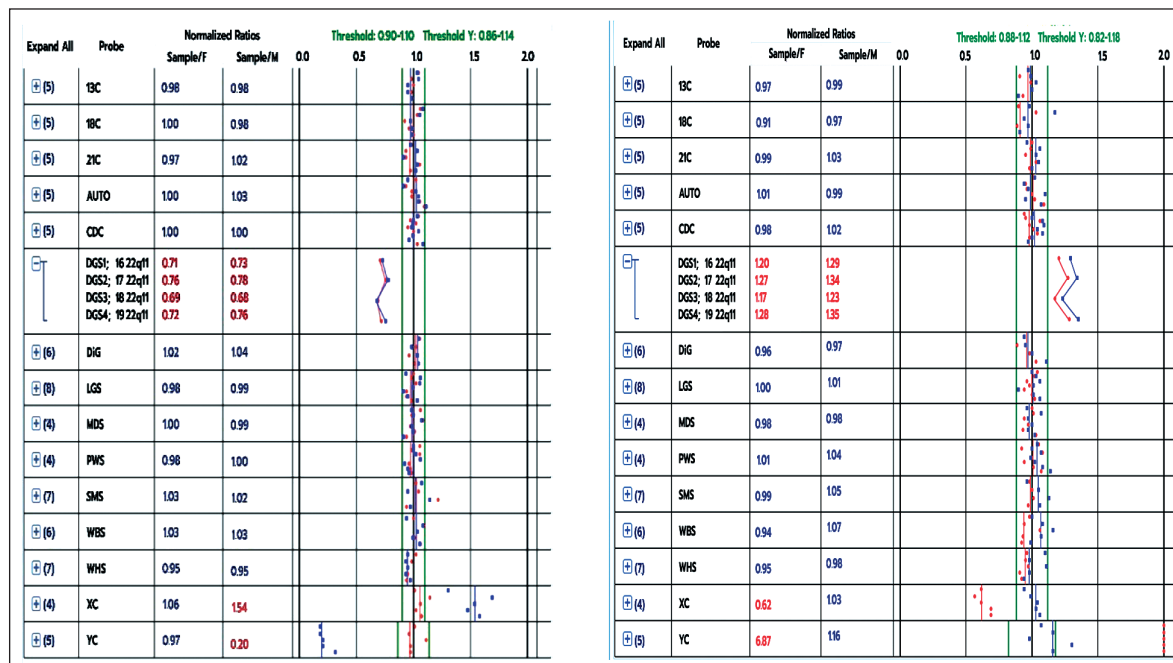


Figure 2 Molecular karyotyping profiles of Trisomy 21 (A), Trisomy 18 (B) and Trisomy 13 (C). Red and blue spot represents sample:reference female and sample:reference male fluorescence ratio respectively.



A) 22q11.2 microdeletion (DiGeorge syndrome)

B) 22q11.2 microduplication

Figure 3 Molecular karyotyping profiles of 22q11.2 microdeletion (A) and 22q11.2 microduplication (B). Red and blue spot represents sample:reference female and sample:reference male fluorescence ratio respectively.

Table 2 Molecular karyotyping assay fluorescence ratios in chromosomal disorders of 13C, 18C, 21C and 22q11.2 DiGeorge syndrome (DGS) from amniocentesis samples of mothers attending the Antenatal Clinic, Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand (August 2016–October 2017).

Syndrome	Number of samples	Fluorescence ratio (mean±SD)			
		13C	18C	21C	22q11 (DGS)
Down	10	0.98±0.03	1.01±0.02	1.29±0.03	0.99±0.02
Edwards	7	0.98±0.02	1.30±0.04	0.99±0.02	1.00±0.02
Patau	1	1.29	0.99	0.99	0.98
DiGeorge	1	1.03	0.99	0.96	0.69
22q11.2 microduplication	2	0.99±0.01	0.97±0.04	0.99±0.01	1.27±0.02
Normal	978	0.99±0.03	1.00±0.03	0.98±0.03	1.00±0.03

Table 3 Between-run precision of molecular karyotyping assay (n = 44).

Control	Probe	Min	Max	Mean	SD	%CV
Normal, male	13C	0.96	1.05	1.01	0.02	1.87
Normal, female	13C	0.98	1.05	1.01	0.02	1.52
Normal, male	18C	0.95	1.03	0.99	0.02	2.10
Normal, female	18C	0.96	1.04	0.99	0.02	2.03
Normal, male	21C	0.93	1.07	1.01	0.03	2.55
Normal, female	21C	0.95	1.05	1.00	0.03	2.62
Normal, male	DGS	0.96	1.04	1.01	0.02	1.97
Normal, female	DGS	0.95	1.04	0.99	0.02	1.73
Normal, male	X	0.79	0.89	0.84	0.02	2.64
Normal, female	X	0.96	1.15	1.01	0.03	3.08
Normal, male	Y	0.94	1.07	0.99	0.04	3.92
Normal, female	Y	0.46	0.71	0.59	0.05	7.81

were evaluated according ISO15189:2012 requirements. Turnaround time was reduced from three weeks using conventional method to three days with molecular karyotyping assay.

Discussion

In Thailand, the prevalence of Down syndrome is 1.21 per 1,000 births⁽⁹⁾ and in 2016 there were 1,100 newborns born with Down syndrome.⁽³⁾ A national Down syndrome prenatal screening program was implemented in the country by the National Health Security Office (NHSO) in 2019 whereby mothers > 35 years of age in the second trimester are offered free blood serum screening tests and prenatal diagnosis for at risk mothers to determine chromosome abnormality.⁽³⁰⁾ Mothers carrying Down syndrome fetuses are counseled on the choice of carrying to term or having an abortion.⁽⁹⁾ Although advanced maternal age is the most important risk factor for Down syndrome, Adams MM et al.⁽⁸⁾ reported 80% of infants with Down syndrome were born to mothers under 35 years of age and hence, from

October 2020 the program was extended to all Thai pregnant women.⁽³¹⁾

In order to assist in the national Down syndrome prevention program, the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand has collaborated with the Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University to assess the reliability of molecular karyotyping assay for detection of common aneuploidy and microdeletion/microduplication syndromes, in comparison with conventional gold standard karyotyping technique. Aneuploidies detected by molecular karyotyping assay was in concordance with those observed by the gold standard karyotyping technique and in addition three cases of microdeletion syndromes missed by conventional karyotyping were detected. Precision of the assay was quite high, with an overall %CV of between-run precision within the required range.

The major advantage of molecular karyotyping is its ability to provide more informative results than FISH and QF-PCR

methods that can only reveal common aneuploidies,⁽²⁰⁾ namely detection of micro-deletion/microduplication syndromes. Total reagent and consumable costs per sample in molecular karyotyping assay are comparable with FISH and QF-PCR but less than array-comparative genomic hybridization (CGH).^(18,21,32) In addition, molecular karyotyping assay is less labor-intensive and suitable for a high throughput platform, with a turnaround time within three days. However, molecular karyotyping assay cannot detect chromosome inversions, balanced translocations, point mutations, polyploidies, alterations in methylation and low-level mosaicism.^(18,33,34) Both molecular karyotyping assay and conventional karyotyping alone could not detect all fetal chromosomal abnormalities. A combination of these techniques should improve the detection and accuracy of prenatal diagnosis.^(19,25,33) In 2019, Miao Z et al⁽²⁵⁾ reported that the combined use of molecular karyotyping assay and conventional karyotyping could detect more fetal chromosomal abnormalities (4.51%) than either molecular karyotyping assay (2.97%) and conventional karyotyping (4.04%) alone.

Conclusion

Molecular karyotyping assay is as reliable as conventional gold standard karyotyping in detecting common aneuploidies and is able to identify common microdeletion/microduplication syndromes. Its high accuracy, low sample volume requirement, ease in implementation, adaptation to a high throughput platform and rapid turnaround time should assist in improving acceptance of the national Down syndrome prenatal screening program especially among late antenatal care pregnant women.

Acknowledgements

The research was supported by a grant from the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand. The authors gratefully thank Professor Dr. Prapon Wilairat for valuable suggestions and assistance in editing the manuscript. The authors thank Ms. Panyakamol Chandrasakha and hematology laboratory staffs for their kind assistance.

Conflicts of Interest Declaration

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Al-Biltagi M. Epidemiology and prevalence of Down syndrome. In: Al-Biltagi M, editor. Down syndrome children - an update. Sharjah, U.A.E: Bentham Science Publishers; 2015. p. 3-44.
2. Asim A, Kumar A, Muthuswamy S, Jain S, Agarwal S. Down syndrome: an insight of the disease. *J Biomed Sci* 2015; 22: 41. (9 pages).
3. Pangkanon S, Sawasdivorn S, Kuptanon C, Kabchan P. The prevalence of congenital anomalies in Thailand. *Thai J Pediatr* 2016; 55(2): 85-92.
4. Rojnueangnit K, Khaosamlee P, Chunsuwan I, Vorravanpreecha N, Lertboonnum T, Rodjanadit R, et al. Quality of life and comprehensive health supervision for children with Down syndrome in Thailand. *J Community Genet* 2020; 11(3): 351-8.
5. van den Driessen Mareeuw FA, Coppus AMW, Delnoij DMJ, de Vries E. Quality of health care according to people with Down syndrome, their parents and support staff-A qualitative exploration. *J Appl Res Intellect Disabil* 2020; 33(3): 496-514.

6. Weijerman ME, de Winter JP. Clinical practice. The care of children with Down syndrome. *Eur J Pediatr* 2010; 169(12): 1445-52.
7. Moorthie S, Blencowe H, Darlison MW, Gibbons S, Lawn JE, Mastroiacovo P, et al. Chromosomal disorders: estimating baseline birth prevalence and pregnancy outcomes worldwide. *J Community Genet* 2018; 9(4): 377-86.
8. Adams MM, Erickson JD, Layde PM, Oakley GP. Down's syndrome. Recent trends in the United States. *JAMA* 1981; 246(7): 758-60.
9. Jaruratanasirikul S, Kor-Anantakul O, Chowvichian M, Limpitikul W, Dissaneevate P, Intharasangkanawin N, et al. A population-based study of prevalence of Down syndrome in Southern Thailand. *World J Pediatr* 2017; 13: 63-9.
10. Park GW, Kim NE, Choi EK, Yang HJ, Won S, Lee YJ. Estimating nationwide prevalence of live births with Down syndrome and their medical expenditures in Korea. *J Korean Med Sci* 2019; 34(31): e207. (12 pages).
11. Liu H, Gao Y, Hu Z, Lin L, Yin X, Wang J, et al. Performance evaluation of NIPT in detection of chromosomal copy number variants using low-coverage whole-genome sequencing of plasma DNA. *PLoS One* 2016; 11(7): e0159233. (11 pages).
12. Dahl F, Ericsson O, Karlberg O, Karlsson F, Howell M, Persson F, et al. Imaging single DNA molecules for high precision NIPT. *Sci Rep* 2018; 8: 4549. (8 pages).
13. Rattanasiri T. Common obstetrics problems in fetal diagnosis and treatment. Khon Kaen, Thailand: Faculty of Medicine, Khon Kaen University; 2018.
14. Wanapirak C, Piyamongkol W, Sirichotiyakul S, Tongprasert F, Srisupundit K, Luewan S, et al. Fetal Down syndrome screening models for developing countries; Part I: Performance of maternal serum screening. *BMC Health Serv Res* 2019; 19: 897. (7 pages).
15. Silva M, de Leeuw N, Mann K, Schuring-Blom H, Morgan S, Giardino D, et al. European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. *Eur J Hum Genet* 2019; 27: 1-16.
16. Bui TH. Prenatal cytogenetic diagnosis: gone FISHing, BAC soon! *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007; 30(3): 247-51.
17. Gekas J, van den Berg DG, Durand A, Vallée M, Wildschut HI, Bujold E, et al. Rapid testing versus karyotyping in Down's syndrome screening: cost-effectiveness and detection of clinically significant chromosome abnormalities. *Eur J Hum Genet* 2011; 19: 3-9.
18. Vialard F, Simoni G, Aboura A, De Toffol S, Molina Gomes D, Marcato L, et al. Prenatal BACs-on-Beads™: a new technology for rapid detection of aneuploidies and microdeletions in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2011; 31(5): 500-8.
19. Fang Y, Wang G, Gu L, Wang J, Suo F, Gu M, et al. Application of karyotype analysis combined with BACs-on-Beads for prenatal diagnosis. *Exp Ther Med* 2018; 16(4): 2895-900.
20. Galehdari H, Barati M, Mahmoudi M, Shahbazian N, Masihi S, Zamani M, et al. Validity of chromosomal aneuploidies testing during pregnancy: a comparison of karyotype, interphase-FISH and QF-PCR techniques. *Biomed Res* 2018; 29(10): 2164-8.
21. Choy KW, Kwok YK, Cheng YKY, Wong KM, Wong HK, Leung KO, et al. Diagnostic accuracy of the BACs-on-Beads™ assay versus karyotyping for prenatal detection of chromosomal abnormalities: a retrospective consecutive case series. *BJOG* 2014; 121(10): 1245-52.
22. Mann K, Fox SP, Abbs SJ, Yau SC, Scriven PN, Docherty Z, et al. Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. *Lancet* 2001; 358(9287): 1057-61.

23. UK Department of Health. Our inheritance, our future: realising the potential of genetics in the NHS. London: TSO (The Stationery Office); 2003.
24. García-Herrero S, Campos-Galindo I, Martínez-Conejero JA, Serra V, Olmo I, Lara C, et al. BACs-on-Beads technology: a reliable test for rapid detection of aneuploidies and microdeletions in prenatal diagnosis. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 590298. (7 pages).
25. Miao Z, Liu X, Hu F, Zhang M, Yang P, Wang L. Combined use of bacterial artificial chromosomes-on-beads with karyotype detection improves prenatal diagnosis. *Mol Cytogenet* 2019; 12: 9. (8 pages).
26. Hastings R, Howell R, Bricarelli FD, Kristoffersson U, Cavani S. Specific constitutional cytogenetic guidelines: A common European framework for quality assessment for constitutional, acquired and molecular cytogenetic investigations. *ECA Newslett* 2012; 30; 11-9.
27. McGillivray G, Hui L, Halliday J. Prenatal screening and diagnosis of chromosomal and genetic conditions in the fetus in pregnancy. The Royal Australian and New Zealand College of Obstetricians and Gynaecologists; 2016.
28. ISO 15189:2012. Medical laboratories-Requirements for quality and competence. 3rd ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2012.
29. Schneider F, Maurer C, Friedberg RC. International Organization for Standardization (ISO) 15189. *Ann Lab Med* 2017; 37(5): 365-70.
30. Panichkriangkrai W, Topothai C, Saengruang N, Thammatach-aree J, Tangcharoensathien V. Universal access to sexual and reproductive health services in Thailand: achievements and challenges. *Sex Reprod Health Matters* 2020; 28(2): 1-6.
31. Kunsiripunyo J, Srirot W. Preparation of counseling nurses to support Down syndrome screening system in all age groups of pregnant women. *JPNC* 2021; 32: 237-52.
32. Mellali S, Haoud K, Gouas L, Khaled MB, Vago P, Moulessehoul S. Prenatal BoBs™ in the cytogenetic analysis of products of spontaneous miscarriage. *S Afr Med J* 2015; 105(10): 870-3.
33. Farra C, Nassar AH, Mirza F, Abdouni L, Souaid M, Awwad J. BACs-on-Beads™ assay, a rapid aneuploidy test, improves the diagnostic yield of conventional karyotyping. *Mol Biol Rep* 2020; 47: 169-77.
34. Huang H, Zhang M, Wang Y, Lin N, He D, Chen M, et al. Application of the BACs-on-Beads™ assay for rapid prenatal detection application of BoBs™ for PND of aneuploidies and microdeletions. *Mol Reprod Dev* 2018; 85(2): 146-54.

การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดสำหรับกลุ่มอาการดาวน์และโครโมโซมผิดปกติที่พบบ่อย โดยวิธี Molecular Karyotyping

สิริภากร แสงกิจพร¹ ชเนนทร์ วนาภิรักษ์² อาริรัตน์ ขอไชย³ ชลลดา ยอดทัฬห¹ สาวิตรี ตัวงเรือง¹

ณัฏฐา ปาณะจำนง¹ พัชรภรณ์ นพปรางค์¹ อัจฉราพร คำบัว¹ พัชรภรณ์ บุญชู¹ และ สมชาย แสงกิจพร¹

¹กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

²ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

³โรงพยาบาล ๕๐ พรรษา มทาวชิราลงกรณ อุบลราชธานี 34000

บทคัดย่อ การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดมีความสำคัญในการควบคุมและป้องกันกลุ่มอาการดาวน์และโครโมโซมผิดปกติในหญิงตั้งครรภ์ที่มีความเสี่ยงสูง การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโดยวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ BACs-on-Beads (BoBs™) เป็นวิธีตรวจวินิจฉัยกลุ่มอาการดาวน์และโครโมโซมผิดปกติคู่ที่ 13, 18, X และ Y รวมถึง microdeletion/microduplication syndromes 9 ชนิด อย่างรวดเร็ว การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยโดยวิธีอณูพันธุศาสตร์ในตัวอย่างน้ำคร่ำของหญิงตั้งครรภ์ที่มีอายุครรภ์ 15-22 สัปดาห์ จำนวน 1,004 ราย ศึกษาเปรียบเทียบกับวิธี conventional karyotyping จากการเพาะเลี้ยงน้ำคร่ำซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน ผลการศึกษาพบความผิดปกติทางโครโมโซม 26 ตัวอย่าง เป็น aneuploidies 23 ตัวอย่าง (Down syndrome 10 ตัวอย่าง Edwards syndrome 7 ตัวอย่าง Klinefelter syndrome 1 ตัวอย่าง Patau syndrome 1 ตัวอย่าง Triple X syndrome 1 ตัวอย่าง และ Turner syndromes 3 ตัวอย่าง) ผลทั้งหมดสอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน นอกจากนี้ยังสามารถวินิจฉัย microdeletion/microduplication syndromes ได้ 3 ตัวอย่าง (22q11.2 microdeletion 1 ตัวอย่าง และ 22q11.2 microduplication 2 ตัวอย่าง) ซึ่งวิธีดั้งเดิมตรวจไม่พบ วิธีการนี้ได้บูรณาการสู่การให้บริการตามมาตรฐานสากล ISO 15189:2012 ณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข การตรวจทางอณูพันธุศาสตร์นับเป็นวิธีที่น่าเชื่อถือและรวดเร็วในการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดสำหรับโครโมโซมผิดปกติที่พบบ่อย ทั้งชนิด aneuploidies และ microdeletion/microduplication syndromes โดยไม่ต้องเพาะเลี้ยงน้ำคร่ำ นับเป็นการสนับสนุนการควบคุมและป้องกันกลุ่มอาการดาวน์และโครโมโซมผิดปกติของประเทศ

คำสำคัญ: โครโมโซมผิดปกติ, กลุ่มอาการดาวน์, Microdeletion/microduplication syndrome, อณูพันธุศาสตร์, การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HIV-1 จากตัวอย่าง หยดเลือดแห้งบนกระดาษซับโดยตรง ด้วยวิธี real-time PCR

วิโรจน์ พวงทับทิม¹ รัชณิกร ใจเชื้อ¹ นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา² และ อาชวินทร์ โจนวิวัฒน์³

¹สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

²สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

³สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HIV-1 ในเด็กที่คลอดจากแม่ที่ติดเชื้อโดยวิธี real-time PCR ด้วยตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษซับ (dried blood spot: DBS) ทำให้เข้าถึงการบริการการตรวจได้ง่าย เพื่อให้ได้วิธีตรวจที่สะดวกและประหยัดเวลามากขึ้นโดยตัดขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการตรวจตัวอย่าง DBS โดยตรงด้วยวิธี real-time PCR (direct DBS real-time PCR) และเปรียบเทียบวิธีดังกล่าวที่ใช้ชุดน้ำยา Coyote Bioscience กับวิธีปัจจุบันที่มีการสกัดตัวอย่างก่อนการตรวจด้วยชุดน้ำยา KAPA Probe Fast qPCR kit โดยใช้ primer และ probe ชุดเดียวกัน ประเมินขีดจำกัดของการทดสอบ (limit of detection: LOD) โดยการตรวจสอบสารพันธุกรรม HIV-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยง 8E5 ประเมินความไวและความจำเพาะโดยการตรวจ DBS ที่เหลือจากงานบริการที่ส่งตรวจวินิจฉัย ณ สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างปี พ.ศ. 2559-2561 รวม 287 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างติดเชื้อ 88 ตัวอย่าง ไม่ติดเชื้อ 199 ตัวอย่าง พบว่า LOD ของวิธี direct DBS real-time PCR และวิธีปัจจุบันเท่ากับ 200 และ 500 cells/mL ของเลือด ตามลำดับ โดยวิธี direct DBS real-time PCR มีความไวร้อยละ 100 (88/88) ความจำเพาะร้อยละ 90.5 (180/199) และมีความสอดคล้องกับสถานะการติดเชื้อร้อยละ 93.4 (268/287) ที่ kappa เท่ากับ 0.853 ($p < 0.001$) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธี direct DBS real-time PCR นอกจากลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ได้แล้ว ยังมี LOD ดีกว่าวิธีที่ใช้ในปัจจุบัน แต่ยังมีข้อจำกัดเรื่องผลบวกปลอม การพัฒนาปรับปรุงให้วิธีนี้มีความจำเพาะมากกว่าร้อยละ 99.5 ตามมาตรฐานกำหนดของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา จะทำให้สามารถนำวิธีนี้มาใช้งานบริการได้ในอนาคต

คำสำคัญ: การตรวจวินิจฉัย HIV-1, real-time PCR, ตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษซับโดยตรง

Corresponding author E-mail: wiroj.p@dmsc.mail.go.th

Received: 30 September 2021

Revised: 8 December 2021

Accepted: 3 February 2022

บทนำ

การให้บริการตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อ HIV-1 ในเด็กที่คลอดจากแม่ที่ติดเชื้อของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และเครือข่ายศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 12 แห่ง ในปัจจุบันใช้วิธี real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) โดยใช้ชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นเอง (in-house)⁽¹⁻³⁾ ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ คือ การสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างส่งตรวจ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมายและการตรวจวัดสัญญาณแบบ real-time เป็นวิธีที่มีความไว และความจำเพาะสูง สามารถใช้ตรวจตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย เช่น ตัวอย่างชนิดหยดเลือดแห้งบนกระดาษซับ (dried blood spot: DBS) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ผู้ใช้บริการตรวจทางห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่นิยม เนื่องจากมีความสะดวกในการเก็บรักษาภาพและการขนส่งตัวอย่าง อีกทั้งยังลดโอกาสการปนเปื้อนเชื้อโรคและอันตรายที่เกิดจากการแตกหักของหลอดบรรจุตัวอย่าง ทำให้เพิ่มโอกาสในการเข้าถึงบริการตรวจของประชาชน

การตรวจด้วยเทคนิค real-time PCR มีข้อดีกว่าวิธี PCR แบบดั้งเดิม (conventional PCR) คือ ลดเวลาในการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจากไม่มีขั้นตอนการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) เพื่อตรวจสอบสารพันธุกรรมเป้าหมายที่เพิ่มจำนวน และลดโอกาสการเกิดผลบวกปลอมจากการปนเปื้อนของ PCR product อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจวิเคราะห์ของเครือข่ายห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้บริการในปัจจุบันยังมีช่องว่างที่สามารถพัฒนา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการให้บริการ โดยขั้นตอนที่มีความเป็นไปได้ คือ ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมจากสิ่งส่งตรวจชนิด DBS ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญและใช้ระยะเวลาในการปฏิบัติงานประมาณหนึ่งชั่วโมง

ปัจจุบัน DBS เป็นตัวอย่างที่ได้รับการยอมรับในการตรวจวินิจฉัยโรคในเด็ก⁽⁴⁻⁶⁾ เช่น การตรวจหาภาวะพร่องไทรอยด์ฮอร์โมน และการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ HIV-1 เพราะมีความสะดวกในการเก็บและขนส่งตัวอย่าง แต่ตัวอย่าง DBS มีสารยับยั้ง PCR (inhibitor) จากเลือด เช่น โปรตีน โลหะหนัก ฮีโมโกลบิน หรือเยื่อกระดาษที่นำมาใช้เป็นกระดาษ

ซับเลือด ขั้นตอนการสกัด DNA ออกจากกระดาษจะลดความคลาดเคลื่อนของผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ⁽⁷⁾ มีการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ตัวอย่างจากเลือด (whole blood) หรือ DBS โดยตรงในการทำ PCR โดยไม่มีขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมออกจากตัวอย่าง⁽⁸⁻¹¹⁾ จำเป็นต้องใช้ชุดน้ำยา PCR ชนิดพิเศษ เช่น ใช้เอนไซม์ DNA polymerase ที่สามารถทนต่อสารยับยั้ง และปรับปรุงชนิดส่วนประกอบ ความเข้มข้นของเกลือ (salt composition) และกลุ่มสาร detergent รวมทั้งเพิ่มขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกออกและ DNA หลุดจากนิวเคลียส เพื่อให้ประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมายเกิดได้ดีขึ้น

แม้ว่าเทคโนโลยีน้ำยา PCR แบบใหม่นี้จะสามารถลดขั้นตอนการปฏิบัติงานในส่วนของการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจแบบ DBS ได้ และอาจมีความไวเพียงพอที่จะใช้การตรวจวิเคราะห์ในงานบริการประจำ แต่ยังคงขาดข้อมูลประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคการตรวจ DBS โดยตรงในกลุ่มตัวอย่างศึกษาทางคลินิก⁽¹²⁾ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยใช้ตัวอย่าง DBS ของเด็กไทยอายุน้อยกว่า 24 เดือน ที่คลอดจากแม่ที่ติดเชื้อ HIV-1 เพื่อประเมินประสิทธิภาพการตรวจในด้านความไวและความจำเพาะของวิธีการตรวจตัวอย่าง DBS โดยตรงด้วยวิธี real-time PCR (direct DBS real-time PCR) เปรียบเทียบกับวิธีที่ให้บริการในปัจจุบันด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เอง

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างศึกษา

ชุดตัวอย่างเพื่อประเมินขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์

เตรียมชุดตัวอย่าง (sample panel) โดยนำเซลล์ 8E5 (CRL-8993, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) ซึ่งเป็น Human Lymphoblastic Leukemia ที่มีสารพันธุกรรม whole genome ของเชื้อไวรัส HIV-1 จำนวน 1 ชุดต่อเซลล์ (1 copy/cell) มานับจำนวนเซลล์ด้วยเครื่อง

อัตโนมัติ (Sysmex XT-1800i cell counter, Sysmex Cooperation, Chuo-ku, Kobe, Japan) แล้วจึงเตรียมความเข้มข้นเซลล์ 8E5 ที่ 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 cells/mL ด้วยการเติมเซลล์ 8E5 ลงในเลือดครบส่วน (whole blood) จากผู้บริจาคที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาวไม่น้อยกว่า 4,000 cells/ μ L และมีผลตรวจการติดเชื้อ HIV-1 เป็นลบ (negative) ด้วยวิธีมาตรฐานการตรวจคัดกรองเลือดบริจาคของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ผสมเซลล์ 8E5 และเลือดให้เข้ากันดีแล้วหยดส่วนผสมปริมาตร 50 μ L ลงบนกระดาษซับเลือด 903 Thailand NBS card (Eastern Business Forms Inc, Mauldin, SC, USA) ที่มีรอยพิมพ์วงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 mm จำนวน 6 วงต่อกระดาษซับเลือด 1 แผ่น ผึ่งตัวอย่างให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ในที่ร่ม ไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง

ตัวอย่างศึกษาทางคลินิก (clinical samples)

ตัวอย่าง DBS ของเด็กที่มีการส่งตัวอย่างตรวจอย่างน้อย 2 ครั้ง ในช่วงอายุระหว่าง 1 วัน ถึง 12 เดือน และมีผลตรวจทางซีโรโลยี เพื่อสรุปสถานะการติดเชื้อรายบุคคลที่อายุ 24 เดือน⁽¹³⁻¹⁵⁾ โดยเป็นสิ่งที่ส่งตรวจที่เหลือ (left over samples) จากงานบริการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HIV-1 จากแม่สู่ลูก ของสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ ระหว่างปี พ.ศ. 2559-2561 จำนวน 287 ตัวอย่าง แบ่งเป็น ตัวอย่างที่มีผลการตรวจเป็นบวก (positive) ต่อเชื้อ HIV-1 วิธี PCR ติดต่อกันอย่างน้อย 2 ครั้ง ร่วมกับข้อมูลสถานะการติดเชื้อของเด็กที่อายุ 24 เดือน จำนวน 88 ตัวอย่าง เพื่อศึกษาความไวทางคลินิก (clinical sensitivity) และตัวอย่างที่มีผลการตรวจเป็นลบ (negative) ต่อเชื้อ HIV-1 วิธี PCR ติดต่อกันอย่างน้อย 3 ครั้ง ร่วมกับข้อมูลสถานะการไม่ติดเชื้อของเด็กที่อายุ 24 เดือน เพื่อศึกษาความจำเพาะทางคลินิก (clinical specificity) จำนวน 199 ตัวอย่าง

ตัวอย่างควบคุมคุณภาพการทดสอบ (control samples)

ตัวอย่างกระดาษซับเลือดควบคุมคุณภาพชนิดลบ (DBS negative control sample) เตรียมจากเลือดผู้บริจาคที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาวไม่น้อยกว่า 4,000 cells/ μ L และมีผลตรวจต่อเชื้อ HIV-1 เป็นลบด้วยวิธีมาตรฐาน

การตรวจคัดกรองเลือดบริจาค ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย แล้วหยดลงบนกระดาษซับเลือด 903 Thailand NBS card จำนวน 6 วงเลือดต่อ 1 แผ่น

ตัวอย่างกระดาษซับเลือดควบคุมคุณภาพชนิดบวก (DBS positive control sample) เตรียมโดยเจือจางเซลล์มาตรฐาน 8E5 (ATCC CRL-8993) ด้วยเลือดผู้บริจาคที่ไม่ติดเชื้อ HIV-1 ให้มีจำนวน 1 cell/ μ L แล้วหยดลงบนกระดาษซับเลือด 903 Thailand NBS card จำนวน 6 วงเลือดต่อ 1 แผ่น

การขออนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคน

การใช้ตัวอย่างเลือดที่เหลือจากงานบริการการตรวจวิเคราะห์ที่ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาการวิจัยในคน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เลขที่ EC116/62

การตรวจหาเชื้อ HIV-1 วิธีที่ให้บริการในปัจจุบันด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เอง

การเตรียมตัวอย่าง DNA

สกัดตัวอย่าง DBS ที่ใช้เป็นตัวอย่างศึกษาชนิดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างศึกษาทางคลินิก และตัวอย่างควบคุมคุณภาพการทดสอบตัวอย่างละ 2 วง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 mm) หรือคิดเป็นปริมาตรของเลือด 100 μ L ด้วยวิธีมาตรฐานชุดน้ำยา QIAasymphony DSP DNA (QIAGEN, Hilden, Germany) ด้วยเครื่องสกัดอัตโนมัติ QIAasymphony® Automate Extraction (QIAGEN, Hilden, Germany) ได้ตัวอย่าง DNA ปริมาตร 50 μ L เก็บที่ -20 °C จนกว่าจะใช้งาน

การตรวจ real-time PCR

การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัส HIV-1 ใช้การตรวจ *LTR* gene และใช้การตรวจ human *RNaseP* gene เพื่อเป็น internal control ด้วยวิธี Duplex real-time PCR⁽¹⁾ โดยผสมน้ำยาสำเร็จรูป KAPA Probe Fast qPCR kit (KAPA Biosystems, MA, USA) กับ HIV-1 *LTR* primer/probe และ human *RNaseP* primer/probe ในปริมาตร 15 μ L รายละเอียดลำดับนิวคลีโอไทด์และความเข้มข้นของ primers และ probes ดังแสดงในตารางที่ 1 เติม

DNA 5 µL รวมเป็นส่วนผสมทั้งหมด 20 µL นำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและอ่านผลด้วยเครื่อง ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) โดยตั้งการทำงาน pre-amplification ที่ 50°C นาน 2 นาที และ 95°C นาน 2 นาที หลังจากนั้นทำ PCR จำนวน 45 รอบ ประกอบด้วย denature step ที่ 95°C นาน 15 วินาที annealing และ extension step ที่ 52°C นาน 30 วินาที

การควบคุมคุณภาพและแปลผล

การตรวจตัวอย่างทดสอบ มีการตรวจตัวอย่างควบคุมชนิดบวกและชนิดลบควบคู่ด้วยทุกครั้ง โดยใช้ตัวอย่างควบคุมชนิดบวกที่มี HIV-1 DNA ที่ 5 copies/reaction ต้องพบสัญญาณของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ HIV-1 *LTR* gene ที่มีค่า Cycle threshold (Ct) ต่ำกว่า 35 และพบสัญญาณการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ human *RNAseP* gene มีค่า Ct ต่ำกว่า 25 ส่วนตัวอย่างควบคุมชนิดลบ พบเฉพาะสัญญาณการเพิ่มปริมาณของ human *RNAseP* gene เท่านั้น ตัวอย่าง DNA ที่พบค่า Ct ใน *LTR* gene และ human *RNAseP* gene ครบทั้ง 2 ยีน จะถูกแปล

ผลตรวจเป็นบวก ส่วนตัวอย่างตรวจลบจะตรวจพบเฉพาะ Ct ของ human *RNAseP* gene เท่านั้น ตัวอย่างที่ตรวจไม่พบค่า Ct ของทั้ง 2 ยีน จะรายงานผลว่าตรวจวิเคราะห์ไม่ได้ (invalid)

การตรวจหาเชื้อ HIV-1 ด้วยวิธีการตรวจตัวอย่าง DBS โดยตรงด้วยวิธี real-time PCR (direct DBS real-time PCR)

การเตรียมตัวอย่าง DNA

เจาะ DBS ที่เป็นตัวอย่างเป็นศึกษา LOD ตัวอย่างศึกษาทางคลินิก และตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิดบวกและชนิดลบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 mm (คิดเป็นปริมาตรของเลือด 3 µL/ตัวอย่าง)^(16,17) จำนวนตัวอย่างละ 1 วง เพื่อนำไปทำ PCR ในขั้นตอนถัดไป

การตรวจ real-time PCR

ผสมน้ำยา DirectDetect™ QRT-PCR kit (Coyote Bioscience, Beijing, China) กับ primers และ probes ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และความเข้มข้นเช่นเดียวกับวิธีการที่ใช้ชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นเอง ในปริมาตร 50 µL ใส่ DBS ที่เจาะไว้ 1 วง นำไปเพิ่ม

ตารางที่ 1 รายละเอียดลำดับนิวคลีโอไทด์และความเข้มข้นของ primers/probes ที่ใช้การศึกษา⁽¹⁾

Target gene	Final concentration (nM)	Primer and probe sequence (5'-3')	GenBank Accession no.
HIV-1 <i>LTR</i> gene (89 bp)			AF033819.3
forward primer	300	TGCTTAAGCCTCAATAAAGCTT-GCCTTGA	61-89
reverse primer	500	TCTGAGGGATCTCTAGTTACCAG	127-149
probe	400	FAM-AAGTAGTGTGTGCCCGTCTGT-BHQ	97-117
Human <i>RNAseP</i> gene (65 bp)			AK296196.1
forward primer	100	AGATTTGGACCTGCGAGCG	28-46
reverse primer	200	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	73-92
probe	400	HEX-TTCTGACCTGAAGGCTCT-GCGC-TAMRA	49-71

ปริมาณสารพันธุกรรมและอ่านผลด้วยเครื่อง Mini8 Real-Time PCR System (Coyote Bioscience, Beijing, China) ซึ่งตั้งการทำงานไว้เพื่อทำ pre-amplification ที่ 95°C นาน 5 วินาที ที่ 45°C นาน 5 วินาที จำนวน 15 รอบ ที่ 95°C นาน 60 วินาที อีก 1 รอบ แล้วจึงทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งประกอบด้วย denature step 95°C นาน 5 วินาที annealing และ extension step ที่ 52°C นาน 30 วินาที จำนวน 45 รอบ

การควบคุมคุณภาพและแปลผล

การตรวจตัวอย่างทดสอบ มีการตรวจตัวอย่างควบคุมชนิดบวกและชนิดลบควบคู่ด้วยทุกครั้ง โดยตัวอย่างควบคุมชนิดบวกที่มี HIV-1 DNA ที่ 3 copies/reaction ต้องพบสัญญาณของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ HIV-1 *LTR* gene มีค่า Ct ต่ำกว่า 21 และพบสัญญาณการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ human *RNAseP* gene มีค่า Ct ต่ำกว่า 13 ส่วนตัวอย่างควบคุมชนิดลบ พบเฉพาะสัญญาณการเพิ่มปริมาณของ human *RNAseP* gene เท่านั้น ตัวอย่าง DNA ที่พบค่า Ct ใน *LTR* gene และ human *RNAseP* gene ครบทั้ง 2 ยีน จะถูกแปลผลตรวจเป็นบวก ส่วนตัวอย่างตรวจลบจะตรวจพบเฉพาะ Ct ของยีน human *RNAseP* gene เท่านั้น ตัวอย่างที่ตรวจไม่พบค่า Ct ของทั้ง 2 ยีน จะรายงานผลว่าตรวจวิเคราะห์ไม่ได้

การประเมินผลและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การประเมินความไวเชิงวิเคราะห์ (analytical sensitivity)

หาขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ (LOD) สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อ HIV-1 วิธี real-time PCR ในชุดตัวอย่างสำหรับศึกษาขีดจำกัดของการตรวจ

วิเคราะห์ที่มีความเข้มข้นเซลล์ 8E5 ระหว่าง 25–600 cell/mL ตรวจวิเคราะห์ 10 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น โดยค่า LOD คือ ค่าความเข้มข้นของเซลล์ที่ต่ำสุด ที่ยังคงให้ผลการทดสอบเป็นบวกในทุกครั้งของการตรวจวิเคราะห์ซ้ำ

การประเมินความไวทางคลินิก (clinical sensitivity) ความจำเพาะทางคลินิก (clinical specificity) และความสอดคล้องของวิธีการตรวจ (agreement)

ประเมินความไวทางคลินิก ความจำเพาะทางคลินิก และความสอดคล้องของการทดสอบ โดยเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์เชื้อ HIV-1 ด้วยวิธี real-time PCR ในตัวอย่าง DBS ที่เหลือจากงานบริการกับผลอ้างอิง (สถานะการติดเชื้อ HIV-1 ของเด็ก) คำนวณค่าร้อยละของความไว ความจำเพาะ ความสอดคล้อง และระดับของความสอดคล้องของวิธีการตรวจ ด้วยสถิติสัมประสิทธิ์แคปปาของโคเฮน (Cohen's kappa coefficient) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ รายละเอียดวิธีการคำนวณความไว ความจำเพาะ และความสอดคล้องของวิธีการตรวจ แสดงในตารางที่ 2

ความไวทางคลินิก (clinical sensitivity) คือ วิธีการทดสอบแสดงผลเป็นบวก เมื่อทดสอบกับตัวอย่างอ้างอิงที่มีสถานภาพติดเชื้อ คำนวณได้จาก

$$\% \text{sensitivity} = \{a/(a+b)\} \times 100$$

ความจำเพาะทางคลินิก (clinical specificity) คือ วิธีการทดสอบแสดงผลเป็นลบ เมื่อทดสอบกับตัวอย่างอ้างอิงที่มีสถานภาพไม่ติดเชื้อ คำนวณได้จาก

$$\% \text{specificity} = \{d/(c+d)\} \times 100$$

ความสอดคล้องของวิธีการตรวจ คือ วิธีการทดสอบแสดงผลตรงกับกับสถานภาพของตัวอย่างอ้างอิง คำนวณได้จาก

$$\% \text{agreement} = \{a+d/(a+b+c+d)\} \times 100$$

ตารางที่ 2 วิธีการคำนวณความไวทางคลินิก ความจำเพาะทางคลินิก และความสอดคล้องของวิธีการตรวจ

		ผลอ้างอิง (สถานะการติดเชื้อ HIV-1 ของเด็ก)		
		ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	รวม
ผลการทดสอบที่ได้จากวิธีการตรวจ	ผลบวก	a	c	a+c
	ผลลบ	b	d	b+d
	รวม	a+b	c+d	a+b+c+d

ผล

ความไวเชิงวิเคราะห์ (analytical sensitivity) ของการตรวจหาเชื้อ HIV-1 ด้วยวิธี direct DBS real-time PCR

การตรวจเซลล์ 8E5 ที่ความเข้มข้นระหว่าง 25-600 cells/mL พบว่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ (LOD) วิธี real-time PCR โดยวิธีที่ให้บริการในปัจจุบันด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เอง มี LOD อยู่ที่ 500 cells/mL หรือคิดเป็น 5 DNA copies/reaction ในขณะที่วิธี direct DBS real-time PCR มี LOD อยู่ที่ 200 cells/mL หรือคิดเป็น 0.6 DNA copies/reaction ดังแสดงในตารางที่ 3

ความไวทางคลินิก (clinical sensitivity) ความจำเพาะทางคลินิก (clinical specificity) ความสอดคล้องของวิธีการตรวจ (agreement) และค่าสัมประสิทธิ์แคปปาของโคเฮน (Cohen's kappa coefficient)

จากตัวอย่างกระดาษซับเลือดทั้งหมด 287 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่ติดเชื้อ HIV-1 จำนวน 88 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ไม่ติดเชื้อจำนวน 199 ตัวอย่าง วิธีการตรวจหาเชื้อ HIV-1 ด้วย direct DBS real-time ให้ผลการตรวจตรงกับสถานะการติดเชื้อ HIV-1 ในเด็กที่อายุ 24 เดือน จำนวน 88 ตัวอย่าง คิดเป็นความไวทางคลินิก ร้อยละ 100 แต่ให้ผลตรงกับสถานะการไม่ติดเชื้อ HIV-1 จำนวน 180 ตัวอย่าง คิดเป็นความจำเพาะ

ตารางที่ 3 ความไวในการตรวจวิเคราะห์ (analytical sensitivity) ของการตรวจหาเชื้อ HIV-1 real-time PCR โดยวิธีที่ให้บริการในปัจจุบันด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เองและวิธี direct DBS real-time PCR

ความเข้มข้นของ เซลล์ 8E5 ที่เจือจาง ด้วยเลือด (cells/mL)	วิธีที่ให้บริการในปัจจุบัน ด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เอง			วิธี direct DBS real-time PCR		
	ความเข้มข้น DNA จากปริมาตรเลือด			ความเข้มข้น DNA จากปริมาตรเลือด		
	10 µL (copies/ reaction)	Positive (n/n)	% positive	3 µL (copies/ reaction)	Positive (n/n)	% positive
25	0.25	0/10	0	0.075	0/10	0
50	0.5	0/10	0	0.15	5/10	50
100	1.0	0/10	0	0.3	7/10	70
200	2.0	4/10	40	0.6*	10/10	100
300	3.0	6/10	60	0.9	10/10	100
400	4.0	8/10	80	1.2	10/10	100
500	5.0**	10/10	100	1.5	10/10	100
600	6.0	10/10	100	1.8	10/10	100

*วิธี direct DBS real-time PCR มี LOD ที่ 0.6 DNA copies/reaction หรือคิดเป็นความเข้มข้นของเซลล์ที่ติดเชื้อ 200 cells/mL

**วิธี real-time PCR โดยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นเองที่ให้บริการในปัจจุบัน มี LOD ที่ 5.0 DNA copies/reaction หรือคิดเป็นความเข้มข้นของเซลล์ที่ติดเชื้อ 500 cells/mL

ร้อยละ 90.5 คิดเป็นค่าสอดคล้อง (agreement) เท่ากับ 0.853 ($p < 0.001$) โดยพบผลบวกปลอมจำนวน ร้อยละ 93.4 (95% CI: 89.9–96.0) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ 19 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 9.5 (95% CI: 5.8–14.5) แคลปของโคเฮน (Cohen's kappa coefficient) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความสอดคล้องของผลการตรวจหาเชื้อ HIV-1 วิธี real-time PCR โดยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นเอง ที่ให้บริการในปัจจุบันและวิธี direct DBS real-time PCR ในตัวอย่างส่งตรวจ (clinical samples) ที่ทราบสถานภาพการติดเชื้อ HIV-1 ของเด็กที่อายุ 24 เดือน

วิธีการตรวจ	สถานภาพการติดเชื้อ HIV-1 ในตัวอย่างส่งตรวจ (n = 287)	
	ติดเชื้อ (n = 88)	ไม่ติดเชื้อ (n = 199)
วิธีที่ให้บริการในปัจจุบันด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เอง	ผลบวก	0
	ผลลบ	199
วิธี direct DBS real-time PCR	ผลบวก	19
	ผลลบ	180**

*sensitivity = 100%, **specificity = 90.5%, agreement = 93.4%, kappa = 0.853 ($p < 0.001$)

วิจารณ์

จากการทดสอบด้วยเซลล์ 8E5 ที่ใช้เป็นตัวแทนของการตรวจหาชิ้นเป้าหมายของเชื้อ HIV-1 ในตัวอย่างหยดเลือดแห้งที่เก็บบนกระดาษซับ น้ำยาตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อ HIV-1 วิธี direct DBS real-time PCR มีค่า LOD เท่ากับ 200 cells/mL ดีกว่าวิธีที่ให้บริการในปัจจุบันด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เอง ที่มี LOD เท่ากับ 500 cells/mL ซึ่งใช้ตัวอย่าง DBS ขนาด 3 mm เพียง 1 ชิ้น หรือเท่ากับปริมาตรเลือดเพียง 3 μ L โดยใส่ตัวอย่างส่งตรวจลงไปในน้ำยาทำ PCR ได้โดยตรง ไม่ต้องมีกระบวนการสกัด DNA ทำให้ได้สารพันธุกรรมทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่างนั้น ต่างจากการตรวจด้วยวิธีที่ให้บริการในปัจจุบันด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เอง ที่มีกระบวนการสกัดตัวอย่างหลายขั้นตอน ตั้งแต่การละลายสารพันธุกรรมออกจากกระดาษ การกำจัดสารรบกวนปฏิกิริยา การล้างทำความสะอาดและการชะสารพันธุกรรมออกในรูปแบบสารละลายที่พร้อมนำมาใช้ในการทำ PCR ซึ่งอาจทำให้เกิดการสูญเสียของ DNA ในระหว่างกระบวนการดังกล่าว⁽¹⁸⁾

การตรวจหาการติดเชื้อ HIV-1 วิธี direct DBS real-time PCR ในตัวอย่าง clinical samples จากเด็กที่คลอดจากแม่ที่ติดเชื้อ พบผลตรวจเป็นบวกปลอมจากตัวอย่างที่มีสถานะไม่ติดเชื้อ HIV-1 ร้อยละ 9.5 (19/199 ตัวอย่าง) ในปัจจุบัน วิธีที่ให้บริการด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เองให้ผลตรงกับสถานภาพการติดเชื้อ HIV-1 ของทุกตัวอย่าง ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดย direct DBS real-time PCR ที่ขัดแย้งกับสถานะการติดเชื้ออาจเกิดจากขั้นตอนการทำ pre-amplification จำนวน 15 รอบ จากการทำ amplification จำนวน 45 รอบ จึงเหมือนกับเป็นการทำปฏิกิริยา PCR ซ้ำถึง 2 ครั้ง รวม 60 รอบ ในขณะที่การทำปฏิกิริยา PCR ด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เอง มีการทำ amplification จำนวน 45 รอบ ครั้งเดียวเท่านั้น ซึ่งโดยทั่วไปการทำ PCR มีข้อแนะนำให้ทำการเพิ่มจำนวนไม่เกิน 45 รอบ^(19,20) และการมีขั้นตอน pre-amplification อาจทำให้เกิด amplification bias เนื่องจากจะเป็นการเพิ่มปริมาณสัญญาณของ target gene เป็นจำนวนหลายเท่า (fold) จากจำนวนของ gene target

ที่มีอยู่จริงในตัวอย่าง ทำให้เกิดการอ่านผลแบบการเป็นตัวแทนมากเกินไป (overrepresentation) ซึ่งมีแนวโน้มที่ทำให้เกิดสัญญาณการอ่านเป็นผลบวกปลอมได้⁽²¹⁾ อย่างไรก็ตามชุดน้ำยาที่มีขั้นตอนการทำ pre-amplification มีข้อดีในกรณีที่ตัวอย่างมีสารพันธุกรรมเป้าหมายปริมาณน้อยหรือจำกัด

การอ่านผลการตรวจด้วยเครื่อง Mini8 Real-Time PCR System ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับน้ำยาตรวจ DirectDetect™ QRT-PCR kit ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากผู้ผลิตเดียวกัน โดยตัวรับสัญญาณแสง fluorescence (detector) เป็นเทคโนโลยีและความลับของบริษัทผู้ผลิต ซึ่งตัวรับสัญญาณแสงถูกออกแบบให้มีความจำเพาะและความไวของการตรวจจับสัญญาณ fluorescence ที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ด้วยน้ำยาของบริษัทในระดับสูง⁽²²⁾ ซึ่งแตกต่างจากวิธีที่ให้บริการในปัจจุบันด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เองที่ใช้เครื่อง ABI 7300 Real-Time PCR System ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้กันแพร่หลาย โดยพบว่าเมื่อใช้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของจำนวนยีนเป้าหมายที่เท่ากัน เครื่อง Mini8 Real-Time PCR System ให้ค่า Ct ต่ำกว่าค่าที่อ่านได้จากเครื่อง ABI 7300 Real-Time PCR System ประมาณ 10 cycles (ข้อมูลที่ไม่ได้เผยแพร่) ซึ่งเป็นการอ่านค่า Ct แบบอัตโนมัติที่ไม่สามารถปรับค่า threshold แบบ manual ได้นอกจากนี้ เครื่อง Mini8 Real-Time PCR System มีระบบการอ่านสัญญาณแสงในแนวระนาบที่สูงกว่าตำแหน่งกระดาษ DBS ที่อยู่กันหลอดทำให้ใช้ได้กับหลอดปฏิกิริยาแบบแถว (strip tube) หรือแบบหลอดที่วางในแนวแถวเตี้ยเท่านั้นและจำกัดจำนวนตัวอย่างตรวจสูงสุดได้เพียง 8 ตัวอย่าง และวิธี direct DBS real-time PCR ด้วย ในขณะที่เครื่อง ABI 7300 Real-Time PCR System มีระบบการอ่านสัญญาณแสงในแนวตั้งเหมือนเครื่อง real-time PCR ทั่วไป ซึ่งจะไม่สามารถอ่านค่าสัญญาณแสง fluorescence จากวิธี direct DBS real-time PCR เพราะถูกบังด้วยกระดาษ DBS ที่อยู่กันหลอด

การนำวิธี direct DBS real-time PCR มาใช้ในการให้บริการของสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ ต้องมีการปรับปรุงขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ให้เหมาะสม เช่น ปรับลดรอบของการทำ amplification หรือ pre-amplification อาจทำให้ลดโอกาสเกิดผลบวกปลอมและยังลดเวลาในการทำปฏิกิริยาให้สั้นลงได้อีก

การเพิ่มตัวอย่างศึกษาทางคลินิก (clinical samples) ให้เป็นไปตามมาตรฐานการประเมินชุดน้ำยาที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กำหนด (ตัวอย่างติดเชื้ออย่างน้อย 100 ตัวอย่าง และตัวอย่างไม่ติดเชื้ออย่างน้อย 700 ตัวอย่าง)⁽²³⁾ แม้ว่าจากการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพันธุกรรม primer/probe ที่ใช้ในการศึกษานี้มีความจำเพาะต่อเป้าหมาย HIV-1 *LTR* gene (in silico analysis) และไม่จับกับยีนของเชื้ออื่นๆ (ข้อมูลที่ไม่ได้เผยแพร่) คณะผู้วิจัยเห็นว่าควรมีการศึกษาก่อเกิด cross reactivity ของวิธีการตรวจที่อาจเกิดจากการติดเชื้ออื่นๆ เพิ่มเติมต่อไป เช่น Hepatitis B virus, Hepatitis C virus และ Dengue virus เป็นต้น

สรุป

วิธี direct DBS real-time PCR มีความไวในเชิงวิเคราะห์สูง เป็นวิธีการที่ง่าย สะดวกรวดเร็ว และไม่มีขั้นตอนสกัดสารพันธุกรรม จึงลดเวลาการตรวจวิเคราะห์ มีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HIV-1 ทางห้องปฏิบัติการสำหรับเด็กที่คลอดจากแม่ที่ติดเชื้อ การพัฒนาและปรับปรุงให้วิธีการมีความจำเพาะที่สูงขึ้น รวมทั้งประเมินวิธีการตรวจด้วยจำนวนตัวอย่างตามที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กำหนด ในเรื่องชุดตรวจที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อเอชไอวี ซึ่งกำหนดเกณฑ์การทดสอบหรือวิเคราะห์ชุดตรวจที่ตรวจหากรดนิวคลีอิกเพื่อการวินิจฉัยรายบุคคล กำหนดเกณฑ์ความไวเชิงวิเคราะห์ที่ 100% ของจำนวนตัวอย่างไม่น้อยกว่า 100 ตัวอย่าง และความจำเพาะเชิงวินิจฉัยที่ 99.5% ของจำนวนตัวอย่าง ไม่น้อยกว่า 700 ตัวอย่าง⁽²³⁾ จะทำให้อาจนำวิธีการนี้มาใช้ในการให้บริการได้ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และขอขอบคุณศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ให้การสนับสนุนตัวอย่างโลหิตบริจาคจากผู้ไม่ติดเชื้อ สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ รวมทั้งโรงพยาบาลทั่วไปที่ส่งตรวจตัวอย่างตรวจการติดเชื้อ HIV-1 ในเด็กที่คลอดจากแม่ที่ติดเชื้อในการให้ข้อมูลสถานะการติดเชื้อของเด็กที่ใช้ในการศึกษานี้

ผลประโยชน์ทับซ้อน

การศึกษานี้ สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ไม่ได้มีผลประโยชน์ทับซ้อน (conflict of interest) ที่เป็นส่วนได้ส่วนเสีย หรือ การรับทุนสนับสนุนการวิจัยจากนายยาบริษัท KAPA Probe Fast qPCR kit (KAPA Biosystems, MA, USA) และ นายยาบริษัท DirectDetect™ QRT-PCR kit (Coyote Bioscience, Beijing, China) ที่ได้นำมาใช้ในการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

1. Luo W, Yang H, Rathbun K, Pau CP, Ou CY. Detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA in dried blood spots by a duplex real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2005; 43(4): 1851-7.
2. วิโรจน์ พงษ์ทับทิม, ھرรษา ไทยศรี, รัชณิกร ใจชื่อ, สุพรรณิ กงแก้ว, ปิ่นทอง นะบาล, นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา และคณะ. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาสำหรับการตรวจหาเชื้อเอชไอวี-1 ด้วยวิธี real-time PCR. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 21. วันที่ 16-18 มิถุนายน 2556. โรงแรมเซ็นทาราศูนย์ราชการและคอนเวนชันเซ็นเตอร์ กรุงเทพมหานคร. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2556.
3. ھرรษา ไทยศรี, พงษ์นุวัฒน์ ศรีงาม, อาชวินทร์ ไรจนวิวัฒน์, รัชณิกร ใจชื่อ, สุธน วงษ์ศิริ. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวี-1 วิธีพีซีอาร์ ระหว่างชุดน้ำยาผลิิตใช้เอง กับชุดน้ำยาสำเร็จรูป Amplicor HIV-1 test. *ว วิชาการสาธารณสุข* 2549; 15(2): 215-24.
4. World Health Organization. WHO recommendations on the diagnosis of HIV infection in infants and children. Genève, Switzerland: World Health Organization; 2010.
5. Smit PW, Elliott I, Peeling RW, Mabey D, Newton PN. An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases. *Am J Trop Med Hyg* 2014; 90(2): 195-210.
6. Jani IV, Meggi B, Mabunda N, Vubil A, Siteo NE, Tobaiwa O, et al. Accurate early infant HIV diagnosis in primary health clinics using a point-of-care nucleic acid test. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2014; 67(1): e1-4.
7. Sidstedt M, Hedman J, Romsos EL, Waitara L, Wadsö L, Steffen CR, et al. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. *Anal Bioanal Chem* 2018; 410(10): 2569-83.
8. Nishimura N, Nakayama T, Tonoike H, Kojima K, Kato S. Direct polymerase chain reaction from whole blood without DNA isolation. *Ann Clin Biochem* 2000; 37(Pt 5): 674-80.
9. Mercier B, Gaucher C, Feugeas O, Mazurier C. Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. *Nucleic Acids Res* 1990; 18(19): 5908.
10. Carpi FM, Di Pietro F, Vincenzetti S, Mignini F, Napolioni V. Human DNA extraction methods: patents and applications. *Recent Pat DNA Gene Seq* 2011; 5(1): 1-7.
11. Grunenwald H. Direct PCR from dried blood without DNA extraction using the Failsafe™ PCR system. *Epicenter Forum* 2001; 8: 4-6.
12. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55(4): 611-22.

13. สำนักโรคเอดส์ วัณโรค และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางการตรวจรักษาและป้องกันการติดเชื้อเอชไอวีประเทศไทย ปี 2560. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด; 2560.
14. Lolekha R, Boonsuk S, Plipat T, Martin M, Tonputsu C, Punsuwan N, et al. Elimination of mother-to-child transmission of HIV - Thailand. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016; 65(22): 562-6.
15. Naiwatanakul T, Voramongkol N, Punsuwan N, Lolekha R, Gass R, Thaisri H, et al. Uptake of early infant diagnosis in Thailand's national program for preventing mother-to-child HIV transmission and linkage to care, 2008-2011. *J Int AIDS Soc* 2016; 19(1): 20511. (9 pages).
16. Mei JV, Zobel SD, Hall EM, De Jesús VR, Adam BW, Hannon WH. Performance properties of filter paper devices for whole blood collection. *Bioanalysis* 2010; 2(8): 1397-403.
17. Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J Nutr* 2001; 131(5): 1631S-6S.
18. Rohland N, Hofreiter M. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *Biotechniques* 2007; 42(3): 343-52.
19. Kadri K. Polymerase chain reaction (PCR): principle and applications. In: *Synthetic Biology-New Interdisciplinary Science*. London: IntechOpen; 2020. p. 147-163.
20. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp* 2012; (63): e3998. (15 pages).
21. Okino ST, Kong M, Sarras H, Wang Y. Evaluation of bias associated with high-multiplex, target-specific pre-amplification. *Biomol Detect Quantif*. 2016; 6: 13-21.
22. Zhang XA, Li S, Ching J, Feng HY, Yang K, Dolinger DL, et al. A sensitive and specific point-of-care detection assay for Zaire Ebola virus. *Emerg Microbes Infect* 2017; 6(1): e5. (3 pages).
23. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ชุดตรวจที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อเอชไอวี. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 126 ตอนพิเศษ 179 ง. (วันที่ 14 ธันวาคม 2552). หน้า 17.

HIV-1 Diagnosis from Direct Dried Blood Spot Samples Using real-time PCR

Wiroj Puangtabtim,¹ Ratchaneekorn Jaisue,¹ Nuanjun Wichukchinda,²
and Archawin Rojanawiwat³

¹Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

²Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

³National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Perinatal HIV-1 diagnostic testing by real-time PCR using a dried blood spot (DBS) sample is easily accessible for service delivery. We proposed a novel method, using DBS samples without DNA extraction (direct DBS real-time PCR), which is convenient and less time-consuming. A comparison between the new method using Coyote Bioscience reagent and the current one using KAPA Probe Fast reagent with DNA extraction was performed with the same set of primer/probe. Limit of detection (LOD) was determined by using 8E5 cell line, while clinical sensitivity and specificity were done on 287 leftover DBS specimens sent to the Medical Life Science Institute, Department of Medical Sciences, during 2016 to 2018. Of all the leftover samples, 88 were HIV-1 infected and 199 were non-infected. The LOD of the direct DBS real-time PCR and the current assays were 200 and 500 cells/mL of blood, respectively. The novel method had 100% (88/88) sensitivity and 90.5% (180/199) specificity with 93.4% (268/287) concordant results at kappa score 0.853 ($p < 0.001$). This study showed that the direct DBS real-time PCR was not only less time-consuming, but also more sensitive (lower LOD) than the currently used method. However, optimization to raise the specificity to be higher than 99.5% as per the Thai FDA criteria is needed for use in routine services.

Keywords: HIV-1 diagnosis, real-time PCR, direct dried blood spot samples

การพัฒนาระบบทดสอบสำหรับคัดกรองสารยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส เพื่อค้นหาสารต้านมะเร็ง

ภาณุพันธ์ ปัญญาใจ ปฐมาพร ปริกษากร พันธุ์ธิดา ดริยวง จัตรภรณ์ ไจมา และ ปณิตดา เทพอัศธร
สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพญาไท 11000

บทคัดย่อ ไทโรซีนไคเนสมีบทบาทสำคัญในการส่งสัญญาณต่างๆ ภายในเซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญ การแพร่กระจาย การลุกลาม และการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง โปรตีนกลุ่มนี้หลายชนิดใช้ในการรักษามะเร็งแบบมุ่งเป้า การศึกษาที่มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบทดสอบสำหรับคัดกรองสารยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสจากตัวอย่างสารจำนวนมาก คณะผู้วิจัยได้พัฒนาระบบทดสอบ โดยเริ่มจากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนกลุ่มนี้ในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง 4 ชนิด ด้วยวิธี quantitative real-time PCR รวมทั้งวัดระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนสใน cell lysate แต่ละชนิดด้วยวิธี ELISA เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่เหมาะสม คัดเลือกเซลล์ HeLa สำหรับพัฒนาระบบทดสอบ จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมพบว่าปริมาณ cell lysate 0.125 mg/mL peptide substrate 0.25 μ g ต่อหลุม ATP 25 nM และเวลาในการทำปฏิกิริยา 30 นาที เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาไคเนส เมื่อทดสอบระบบที่พัฒนาด้วยสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง พบว่าสารกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสลดค่าสัญญาณในระบบได้ ทดสอบความใช้ได้ของระบบโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าสัญญาณ พบว่าพารามิเตอร์ทุกค่าผ่านเกณฑ์การยอมรับ แสดงให้เห็นว่าระบบทดสอบนี้สามารถทำซ้ำได้และเหมาะสมสำหรับใช้ทดสอบสาร คณะผู้วิจัยยังนำระบบทดสอบดังกล่าวทดสอบฤทธิ์กับสารสกัดสมุนไพร 180 ตัวอย่าง และตรวจสอบยืนยันฤทธิ์อีกครั้งด้วยวิธี MTT assay และ transmembrane assay พบสารที่แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์เพาะเลี้ยงจริง ระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นจึงเหมาะสมเป็นระบบทดสอบสำหรับคัดกรองสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส

คำสำคัญ: มะเร็ง, ระบบทดสอบสำหรับคัดกรองสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส, สารยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส, เป้าหมายยาต้านมะเร็ง

Corresponding author E-mail: parnuphan.p@dmsc.mail.go.th

Received: 25 October 2021

Revised: 5 February 2022

Accepted: 7 February 2022

บทนำ

โรคมะเร็งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก ในปี พ.ศ. 2563 ประเมินการว่ามีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งจำนวน 10 ล้านคน และมีผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นจำนวน 19.3 ล้านคน โดยในปี พ.ศ. 2583 คาดการณ์ว่าจะมีผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 28.4 ล้านคน ต่อปี⁽¹⁾ สำหรับประเทศไทยโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 1 ติดต่อกันหลายปี ในปี พ.ศ. 2562 มีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็ง 84,073 คน โดยมีอัตราการตาย 128.2 คน ต่อประชากร 100,000 คน⁽²⁾ การรักษาโรคมะเร็งทำได้โดยการผ่าตัด การฉายรังสี และการใช้วิธีเคมีบำบัด แพทย์อาจพิจารณาการรักษาด้วยวิธีเดียวหรือหลายวิธีร่วมกัน การรักษาในปัจจุบันยังพบปัญหาการกลับเป็นซ้ำ การดื้อยา และการเกิดอาการไม่พึงประสงค์เนื่องจากยาเคมีบำบัด ไม่ออกฤทธิ์จำเพาะกับเซลล์มะเร็ง ทำลายเซลล์ปกติของร่างกาย⁽³⁾ การพัฒนายาที่มีประสิทธิภาพดีและมีความจำเพาะต่อเป้าหมายจึงยังเป็นที่ต้องการสำหรับโรคนี

ไทโรซีนไคเนส (tyrosine kinases) เป็นเอนไซม์ (enzyme) ชนิดหนึ่งที่เป็นกุญแจสำคัญในการส่งสัญญาณเพื่อควบคุมกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น การเจริญ การเพิ่มจำนวน การเคลื่อนที่ และการเปลี่ยนรูปร่าง โปรตีนชนิดนี้ทำหน้าที่ถ่ายโอนหมู่ฟอสเฟตตัวท้าย (γ phosphate group) จาก adenosine triphosphate (ATP) ไปยังโปรตีนเป้าหมายที่ตำแหน่งไทโรซีน แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เป็นตัวรับ (receptor tyrosine kinase: RTK) และกลุ่มที่ไม่เป็นตัวรับ (non-receptor tyrosine kinase: NRTK) ภาพรวมกระบวนการส่งสัญญาณของไทโรซีนไคเนสกลุ่ม RTK เริ่มจากลิแกนด์ (ligand) จับกับ RTK ส่วนที่ยื่นอยู่นอกเซลล์ ทำให้ RTK เข้าคู่กันในรูปแบบไดเมอร์ (dimerization) และกระตุ้นให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตระหว่างกัน (autophosphorylation) ที่ kinase domain ซึ่งอยู่ภายในเซลล์ จากนั้น RTK จะเริ่มส่งสัญญาณโดยดึงหมู่ฟอสเฟตจาก ATP และถ่ายโอนไปยังโปรตีนอื่น (phosphorylation) ที่เกี่ยวข้องกับวิธีการส่งสัญญาณ ซึ่งส่งผลการตอบสนองของเซลล์ต่อไป การส่งสัญญาณของไทโรซีนไคเนสกลุ่ม NRTK มีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยเมื่อ NRTK

ถูกกระตุ้นจะเกิด autophosphorylation หรือเกิด phosphorylation โดย NRTK ชนิดอื่นก่อนจะเริ่มส่งสัญญาณ การแสดงออกที่มากเกินไปของโปรตีนหลายชนิดในกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การแพร่กระจาย การลุกลาม และการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ในเซลล์มะเร็ง^(4,5) โปรตีนกลุ่มนี้จึงเป็นเป้าหมายในการพัฒนายา เช่น EGFR (epidermal growth factor receptor หรือ ErbB-1), HER2 (human epidermal growth factor receptor 2 หรือ ErbB-2), c-Met (hepatocyte growth factor receptor: HGFR) และ c-Kit (proto-oncogene receptor tyrosine kinase) เป็นต้น ยาที่จำเพาะต่อเป้าหมายเหล่านี้ได้รับการขึ้นทะเบียนในหลายประเทศแล้ว^(6,7) แต่ยังพบปัญหาการดื้อยา และการเกิดอาการไม่พึงประสงค์^(6,7) ดังนั้น การค้นหาสารยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส (tyrosine kinase inhibitors) เพื่อพัฒนายาใหม่ที่ออกฤทธิ์ครอบคลุมโปรตีนเป้าหมายหลายชนิด มีประสิทธิภาพดี และมีผลข้างเคียงน้อยจึงมีความสำคัญ

การวิเคราะห์ระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนส เพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีนดังกล่าว นั้น แต่เดิมใช้วิธี filtration assay (FA) ซึ่งใช้ [γ -³²P] ATP ในการทำปฏิกิริยา และกรองแยกเปปไทด์ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟต ก่อนจะตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่องวัดรังสีแบบซินทิลเลชัน (scintillation counter)⁽⁸⁾ วิธีนี้ทำให้เกิดของเสียที่ประกอบด้วยสารกัมมันตรังสี และไม่เหมาะสมกับการทดสอบกับสารต่างๆ จำนวนมากจากคลังสารเคมี (compound library) จึงมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนสด้วยวิธีการหรือหลักการอื่น เช่น วิธี scintillation proximity assay (SPA) ซึ่งใช้ [γ -³³P] ATP แทน [γ -³²P] ATP เนื่องจากมีความเสถียรมากกว่า และวิเคราะห์ระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนสจากโฟตอนที่ถูกปล่อยออกมาจากการจับตัวกันของเปปไทด์ที่เชื่อมกับไบโอติน (biotinylated peptide) กับเม็ดบีดหรือไมโครเพลทที่มี scintillant^(9,10) นอกจากนี้ยังมีวิธี fluorescence polarization (FP) ซึ่งใช้ระดับการบิดระนาบของแสง

(polarization) ในการตรวจวิเคราะห์⁽¹¹⁾ วิธี fluorescence resonance energy transfer (FRET) ซึ่งวิเคราะห์จากความเข้มข้นของการเรืองแสงที่เกิดจากการถ่ายทอดพลังงานระหว่างโมเลกุล⁽¹²⁾ และวิธี luciferase-based ATP detection ซึ่งวัดระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนสจากปริมาณ ATP ที่เหลือในระบบโดยเอนไซม์ luciferase⁽¹³⁾ วิธีตรวจวิเคราะห์ข้างต้นมีข้อจำกัด เช่น วิธี FA จำเป็นต้องใช้สารกัมมันตรังสี จึงต้องปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการเฉพาะเท่านั้น วิธี FP ให้ค่าสัญญาณวิเคราะห์ต่อสัญญาณรบกวน (signal-to noise ratio: S/N) ต่ำและไม่เหมาะกับการทดสอบกับสารที่มีความเข้มข้นสูง วิธี FRET และ luciferase-based ATP detection เป็นการวัดปฏิกิริยาโดยอ้อมและอาจถูกรบกวนจากสารยับยั้ง protease หรือ luciferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในระบบทดสอบดังกล่าว

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการตรวจวัดระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนส วิธีที่ใช้เทคนิคนี้จะใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อไทโรซีนที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphotyrosine) ในการตรวจวิเคราะห์⁽¹⁴⁻¹⁸⁾ ซึ่งสะดวกและสามารถปฏิบัติได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป แต่ส่วนใหญ่ มักใช้ไทโรซีนไคเนสที่บริสุทธิ์ซึ่งมีราคาสูงและมักจำเพาะต่อไทโรซีนไคเนสชนิดหนึ่งๆ เท่านั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบทดสอบสำหรับวิเคราะห์ระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนสด้วยเทคนิค ELISA โดยศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มไทโรซีนไคเนสในเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อคัดเลือกเซลล์ สำหรับพัฒนาระบบทดสอบ หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาทดสอบความใช้ได้ของระบบและทดลองใช้กับสารจำนวนมาก ให้ได้ระบบทดสอบสำหรับคัดกรอง (screening assay) ที่สะดวก ประหยัดต้นทุน และครอบคลุมไทโรซีนไคเนสหลายชนิด สำหรับเป็นทางเลือกในการประยุกต์ใช้เพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซีนไคเนสจากสารจำนวนมาก เพื่อนำไปศึกษาและพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่อไป

วัสดุและวิธีการ

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์มะเร็งปากมดลูกเพาะเลี้ยง HeLa (CLS, Germany) เซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยง PLC/PRF/5 (CLS, Germany) และเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง MCF-7 (CLS, Germany) เลี้ยงในอาหาร MEM (Gibco, USA) ที่เสริมด้วย 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA) และ 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, USA) เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยง KKU-100 (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, Japan) เลี้ยงในอาหาร DMEM (Gibco, USA) ที่เสริมด้วย 10% FBS บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะ CO₂ 5%

สารสกัดและพืชสมุนไพร

ตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบเป็นตัวอย่างจากคลังสารสกัดสมุนไพรของสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยเป็นสารสกัดเอทานอล จำนวน 180 ตัวอย่าง จากพืช 120 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1 การเตรียมสารสกัดโดยตัดชิ้นส่วนของตัวอย่างพืชให้มีขนาดเล็กและผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำชิ้นส่วนพืชแห้งที่ได้หมักด้วยเอทานอล 95% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองและหมักซ้ำอีก 24 ชั่วโมง นำสารที่กรองได้ไประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ จากนั้นเตรียมตัวอย่าง โดยละลายสารสกัดที่ได้ด้วย absolute ethanol ให้ได้ความเข้มข้น 0.3, 1, 3 และ 10 mg/mL

สำหรับตัวอย่างพืชที่แสดงฤทธิ์ที่ IC₅₀ < 100 µg/mL จากการคัดกรองด้วยระบบทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส ได้แก่ ทับทิม (*Punica granatum* L.) ว่านหอมแดง (*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.) มะยม (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) น้านมราชสีห์ (*Euphorbia hirta* L.) และพลู (*Piper betle* L.) มีการเก็บรวบรวมตัวอย่างอีกครั้งจากพื้นที่จังหวัดราชบุรี เดือนกรกฎาคม 2562 และตรวจระบุชนิดพร้อมจัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิง ตัวอย่าง

ทั้งหมดเก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์พืช กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หมายเลขพรรณไม้ DMSC 5274, DMSC 5278, DMSC 5275, DMSC 5277 และ DMSC 5273 ตามลำดับ

การศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มไทโรซีนไคเนส

เพาะเลี้ยงเซลล์ HeLa, PLC/PRF/5, MCF-7 และ KKU-100 ชนิดละ 3 ตัวอย่าง แล้วยำเซลล์แต่ละชนิด จำนวน 1.5×10^6 เซลล์ มาสกัด RNA ด้วยชุดน้ำยา RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) สังเคราะห์ cDNA โดยใช้ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher, USA) และใช้ชุดน้ำยา LightCycler® FastStart DNA Master PLUS SYBR Green I (Roche, Germany) ใน

การเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการศึกษา โดยใช้ primers และสภาวะ ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ เพื่อศึกษายีนเป้าหมาย คือ *EGFR*, *HER2*, *MET* และ *KIT* ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers ได้มาจากฐานข้อมูล PrimerBank⁽¹⁹⁾ โดยการสกัด RNA การเตรียม cDNA และการเพิ่มปริมาณ DNA ดำเนินการตามวิธีของชุดน้ำยาทั้งหมด จากนั้นวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยวิธี quantitative real-time PCR ด้วยเครื่อง LightCycler® (Roche, Germany) ใช้ยีน *GAPDH* ซึ่งเป็นยีนเจ้าบ้าน (housekeeping gene)⁽²⁰⁾ สำหรับ normalization คำนวณค่า relative expression จากการนำค่าการเพิ่มจำนวน (copy number) ของยีนเป้าหมายหารด้วยค่าการเพิ่มจำนวนของยีน *GAPDH*

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบ

ลำดับที่	พืชสมุนไพร (ชื่อท้องถิ่น)	ส่วนที่ใช้	ลำดับที่	พืชสมุนไพร (ชื่อท้องถิ่น)	ส่วนที่ใช้
1	กระเจี๊ยบแดง	กิ่งและใบ ผลดิบ	14	กาหลง	ดอก ใบ
2	กระเทียม	หัวใต้ดิน	15	กุ่ม	ใบ
3	กระเทียมเถา	ใบ ดอก	16	แก้ว	ใบ
4	กระชาย	ส่วนเหนือดิน เหง้า	17	โกสน	ใบ
5	กระชายดำ	ส่วนเหนือดิน เหง้า	18	ขจร	กิ่งและใบ
6	กระตุมไพลิน	ส่วนเหนือดิน	19	ขมิ้น	ส่วนเหนือดิน
7	กระตือกไค้ดำ	ส่วนเหนือดิน	20	ข่อย	กิ่งและใบ
8	กระถิน	กิ่งและใบ ผล	21	ขัดมอน	ส่วนเหนือดิน
9	กระถินป่า	ใบ ดอก	22	ชำ	ส่วนเหนือดิน เหง้า
10	กระพังโหม	ส่วนเหนือดิน	23	ชิง	ส่วนเหนือดิน
11	กระสัง	ทุกส่วน	24	ขลุ	ส่วนเหนือดิน
12	กล้วย	ใบ ดอก ผลดิบ	25	จันทร์กระจ่างฟ้า	ใบ
13	กะเพราแดง	ส่วนเหนือดิน	26	ชะพลู	ใบ
			27	ช้างกระ	ใบ
			28	ขำมะเลียง	ดอก
			29	ขำมะนาด	ผล ใบ ดอก

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบ (ต่อ)

ลำดับที่	พืชสมุนไพร (ชื่อท้องถิ่น)	ส่วนที่ใช้	ลำดับที่	พืชสมุนไพร (ชื่อท้องถิ่น)	ส่วนที่ใช้
30	ชุมเห็ดเทศ	ใบ ดอก	57	พญาขอ	ดอก
31	ต้อยติ่ง	ส่วนเหนือดิน ราก	58	พริกไทย	ใบ ผลดิบ
32	ตะไคร้	ใบ	59	พริกหอม	กิ่งและใบ ผล
33	ตะขบหิน	ส่วนเหนือดิน	60	พลู	ใบ
34	ตำแยแมว	ส่วนเหนือดิน ราก	61	พวงคราม	ใบ ดอก
35	ตีนตุ๊กแก	ทุกส่วน	62	พัฒนางชี	ราก
36	ทองพันชั่ง	กิ่งและใบ ราก	63	พังกา	ส่วนเหนือดิน
37	ทองหลาง	ดอก	64	พุด	ดอก
38	ทับทิม	กิ่งและใบ เมล็ด	65	พุทธรักษา	ส่วนเหนือดิน เหง้า
39	เทียนหยด	ผล	66	โพ	กิ่งและใบ ผล
40	ธรณีสาร	กิ่งและใบ	67	ไพลดำ	ส่วนเหนือดิน
41	น้อยหน่า	เมล็ด			ดอก
42	น้ำมันราชสีห์	ทุกส่วน			เหง้า
43	บัวฉัตรขาว	ใบ ก้าน กลีบดอก	68	ฟ้าทะลายโจร	ส่วนเหนือดิน
44	บานไม่รู้โรย	ส่วนเหนือดิน	69	มะกรูด	เปลือกผล เมล็ด
45	ใบนาคน	ส่วนเหนือดิน			กิ่งและใบ
46	ผักเป็ดแดง	ส่วนเหนือดิน	70	มะกา	ใบ
47	ผักเสี้ยน	ส่วนเหนือดิน	71	มะคำดีควาย	ผล
48	ผักเสี้ยนผี	ส่วนเหนือดิน	72	มะดัน	ใบ
49	ผักแครด	ส่วนเหนือดิน			ผล
50	ผักโขม	ส่วนเหนือดิน	73	มะตูม	ใบ
51	ผักกาดน้ำ	ทุกส่วน			เนื้อผลสุก
52	ผักชี	ส่วนเหนือดิน			เมล็ด
53	ผักชีฝรั่ง	ใบ ดอก ราก	74	มะนาว	กิ่งและใบ เปลือกผล
54	ผักบุ้ง	ใบ ผล	75	มะปราง	เปลือกผล ใบ
55	ผักปลาบ	ส่วนเหนือดิน	76	มะพูด	ใบ
56	ผักหวานบ้าน	กิ่งและใบ ผล			เนื้อผลสุก เมล็ด

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบ (ต่อ)

ลำดับที่	พืชสมุนไพร (ชื่อท้องถิ่น)	ส่วนที่ใช้	ลำดับที่	พืชสมุนไพร (ชื่อท้องถิ่น)	ส่วนที่ใช้
77	มะม่วงหาวมะนาวโห่	ใบ	98	ว่านกวณิม	ส่วนเหนือดิน
78	มะยม	เปลือกต้น	99	ว่านหอมแดง	เหง้า
		ใบ	100	ว่านทางจระเข้	เปลือกใบ
79	มะระ	ผล			เนื้อวุ้น
80	มะระขี้นก	ผล	101	สนแฉะ	ใบ
81	มะรุม	ใบ	102	สร้อยทอง	ส่วนเหนือดิน
		ผล	103	สะเดา	ใบ
82	มะละกอ	ใบ			ดอก
		ลำต้น			เมล็ด
83	มะลิ	ใบ	104	สะเดาดิน	ทุกส่วน
		ดอก	105	สระระแห่	ทุกส่วน
84	มะลิวัลย์	ใบ	106	สับปะรด	ใบ
		ดอก			เปลือกผล
85	มะแว้งเครือ	ส่วนเหนือดิน	107	สาบม่วง	ส่วนเหนือดิน
86	มันสำปะหลัง	ส่วนเหนือดิน	108	เสลดพังพอนตัวเมีย	ส่วนเหนือดิน
		หัวใต้ดิน	109	เสาวรส	กิ่งและใบ
87	โมกบ้าน	กิ่งและใบ	110	โสมไทย	ส่วนเหนือดิน
88	ไมยราบ	ส่วนเหนือดิน			ราก
89	ยอ	ผล	111	หญ้าแห้วหมู	ส่วนเหนือดิน
		ใบ			ราก
90	ย่านาง	ใบ	112	หญ้างวงช้าง	ส่วนเหนือดิน
91	รัก	กิ่งและใบ			ราก
92	รางจืด	ใบ	113	หญ้าหมอน้อย	ส่วนเหนือดิน
93	ราชพฤกษ์	ใบ	114	หนอนตายหยาก	ราก
		ดอก	115	หนามแดง	ผลดิบ
94	รำเพย	ใบ	116	หนามกระสุน	ทุกส่วน
95	ลูกใต้ใบ	ใบ	117	หนุมานประสาณกาย	ใบ
96	เล็บครุฑ	ส่วนเหนือดิน	118	หม่อน	ใบ
97	เล็บมือนาง	ใบ	119	เหงือกปลาหมอ	ส่วนเหนือดิน
		ดอก	120	อัญชัน	ดอก
					กิ่งและใบ

ตารางที่ 2 Primers ที่ใช้ในการศึกษา

ยีนเป้าหมาย	โปรตีน	Forward primer	Reverse primer
<i>EGFR</i>	EGFR	AGGCACGAGTAACAAGCTCAC	ATGAGGACATAACCAGCCACC
<i>HER2</i>	HER2	TGCAGGGAAACCTGGAAGCTC	ACAGGGGTGGTATTGTTTCAGC
<i>MET</i>	c-Met	ACAGTGGCATGTCAACATCGCT	CCATTGAGATCATCACTGGCT
<i>KIT</i>	c-Kit	GGCGACGAGATTAGGCTGTT	CATTCGTTTCATCCAGGATCTCA
<i>GAPDH</i>	GAPDH	TGTTGCCATCAATGACCCCTT	CTCCACGACGTACTCAGCG

ตารางที่ 3 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการศึกษา

ยีนเป้าหมาย	<i>EGFR</i>	<i>HER2</i>	<i>MET</i>	<i>KIT</i>	<i>GAPDH</i>
Pre-incubation	95°C, 10 นาที	95°C, 10 นาที	95°C, 10 นาที	95°C, 10 นาที	95°C, 10 นาที
Amplification	45 รอบ	45 รอบ	45 รอบ	45 รอบ	45 รอบ
	95°C, 15 วินาที	95°C, 15 วินาที	95°C, 15 วินาที	95°C, 15 วินาที	95°C, 15 วินาที
	62°C, 45 วินาที	62°C, 45 วินาที	62°C, 45 วินาที	62°C, 45 วินาที	62°C, 45 วินาที
	72°C, 8 วินาที	72°C, 9 วินาที	72°C, 8 วินาที	72°C, 4 วินาที	72°C, 10 วินาที
Melting curve	65°C, 1 นาที	65°C, 1 นาที	65°C, 1 นาที	65°C, 1 นาที	65°C, 1 นาที
Cooling	40°C, 30 วินาที	40°C, 30 วินาที	40°C, 30 วินาที	40°C, 30 วินาที	40°C, 30 วินาที

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ระดับการทำงานของโปรตีนกลุ่มไทโรซีนไคเนส

การพัฒนาระบบทดสอบเริ่มจากการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ระดับการทำงานของโปรตีนกลุ่มไทโรซีนไคเนส ซึ่งแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ การทำปฏิกิริยาไคเนส (kinase reaction) และการตรวจ phosphotyrosine ด้วยเทคนิค ELISA ดังแสดงในภาพที่ 1 ลำดับแรกเพาะเลี้ยงเซลล์ HeLa, PLC/PRF/5, MCF-7 และ KKKU-100 ชนิดละ 3 ตัวอย่าง แล้วนำเซลล์แต่ละชนิดจำนวน 5×10^6 เซลล์ มาปั่นล้างด้วย PBS (Gibco, USA) และเตรียม cell lysate สำหรับทำปฏิกิริยา โดยเติม lysis buffer (KH_2PO_4 100 mM: pH 7.8, Na_3VO_4 1 mM, 0.2% Triton X-100, 10% glycerin) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นวางทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ 1,200 rpm 10 นาที นำ cell lysate ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยเครื่อง NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) และปรับความเข้มข้นของโปรตีนให้เป็น 1.50 mg/mL ด้วย lysis buffer

การทำปฏิกิริยาไคเนสดัดแปลงจากวิธีของ Ghosh G และคณะ⁽²¹⁾ ขั้นแรกเตรียม peptide substrate สำหรับปฏิกิริยาไคเนส โดยนำเปปไทด์ KKKAEEEEYFELVAC ที่เชื่อมกับ biotin ซึ่งสังเคราะห์จากบริษัท GenScript (USA) ใน coating buffer (Na_2CO_3 15 mM, NaHCO_3 35 mM, pH 9.6) เคลือบลงบนไมโครเพลท Nunc MaxiSorp™ (Thermo Fisher Scientific, USA) หลุมละ 2 μg บ่มที่ 4°C ซ้ำคืนแล้วล้างไมโครเพลทด้วย tris buffered saline with Tween 20 (TBST; Tris base 20 mM, NaCl 150 mM, 0.1% Tween 20, pH 7.6) จากนั้นเตรียมปฏิกิริยาไคเนสโดยผสม 3X reaction buffer (HEPES 60 mM: pH 7.2, MnCl_2 30 mM, MgCl_2 45 mM, bovine serum albumin 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dithiothreitol 3 mM) 50 μL , 50% glycerin 15 μL , 1 mM ATP (CALBIOCHEM, USA) 15 μL และ cell lysate 70 μL (รวม 150 μL ต่อปฏิกิริยา) นำสารละลายผสมดังกล่าวเติมลงในไมโครเพลทที่เคลือบด้วย peptide substrate ที่เตรียมไว้หลุมละ 50 μL และบ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

การตรวจ phosphotyrosine ดำเนินการโดยล้างไมโครเพลทที่ทำปฏิกิริยาไคเนสด้วย TBST แล้ว block ด้วย 3% skim milk (BD Biosciences, USA) ใน TBST ปริมาตร 100 μ L ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย TBST แล้วเติม phospho-tyrosine monoclonal antibody, clone pY20 (Invitrogen, USA) ซึ่งเป็น primary antibody ใน 3% skim milk/TBST อัตราการเจือจาง 1:1,000 ปริมาตร 100 μ L ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย TBST จากนั้นเติม polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins/HRP (DakoCytomation, Denmark) ซึ่งเป็น secondary antibody ใน TBST อัตราการเจือจาง 1:2,000 ปริมาตร 100 μ L ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย TBST จากนั้นเติม TMB 2-Component Microwell Peroxidase Substrate (SeraCare, USA) 100 μ L ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1% HCl ปริมาตร 100 μ L ต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท Infinite M200 PRO (TECAN, Switzerland)

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาไคเนส

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาไคเนส ดำเนินการดังนี้

1) การแปรผันความเข้มข้นของ cell lysate 0–2 mg/mL โดยเตรียม cell lysate ให้มีความเข้มข้น 0.008, 0.016, 0.031, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/mL และทำปฏิกิริยาไคเนส โดยกลุ่มควบคุมให้เติม lysis buffer ในปริมาตรเท่ากัน จากนั้นตรวจ phosphotyrosine เพื่อวิเคราะห์ระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนส แล้วเปรียบเทียบค่าสัญญาณการดูดกลืนแสงกับกลุ่มควบคุม เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสม ทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ขั้ว

2) การแปรผันปริมาณ peptide substrate ในการเคลือบไมโครเพลท 0–2 μ g ต่อหลุม โดยนำ peptide substrate ใน coating buffer มาเคลือบลงบนไมโครเพลท Nunc MaxiSorp™ หลุมละ 0.016, 0.031, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 μ g โดยกลุ่ม

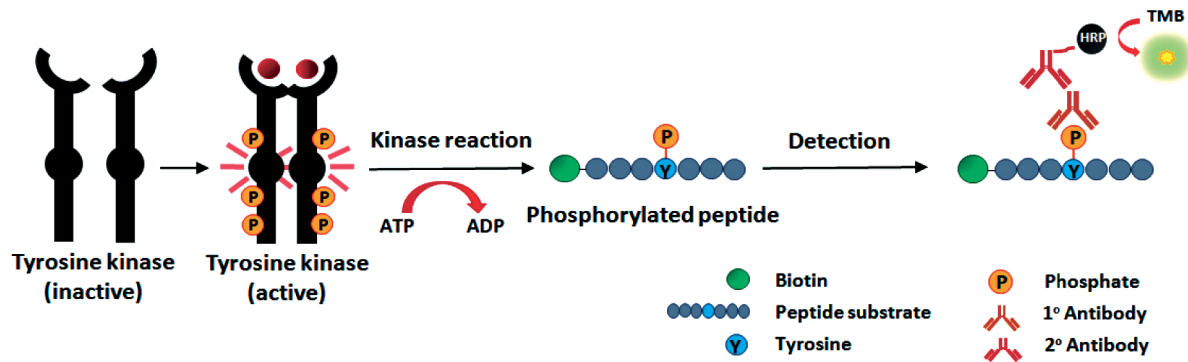
ควบคุมให้เติม coating buffer ในปริมาตรเท่ากัน บ่มที่ 4°C ชำมคืนและทำปฏิกิริยาไคเนสโดยใช้ความเข้มข้น cell lysate ที่ได้จากการทดสอบในข้อ 1) จากนั้นตรวจ phosphotyrosine เพื่อวิเคราะห์ระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนส แล้วเปรียบเทียบค่าสัญญาณการดูดกลืนแสงกับกลุ่มควบคุมเพื่อคัดเลือกปริมาณที่เหมาะสม ทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ขั้ว

3) การแปรผันความเข้มข้นของ ATP ในปฏิกิริยา 0–200 nM โดยเตรียมสารละลาย ATP ที่ความเข้มข้น 0.031, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mM แล้วนำไปผสมกับ 3X reaction buffer, 50% glycerin และ cell lysate และทำปฏิกิริยาไคเนส ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเป็น 3.1, 6.3, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 nM ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมให้เติมน้ำกลั่นในปริมาตรเดียวกัน โดยใช้ความเข้มข้น cell lysate และปริมาณ peptide substrate ในการเคลือบไมโครเพลทที่ได้จากการทดสอบในข้อ 1) และ 2) จากนั้นตรวจ phosphotyrosine เพื่อวิเคราะห์ระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนส แล้วเปรียบเทียบค่าสัญญาณการดูดกลืนแสงกับกลุ่มควบคุมเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสม ทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ขั้ว

4) การแปรผันเวลาในการทำปฏิกิริยาไคเนส 0–60 นาที โดยทำปฏิกิริยาไคเนสและบ่มที่อุณหภูมิห้อง 0, 5, 10, 15, 30 และ 60 นาที โดยใช้ความเข้มข้น cell lysate ปริมาณ peptide substrate ในการเคลือบไมโครเพลท และความเข้มข้น ATP ที่ได้จากการทดสอบในข้อ 1) – 3) จากนั้นตรวจ phosphotyrosine เพื่อวิเคราะห์ระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนส เปรียบเทียบค่าสัญญาณการดูดกลืนแสงกับกลุ่มควบคุม (เวลาในการทำปฏิกิริยา 0 นาที) เพื่อคัดเลือกเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม ทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ขั้ว

การทดสอบความคงทนต่อตัวทำละลาย (solvent tolerance) ของระบบทดสอบ

ทดสอบระบบที่พัฒนาขึ้นในสภาวะที่มีตัวทำละลายเอทานอล และ dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, USA) ปริมาณ 0–10% โดยเติม absolute ethanol หรือ DMSO ในขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยาไคเนส ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5, 1, 2, 4, 6, 8



ภาพที่ 1 การตรวจวัดระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนสด้วยเทคนิค ELISA ขั้นแรกทำปฏิกิริยาไคเนสเพื่อให้เกิดการถ่ายโอนหมู่ฟอสเฟตจาก ATP ไปยัง peptide substrate ที่ตำแหน่งไทโรซีน จากนั้นใช้แอนติบอดีที่จำเพาะในการตรวจ phosphotyrosine เพื่อวิเคราะห์ระดับการทำงาน

และ 10% และบ่มที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ก่อนนำสารละลายผสมดังกล่าวเติมลงในไมโครเพลทที่เคลือบ peptide substrate ที่เตรียมไว้ เพื่อทำปฏิกิริยาไคเนส โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษา ได้แก่ cell lysate ความเข้มข้น 0.125 mg/mL ปริมาณ peptide substrate ในการเคลือบไมโครเพลท 0.25 μ g ต่อหลุม ATP ความเข้มข้น 25 nM และเวลาในการทำปฏิกิริยาไคเนส 30 นาที จากนั้นจึงวิเคราะห์ค่าสัญญาณการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นต่างๆ ของตัวทำละลาย และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่เติมตัวทำละลายทั้งสองชนิด ทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ขั้ว

การตรวจสอบความถูกต้องของระบบทดสอบ

ทดสอบระบบที่พัฒนาขึ้นกับสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง รวม 7 ชนิด แบ่งเป็นสารที่มีรายงานฤทธิ์ยับยั้งโปรตีนกลุ่มไทโรซีนไคเนส EGFR, HER2, c-Met และ c-Kit รวม 6 ชนิด คือ axitinib, crizotinib, sunitinib, gefitinib, erlotinib และ lapatinib^(6,7) และสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งด้วยกลไกการแทรกตัวเข้าไปใน DNA (DNA intercalation) คือ doxorubicin สารทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma-Aldrich (USA) โดยเติมสารในขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยาไคเนสให้มีความเข้มข้น 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 และ 100 μ g/mL บ่มที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ก่อนนำสารละลายผสมเติมลงในไมโครเพลทที่เคลือบ peptide substrate เพื่อ

ทำปฏิกิริยาไคเนส โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษา ได้แก่ cell lysate ความเข้มข้น 0.125 mg/mL ปริมาณ peptide substrate ในการเคลือบไมโครเพลท 0.25 μ g ต่อหลุม ATP ความเข้มข้น 25 nM และเวลาในการทำปฏิกิริยาไคเนส 30 นาที จากนั้นวัดค่าสัญญาณการดูดกลืนแสง และวิเคราะห์ร้อยละการยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส (%inhibition) แล้ววาดกราฟเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสได้ร้อยละ 50 (inhibitory concentration at 50%, IC₅₀) เพื่อตรวจสอบว่าระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้สำหรับคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซีนไคเนสได้หรือไม่ ทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ขั้ว

การทดสอบความใช้ได้ของระบบทดสอบ

การทดสอบความใช้ได้ของระบบ กรณีทดสอบต่างหลุม (intra-plate) ต่างไมโครเพลท (inter-plate) และต่างวัน (inter-day) ดัดแปลงจากวิธีของ Iversen PW และคณะ⁽²²⁾ ทดสอบระบบที่พัฒนาขึ้นในสภาวะต่างๆ ที่ทำให้ได้ค่าสัญญาณที่ผ่านการปรับค่าแล้ว (normalized signal ซึ่งในที่นี้คือ %inhibition) ระดับสูงสุด (max) ปานกลาง (mid) และต่ำสุด (min) ดังนี้ การทดสอบในสภาวะที่ทำให้ได้ค่าสัญญาณสูงสุด (max) โดยทำปฏิกิริยาไคเนส แต่ไม่เติม cell lysate และสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส ลงในปฏิกิริยา ใช้ lysis buffer ในปริมาตรเดียวกันแทน cell lysate ในขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยาไคเนส

การทดสอบในสภาวะที่ทำให้ได้ค่าสัญญาณปานกลาง (mid) โดยทำปฏิกิริยาไคเนส และเติมสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส (gefitinib) ในขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยาไคเนสที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.25, 0.5, 1, 2, 4 และ 8 $\mu\text{g/mL}$

การทดสอบในสภาวะที่ทำให้ได้ค่าสัญญาณต่ำสุด (min) โดยทำปฏิกิริยาไคเนส แต่ไม่เติมสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสในขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยาไคเนส

การทำปฏิกิริยาไคเนส ใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษา ได้แก่ cell lysate ความเข้มข้น 0.125 mg/mL ปริมาณ peptide substrate ในการเคลือบไมโครเพลท 0.25 μg ต่อหลุม ATP ความเข้มข้น 25 nM และเวลาในการทำปฏิกิริยาไคเนส 30 นาที จากนั้นวัดค่าสัญญาณการดูดกลืนแสง โดยทดสอบสภาวะละ 4 ซ้ำ ในไมโครเพลทเดียวกัน (intra-plate) จำนวน 3 ไมโครเพลท (inter-plate) ติดต่อกัน 3 วัน (inter-day) แล้วคำนวณค่า Z' factor ซึ่งเป็นพารามิเตอร์หลักในการพิจารณาความใช้ได้และคุณภาพของระบบ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%coefficient of variation หรือ %CV) ของค่าสัญญาณ และค่า %inhibition จากสูตรคำนวณต่อไปนี้

$$Z' \text{ factor} = 1 - 3 \times \frac{SD_{\max} - SD_{\min}}{\text{mean}_{\max} - \text{mean}_{\min}}$$

$$\%CV = \frac{SD}{\text{mean}} \times 100$$

$$\%inhibition = \left(\frac{OD_{\text{control}} - OD_{\text{test}}}{OD_{\text{control}}} \right)$$

โดย SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, mean คือ ค่าเฉลี่ย, OD_{control} และ OD_{test} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ตามลำดับ

เกณฑ์การยอมรับของผลการทดสอบ^(22,23) ได้แก่ การทดสอบ intra-plate โดยแต่ละไมโครเพลทจะต้องมีค่า $\%CV_{\max}$, $\%CV_{\text{mid}}$, $\%CV_{\min} \leq 20\%$, ค่า SD ของ %inhibition ระดับปานกลาง ($SD_{\text{mid-normalized}}$) ≤ 20 และค่า Z' factor ≥ 0.5 ส่วนการทดสอบ inter-plate และ inter-day ค่า %inhibition ระหว่างไมโครเพลทและระหว่างวันต้องแตกต่างกันน้อยกว่า 15%

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสในตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร

นำระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นทดสอบกับตัวอย่างจากคลังสารสกัดสมุนไพร โดยเป็นสารสกัดเอทานอลจำนวน 180 ตัวอย่าง จากพืช 120 ชนิด โดยเติมตัวอย่างสารสกัดความเข้มข้น 0.3, 1, 3 และ 10 mg/mL ปริมาตร 1.5 μL ในขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยาไคเนส ใช้ gefitinib ที่ความเข้มข้นและปริมาตรเดียวกันสำหรับกลุ่มควบคุมบวก และใช้ absolute ethanol ที่ปริมาตรเดียวกันสำหรับกลุ่มควบคุมลบ นำสารละลายผสมบ่มที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที และเติมลงในไมโครเพลทที่เคลือบ peptide substrate เพื่อทำปฏิกิริยาไคเนส โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษา ได้แก่ cell lysate ความเข้มข้น 0.125 mg/mL ปริมาณ peptide substrate ในการเคลือบไมโครเพลท 0.25 μg ต่อหลุม ATP ความเข้มข้น 25 nM และเวลาในการทำปฏิกิริยาไคเนส 30 นาที จากนั้นวัดค่าสัญญาณการดูดกลืนแสง ทดสอบ 2 ซ้ำ สำหรับการทดสอบเบื้องต้น (primary screening) จากนั้นวิเคราะห์ค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส (%inhibition) และ IC_{50} และคัดเลือกสารสกัดที่แสดงฤทธิ์ที่ $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ ทดสอบฤทธิ์อีกครั้ง โดยทำการทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร

นำตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรที่แสดงฤทธิ์ที่ $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ ในการยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เพื่อตรวจสอบยืนยันฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยเตรียมเซลล์ HeLa ให้มีปริมาณ 2×10^5 cells/mL แล้วเพาะเลี้ยงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม หลุมละ 200 μL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้น 0.3, 1, 3 และ 10 mg/mL ปริมาตร 2 μL ใช้ gefitinib เดิมที่ความเข้มข้นและปริมาตรเดียวกันสำหรับกลุ่มควบคุมบวก และใช้ absolute ethanol เดิมที่ปริมาตรเดียวกันสำหรับกลุ่มควบคุมลบ เพาะเลี้ยงต่อ 48 ชั่วโมง และตรวจวัดการเจริญของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay⁽²⁴⁾ เพื่อวิเคราะห์ค่าร้อยละ

การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (%inhibition) สำหรับหาค่า IC_{50} ทำการทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ในตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร

นำตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรที่แสดงฤทธิ์ที่ $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ ในการยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เพื่อตรวจสอบยืนยันฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยดัดแปลงจากวิธี trans-membrane assay⁽²⁵⁾ โดยเตรียมเซลล์ HeLa ให้มีปริมาณ $2.5 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่ไม่ผสม FBS ใส่ลงใน cell culture insert (Corning, USA) หลุมละ 300 μL และเติมตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้น 1 หรือ 3 mg/mL ปริมาตร 3 μL ใช้ gefitinib ที่ความเข้มข้นและปริมาตรเดียวกันสำหรับกลุ่มควบคุมบวก และใช้ absolute ethanol ที่ปริมาตรเดียวกันสำหรับกลุ่มควบคุมลบ จากนั้นเตรียมไมโครเพลทสำหรับวาง cell culture insert โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่ผสม FBS 10% และรีคอมบิแนนท์โปรตีน SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) 100 mg/mL ปริมาตรรวม 700 μL ลงในไมโครเพลทชนิด 24 หลุม และเติมตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้น 1 หรือ 3 mg/mL ปริมาตร 7 μL ใช้ gefitinib ที่ความเข้มข้นและปริมาตรเดียวกันสำหรับกลุ่มควบคุมบวก และใช้ absolute ethanol ที่ปริมาตรเดียวกันสำหรับกลุ่มควบคุมลบ จากนั้นนำ cell culture insert ที่เตรียมวางลงบนไมโครเพลท และเพาะเลี้ยง 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด ตรึงเซลล์ด้วยเมทานอล (JT Baker, USA) และย้อมสีเซลล์ด้วย 25% Giemsa stain solution (Merck, USA) นับจำนวนเซลล์ที่เกาะอยู่บน cell culture insert และคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์ (%inhibition) ทำการทดสอบ 3 ครั้ง

สำหรับรีคอมบิแนนท์โปรตีน SDF-1 ซึ่งเป็นสารกระตุ้นการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง⁽²⁶⁾ ผลิตโดยโคลนยีน *SDF-1* จากเซลล์ PLC/PRF/5 เข้าสู่พลาสมิด pGEM®-T (Promega, USA) เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้น subclone เข้าสู่พลาสมิด pET-21a

(Novagen, USA) และนำเข้าสู่ *E. coli* BL21 (DE3) เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Ni-NTA affinity chromatography⁽²⁷⁾

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลนำเสนอในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยมากกว่า 2 กลุ่ม ใช้ ANOVA (analysis of variance) จากนั้นเปรียบเทียบข้อมูลที่ต่างกันด้วย Tukey's multiple comparisons test กำหนดค่า $p < 0.05$ ถือว่า มีนัยสำคัญทางสถิติ วิเคราะห์โดยซอฟต์แวร์ GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, USA)

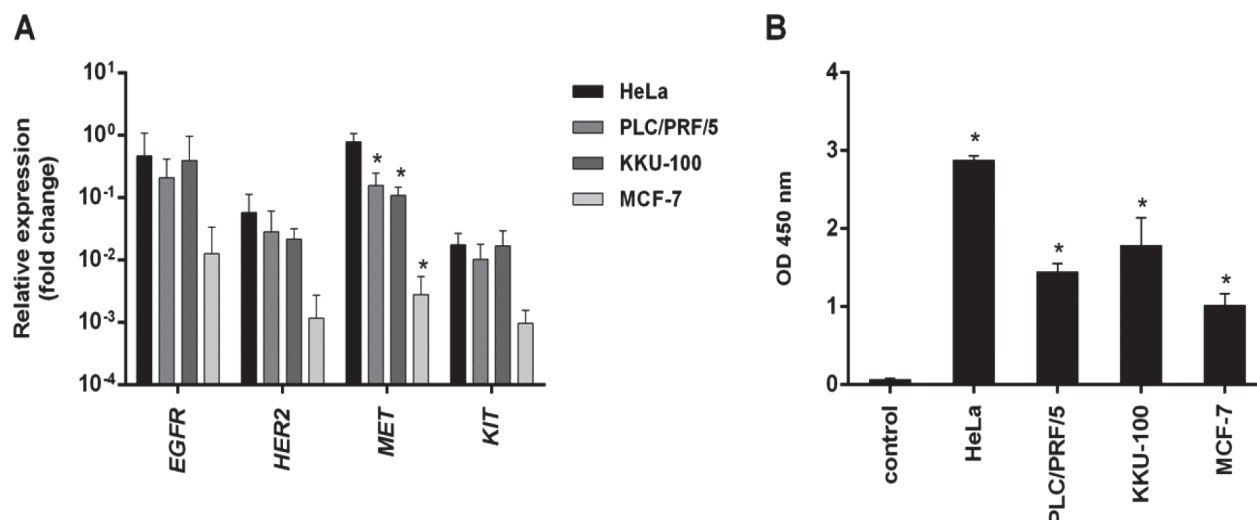
ผล

การศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มไทโรซีนไคเนส

การศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มไทโรซีนไคเนส พบว่าโดยภาพรวม เซลล์ HeLa มีระดับการแสดงออกของยีนทั้งสี่ชนิด คือ *EGFR*, *HER2*, *MET* และ *KIT* สูงกว่าเซลล์ PLC/PRF/5, MCF-7 และ KKKU-100 อย่างไรก็ตามระดับการแสดงออกของยีน *EGFR*, *HER2* และ *KIT* ไม่แตกต่างกันในแต่ละเซลล์ ยกเว้นยีน *MET* ที่มีการแสดงออกในเซลล์ HeLa มากกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงอื่น ดังแสดงในภาพที่ 2A

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ระดับการทำงานของโปรตีนกลุ่มไทโรซีนไคเนส

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ระดับการทำงานของโปรตีนกลุ่มไทโรซีนไคเนส โดยนำ cell lysate ของเซลล์ HeLa, PLC/PRF/5, KKKU-100 และ MCF-7 มาทำปฏิกิริยาไคเนส และตรวจ phosphorylation เพื่อวิเคราะห์ระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนส พบว่าเซลล์ HeLa, PLC/PRF/5, KKKU-100 และ MCF-7 ให้ค่าสัญญาณเป็น 2.88, 1.45, 1.79 และ 1.02 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2B เนื่องจากเซลล์ HeLa มีระดับการแสดงออกของยีนกลุ่มไทโรซีนไคเนสสูงกว่าเซลล์ชนิดอื่นโดยภาพรวม และมีระดับการทำงานของโปรตีนไทโรซีนไคเนสสูงที่สุด จึงเลือกใช้เซลล์ HeLa ในการพัฒนาระบบทดสอบ



ภาพที่ 2 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มไทโรซีนไคเนส และการตรวจวัดระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนส ในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ (A) การศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มไทโรซีนไคเนส ได้แก่ *EGFR*, *HER2*, *MET* และ *KIT* ในเซลล์เพาะเลี้ยง HeLa, PLC/PRF/5, KKKU-100 และ MCF-7 ด้วยวิธี quantitative real-time PCR ทดสอบกับเซลล์ชนิดละ 3 ตัวอย่าง * คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับเซลล์ HeLa (B) การตรวจวัดระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนสจาก cell lysate ของเซลล์เพาะเลี้ยง HeLa, PLC/PRF-5, KKKU-100 และ MCF-7 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่เติม cell lysate จากการวัด phosphotyrosine ที่เกิดจากปฏิกิริยาไคเนส ด้วยวิธี ELISA ทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ * คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาไคเนส

การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ cell lysate ในช่วง 0-2 mg/mL พบว่าค่าสัญญาณจากการตรวจวัดระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนสในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่เติม cell lysate เป็น 0.15 โดยค่าสัญญาณจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ความเข้มข้น 0.008 mg/mL (0.53) และจะสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น จากนั้นจะเริ่มคงที่เมื่อ cell lysate มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.25 mg/mL ขึ้นไป โดยค่าสัญญาณในช่วงความเข้มข้น 0.25-2 mg/mL จะอยู่ระหว่าง 3.68-3.87 ซึ่งไม่มี ความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นถึงปริมาณ cell lysate ที่มากเกินไป จึงเลือกความเข้มข้น 0.125 mg/mL ซึ่งให้ค่าสัญญาณเป็น 3.44 ในการทดลองต่อไป ดังแสดง ในภาพที่ 3A

การศึกษาปริมาณ peptide substrate ที่เหมาะสม ในการเคลือบไมโครเพลท และการศึกษาความเข้มข้นที่ เหมาะสมของ ATP ในปฏิกิริยา พิจารณาด้วยหลักการ

เดียวกัน สำหรับ peptide substrate พบว่าที่ปริมาณ 0.031 μ g ต่อหลุมขึ้นไป จะให้ค่าสัญญาณที่สูงกว่ากลุ่ม ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจะเริ่มคงที่เมื่อมี ปริมาณตั้งแต่ 0.5 μ g ต่อหลุม ดังแสดงในภาพที่ 3B จึงเลือกใช้ปริมาณ 0.25 μ g ต่อหลุม ในการทดลองต่อไป ส่วน ATP จะให้ค่าสัญญาณที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่ความเข้มข้น 3.1 nM ขึ้นไป และจะเริ่มคงที่ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50 nM จึงเลือกใช้ ความเข้มข้น 25 nM ในการทดลองต่อไป ดังแสดงใน ภาพที่ 3C

สำหรับเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาไคเนส พบว่าค่าสัญญาณจะสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำ ปฏิกิริยาตั้งแต่ 10 นาทีขึ้นไป และจะสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง เมื่อทำปฏิกิริยานานขึ้น โดยที่เวลา 30 และ 60 นาที จะให้ค่าสัญญาณเป็น 3.24 และ 3.76 ซึ่งแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณา Z' factor ซึ่งเป็น พารามิเตอร์หลักในการทดสอบความใช้ได้ของระบบ พบ

ว่าค่า Z' factor ของระบบทดสอบเป็น 0.83 และ 0.89 ซึ่งใกล้เคียงกันและผ่านเกณฑ์การยอมรับ เพื่อไม่ให้ระบบทดสอบนี้ใช้เวลามากเกินไป จึงเลือกใช้เวลา 30 นาทีในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในภาพที่ 3D

การทดสอบความคงทนต่อตัวทำละลาย (solvent tolerance) ของระบบทดสอบ

การทดสอบความคงทนต่อตัวทำละลายของระบบพบว่าตัวทำละลายเอทานอลและ DMSO จะเริ่มทำให้ค่าสัญญาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่ความเข้มข้น 6% และ 8% ตามลำดับ โดยจะทำให้ค่าสัญญาณลดลงเหลือ $74.02 \pm 12.67\%$ และ $74.40 \pm 6.91\%$ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4A การทดสอบกับสารทดสอบจึงไม่ควรมีตัวทำละลายเหล่านี้เกินความเข้มข้นดังกล่าว

การตรวจสอบความถูกต้องของระบบทดสอบ

การตรวจสอบความถูกต้องของระบบโดยทดสอบกับสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง พบว่าสารกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ axitinib, crizotinib, sunitinib, gefitinib, erlotinib และ lapatinib ลดค่าสัญญาณในระบบตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ดังกราฟแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นสารแต่ละชนิดกับค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส ดังแสดงในภาพที่ 4B โดยเมื่อคำนวณค่า IC_{50} ของสารกลุ่มนี้ พบว่า sunitinib, crizotinib, axitinib, gefitinib และ erlotinib มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสสูง โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.1–2.5 $\mu\text{g/mL}$ ในขณะที่ lapatinib มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสต่ำกว่าสารอื่นในกลุ่ม โดยมีค่า IC_{50} เป็น $88.53 \pm 9.95\%$ ดังแสดงในตารางที่ 4 ส่วน doxorubicin ซึ่งเป็นสารยับยั้งมะเร็งกลไกอื่น ไม่ลดค่าสัญญาณ ยกเว้นที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$

การทดสอบความใช้ได้ของระบบทดสอบ

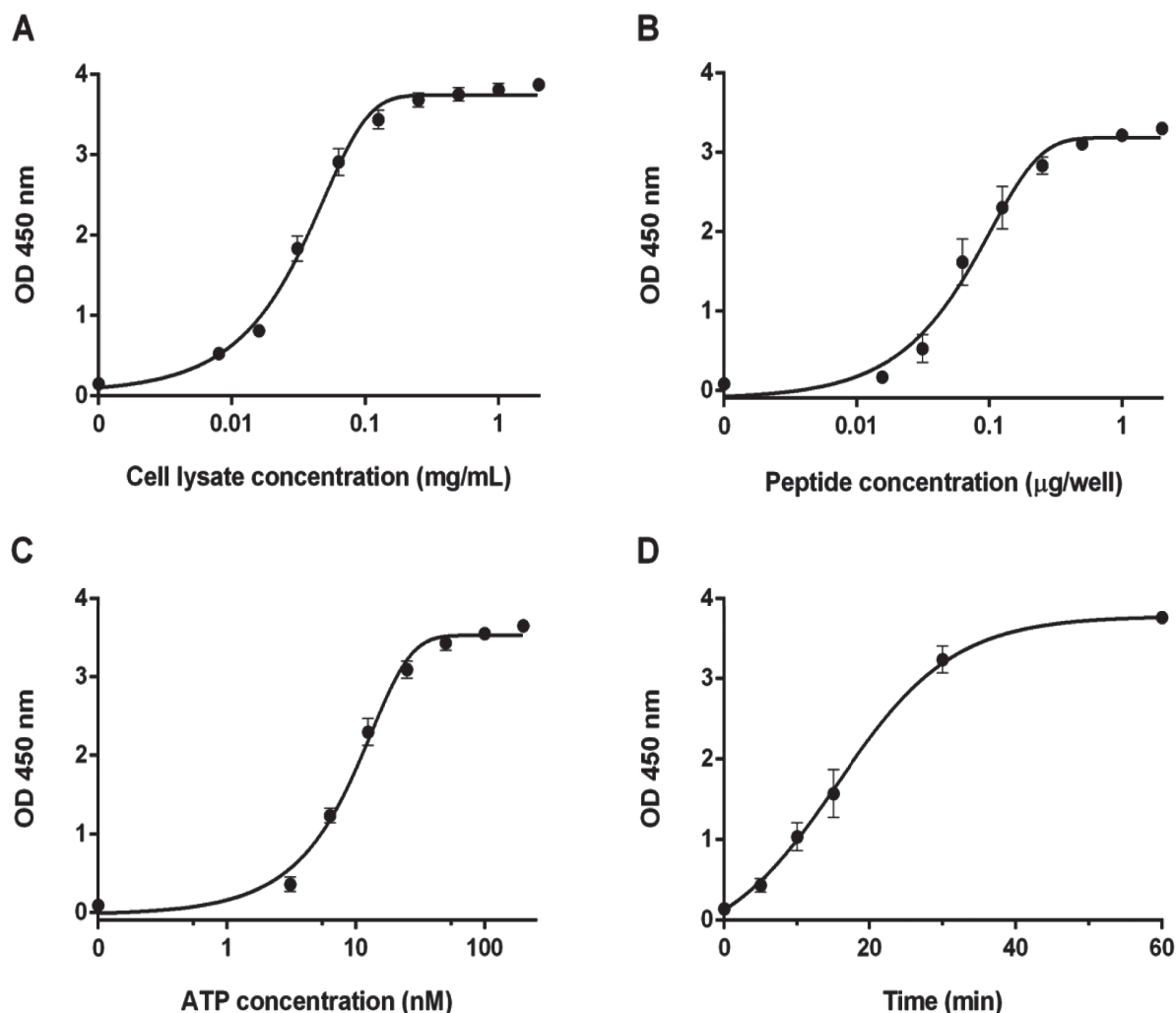
การทดสอบความใช้ได้ของระบบกรณีทดสอบต่างหลุม (intra-plate) พบว่าค่า Z' factor, $\%CV_{\text{max}}$,

$\%CV_{\text{mid}}$, $\%CV_{\text{min}}$ และ $SD_{\text{mid-normalized}}$ ของแต่ละไมโครเพลทอยู่ในช่วง 0.77–0.96, 1.06–7.05, 0.71–12.09, 4.45–13.13 และ 0.44–4.15 ตามลำดับ ซึ่งทุกค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ดังแสดงในตารางที่ 5 การทดสอบความใช้ได้ของระบบกรณีทดสอบต่างไมโครเพลท (inter-plate) และต่างวัน (inter-day) พบว่าผลต่างของค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส ($\%inhibition$) ระหว่างไมโครเพลทและระหว่างวันอยู่ในช่วง 0.08–5.67 และ 0.08–13.07 ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่า 15% และอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ดังแสดงในตารางที่ 6 ผลการศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นว่าระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถทำได้

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสในตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร

เมื่อนำระบบทดสอบสำหรับคัดกรองสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนสที่พัฒนาขึ้นทดสอบกับตัวอย่างสารสกัดเอทานอลจากพืช 120 ชนิด จำนวน 180 ตัวอย่าง พบสารสกัดจากพืช 5 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากทับทิม วานหอมแดง มะยม น้ำมันมะขามสีห์ และพลู มีค่า IC_{50} สำหรับฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสเป็น 16.25 ± 3.27 , 23.16 ± 1.94 , 30.59 ± 7.47 , 50.44 ± 1.64 และ 73.82 ± 10.45 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ในขณะที่ gefitinib ซึ่งเป็นสารควบคุมบวก มีค่า IC_{50} เป็น 1.71 ± 0.50 $\mu\text{g/mL}$ ดังแสดงในตารางที่ 7 สำหรับสารสกัดสมุนไพรอีก 175 ตัวอย่าง พบว่ามีค่า IC_{50} มากกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$

เนื่องจากระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นเป็นระบบทดสอบสำหรับคัดกรองเบื้องต้น และใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมีในการทดสอบ การศึกษานี้จึงคัดเลือกสารสกัดสมุนไพรที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสที่ $IC_{50} < 100$ $\mu\text{g/mL}$ ได้แก่ ทับทิม วานหอมแดง มะยม น้ำมันมะขามสีห์ และพลู ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ และฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เพื่อตรวจสอบยืนยันฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับทำปฏิกิริยาไคเนส (A) การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ cell lysate โดยเติม cell lysate ของเซลล์เพาะเลี้ยง HeLa ที่ความเข้มข้น 0-2 mg/mL ในปฏิกิริยา และตรวจวัดค่าสัญญาณที่เกิดจากการทำงานของไทโรซีนไคเนส (B) การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของ peptide substrate โดยเคลือบเปปไทด์ KKKAEEEEYFELVAC ที่เชื่อมกับ biotin ที่ไมโครเพลท ปริมาณ 0-2 μg ต่อหลุม และทำปฏิกิริยาไคเนส เพื่อตรวจวัดค่าสัญญาณที่เกิดขึ้น (C) การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ATP ในปฏิกิริยา โดยเติม ATP ในปฏิกิริยาให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0-200 nM และตรวจวัดค่าสัญญาณที่เกิดขึ้น (D) การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสม สำหรับการทำปฏิกิริยาไคเนส โดยทำปฏิกิริยาไคเนส 0, 5, 10, 15, 30 และ 60 นาที และตรวจวัดค่าสัญญาณที่เกิดขึ้น ทดสอบ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ขั้ว

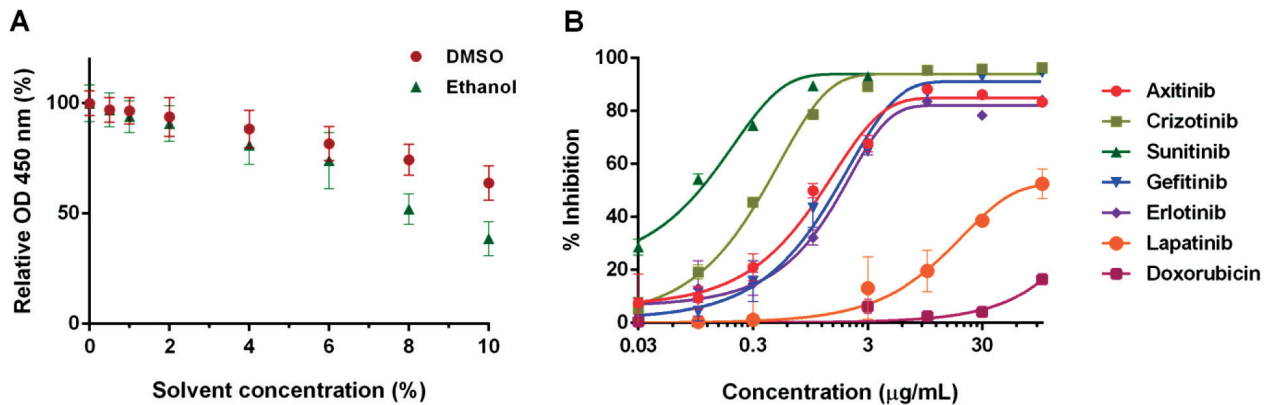
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ในตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง พบว่าสารสกัดจากว่านหอมแดงและพลูมีค่า IC_{50} สำหรับ ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเท่ากับ 89.89 ± 6.31 และ 90.91 ± 2.21 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนสารสกัดจากทับทิม

มะยม และน้ำนมราชสีห์ มีค่า IC_{50} มากกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$ ในขณะที่ gefitinib ซึ่งเป็นสารควบคุมบวกมีค่า IC_{50} เป็น 19.58 ± 0.17 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อพิจารณาค่าร้อยละ การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง พบว่าที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ สารสกัดจากว่านหอมแดงและพลูยับยั้ง การเจริญของเซลล์มะเร็งร้อยละ 64.99 ± 7.34 และ

62.93±8.18 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากมะยมแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งใกล้เคียงกัน ในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ ตั้งแต่ 3-100 µg/mL เฉลี่ยร้อยละ 49.00±2.66 ในขณะที่สารสกัดจากทับทิม และน้ำมันราซสีห์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเพียง

ร้อยละ 21.75±5.43 และ 22.26±1.02 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL สำหรับ gefitinib ซึ่งเป็นสารควบคุมบวก ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งร้อยละ 82.65±4.64 ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL



ภาพที่ 4 ผลการทดสอบความคงทนต่อตัวทำละลายและการตรวจสอบความถูกต้องของระบบทดสอบสำหรับคัดกรองสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส (A) การทดสอบความคงทนต่อตัวทำละลาย โดยเติมตัวทำละลายเอทานอล และ DMSO ที่ความเข้มข้น 0-10% ในปฏิกิริยาไคเนสและเปรียบเทียบค่าสัญญาณที่เกิดขึ้น เพื่อตรวจสอบผลกระทบของตัวทำละลายที่มีต่อระบบทดสอบ (B) ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นสารแต่ละชนิดกับค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส ตรวจสอบความถูกต้องของระบบโดยทดสอบกับสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง 7 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.03-100 µg/mL ทดสอบ 3 ครั้ง ครึ่งละ 3 ชั่วโมง

ตารางที่ 4 ค่า IC₅₀ ของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งที่ได้จากการทดสอบด้วยระบบทดสอบสำหรับคัดกรองสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส

สาร	IC ₅₀ (µg/mL)
Axitinib	1.58±0.54
Crizotinib	0.50±0.01
Sunitinib	0.12±0.02
Gefitinib	2.11±0.17
Erlotinib	2.16±0.13
Lapatinib	88.53±9.95
Doxorubicin	> 100

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง พบว่าสารสกัดจากพลูยับยั้งการแพร่กระจายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้น 30 และ 10 µg/mL โดยยับยั้งร้อยละ 98.58±1.23 และ 50.86±9.97 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากว่านหอมแดงยับยั้งการแพร่กระจายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL โดยยับยั้งร้อยละ 47.08±2.90 ในขณะที่สารสกัดจากมะยม ทับทิม และน้ำมันราซสีห์ ไม่แสดงฤทธิ์ที่ความเข้มข้นที่ทดสอบ สำหรับ gefitinib ซึ่งเป็นสารควบคุมบวก ยับยั้งการแพร่กระจายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้น 30 และ 10 µg/mL โดยยับยั้งร้อยละ 99.97±0.04 และ 86.57±11.77 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 5 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ จากการทดสอบความใช้ได้ของระบบทดสอบ เพื่อคัดกรองสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส กรณีทดสอบต่างหลุม

พารามิเตอร์		Z' factor	%CV _{max}	%CV _{mid}	%CV _{min}	SD _{mid-normalized}
วันที่ 1	plate 1	0.93	2.04	0.76-4.12	13.04	0.62-1.77
	plate 2	0.89	3.27	1.17-6.44	6.70	1.08-2.56
	plate 3	0.96	1.06	1.30-7.75	8.42	1.21-3.28
วันที่ 2	plate 1	0.95	1.61	0.83-7.19	4.45	0.44-2.35
	plate 2	0.94	1.45	1.43-12.09	12.65	1.31-3.85
	plate 3	0.84	5.14	4.28-9.21	5.13	1.07-4.15
วันที่ 3	plate 1	0.87	3.96	2.07-4.71	6.74	0.90-2.56
	plate 2	0.82	5.35	0.71-7.29	13.13	0.69-3.68
	plate 3	0.77	7.05	1.22-4.06	8.15	0.22-3.00
เกณฑ์การยอมรับ		≥ 0.5	≤ 20	≤ 20	≤ 20	≤ 20

ตารางที่ 6 ผลต่างของค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสระหว่างไมโครเพลทและระหว่างวัน เมื่อทดสอบกับสาร gefitinib ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น gefitinib (μg/mL)	ค่าเฉลี่ย %inhibition	เกณฑ์การยอมรับ	ผลต่างของค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส (%)			
			inter-plate			inter-day
			วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	
0.25	5.77±2.12	< 15	0.95-2.84	0.59-2.23	0.45-2.71	0.27-5.95
0.50	13.50±2.87		0.90-2.34	0.28-2.95	1.25-2.71	0.09-7.53
1.00	25.72±3.57		2.44-5.67	0.55-1.44	2.68-5.58	0.25-10.50
2.00	42.65±4.63		0.14-3.88	0.08-2.58	1.17-3.59	0.08-13.07
4.00	62.62±3.37		0.44-3.24	0.25-1.84	0.46-3.09	0.25-9.89
8.00	79.29±1.85		0.15-2.05	0.17-0.49	0.31-2.67	0.15-5.37

ตารางที่ 7 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนส ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ และฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิด

สมุนไพร	ส่วนที่ใช้	ฤทธิ์ยับยั้ง การทำงานของ ไทโรซีนไคเนส (IC ₅₀ , μg/mL)	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ ของเซลล์มะเร็ง (IC ₅₀ , μg/mL)	ฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจาย ของเซลล์มะเร็ง (%inhibition)	
				30 μg/mL	10 μg/mL
ว่านหอมแดง	เหง้า	23.16±1.94	89.89±6.31	47.08±2.90	5.53±1.39
พลู	ใบ	73.82±10.45	90.91±2.21	98.58±1.23	50.86±9.97
มะยม	เปลือกต้น	30.59±7.47	> 100	-	-
ทับทิม	กิ่งและใบ	16.25±3.27	> 100	-	-
น้ำมันราศี	ทุกส่วน	50.44±1.64	> 100	-	-
Gefitinib (positive control)		1.71±0.50	19.58±0.17	99.97±0.04	86.57±11.77

วิจารณ์

ระบบทดสอบฤทธิ์เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการพัฒนายา การเลือกใช้ระบบทดสอบที่เหมาะสมจะช่วยให้ค้นพบสารออกฤทธิ์ที่อาจนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นสารต้นแบบทางยาได้ ระบบทดสอบที่ดีสำหรับการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น ควรตรวจวัดฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สนใจได้ ทำซ้ำได้ มีความคงทนต่อสารเคมี มีคุณภาพและประหยัดต้นทุน⁽²⁸⁾ การวิเคราะห์ระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนส เพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีนดังกล่าวนี้ทำได้หลายหลักการซึ่ง ELISA เป็นหลักการหนึ่งที่ถูกนำมาใช้พัฒนาระบบทดสอบ ระบบทดสอบหลักการ ELISA นั้นง่ายและสามารถปฏิบัติได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป มีทั้งรูปแบบที่ใช้เซลล์ (cell-based assay)^(14,15) และรูปแบบที่ใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมี (biochemical assay)⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัด ระบบทดสอบที่ใช้เซลล์ต้องทดสอบสารกับเซลล์ในแต่ละหลุมของไมโครเพลทก่อน แล้วจึงเตรียม cell lysate และถ่ายไปยังอีกไมโครเพลทหนึ่งเพื่อวิเคราะห์การทำงานของไทโรซีนไคเนส แต่ผลของสารทดสอบอาจทำให้เซลล์ในแต่ละหลุมมีจำนวนมากน้อยต่างกัน การจะควบคุมให้มีความเข้มข้นเท่ากันจึงเป็นเรื่องยาก ส่วนระบบทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมีมักใช้โปรตีนที่บริสุทธิ์ซึ่งมีราคาสูง และจำเพาะต่อไทโรซีนไคเนสชนิดหนึ่งๆ เท่านั้น ระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้ไม่จำเป็นต้องใช้โปรตีนที่บริสุทธิ์ ไม่จำเพาะกับโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่ง และไม่มีความยุ่งยากในการควบคุมความเข้มข้นของ cell lysate จึงอาจเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้ในการคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสได้

การศึกษานี้เลือกศึกษาการแสดงออกของยีน *EGFR*, *HER2*, *MET* และ *KIT* ในเซลล์มะเร็งเฉพาะเลี้ยงชนิดต่าง ๆ เพื่อคัดเลือกเซลล์สำหรับพัฒนาระบบทดสอบ เนื่องจากยีนทั้งสี่ชนิดเป็นยีนของโปรตีนกลุ่มไทโรซีนไคเนสที่เป็นเป้าหมายการรักษา และมียาที่ได้รับการขึ้นทะเบียนจากองค์การอาหารและยา สหรัฐอเมริกาแล้ว^(6,7) ผลการศึกษาพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดมะเร็งปากมดลูก (HeLa), มะเร็งตับ (PLC/PRF/5), มะเร็งท่อน้ำดี (KKU-100) และมะเร็งเต้านม (MCF-7)

มีการแสดงออกของยีนกลุ่มนี้ทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าเซลล์มะเร็งจากคนไข้มีการแสดงออกของโปรตีนของยีนกลุ่มดังกล่าว⁽²⁹⁻³¹⁾ สำหรับการตรวจวัดระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนสของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงทั้งสี่ชนิด พบว่าเซลล์ HeLa ให้ค่าสัญญาณสูงสุดสอดคล้องกับผลการศึกษาการแสดงออกของยีน ซึ่งพบว่าเซลล์ HeLa มีการแสดงออกของยีนทั้งสี่ชนิดสูงกว่าเซลล์อื่นโดยภาพรวม อย่างไรก็ตามเนื่องจากระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นไม่จำเพาะกับโปรตีนไทโรซีนไคเนสชนิดใดชนิดหนึ่ง ค่าสัญญาณที่เกิดขึ้นจึงอาจเกิดจากการทำงานของไทโรซีนไคเนสชนิดอื่นที่พบในเซลล์ HeLa ร่วมด้วย เช่น Janus kinase (JAK), focal adhesion kinase (FAK), platelet-derived growth factor receptors (PDGFR) และ fibroblast growth factor receptors (FGFR) เป็นต้น⁽³²⁾

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาไคเนส พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ cell lysate, peptide substrate และ ATP ทำให้ค่าสัญญาณจากการตรวจวัดระดับการทำงานของไทโรซีนไคเนสเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นถึงระดับหนึ่ง ค่าสัญญาณจะเริ่มคงที่ แสดงให้เห็นถึงปริมาณที่มากเกินไป ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อ การทดสอบฤทธิ์สาร การเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสม จึงควรเลือกความเข้มข้นที่ยังอยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล (exponential phase) และทำให้ได้ค่าสัญญาณที่สูงเพียงพอ การศึกษานี้จึงเลือก cell lysate 0.125 mg/mL, peptide substrate 0.25 µg ต่อหลุม และ ATP 25 nM ในการทำปฏิกิริยา สำหรับการหาระยะเวลาที่เหมาะสม พิจารณาด้วยหลักการเดียวกัน เพื่อไม่ให้ระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นใช้เวลานานเกินไป จึงเลือกใช้เวลา 30 นาที ในการทำปฏิกิริยา เนื่องจากให้ค่าสัญญาณที่สูง และให้ค่า Z' factor ที่ใกล้เคียงกับการทำปฏิกิริยา 60 นาที ซึ่งสภาวะที่ได้นี้อาจแตกต่างจากระบบทดสอบลักษณะเดียวกันในการศึกษาอื่น^(16-18, 21) เนื่องจากเซลล์ โปรตีน หรือซับสเตรตที่ใช้ต่างกัน

การศึกษานี้ได้ทดสอบความคงทนของระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นต่อตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการละลายสารทดสอบ ได้แก่ เอทานอลและ DMSO เนื่องจากสารละลายทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติทำให้โปรตีนตกตะกอน

หรือเสียสภาพ^(33,34) จึงอาจส่งผลกระทบต่อเอนไซม์ในปฏิกิริยาไคเนส ผลการทดสอบพบว่าสารละลายทั้งสองชนิดจะทำให้ค่าสัญญาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ตั้งแต่ความเข้มข้น 6% และ 8% ตามลำดับ โดยทั่วไปการทดสอบฤทธิ์ของสารมักมีสารละลายในสัดส่วน 0.1% ถึง 5%⁽³⁴⁾ จึงแสดงให้เห็นว่าระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นมีความคงทนต่อตัวทำละลายทั้งสองชนิด การศึกษานี้ยังได้ตรวจสอบความถูกต้องของระบบทดสอบโดยใช้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ผลการศึกษาพบว่าสารกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซีนไคเนสทั้งหมดลดค่าสัญญาณของระบบ ขณะที่สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ด้วยกลไกอื่นไม่ลดค่าสัญญาณโดยรวม จึงแสดงให้เห็นว่าระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสได้ อย่างไรก็ตามพบการลดลงของค่าสัญญาณเล็กน้อยจากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ด้วยกลไกอื่นที่ความเข้มข้น 100 µg/mL ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณสารที่มากเกินไปรบกวนการทำงานของปฏิกิริยา ระบบทดสอบนี้จึงอาจมีข้อจำกัดในการทดสอบกับสารที่มีความเข้มข้นมากเกินไป

การศึกษานี้ใช้ Z' factor เป็นพารามิเตอร์หลักในการตรวจสอบคุณภาพและความใช้ได้ของระบบ โดย Z' factor เป็นพารามิเตอร์ที่แสดงช่วงความกว้างของค่าสัญญาณ ระบบทดสอบที่มีค่า Z' factor ตั้งแต่ 0.5 ขึ้นไปถือว่าเป็นระบบทดสอบที่ดี⁽²³⁾ จึงใช้ค่านี้ในการกำหนดเกณฑ์การยอมรับ นอกจากนี้ยังใช้ %CV และ SD เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนของค่าสัญญาณ และใช้ผลต่างของค่า %inhibition ตรวจสอบความแตกต่างของการทดสอบระหว่างไมโครเพลทและระหว่างวัน⁽²²⁾ ผลการศึกษาพบว่าค่าพารามิเตอร์ทุกค่าผ่านเกณฑ์การยอมรับ จึงแสดงให้เห็นว่าระบบทดสอบที่พัฒนามีคุณภาพและสามารถทำได้

การทดสอบกับตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรจำนวน 180 ตัวอย่าง จากพืช 120 ชนิด พบสารสกัด 5 ชนิดแสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสที่ $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ คือ ทับทิม วานหอมแดง มะยม น้านมราชสีห์ และพลู เนื่องจากระบบทดสอบที่พัฒนาเป็นระบบทดสอบสำหรับคัดกรองเบื้องต้น และใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมีในการทดสอบ อาจถูกรบกวนจากสารอื่น เช่น สารที่มี

คุณสมบัติทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ จึงมีความจำเป็นต้องตรวจสอบยืนยันฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงอีกครั้ง เนื่องจากไทโรซีนไคเนสเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญ และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง การศึกษานี้จึงเลือกที่จะศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งของสารสกัดทั้ง 5 ชนิด เพื่อตรวจสอบยืนยันฤทธิ์ต้านมะเร็ง ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากใบพลูแสดงฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 30 และ 10 µg/mL ส่วนสารสกัดจากเหง้าว่านหอมแดงยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะที่ความเข้มข้น 30 µg/mL โดยสารสกัดทั้งสองชนิดนี้มีค่า IC_{50} สำหรับฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่ำกว่า 100 µg/mL แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์เพาะเลี้ยง สอดคล้องกับการศึกษาอื่นซึ่งพบว่า สารสกัดจากพืชทั้งสองชนิดนี้แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง⁽³⁵⁻³⁸⁾ สำหรับสารสกัดจากเปลือกต้นมะยม แม้จะไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นที่ทดสอบ และมีค่า IC_{50} สำหรับฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งสูงกว่า 100 µg/mL แต่สารสกัดชนิดนี้มีค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งใกล้เคียงกันในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ คือ $49.00 \pm 2.66\%$ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกต้นมะยมแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ระดับหนึ่ง โดยยับยั้งการเจริญของเซลล์ในช่วงความเข้มข้นที่กว้าง ซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในสารสกัดจากเปลือกต้นมะยม แต่มีรายงานสารออกฤทธิ์บางชนิดที่สกัดแยกได้จากรากและใบของต้นมะยมแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง^(39, 40) จึงจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติม สำหรับสารสกัดจากกิ่งและใบทับทิมและต้นน้านมราชสีห์ แม้จะแสดงฤทธิ์ดีจากการทดสอบด้วยระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้น แต่เมื่อตรวจสอบยืนยันฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่าไม่แสดงฤทธิ์ที่ความเข้มข้นที่ทดสอบ สาเหตุอาจเกิดจาก 1) การตรวจสอบยังไม่ครอบคลุม เนื่องจากไทโรซีนไคเนสเกี่ยวข้องกับหลายกระบวนการ ทั้งการเจริญเติบโต การแพร่กระจาย การลุกลาม และการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง แต่การศึกษานี้

ตรวจสอบเฉพาะฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเท่านั้น จึงอาจต้องตรวจสอบเพิ่มเติม 2) สารแสดงฤทธิ์ที่ความเข้มข้นสูงกว่าที่ทดสอบ เช่น สารสกัดจากน้ำมันราชสีห์ ซึ่งมีรายงานฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ HeLa ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$ โดยมีค่า IC_{50} ต่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เป็น > 200 , 100.13 ± 10.01 และ 144.60 ± 5.52 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ⁽⁴¹⁾ และ 3) เกิดผลบวกปลอม สารสกัดสมุนไพรมีสารกลุ่ม tannins เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติทำให้โปรตีนตกตะกอน⁽⁴²⁾ สารสกัดที่มีสัดส่วนของสารกลุ่ม tannins สูง อาจทำให้ไทโรซีนไคเนสเสียสภาพ จนส่งผลกระทบต่อระบบทดสอบ ซึ่งทับทิมและน้ำมันราชสีห์ต่างมีสารกลุ่มนี้^(43,44) ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสสูงเกินจริงจนเกิดผลบวกปลอม

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าระบบทดสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้คัดกรอง เพื่อค้นหาสารต้านมะเร็งที่มีกลไกยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสได้ อย่างไรก็ตามอาจเพิ่มประสิทธิภาพของระบบทดสอบได้หากศึกษาปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาไคเนสเพิ่มเติม เช่น pH อุณหภูมิ ปริมาณ Mg^{2+} และ Mn^{2+} รวมถึงส่วนประกอบในสารละลายบัฟเฟอร์ และอาจนำไปปรับเปลี่ยนเพื่อประยุกต์ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ที่จำเพาะต่อไทโรซีนไคเนสชนิดใดชนิดหนึ่งได้โดยใช้ไทโรซีนไคเนสที่บริสุทธิ์หรือใช้ cell lysate ของเซลล์ที่ถูกทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจเพิ่มสูงขึ้นจากการนำยีนของโปรตีนดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ ซึ่งจำเป็นต้องทำการตรวจสอบและศึกษาสถานะที่เหมาะสมเพิ่มเติม

สรุป

การศึกษานี้ได้พัฒนาระบบทดสอบสำหรับวิเคราะห์ระดับการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนสด้วยเทคนิค ELISA ซึ่งระบบทดสอบดังกล่าวสามารถปฏิบัติได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ครอบคลุมไทโรซีนไคเนสหลายชนิด และประหยัดต้นทุน การทดสอบความใช้ได้ของระบบ พบว่าระบบที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจสอบฤทธิ์ของสารต้านมะเร็งที่มีกลไกยับยั้งไทโรซีนไคเนส มีความ

คงทนต่อตัวทำลาย และสามารถทำซ้ำได้ เมื่อนำระบบที่พัฒนามาทดสอบกับตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรจำนวนมาก พบสารที่แสดงฤทธิ์จริง ระบบทดสอบนี้จึงอาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้สำหรับคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซีนไคเนสจากสารหลายชนิด เพื่อนำไปศึกษาและพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และขอขอบคุณสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจระบุชนิดพันธุ์พืช และจัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ่างอิง

เอกสารอ้างอิง

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71(3): 209–49.
2. กลุ่มข้อมูลข่าวสารสุขภาพ. สถิติสาธารณสุข พ.ศ. 2562. นนทบุรี: กองยุทธศาสตร์และแผนงาน สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข; 2563. หน้า 78–79.
3. Padma VV. An overview of targeted cancer therapy. *BioMedicine*. [serial online]. 2015; [cited 2021 Oct 21]; 5(4): [6 screens]. Available from: URL: <https://biomedicine.cmu.edu.tw/doc/17-1.pdf>.
4. Gocek E, Moulas AN, Studzinski GP. Non-receptor protein tyrosine kinases signaling pathways in normal and cancer cells. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2014; 51(3): 125–37.
5. Du Z, Lovly CM. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer*. [serial online]. 2018; [cited 2021 Oct 21]; 17: [13 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0782-4>.
6. Pottier C, Fresnais M, Gilon M, Jérusalem G, Longuespée R, Sounni NE. Tyrosine kinase inhibitors in cancer: breakthrough and

- challenges of targeted therapy. *Cancers*. [serial online]. 2020; [cited 2021 Oct 21]; 12(3): [17 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.3390/cancers12030731>.
7. Metibemu DS, Akinloye OA, Akamo AJ, Ojo DA, Okeowo OT, Omotuyi IO. Exploring receptor tyrosine kinases-inhibitors in cancer treatments. *Egypt J Med Hum Genet*. [serial online]. 2019; [cited 2021 Oct 21]; 20(1): [16 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.1186/s43042-019-0035-0>.
 8. Gopalakrishna R, Chen ZH, Gundimeda U, Wilson JC, Anderson WB. Rapid filtration assays for protein kinase C activity and phorbol ester binding using multiwell plates with fitted filtration discs. *Anal Biochem* 1992; 206(1): 24-35.
 9. Nakayama GR, Nova MP, Parandoosh Z. A scintillating microplate assay for the assessment of protein kinase activity. *J Biomol Screen* 1998; 3(1): 43-8.
 10. Park YW, Cummings RT, Wu L, Zheng S, Cameron PM, Woods A, et al. Homogeneous proximity tyrosine kinase assays: scintillation proximity assay versus homogeneous time-resolved fluorescence. *Anal Biochem* 1999; 269(1): 94-104.
 11. Kumar EA, Charvet CD, Lokesh GL, Natarajan A. High-throughput fluorescence polarization assay to identify inhibitors of Cbl(TKB)-protein tyrosine kinase interactions. *Anal Biochem* 2011; 411(2): 254-60.
 12. Rodems SM, Hamman BD, Lin C, Zhao J, Shah S, Heidary D, et al. A FRET-based assay platform for ultra-high density drug screening of protein kinases and phosphatases. *Assay Drug Dev Technol* 2002; 1(1): 9-19.
 13. Koresawa M, Okabe T. High-throughput screening with quantitation of ATP consumption: a universal non-radioisotope, homogeneous assay for protein kinase. *Assay Drug Dev Technol* 2004; 2(2): 153-60.
 14. King IC, Feng M, Catino JJ. High throughput assay for inhibitors of the epidermal growth factor receptor-associated tyrosine kinase. *Life Sci* 1993; 53(19): 1465-72.
 15. Baumann CA, Zeng L, Donatelli RR, Maroney AC. Development of a quantitative, high-throughput cell-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of colony-stimulating factor-1 receptor tyrosine kinase inhibitors. *J Biochem Bioph Methods* 2004; 60(1): 69-79.
 16. Zhang XH, Guo XN, Zhong L, Luo XM, Jiang HL, Lin LP, et al. Establishment of the active catalytic domain of human PDGFR β tyrosine kinase-based ELISA assay for inhibitor screening. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1770(10): 1490-7.
 17. Angeles TS, Steffler C, Bartlett BA, Hudkins RL, Stephens RM, Kaplan DR, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for trkA tyrosine kinase activity. *Anal Biochem* 1996; 236(1): 49-55.
 18. Bauer SM, Gehringer M, Laufer SA. A direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative evaluation of Janus kinase 3 (JAK3) inhibitors. *Anal Methods* 2014; 6(21): 8817-22.
 19. Spandidos A, Wang X, Wang H, Seed B. PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. *Nucleic Acids Res*. [serial online]. 2009; [cited 2021 Oct 21]; 38: [8 screens]. Available from URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1005>.
 20. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 2005; 21(3): 389-95.
 21. Ghosh G, Yan X, Kron SJ, Palecek SP. Activity assay of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in triple-negative breast cancer cells using peptide-conjugated magnetic beads. *Assay Drug Dev Technol* 2013; 11(1): 44-51.
 22. Iversen PW, Beck B, Chen YF, Dere W,

- Devanarayan V, Eastwood BJ, et al. HTS assay validation. In: Assay guidance manual. [online]. 2012; [cited 2021 Oct 21]: [26 screens]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK83783>.
23. Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 1999; 4(2): 67-73.
24. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell viability assays. In: Assay guidance manual. [online]. 2012; [cited 2021 Oct 21]: [25 screens]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065>.
25. Hulkower KI, Herber RL. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. *Pharmaceutics* 2011; 3(1): 107-24.
26. Settasupana K, Pruksakorn P, Leunchai-chaweng A, Prachasuphap A, Dhepakson P. Cloning, expression and purification of human CXCL12 alpha recombinant protein. Poster session presented at: The 24th Annual Medical Sciences Conference; Thailand. [online]. 2016 Jun 1-3; [cited 2021 Oct 21]: [1 screen]. Available from: URL: <http://e-library.dmshc.moph.go.th/ebooks/files/P2-11%20กัญจน์รัชต์.pdf>.
27. Dillenburg-Pilla P, Patel V, Mikelis CM, Zárate-Bladés CR, Doçi CL, Amornphimoltham P, et al. SDF-1/CXCL12 induces directional cell migration and spontaneous metastasis via a CXCR4/Gαi/mTORC1 axis. *FASEB J* 2015; 29(3): 1056-68.
28. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol* 2011; 162(6): 1239-49.
29. Nicholson RI, Gee JMW, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37(Suppl 4): S9-15.
30. Miyamoto M, Ojima H, Iwasaki M, Shimizu H, Kokubu A, Hiraoka N, et al. Prognostic significance of overexpression of c-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2011; 105(1): 131-8.
31. Chung CY, Yeh KT, Hsu NC, Chang JHM, Lin JT, Horng HC, et al. Expression of c-kit proto-oncogene in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2005; 217(2): 231-6.
32. Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, Cox J, Kircher M, Kelso J, et al. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol*. [serial online]. 2011; [cited 2021 Oct 21]; 7(1): [8 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.1038/msb.2011.81>.
33. Herskovits TT, Gadegbeku B, Jaillet H. On the structural stability and solvent denaturation of proteins. I. Denaturation by the alcohols and glycols. *J Biol Chem* 1970; 245(10): 2588-98.
34. Tjernberg A, Markova N, Griffiths WJ, Hallén D. DMSO-related effects in protein characterization. *J Biomol Screen* 2006; 11(2): 131-7.
35. Lestari D, Kartika R, Marlina E. Antioxidant and anticancer activity of Eleutherine bulbosa (Mill.) Urb on leukemia cells L1210. *J Phys Conf Ser*. [serial online]. 2019; [cited 2021 Oct 21]: 1277: [7 screens]. Available from: URL: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/1277/1/012022>.
36. Suwarso E. The apoptosis effects of ethylacetate extract of Eleutherine bulbosa (Mill.) Urb. against T47D cells. *Int J PharmTech Res* 2014-2015; 7(3): 535-9.
37. Widowati W, Wijaya L, Wargasetia T, Bachtiar I, Yellianty Y, Laksmitawati D. Antioxidant, anticancer, and apoptosis-inducing effects of Piper extracts in Hela cells. *J Exp Integr Med* 2013; 3(3): 225-30.
38. Boontha S, Taowkaen J, Phakwan T, Worauai-cha T, Kamonnate P, Buranrat B, et al. Evaluation of antioxidant and anticancer effects of Piper betle L (Piperaceae) leaf extract on MCF-7 cells, and preparation of transdermal patches of the extract. *Trop J Pharma Res* 2019; 18(6): 1265-72.
39. Duong TH, Bui XH, Pogam PL, Nguyen

- HH, Tran TT, Nguyen TAT, et al. Two novel diterpenes from the roots of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeel. *Tetrahedron* 2017; 73(38): 5634–8.
40. Geng HC, Zhu HT, Yang WN, Wang D, Yang CR, Zhang YJ. New cytotoxic dichapetalins in the leaves of *Phyllanthus acidus*: Identification, quantitative analysis, and preliminary toxicity assessment. *Bioorg Chem.* [serial online]. 2021; [cited 2021 Oct 21]; 114: [6 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105125>.
41. Kwan YP, Saito T, Ibrahim D, Al-Hassan FM, Ein Oon C, Chen Y, et al. Evaluation of the cytotoxicity, cell-cycle arrest, and apoptotic induction by *Euphorbia hirta* in MCF-7 breast cancer cells. *Pharm Biol* 2016; 54(7): 1223–36.
42. Silva GL, Kinghorn AD, Lee IS. Special problems with the extraction of plants. In: Cannell RJP, editors. *Natural products isolation*. New Jersey: Humana Press; 1998. p. 343–363.
43. Tanaka T, Nonaka GI, Nishioka I. Tannins and related compounds. XL. Revision of the structures of Punicalin and Punicalagin, and isolation and characterization of 2-O-galloyl-punicalin from the bark of *Punica granatum* L. *Chem Pharm Bull* 1986; 34(2): 650–5.
44. Ahmad W, Singh S, Kumar S. Phytochemical screening and antimicrobial study of *Euphorbia hirta* extracts. *J Med Plants Stud* 2017; 5(2): 183–6.

Development of Tyrosine Kinase Inhibitor Screening Assay for Anti-cancer Agents

Parnuphan Panyajai, Patamaporn Pruksakorn, Pantida Treeyoung, Chattraporn Jaima, and Panadda Dhepakson

Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Tyrosine kinases play a key role in various cellular signaling pathways, linking to proliferation, migration, invasion and angiogenesis of cancer cells. Many of these are therapeutic targets for the treatment of cancers. This study aimed to develop the tyrosine kinase inhibitor assay for compound library screening. The assay development was started by investigating the expression levels of genes associated with these proteins in four cancer cell lines by quantitative real-time PCR, and measuring the tyrosine kinase activity of each cell lysate by ELISA. HeLa cell was chosen for the development. We further optimized the assay conditions, and the following were found: cell lysate, 0.125 mg/mL; peptide substrate, 0.25 µg/well; ATP, 25 nM; and incubation time of 30 minutes was suitable for the kinase reaction. The assay system was verified by using anti-cancer agents. The results showed that tyrosine kinase inhibitors decreased the assay signal. We also validated this assay by quantitative measurement of signal variability. It was shown that all parameters met the acceptance criteria, indicating that this assay was reproducible and suitable for screening. This developed assay was also used to test 180 medicinal plant extracts, and the active extracts were further tested by MTT and transmembrane assays. The results showed that some extracts exhibited potential anti-cancer activity in cell lines. Thus, the developed assay could be used for screening of tyrosine kinase inhibitors in a large number of samples.

Keywords: Cancer, Tyrosine kinase inhibitor screening assay, Tyrosine kinase inhibitors, Cancer therapeutic targets

การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์ตกค้างในไข่และผลิตภัณฑ์

วีรวุฒิ วิทยานันท์ และ ธรณิศวรร ไชยมงคล

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ ฟิโพรนิล (fipronil) เป็นสารกำจัดแมลงที่เมื่อสลายตัวให้สารเมตาโบไลต์ที่มีพิษทำลายระบบประสาทรุนแรง ประเทศไทยอนุญาตให้ใช้ในพืชแต่ห้ามใช้กับสัตว์ที่เป็นอาหาร ในปี พ.ศ. 2560 พบไข่ที่ผลิตในสหภาพยุโรปปนเปื้อนสารฟิโพรนิล สร้างความวิตกกังวลแก่ผู้บริโภคไทย ทำให้ต้องหาวิธีเพื่อใช้สำหรับตรวจสอบการตกค้างของสารฟิโพรนิลในไข่และผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในประเทศไทย จึงได้พัฒนาการสกัดจากวิธี EN 15662:2018 QuEChERS ตรวจวัดด้วยเทคนิค selected reaction monitoring (SRM) จากเครื่อง GC-MS/MS คำนวณผลด้วย matrix-matched calibration curve ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์ 2 ชนิด (fipronil-desulfinyl และ fipronil-sulfone) ในไข่ไก่และไข่เป็ด พบว่าค่า LOD และ LOQ เป็น 0.002 และ 0.005 mg/kg ตามลำดับ การทดสอบความแม่นยำกับตัวอย่างที่เติมสารที่ระดับ 0.005, 0.05 และ 0.1 mg/kg ค่าร้อยละในการคืนกลับ (recovery) อยู่ในช่วง 92.9–111.6% โดยมีความเที่ยงแสดงด้วย RSD น้อยกว่า 8.6% การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดให้ค่า relative standard uncertainty น้อยกว่า 20% มีช่วงการวิเคราะห์อยู่ระหว่าง 0.005–0.5 mg/kg อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ เป็นวิธีที่มีความไว แม่นยำและเชื่อถือได้เหมาะสมสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ เมื่อใช้วิธีนี้ตรวจสอบไข่และผลิตภัณฑ์จำนวน 66 ตัวอย่าง ที่เก็บจากกรุงเทพมหานครและปริมณฑลในปี พ.ศ. 2564 ผลไม่พบการตกค้างของสารฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์ในทุกตัวอย่าง บ่งชี้ว่าวิธีที่พัฒนานี้สามารถนำไปใช้สำหรับการเฝ้าระวังการตกค้างในไข่และผลิตภัณฑ์ต่อไป

คำสำคัญ: ฟิโพรนิล, ไข่, GC-MS/MS, การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธี

Corresponding author E-mail: weerawut.w@dmsc.mail.go.th

Received: 2 October 2021

Revised: 6 February 2022

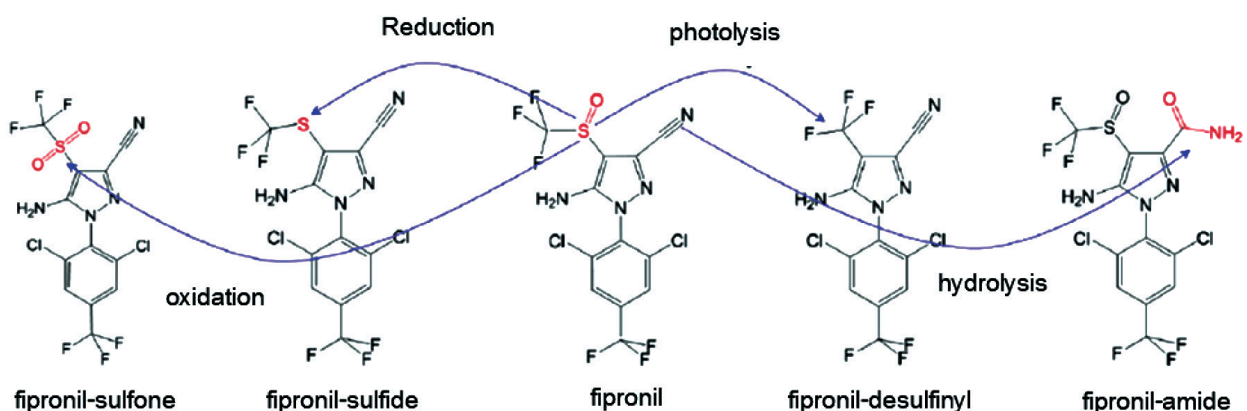
Accepted: 8 February 2022

บทนำ

ฟิโพรนิล (fipronil) เป็นสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช (pesticide) ประเภทสารฆ่าแมลง (insecticide) กลุ่ม phenyl pyrazole มีข้อบ่งชี้ในการใช้งานกว้าง สามารถกำจัดแมลงได้หลายชนิด เช่น ใช้กำจัดเห็บและหมัดในสุนัข ใช้ฆ่าเพลี้ย หนอน มด ปลวก เป็นต้น⁽¹⁾ เป็นสารที่ถูกจำกัดให้ใช้เฉพาะกับพืชและสัตว์เลี้ยงในบ้านเพื่อการสาธารณสุขเท่านั้น ห้ามมิให้ใช้ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ที่ใช้เป็นอาหาร เนื่องจากเมื่อสัตว์ได้รับสารฟิโพรนิลเข้าสู่ร่างกายจะเกิดกระบวนการ metabolism เป็นสารเมตาโบไลต์ที่มีความเป็นพิษต่อมนุษย์สูงโดยเฉพาะกับเด็ก⁽²⁾ สำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อมแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา (Environmental Protection Agency: EPA) พบว่าเมื่อได้รับสารนี้เข้าไปจะเกิดอาการเหงื่อออกมาก คลื่นไส้ อาเจียน ปวดและเวียนศีรษะ ปวดท้อง ชัก และเสียชีวิตได้⁽³⁾ ข้อมูลจากองค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) ระบุว่าสารฟิโพรนิลเป็นสารพิษระดับกลาง จัดอยู่ใน Class II moderately hazardous เมื่อได้รับในปริมาณมากจะเป็นอันตรายต่อตับไต และระบบน้ำเหลือง⁽⁴⁾ ฟิโพรนิลเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก มีความเป็นขั้วปานกลางและสามารถละลายในตัวทำละลายบางชนิดได้ดี เช่น acetone toluene เป็นต้น⁽⁵⁾ ในธรรมชาติสารฟิโพรนิลจะทำปฏิกิริยาต่างๆ เช่น photolysis, hydrolysis, reduction และ oxidation เกิดเป็นสาร fipronil-desulfinyl, fipronil-amide, fipronil-sulfide และ fipronil-

sulfone ตามลำดับ⁽⁶⁾ ดังแสดงในภาพที่ 1 การตรวจวัดการปนเปื้อนตกค้างจึงต้องคำนึงถึงสารเมตาโบไลต์ต่างๆ ที่เกิดขึ้นด้วย เช่น เมื่อสารฟิโพรนิลถูก oxidized ด้วย cytochrome P450 ในสัตว์จะเกิดเป็น fipronil-sulfone⁽⁷⁾ ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อสัตว์มีกระดูกสันหลังมากกว่าเดิมถึง 20 เท่า แม้ว่าฟิโพรนิลเป็นสารที่มีความคงตัวต่ำ แต่สารเมตาโบไลต์กลับมีความคงตัวสูงกว่ามาก⁽⁸⁾ นอกจากนี้ยังสามารถจับตัวกับชั้นไขมันได้ดีมีคุณสมบัติเป็น bioaccumulate ในห่วงโซ่อาหาร พบว่าในธรรมชาติเมื่อฟิโพรนิลถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยแสงเกิดเป็นสาร fipronil-desulfinyl ในปริมาณมาก งานวิจัยนี้จึงเลือกตรวจวิเคราะห์สารรวม 3 ชนิด ได้แก่ สารตั้งต้นหรือ active form คือ ฟิโพรนิล และสารเมตาโบไลต์ 2 ชนิด ได้แก่ fipronil-desulfinyl และ fipronil-sulfone

จากการสืบค้นวิธีตรวจวิเคราะห์สารฟิโพรนิล พบว่ามีข้อมูลการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในปริมาณจำกัด โดยปกติจะใช้เครื่อง GC-ECD, GC-MS/MS และ LC-MS/MS เป็นเครื่องมือตรวจวิเคราะห์^(9,10) ส่วนวิธีการเตรียมตัวอย่างมีทั้งวิธี liquid-liquid partition, solid-phase extraction (SPE) และ solid-phase microextraction ซึ่งเป็นวิธีที่ยุ่งยาก ใช้สารเคมีจำนวนมาก และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันมีการนำวิธี QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) มาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย⁽¹¹⁾ มีรายงานการใช้วิธีนี้สำหรับการเตรียมตัวอย่างไข่เพื่อวิเคราะห์สารฟิโพรนิลไม่มากนัก



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์ที่เกิดจากปฏิกิริยาต่างๆ⁽⁵⁾

ซึ่งเป็นวิธีที่น่าจะมีความเหมาะสมต่อการใช้งานมากที่สุด เพราะนอกจากจะใช้ตรวจวิเคราะห์ฟิโพรนิลแล้วยังสามารถใช้เป็น multiresidue method ร่วมกับสารชนิดอื่นๆ ได้เป็นจำนวนมาก⁽¹²⁾ มีรายงานการใช้วิธีนี้สำหรับเตรียมตัวอย่างไข่เพื่อวิเคราะห์สารฟิโพรนิลไม่มากนัก รวมทั้งความท้าทายของการเตรียมตัวอย่างไข่ คือ การกำจัดสารรบกวน (interference) ที่เป็นโปรตีน ไขมัน และคอเลสเตอรอล ซึ่งเป็นองค์ประกอบให้ได้มากที่สุด เพื่อเพิ่มความไว (sensitivity) ให้สามารถตรวจวัดได้ที่ระดับต่ำมากได้ การเลือกใช้ GC-MS/MS เป็นเครื่องมือที่มีความเหมาะสมเพราะให้ความไวและความเป็นเส้นตรง (linearity) ของการวิเคราะห์ที่ดี

ในปี พ.ศ. 2560 องค์การความปลอดภัยของอาหารแห่งสหภาพยุโรป (European Food Safety Authority: EFSA) พบการปนเปื้อนของสารฟิโพรนิลและสารอื่นๆ ในตัวอย่างไข่ไก่ที่มีการสุ่มตรวจ สูงเกินกว่ากฎหมายของสหภาพยุโรปซึ่งกำหนดไว้ที่ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม⁽¹³⁻¹⁵⁾ ทำให้มีการทำลายไข่ไก่เป็นจำนวนมาก และมีการขยายผลการตรวจในสินค้าเนื้อไก่และผลิตภัณฑ์แปรรูปจากไข่ไก่ด้วย ส่งผลให้เกิดความตระหนักไปทั่วโลก ประเทศญี่ปุ่น และ Codex⁽¹⁶⁾ กำหนดปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit: MRL) ของสารฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์ในไข่ที่ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับประเทศไทยกำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 387 พ.ศ. 2560 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง โดยกำหนดปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดในพืชบางชนิดที่ระดับแตกต่างกันไป และค่าดีฟอลต์ลิมิต (default limit) สำหรับอาหารอื่นๆ รวมทั้งไข่ไก่ที่ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยชนิดสารพิษตกค้างในพืชเป็น fipronil (ละลายในไขมัน) และในสัตว์เป็นผลรวมของ fipronil และ fipronil-sulfone รายงานผลเป็น fipronil (ละลายในไขมัน)⁽¹⁷⁾ ซึ่งปัจจุบันกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ให้บริการตรวจวิเคราะห์สารฟิโพรนิลในผักและผลไม้⁽¹⁸⁾ โดยมี limit of detection (LOD) เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่ยังไม่มียูนิเวอร์สัลการแพทย์ โดยสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ให้บริการตรวจวิเคราะห์สารฟิโพรนิลในผักและผลไม้⁽¹⁸⁾ โดยมี limit of detection (LOD) เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่ยังไม่มียูนิเวอร์สัล

ที่กฎหมายกำหนด จึงต้องมีการพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่าง การสกัดและการตรวจวัดด้วยเครื่องมือ ให้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ตามค่าที่กฎหมายกำหนด นอกจากนี้ยังต้องการประเมินความใช้ได้ของวิธี เพื่อใช้ในงานบริการ เมื่อได้วิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อสำรวจติดตามเบื้องต้นการปนเปื้อนของสารฟิโพรนิล ปัจจุบันไม่พบข้อมูลการใช้สารฟิโพรนิลในฟาร์มไก่ในประเทศไทย และยังไม่มียูนิเวอร์สัลการแพทย์ โดยสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ให้บริการตรวจวิเคราะห์สารฟิโพรนิลในผักและผลไม้⁽¹⁸⁾ โดยมี limit of detection (LOD) เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่ยังไม่มียูนิเวอร์สัล

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารฟิโพรนิลตกค้างในไข่และผลิตภัณฑ์ สำหรับให้บริการตรวจวิเคราะห์ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 387 พ.ศ. 2560 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง และค่ากำหนดของโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius) โดยมีคุณลักษณะของวิธีสอดคล้องกับมาตรฐานและกฎหมายที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งสำรวจและตรวจสอบสินค้าไข่และผลิตภัณฑ์จากไข่ที่จำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล เพื่อให้ทราบสถานการณ์เบื้องต้นของการตกค้างของสารฟิโพรนิลในอาหารก่อนถึงมือผู้บริโภค ใช้ผลสำหรับแจ้งเตือนภัยและขยายผลการสำรวจติดตามในวงกว้างให้ครอบคลุมทั่วประเทศต่อไป อีกทั้งสามารถนำเสนอข้อมูลให้แก่หน่วยงานที่เกี่ยวข้องสำหรับการจัดการความเสี่ยงของการได้รับสารพิษอีกด้วย

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี (Reagents) ได้แก่ acetonitrile (HPLC, Merck, USA) acetone (AR, RCI Labscan, USA) n-hexane (PG, Burdick & Jackson, USA) ethyl acetate (HPLC, Burdick & Jackson Korea) QuEChERS Extraction Packet (Agilent Technologies, USA) EN Method Part No: 5982-7650 เป็นส่วนผสมของ MgSO_4 4 g NaCl 1 g sodium citrate dehydrate 1 g และ disodium hydrogen citrate sesquihydrate 0.5 g Dispersive SPE 15 mL, Fatty sample, EN (Agilent Technologies, USA) เป็นส่วนผสมของ MgSO_4 900 mg PSA 150 mg และ C18EC 150 mg (Agilent Technologies, USA) น้ำ reverse osmosis (RO) D-sorbitol (AR, purity $\geq 98\%$) วัสดุควบคุมคุณภาพ Quality Control Material (QCM) FCPM11-EGG2QC Pesticide Residues (fat soluble) in Chicken (Hens)

สารมาตรฐาน (standards) ได้แก่ fipronil fipronil-desulfinyl และ fipronil-sulfone เกรด วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material: CRM, Dr. Ehrenstorfer, Germany) ความบริสุทธิ์ (purity) $\geq 98.5\%$

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ทำโดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Stock standard solution) แต่ละชนิดที่มีความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ ใน acetone แล้วเตรียมสารละลายมาตรฐานผสม 3 ชนิด (mixed intermediate standard solution) ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/mL}$ ใน volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรด้วย acetone เก็บรักษาที่อุณหภูมิ $\leq -18^\circ\text{C}$ ก่อนการใช้งาน เจือจาง intermediate standard solution ด้วย acetone หรือสารสกัดจากตัวอย่าง เพื่อทำ working standard solution ช่วงความเข้มข้น 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 และ 1.0 $\mu\text{g/mL}$ เติมสารละลาย D-sorbitol 3% (analytical protectant) ปริมาตร 3 μL ในสารละลาย 1 mL ใช้วิเคราะห์

ทันทีหรือสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $\leq -18^\circ\text{C}$ ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 g Sartorius รุ่น LP 620S และ 0.01 mg Sartorius รุ่น MC 210S (Sartorius AG, Germany) สำหรับชั่งตัวอย่างและสารมาตรฐาน เครื่องระเหยสารละลายแบบ heating box และใช้แก๊สไนโตรเจน (N_2) ในการระเหยสารสกัด REACTI-THERM III #TS-18824 Thermo scientific เครื่องหมุนปั่นผสมสารละลาย Vortex-2 Genie micropipette ขนาด 2–20 μL amber vial centrifuge tube ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำกว่า -18°C certified volumetric flask ก่อนการใช้งานเครื่องแก้วทุกชนิดให้ล้างด้วย acetone 2 ครั้ง และ n-hexane 2 ครั้ง จากนั้นผึ่งให้แห้งก่อนนำมาใช้งาน

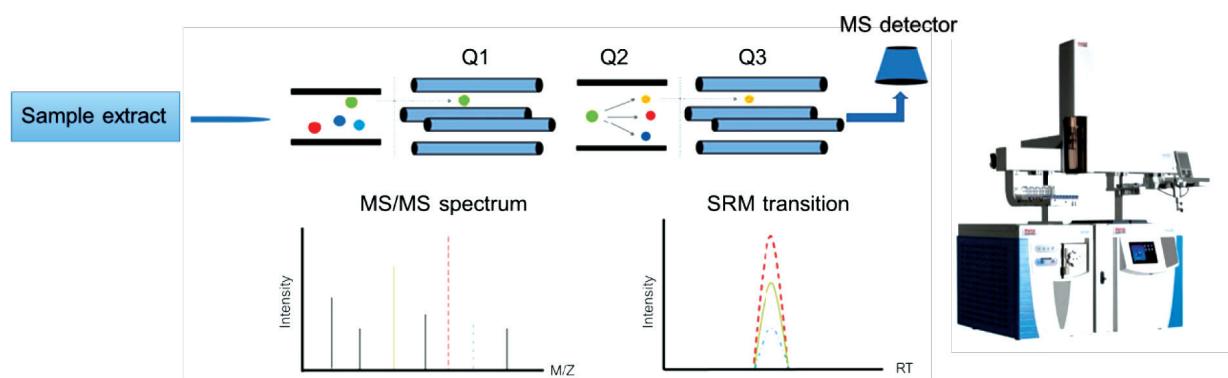
เครื่อง Gas Chromatograph-Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS) ของ Thermo Scientific TRACE™ 1300 Gas Chromatograph (Thermo Scientific, Italy) ต่อกับเครื่อง TSQ 9000, Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Thermo Scientific, Italy) โดยใช้ PAL RTC auto-sampler และใช้ TraceFinder 4.1 EFS software ทำให้สารเป็นประจุด้วย electron ionization mode (EI, 70 eV) สารจะถูกแยกด้วย fused silica capillary column DB-5ms (30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) ของ Agilent Technologies โปรแกรมที่ใช้สำหรับปรับอุณหภูมิใน oven ของเครื่อง GC เริ่มจาก 70°C เป็นเวลา 1 นาที เพิ่มที่อัตรา 50°C ต่อนาที จนถึง 150°C เพิ่มที่อัตรา 6°C ต่อนาที จนถึง 200°C เพิ่มที่อัตรา 16°C ต่อนาที จนถึง 280°C คงไว้ 8.5 นาที จากนั้นเพิ่มที่อัตรา 50°C ต่อนาที ถึงอุณหภูมิสุดท้ายที่ 300°C คงไว้ 0.5 นาที ใช้เวลาทั้งสิ้นประมาณ 25 นาที โดยมี injection volume เป็น 2 μL ใช้ inlet ชนิด programmable temperature vaporizing (PTV) ตั้งอุณหภูมิของ PTV ไว้ที่ 80°C ค้างไว้ 0.1 นาที เพิ่มที่อัตรา 5°C ต่อกววินาที จนถึง 300°C ตั้งอุณหภูมิ

ion source เป็น 280°C และ quadrupole MS1 และ MS2 เป็น 180°C เมื่อสารเข้าสู่เครื่อง GC-MS/MS จะถูกทำให้แตกตัวเป็นประจุโดยใช้แก๊สไนโตรเจน

เป็น quench gas และ Argon เป็น collision gas ถูกตรวจวัดด้วย selected reaction monitoring (SRM) mode ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 2

ตารางที่ 1 Selected reaction monitoring (SRM) transitions และ collision energies ของสาร fipronil และเมตาโบไลต์

Compound (RT, min)	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Collision Energy (eV)	Transition type
fipronil-desulfinyl (12.07)	333	231	20	Quantification
	333	281	12	Qualification-1
	388	281	26	Qualification-2
	388	333	12	Qualification-3
	390	333	12	Qualification-4
	390	335	12	Qualification-5
fipronil (13.86)	255	157	34	Quantification
	255	228	14	Qualification-1
	351	255	14	Qualification-2
	367	213	28	Qualification-3
	367	245	20	Qualification-4
	369	215	30	Qualification-5
fipronil-sulfone (15.02)	255	228	10	Quantification
	335	255	10	Qualification-1
	383	255	15	Qualification-2
	385	257	15	Qualification-3
	452	241	20	Qualification-4
	452	255	25	Qualification-5



ภาพที่ 2 กลไกการทำงานของ selected reaction monitoring (SRM) mode ด้วยเครื่อง GC-MS/MS (ภาพจากเอกสารประกอบการบรรยายการใช้เครื่องมือจากบริษัท AB Sciex Thailand Ltd.)

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธี 2 ชนิด ได้แก่ ไข่ไก่และไข่เป็ด ใช้เฉพาะไข่ขาวและไข่แดง ไม่รวมเปลือก ปั่นผสมตัวอย่างแต่ละชนิดให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องตีผสมอาหาร ซึ่งแบ่งตัวอย่างเพื่อเป็น analytical portions โดยชั่งตัวอย่างน้ำหนักไข่ไก่และไข่เป็ด 10.0 ± 0.1 g ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 mL ตัวอย่างที่ยังไม่นำมาวิเคราะห์จะถูกเก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -15°C สำหรับตัวอย่างที่เป็นผลิตภัณฑ์จากไข่ ใช้ตัวอย่างอาหารประมาณ 200–300 กรัม ปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

การสกัดตัวอย่าง นำตัวอย่างที่ชั่งไว้เติม acetonitrile ปริมาตร 10 mL เขย่าด้วยมืออย่างแรง 1 นาที เติม QuEChERS extraction pocket เขย่าต่ออีก 1 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แบ่งสารสกัดส่วนใสด้านบน 5 mL ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 mL จากนั้นเติม Dispersive SPE เขย่าด้วยมือ 30 วินาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บสารละลายชั้นบน ปริมาตร 2 mL นำไปประเหยแห้ง ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายผสมของ n-hexane:ethyl acetate (3:1) เป็น 2 mL เติม D-sorbitol 3% ปริมาตร 6 μL ได้ความเข้มข้นตัวอย่าง 1 g/mL จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS

ตัวอย่างสำหรับการสำรวจติดตามเบื้องต้น สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ทำการเก็บตัวอย่าง ได้แก่ ไข่สดชนิดแบ่งขายและชนิดมีบรรจุภัณฑ์

ประกอบด้วยไข่ไก่และไข่เป็ด ตัวอย่างละ 12 ฟอง ไข่นกกกระทา ตัวอย่างละ 30 ฟอง และผลิตภัณฑ์จากไข่ ได้แก่ ขนมที่ทำจากไข่ เช่น ทองหยอด ทองหยิบ ฝอยทอง ตัวอย่างละ 200–300 g ไข่เหลวบรรจุขวดไข่ตุ๋น พร้อมบริโภคเต้าหู้ไข่ ตัวอย่างละ 2 หน่วย (ขวด/ถ้วย/หลอด) และไข่ผง ตัวอย่างละ 200–300 g โดยสถานที่เก็บตัวอย่างเป็นตลาดสด ห้างสรรพสินค้าร้านค้าปลีก และร้านสะดวกซื้อในเขตกรุงเทพมหานคร ปทุมธานี นครปฐม นนทบุรี สมุทรปราการ และสมุทรสาคร รวม 6 จังหวัด จำนวน 11 ตัวอย่างต่อจังหวัด รวมทั้งสิ้น 66 ตัวอย่าง โดยแบ่งระยะการเก็บเป็น 3 เดือน เดือนละ 2 จังหวัด ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แผนการเก็บตัวอย่างไข่และผลิตภัณฑ์ จำนวน 66 ตัวอย่าง ในปี พ.ศ. 2564 (จังหวัดละ 11 ตัวอย่าง)

เดือน	จังหวัด
เมษายน	กรุงเทพมหานคร นนทบุรี
พฤษภาคม	ปทุมธานี สมุทรสาคร
มิถุนายน	นครปฐม สมุทรปราการ

การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

ประยุกต์ใช้วิธีที่อ้างอิงจากวิธีมาตรฐานของสหภาพยุโรป EN 15662:2018 ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์สารเคมี ป้องกันกำจัดศัตรูพืชในอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์จากพืช (food of plant origin) แบบ multiresidue method

ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) และเครื่องลิควิดโครมาโทกราฟี (LC) โดยการสกัดด้วย acetonitrile และ partition ด้วยวิธี QuEChERS ทำให้บริสุทธิ์ด้วย dispersive SPE ดัดแปลงให้ใช้กับอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ (animal origin food) ซึ่งเป็นตัวอย่างไข่ไก่และไข่เป็ด ด้วยการหา mass transition condition จากเครื่อง GC-MS/MS ที่จำเพาะต่อสารสนใจและคัดเลือก dispersive SPE ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์อาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ (fatty sample) รวมถึงการปรับตัวทำละลายสุดท้ายให้มีความเป็นขี้ที่เข้ากับสารฟิโพรนิล

ความจำเพาะของวิธี

ฉีดสารมาตรฐานเข้าเครื่อง GC-MS/MS ตามสภาวะที่กำหนด จำนวน 3 ซ้ำ บันทึก retention time (RT) และ ion intensity ratio แล้วทดสอบความจำเพาะของวิธีโดยวิเคราะห์ method blank (reagent blank) ที่ใช้น้ำ RO แทนตัวอย่าง และ sample blank ได้แก่ ไข่ไก่และไข่เป็ด เมื่อไม่พบพีคหรือพบพีคที่มีสัญญาณ signal-to-noise ratio (S/N) น้อยกว่า 3 ที่มี RT และ/หรือ ค่า m/z ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน ถือว่าวิธีปราศจากสารรบกวนและวิธีมีความจำเพาะ

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานแบบ matrix-matched calibration (MMC) ศึกษาโดยใช้สารสกัดที่ได้จากไข่ไก่และไข่เป็ดที่เป็น blank เป็นตัวทำละลาย เจือจาง intermediate standard solution ให้ได้ 12 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.0002, 0.0005, 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 และ 1 $\mu\text{L/mL}$ และฉีดเข้าเครื่อง GC-MS/MS แบบสุ่ม (random, $n = 3$) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient: r) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ r มีค่ามากกว่า 0.995

ขีดจำกัดของการตรวจพบ

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection: LOD) ศึกษาโดยเติมสารละลายมาตรฐานลงในสารสกัดจากไข่ไก่และไข่เป็ดที่ระดับ LOD แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC-MS/MS คำนวณค่า signal-to-noise ratio

(S/N) จากนั้นยืนยันค่า LOD ที่ระดับความเข้มข้น 0.002 mg/kg โดยเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างไข่ไก่และไข่เป็ด สกัดตามขั้นตอนวิเคราะห์จำนวน 7 ซ้ำ ($n = 7$) แล้วคำนวณค่า S/N ค่า LOD คือ ระดับความเข้มข้นที่ให้ค่า S/N มากกว่า 3

ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ

ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation: LOQ) ศึกษาโดยใช้ข้อมูลจากการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 mg/kg วิเคราะห์ จำนวน 7 ซ้ำ ($n = 7$) แล้วคำนวณ %recovery กำหนดเกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วงร้อยละ 70–120 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ $\leq 20\%$

ความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์

ความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ศึกษาโดยการเติมสารมาตรฐานในตัวอย่าง (sample blank) ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.005, 0.020, 0.050, 0.1, 0.2 และ 0.5 mg/kg วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ ($n = 3$) สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่างกับความเข้มข้นที่ตรวจพบ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient: r) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ r มีค่ามากกว่า 0.995

ความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision)

ศึกษาโดยเติมสารมาตรฐานในตัวอย่าง (sample blank) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ LOQ, 10 และ 20 เท่าของ LOQ ซึ่งมีความเข้มข้นเป็น 0.005, 0.05 และ 0.1 mg/kg ตามลำดับ วิเคราะห์ระดับละ 7 ซ้ำ ($n = 7$) แล้วคำนวณ %recovery และ RSD โดยเกณฑ์ยอมรับความแม่นยำ (mean recovery) ในช่วง 70–120% และเกณฑ์ยอมรับความเที่ยง (RSD) มีค่า $\leq 20\%$

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Estimation of Measurement Uncertainty: MU) ของการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในอาหารที่ทดสอบใช้วิธีการของ EURACHEM⁽¹⁹⁾ ซึ่งเป็นการคำนวณโดยใช้ทุกแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน จากนั้น

คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้ค่า $k=2$ เป็นวิธีที่มีความถูกต้องเป็นที่ยอมรับและเหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน

การทดสอบผลกระทบของเมทริกซ์

ศึกษาผลกระทบของเมทริกซ์ (matrix effect: ME) โดยฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้นที่ต้องการที่ได้จาก spiked matrix blank และ standard on solution แล้วสร้าง curve ระหว่างความเข้มข้น (x-axis) กับ peak area หรือ intensity/response (y-axis) คำนวณ slope ของกราฟมาตรฐาน จากสมการ $y = ax + b$ โดย x คือ analyte concentration, y คือ analyte peak, a คือ ความชันของ calibration curve และ b คือ จุดตัดแกน y คำนวณ matrix factor จากสมการ MF (matrix factor) = $a(\text{matrix})/a(\text{solvent})$ จากนั้นคำนวณ ME (%) จากสมการ $ME (\%) = (MF - 1) \times 100$ หากผลการประเมินพบว่า ME (%) มีผลกระทบน้อย (soft) แสดงว่าผลกระทบของเมทริกซ์ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการวิเคราะห์และสามารถใช้ standard on solution ในการคำนวณผลได้ หากพบว่ามีผลกระทบปานกลางและมาก (medium and strong) แสดงว่าไม่สามารถใช้ standard on solution ในการคำนวณ

ผลได้ เกณฑ์การตัดสินผลกระทบของเมทริกซ์ ดังแสดงในตารางที่ 3 หากเครื่องหมาย ME (%) เป็นบวก ผลกระทบของเมทริกซ์จะเป็นแบบ enhancement หากเครื่องหมาย ME (%) เป็นลบ ผลกระทบของเมทริกซ์จะเป็นแบบ suppression⁽²⁰⁾

การทวนสอบความใช้ได้ของวิธี

การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีศึกษาโดยนำวัสดุควบคุมคุณภาพในตัวกลาง (matrix quality control material) QCM Product Code FCPM11-EGG2QC จาก FAPAS[®] ซึ่งทราบค่าความเข้มข้นของ fipronil-sulfone ใน chicken (hens) eggs เป็น $12.0 \mu\text{g/kg}$ มีช่วงยอมรับอยู่ระหว่าง $6.7-17.3 \mu\text{g/kg}$ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นแล้ว ผลที่ได้ต้องอยู่ในช่วงยอมรับ จึงจะแสดงว่าวิธีมีความถูกต้อง และขยายขอบข่ายชนิดตัวอย่างจากการใช้ตัวอย่างไข่ไก่และไข่เป็ดในขั้นตอนการทดสอบความใช้ได้ของวิธี ด้วยการทำ internal quality control โดยการทดสอบการคืนกลับที่ระดับ LOQ ในตัวอย่างไข่นกกระทาและผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำจากไข่อื่นๆ ทุกชนิดที่ทำการทดสอบ ผลต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ %recovery อยู่ระหว่าง 70-120%

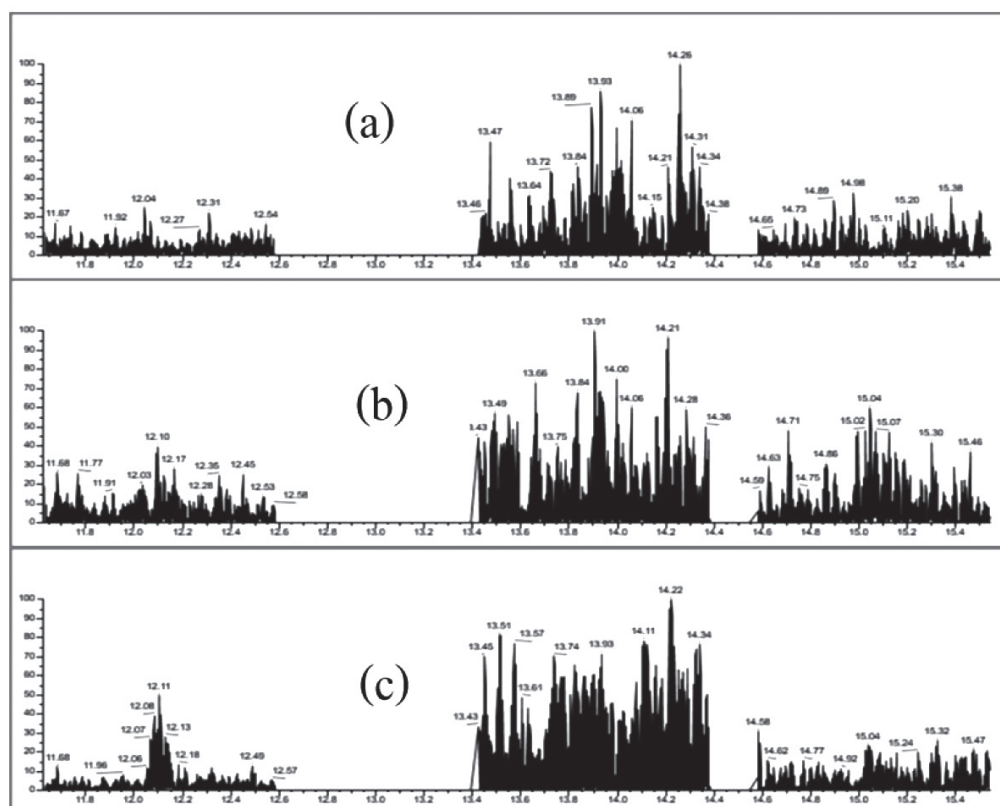
ตารางที่ 3 เกณฑ์การตัดสินผลกระทบของเมทริกซ์

Matrix effect (%)	Consideration	Result	Consideration
-20% to 20 %	Soft	Negative (-)	Suppression
> 20% to 50%	Medium	Zero (0)	No matrix effect
> 50%	Strong	Positive (+)	Enhancement

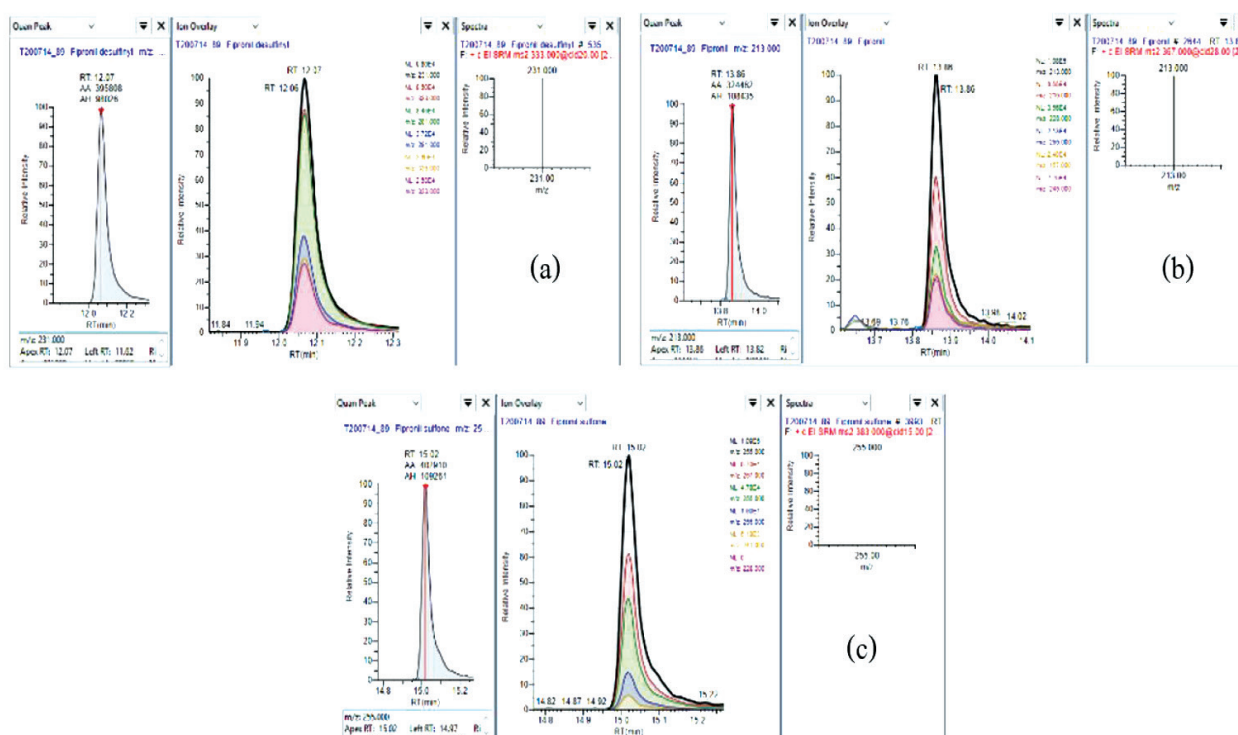
ผล

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ความจำเพาะของวิธี พบว่า peak ที่ได้จากการวิเคราะห์ method blank และ sample blank ที่เป็นไข่ไก่และไข่เป็ด โดยใช้เครื่อง GC-MS/MS ด้วยเทคนิค SRM ตรวจไม่พบสารรบกวนที่ให้พีคตรงหรือใกล้เคียงกับ retention time (RT) ของสารมาตรฐาน และพีคที่

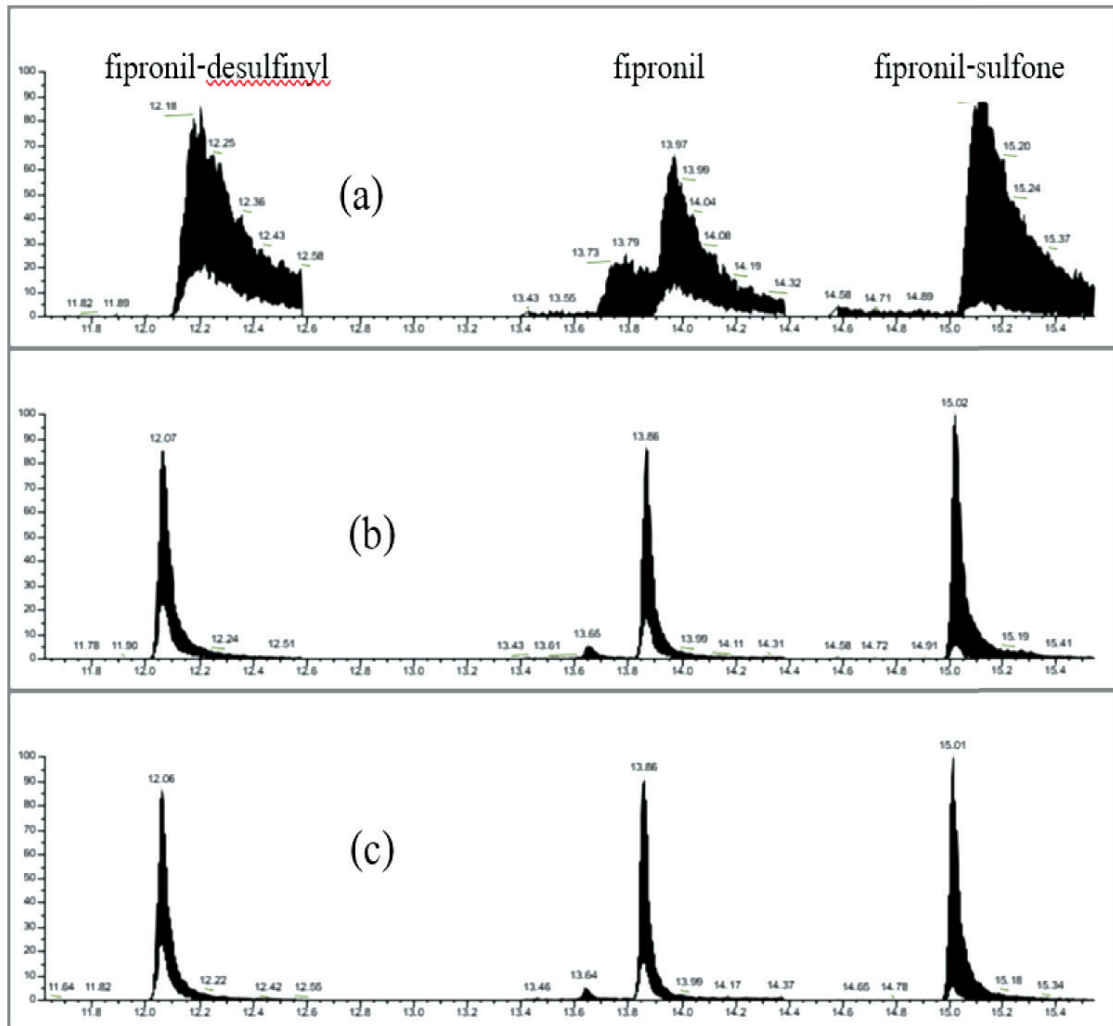
ตรวจพบมีสัญญาณ signal-to-noise ratio (S/N) น้อยกว่า 3 ซึ่งแสดงว่าวิธีมีความจำเพาะ ดังแสดงในภาพที่ 3 การวิเคราะห์แบบ SRM ด้วยเครื่อง GC-MS/MS ทำให้ตรวจวัดฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์ ได้อย่างชัดเจน เป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจวัดสารสนใจในเมทริกซ์ที่มีสารรบกวนได้ดี ดังแสดงในภาพที่ 4-5



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของ method blank (a) matrix blank ไข่ไก่ (b) และ matrix blank ไข่เป็ด (c)



ภาพที่ 4 Quantification and qualification peak ของสาร fipronil-desulfinyl (a), fipronil (b) และ fipronil-sulfone (c)



ภาพที่ 5 Total ion chromatogram (TIC) ของสาร fipronil-desulfinyl, fipronil และ fipronil-sulfone ใน acetone (a), ไข่ไก่ (b) และไข่เป็ด (c)

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสามารถสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง concentration กับ peak area (response) ของสารสนใจมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.0002 ถึง 1 $\mu\text{L/mL}$ ดังแสดงในภาพที่ 6 โดยกราฟมาตรฐานของสารทุกชนิดมีค่า r ในช่วง 0.997–0.999 ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์ยอมรับที่ 0.995

ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ของสารทั้ง 3 ชนิด เท่ากับ 0.002 mg/kg ($S/N > 3$) และการยืนยันโดยการสกัดตัวอย่างที่ระดับ LOD ผลพบว่าพบสารทุกชนิดทั้ง 7 ชนิด โดยมีขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.005 mg/kg ดังแสดงในตารางที่ 4

ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีดังแสดงในตารางที่ 5 ความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับ

LOQ, 10 และ 20 เท่าของ LOQ ที่ 0.005, 0.05 และ 0.1 mg/kg ให้ %recovery อยู่ระหว่าง 92.9–111.6% โดยมีความเที่ยงแสดงด้วย RSD น้อยกว่า 8.6% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับที่ 70–120% และ $\leq 20\%$ ตามลำดับ

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ทั้งแสดงในตารางที่ 4 LOD ที่ 0.002 mg/kg และ LOQ ที่ 0.005 mg/kg พบว่าสารทั้ง 3 ชนิด มีความเป็นเส้นตรงอยู่ระหว่าง 0.005–0.5 mg/kg ด้วยคุณลักษณะทั้งหมดที่ทำการทดสอบความใช้ได้แสดงว่าสามารถใช้วิธีนี้วิเคราะห์สารสนใจดังกล่าวได้

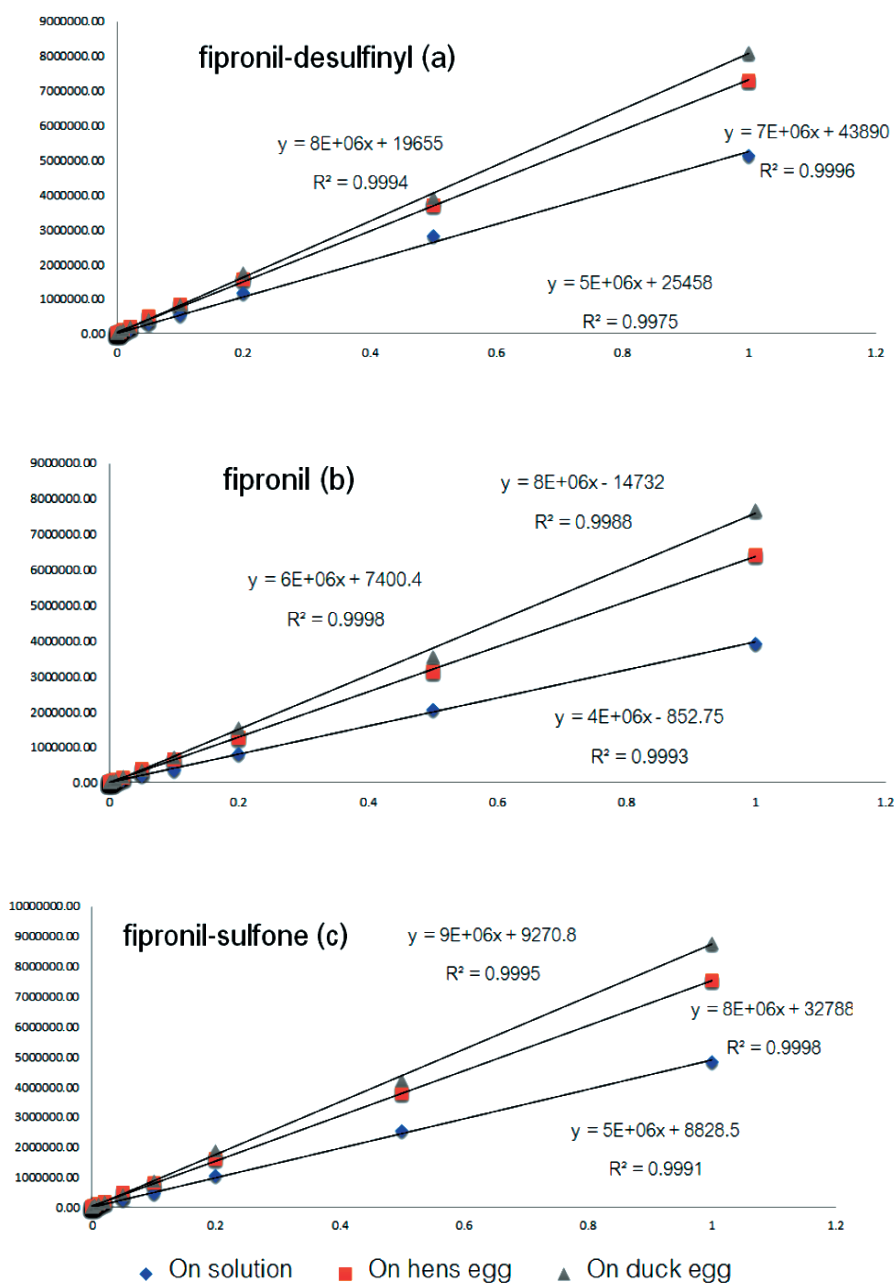
การทดสอบผลกระทบของเมทริกซ์ จากภาพที่ 6 ความชันของกราฟมาตรฐานสาร fipronil-desulfinyl, fipronil และ fipronil-sulfone และค่า ME (%) ที่คำนวณได้ดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่าผลกระทบของเมทริกซ์

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ Limit of detection (LOD), Limit of quantitation (LOQ) และ Linearity of working range

Compounds	S/N ratio (at LOD = 0.002 mg/kg)	Working range (mg/kg)	r (chicken egg/duck egg)
fipronil-desulfinyl	Infinity	0.005-0.5	0.9998/0.9990
fipronil	31-4329	0.005-0.5	0.9997/0.9991
fipronil-sulfone	63-170	0.005-0.5	0.9998/0.9995

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง (accuracy and precision)

Compounds	Matrix	Spiked level (mg/kg)	%Recovery (mean, mg/kg)	%RSD
fipronil-desulfinyl	chicken egg	0.005	95.7 (0.00479)	8.62
		0.05	99.1 (0.04956)	6.11
		0.1	99.1 (0.09908)	4.86
	duck egg	0.005	98.8 (0.00494)	6.17
		0.05	94.4 (0.04720)	5.55
		0.1	111.0 (0.11100)	7.86
fipronil	chicken egg	0.005	92.9 (0.00465)	6.47
		0.05	100.7 (0.05033)	6.40
		0.1	101.0 (0.10100)	5.77
	duck egg	0.005	111.6 (0.00558)	6.55
		0.05	100.7 (0.05034)	8.57
		0.1	104.2 (0.10420)	8.56
fipronil-sulfone	chicken egg	0.005	96.2 (0.00481)	5.64
		0.05	105.1 (0.05256)	5.41
		0.1	101.6 (0.10160)	2.85
	duck egg	0.005	107.0 (0.00535)	6.03
		0.05	99.1 (0.04954)	6.22
		0.1	110.8 (0.11080)	8.15



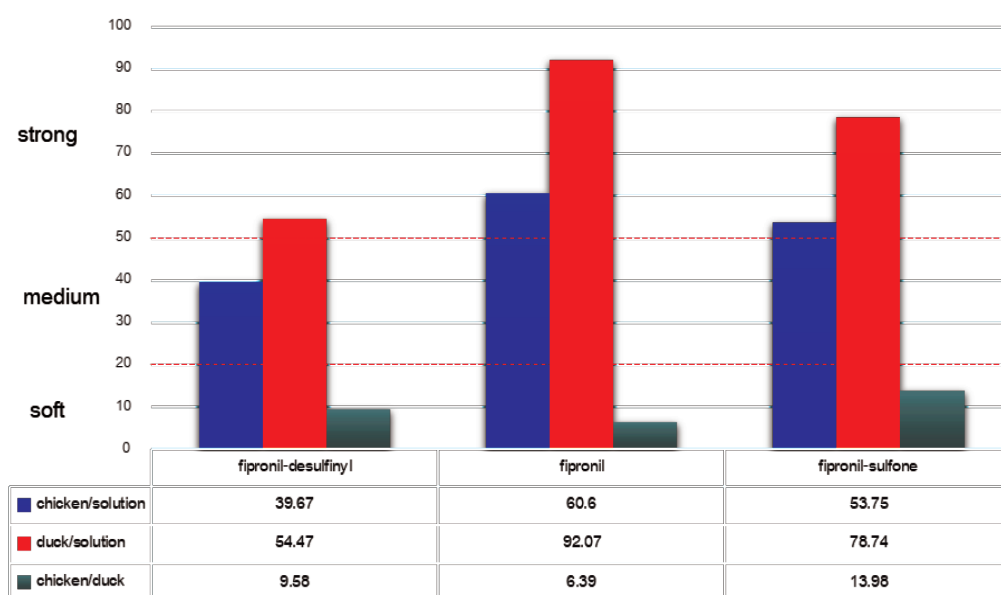
ภาพที่ 6 กราฟมาตรฐานของสาร fipronil-desulfinyl (a), fipronil (b) และ fipronil-sulfone (c) ใน solution, matrix ไข่ไก่ และ matrix ไข่เป็ด

ตารางที่ 6 ผลกระทบของ matrix ของ fipronil-desulfinyl, fipronil และ fipronil-sulfone แบบ on solution, matrix ไข่ไก่ และ matrix ไข่เป็ด

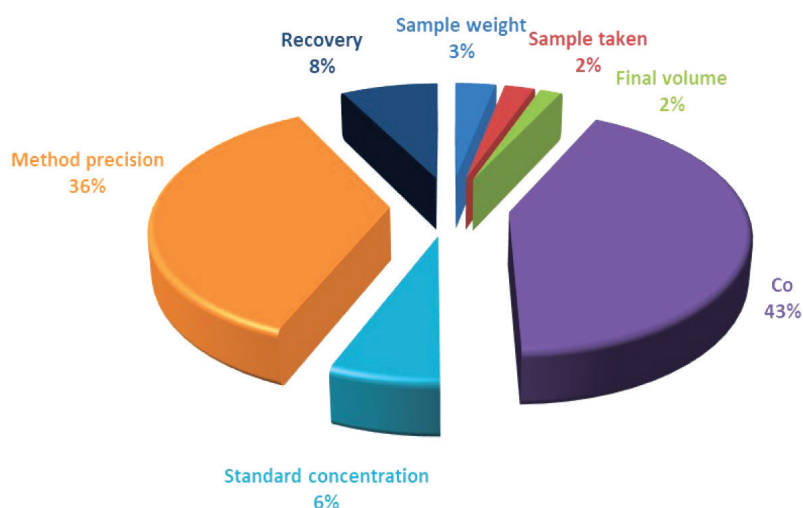
Compound	Matrix Effect (%)					
	chicken/solution		duck/solution		chicken/duck	
fipronil-desulfinyl	39.67	medium	54.47	strong	9.58	soft
fipronil	60.60	strong	92.07	strong	6.39	soft
fipronil-sulfone	53.75	strong	78.74	strong	13.98	soft

ไข่ไก่และไข่เป็ดต่อการวิเคราะห์ on solution เป็นแบบเพิ่มสัญญาณ (enhancement) และไข่ทั้ง 2 ชนิด ไม่มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการวิเคราะห์ต่อกัน สามารถใช้ทดแทนกันได้และพบว่าผลกระทบของเมทริกซ์ไข่ไก่และไข่เป็ดมีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการวิเคราะห์ต่อการวิเคราะห์ on solution ดังแสดงในภาพที่ 7

ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดตามแนวของ ISO GUM Approach หรือ Bottom-up approach (ที่ระดับความเชื่อมั่นประมาณ 95%, $k = 2$) จากการประมาณค่าความไม่แน่นอน พบว่าแหล่งความไม่แน่นอนที่สำคัญที่สุด คือ calibration curve (C_0) (43%) และ method precision (36%) ส่วน bias หรือ recovery (8%), standard concentration (6%) และ sample weight (3%) และองค์ประกอบอื่นๆ นั้นถือเป็นองค์ประกอบที่น้อยมาก ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 7 แผนภูมิแท่ง ME (%) ของ fipronil และเมตาโบไลต์



ภาพที่ 8 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สารฟิโพรนิลในไข่ไก่ที่ระดับ 0.005 mg/kg (C_0 = calibration curve)

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นก่อนนำไปใช้งาน ซึ่งต้องสามารถให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง พบว่าเมื่อนำวัสดุควบคุมคุณภาพในตัวกลาง matrix quality control material, QCM Product Code FCPM11-EGG2QC ที่ผลิตโดย FAPAS® ซึ่งทราบค่าที่แน่นอนของ fipronil-sulfone ใน chicken (hens) eggs เป็น 12.0 µg/kg ช่วงยอมรับอยู่ระหว่าง 6.7–17.3 µg/kg ผลการวิเคราะห์ fipronil-sulfone

เป็น 11.0 µg/kg ซึ่งอยู่ในช่วงยอมรับได้ จากนั้นทดสอบ IQC โดยการศึกษาการคืนกลับ ผลพบว่า %recovery อยู่ในเกณฑ์ยอมรับที่ 70–120% ผลการสำรวจเบื้องต้น พบว่าเมื่อใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นและผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์แล้ว ตรวจสอบไข่และผลิตภัณฑ์จำนวน 66 ตัวอย่าง ที่เก็บจากกรุงเทพมหานครและปริมณฑลในปี พ.ศ. 2564 ผลไม่พบการตกค้างของสารฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์ในทุกตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการตรวจวิเคราะห์สาร fipronil และเมตาโบไลต์ แบ่งตามประเภทของผลิตภัณฑ์

ประเภทตัวอย่าง	Analyte		
	Fipronil-desulfinyl	Fipronil	Fipronil-sulfone
ไข่สดชนิดแบ่งขาย ไม่มีบรรจุภัณฑ์ (n = 18)	Not detected	Not detected	Not detected
ไข่สดบรรจุในบรรจุภัณฑ์ที่ระบุแหล่งผลิต (n = 18)	Not detected	Not detected	Not detected
ผลิตภัณฑ์จากไข่ (n = 30)	Not detected	Not detected	Not detected

วิจารณ์

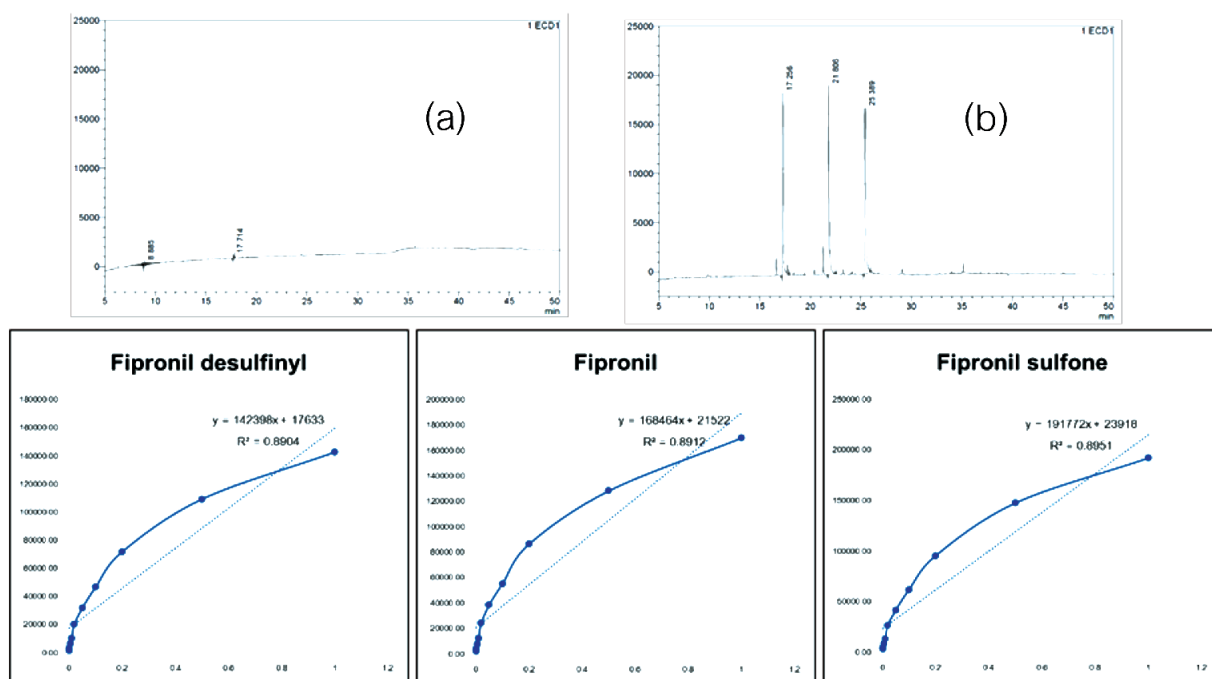
การเตรียมตัวอย่างเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญต่อการให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง การเตรียมตัวอย่างไข่ให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenization) ทำได้ง่ายกว่าการเตรียมตัวอย่างผักผลไม้ เนื่องจากตัวอย่างมีสถานะเป็นของเหลว การวิจัยนี้ไม่ได้ทำการวิเคราะห์สารฟิโพรนิลที่อาจตกค้างหรือเคลื่อนที่เปลือกไข่ แต่จะทำการตรวจวิเคราะห์เฉพาะส่วนที่บริโภคได้เพื่อให้สอดคล้องกับมาตรฐานการเตรียมตัวอย่าง⁽²¹⁾ สำหรับการสกัดใช้ acetonitrile ที่มีความเป็นขั้วระดับกลางสามารถละลายสารฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์ได้ดี และมีคุณสมบัติทำให้โปรตีนในตัวอย่างเสื่อมสภาพและจับตัวกันเป็นก้อนแยกออกจากส่วนอื่นๆ (protein precipitation) การสกัดควรใช้การเขย่าในแนวตั้งของ centrifuge tube และเขย่าด้วยมืออย่างแรง สามารถใช้เครื่องเขย่าแบบ mechanic แทนได้ โดยใส่แท่งเซรามิกเพื่อช่วยในการทำให้ก้อนโปรตีนแตกตัวได้ดีขึ้น หากเขย่าไม่แรงเพียงพอ ก่อนตัวอย่างจะติดที่หลอดพลาสติกทำให้ไม่สามารถสกัด

สารออกมาได้ หลังจากได้สารสกัดแล้ว ใช้ dispersive SPE ในการทำให้บริสุทธิ์⁽²²⁾ ซึ่งมีคุณสมบัติสำคัญ คือ C18EC สารนี้มีคุณสมบัติดูดซับไขมันได้ดี จึงเป็นการกำจัดไขมันจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เนื่องจากสารฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์เป็นสารระเหยได้เมื่อถูกความร้อนและคงตัวที่อุณหภูมิสูง จึงสามารถใช้เครื่องมือชนิด gas chromatograph สำหรับแยกและวิเคราะห์สารได้ สารฟิโพรนิลเป็นสารที่มี electron สามารถตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดชนิด electron capture detector (ECD) ซึ่งเป็นเครื่องมือพื้นฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการสำหรับวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่มี electron ในกลุ่ม organochlorine (OC) ดังนั้นเบื้องต้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทดลองฉีดสารมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-ECD พบว่าเครื่องมือนี้มี selectivity และ sensitivity ที่ดี สามารถตรวจวัดได้ระดับต่ำมากที่ 0.0002 mg/mL (0.2 ppb) และสามารถแยกสารสนใจออกจากกันได้อย่างชัดเจน ในขั้นตอนการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟ

มาตรฐาน พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ในช่วงแคบระหว่าง 0.0002–0.005 mg/mL เท่านั้น และเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น ECD detector จะอิ่มตัว (saturated) ทำให้กราฟมีลักษณะโค้งที่ความเข้มข้นสูง จึงไม่สามารถใช้งานในช่วงการวิเคราะห์ที่ยาวครอบคลุมค่ากำหนดได้ ดังแสดงในภาพที่ 9

ด้วยคุณสมบัติด้านความไว (sensitivity) ที่ดี จึงนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจแบบคัดกรอง (screening method) ที่ระดับต่ำมากได้และหากตรวจพบเบื้องต้นจึงทำการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค single point calibration หรือใช้เครื่อง GC-MS/MS ในลำดับต่อไป



ภาพที่ 9 Chromatogram ที่ได้จากเครื่อง ECD ของ method blank (a) fipronil และ metabolites (b) และกราฟมาตรฐาน

ในขั้นตอนการพัฒนาและการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์นั้น ดำเนินการได้ตรงตามวัตถุประสงค์ กล่าวคือ parameters ต่างๆ ที่ทำการทดสอบมีคุณลักษณะและคุณสมบัติอยู่ในเกณฑ์ยอมรับตาม pesticide analytical guideline ของสหภาพยุโรป SANTE/12682/2019 สามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในห้องปฏิบัติการได้ ทั้งนี้หากห้องปฏิบัติการมีประสบการณ์ด้านการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS ในการวิเคราะห์ผักและผลไม้แล้ว สามารถนำวิธีนี้ไปประยุกต์ใช้ได้โดยปรับเพียงขั้นตอนการเลือก dispersive SPE ที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอนที่สำคัญและมีความท้าทายที่สุด คือ การหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องมือวิเคราะห์ และการตรวจวัดที่ระดับต่ำมาก 2–5 ส่วนในพันล้านส่วน (ppb)

ทั้งนี้เครื่องมือที่เลือกใช้ คือ GC-MS/MS จะตอบสนอง detection limit ได้ เนื่องจากเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูง จากการวิเคราะห์แบบ SRM โดยการเลือก mass transition จำเพาะของสารและเครื่องมือจะตรวจจับเฉพาะสารสนใจโดยไม่มี interferences อื่นปนเปื้อนในระบบ วิธีนี้ช่วยเพิ่ม sensitivity ให้สามารถตรวจที่ระดับต่ำมากได้ การใช้ mass ของ 2 products ion จากเครื่อง GC-MS/MS ชนิด triple quadrupole ให้ degree of selectivity ซึ่งใช้ในการประเมินความเชื่อมั่นในการระบุชนิดสารสูงตรงตามมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับในระดับสากลโดยไม่ต้องมีการยืนยันเพิ่มเติม

อุปสรรคที่พบระหว่างการทำเนงาน คือ ประสิทธิภาพที่ไม่สามารถควบคุมได้ในระหว่างการเก็บตัวอย่าง

ในเขตพื้นที่การระบาดของโรคติดต่ออุบัติใหม่ (COVID-19) อย่างรุนแรงในช่วงธันวาคม 2563 ถึง เมษายน 2564 ทำให้ภาครัฐต้องออกมาตรการห้ามเข้าถึงพื้นที่เป้าหมายของการเก็บตัวอย่าง ได้แก่ กรุงเทพมหานครและปริมณฑล และเพื่อความปลอดภัยของคณะผู้วิจัยจึงต้องมีการปรับแผนในการเก็บตัวอย่างออกไป 1-2 เดือนเพื่อรอจนกว่าสถานการณ์จะคลี่คลายลง แต่เนื่องจากพื้นที่เป้าหมายเป็นพื้นที่ใกล้เคียงกับห้องปฏิบัติการในรัศมีไม่เกิน 100 กิโลเมตร หลังจากมีการผ่อนคลายมาตรการลง จึงจะเข้าเก็บตัวอย่างในพื้นที่เป้าหมายได้อย่างรวดเร็วและดำเนินการตามแผนที่วางไว้จนสำเร็จ ผลการสำรวจเบื้องต้นไม่พบการตกค้างของสารฟิโพรนิลและเมตาโบไลต์ในทุกตัวอย่าง ทำให้ทราบสถานการณ์เบื้องต้นของการตกค้างของสารฟิโพรนิลในอาหารในเขตพื้นที่เป้าหมาย ซึ่งบ่งชี้ว่า ณ บริเวณที่สำรวจตัวอย่างไม่มีการตกค้างของสารสนใจในระดับที่จะก่อให้เกิดอันตราย และสถานที่ผลิตไม่มีการใช้งานสารฟิโพรนิล ผิดวัตถุประสงค์ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ ซึ่งผลการวิเคราะห์นี้สะท้อนความปลอดภัยของอาหารเฉพาะส่วนที่บริโภคได้เท่านั้น หากต้องการศึกษาเพิ่มเติมการใช้สารในการกำจัดไรในฟาร์มไก่หรือไม่ อาจมีการตรวจเพิ่มเติมการวิเคราะห์ในส่วนเปลือกไข่ได้ด้วย ข้อมูลดังกล่าวนี้สามารถใช้สร้างความมั่นใจแก่ผู้บริโภคไข่และผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยต่อการบริโภค อาจมีการขยายผลเพื่อจัดทำโครงการสำรวจติดตามในวงกว้างครอบคลุมทั่วประเทศต่อไปได้

สำหรับการควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์ เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นต้องทำการควบคุมคุณภาพ เช่น การวิเคราะห์ method blank/reagent blank, spiked sample และ duplicate sample ทุกชุดของการสกัด (batch) หรืออย่างน้อย 10% ของตัวอย่าง และเนื่องจาก MS detector เป็นเครื่องมือตรวจวัดที่ sensitivity สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ตามระยะเวลาการใช้งาน จึงต้องมีการตรวจสอบ instrument drift ด้วยเสมอ โดย response ใน analytical batch เดียวกัน จะต้องแตกต่างกันไม่เกิน 30% และหากพบสารที่สงสัยว่าเป็นสารสนใจจะต้องทำการตรวจยืนยันด้วยทุกครั้งการยืนยันชนิดของสารที่ตรวจพบต้องยืนยันผลด้วย ion intensities ratio โดยค่า ion intensities

ratio ของสารที่วิเคราะห์แต่ละตัวในตัวอย่าง และ ion intensities ratio เฉลี่ยของสารมาตรฐานนั้น จะต้องแตกต่างกันไม่เกิน 30% หรือใช้วิธีทางเลือกอื่น (alternative method) เช่น GC-ECD หรือ LC-MS/MS เป็นต้น และยืนยันปริมาณที่ตรวจพบ โดยทำการทดสอบตัวอย่างใหม่ (retest) แบบ duplicate test รายงานโดยใช้ค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำ และเกณฑ์ยอมรับของ %RPD ต้องไม่เกิน 25% เป็นการยืนยันว่ากระบวนการวิเคราะห์ทั้งหมดมีความถูกต้องเหมาะสมและสอดคล้องกับเอกสารอ้างอิงและมาตรฐานห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ ISO/IEC 17025:2017

จากปัญหาตั้งต้นที่สหภาพยุโรปพบไข่จำนวนมากถูกปนเปื้อนด้วยสารฟิโพรนิล ซึ่งเป็นสารเคมีที่ห้ามใช้ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ที่ใช้เป็นอาหาร ทำให้ต้องสั่งปิดฟาร์มเลี้ยงไก่จำนวนมากเพื่อดำเนินการตรวจสอบ และต้องระงับการขายและเรียกคืนไข่เพื่อนำไปทำลายทิ้ง เรื่องดังกล่าวบ่งชี้ว่าแม้กลุ่มประเทศพัฒนาแล้วและความเข้มแข็งของการตรวจสอบสินค้าอาหารจากต่างประเทศที่จะนำเข้ามาจำหน่ายภายในประเทศสมาชิก แต่กลับมีมาตรการที่หละหลวมต่อการตรวจสอบภาคการผลิตภายในสหภาพยุโรปเอง ในส่วนของประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศผู้ผลิตอาหารรายใหญ่ของโลกและมีการส่งออกสินค้าเกษตรเป็นมูลค่ามหาศาล จำเป็นต้องมีหน่วยงานที่ดูแลด้านความปลอดภัยของอาหาร ดำเนินการตรวจสอบสินค้าที่มีวงจำหน่ายอย่างสม่ำเสมอและต่อเนื่องอย่างเป็นระบบ ภาครัฐต้องให้การสนับสนุนทรัพยากรที่เพียงพอต่อการสำรวจติดตาม ซึ่งจะเป็นประโยชน์โดยตรงต่อประชาชนต่อการดำรงไว้ซึ่งสุขภาพที่ดี ลดค่าใช้จ่ายทางการแพทย์และการสาธารณสุข ในส่วนของภาคการผลิตนอกจากจะต้องมีการให้ความรู้ด้านการใช้สารเคมีอย่างถูกต้องในภาคเกษตรกรรมแล้ว ยังต้องมีการกำกับดูแลอย่างเข้มงวดจากหน่วยงานต้นน้ำในขั้นตอนการผลิต ตรวจสอบความปลอดภัยสินค้าหน้าฟาร์ม ก่อนวางจำหน่าย ผลการสำรวจเบื้องต้นของโครงการแสดงให้เห็นว่าไข่และผลิตภัณฑ์จากไข่ที่จำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑลยังคงมีความปลอดภัย และเพื่อเป็นการรักษาระดับคุณภาพสินค้าที่จำหน่ายใน

ท้องตลาด จำเป็นต้องมีการวิเคราะห์สารตกค้างทั้งจากฟาร์มผู้ผลิตก่อนนำออกจำหน่าย ผู้ผลิตรายใหญ่ที่มีห้องปฏิบัติการสามารถนำวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อควบคุมคุณภาพสินค้าของตนได้ และหน่วยงานกำกับดูแลด้านกฎหมายต้องมีแผนการเก็บตัวอย่างอย่างสม่ำเสมอและต้องได้รับการสนับสนุนทรัพยากรจากหน่วยงานที่เกี่ยวข้องอย่างต่อเนื่องด้วย

สรุป

วิธีทดสอบที่ได้จากการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์มีคุณสมบัติเหมาะสม สอดคล้องกับมาตรฐานและกฎหมายของประเทศไทย ได้แก่ ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 387 พ.ศ. 2560 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง และมาตรฐานระดับนานาชาติตามโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius) สามารถใช้เป็นวิธีการทดสอบที่ให้บริการของหน่วยงาน และเพื่อใช้ในการสำรวจติดตามเพื่อประเมินสถานการณ์การตกค้างของสารพิษได้ ผลการสำรวจสินค้าไข่และผลิตภัณฑ์จากไข่ที่จำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ไม่พบสาร fipronil และเมตาโบไลต์ตกค้างในทุกตัวอย่าง สามารถสร้างความมั่นใจแก่ผู้บริโภคได้ระดับหนึ่ง รวมถึงการเฝ้าระวังความปลอดภัยจำเป็นต้องดำเนินการอย่างเป็นระบบและต่อเนื่อง เพื่อสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ผู้บริโภคและประเทศคู่ค้า

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ภายใต้โครงการพัฒนาขีดความสามารถและเครือข่ายห้องปฏิบัติการด้านอาหารเพื่อความมั่นคงด้านสุขภาพ

เอกสารอ้างอิง

1. Lecoq M, Balança G. Field trials of fipronil for control of *Rhammatocerus schistocercoides* (Rehn, 1906) hopper bands in Brazil. *Crop Protect* 1998; 17(2): 105-10.

2. Kaur R, Mandal K, Kumar R, Singh B. Analytical method for determination of fipronil and its metabolites in vegetables using the QuEChERS method and gas chromatography/mass spectrometry. *J AOAC Int* 2015; 98(2): 464-71.
3. Jackson D, Cornell CB, Luukinen B, Buhl K, Stone D. Fipronil technical fact sheet; National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. [online]. 2009; [cited 2021 Oct 2]; [13 screens]. Available from: URL: <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/fiptech.html>.
4. World Health Organization. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification. [online]. 2004; [cited 2021 Oct 2]; [60 screens]. Available from: URL: https://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_rev_3.pdf.
5. Li X, Ma W, Li H, Zhang Q, Ma Z. Determination of residual fipronil and its metabolites in food samples: a review. *Trends Food Sci Tech* 2020; 97(1): 185-95.
6. Gunasekara AS, Truong T, Goh KS, Spurlock F, Tjeerdema RS. Environmental fate and toxicology of fipronil. *J Pestic Sci* 2007; 32(3): 189-99.
7. Brennan AA, Harwood AD, You J, Landrum PF, Lydy MJ. Degradation of fipronil in anaerobic sediments and the effect on porewater concentrations. *Chemosphere* 2009; 77(1): 22-8.
8. Qu H, Ma RX, Liu DH, Jing X, Wang F, Zhou ZQ, et al. The toxicity, bioaccumulation, elimination, conversion of the enantiomers of fipronil in *Anodonta woodiana*. *J Hazard Mater* 2016; 312: 169-74.
9. Charalampous AC, Liapis KS, Bempelou ED. Fipronil in eggs. Is LC-MS/MS the only option? A comparison study of LC-MS/MS and GC-ECD for the analysis of fipronil. *J Chromatogr B* 2019; 1129(2019): 121785. (6 pages).

10. Shen W, Liu H, Zhang R, Yu K, Cai L, Liu Y, et al. Determination of fipronil and its metabolites in eggs and egg products with gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry. *Chin J Chrom* 2017; 35(12): 1224-8.
11. Wittayanan W, Srikote R, Chaimongkol T. Determination of organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl as POPs residues in freshwater animals in Thailand during 2017-2018. *Science & Technology Asia* 2019; 24(3): 27-38.
12. Wittayanan W, Chaimongkol T. Determination of pesticides residue in cannabis, cannabis extract and cannabis oil by gas chromatography tandem mass spectrometry technique. *Pharm Sci Asia* 2021; 48(4): 354-66.
13. Anagnostopoulos C, Ampadogiannis G, Bempelou E, Liapis K, Kastellanou E. The 2017 fipronil egg contamination incident: the case of Greece. *J Food Saf* 2019; 40(1): e12727. (10 pages).
14. Reich H, Triacchini GA. Occurrence of residues of fipronil and other acaricides in chicken eggs and poultry muscle/fat. *EFSA J* 2018; 16(5): e05164. (30 pages).
15. Commission Regulation (EU) No 1127/2014 of 20 October 2014 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for amitrole, dinocap, fipronil, flufenacet, pendimethalin, propyzamide, and pyridate in or on certain products. *OJ L* 305, 24.10.2014, pp. 47-99.
16. Codex Alimentarius International Food Standard. Codex pesticides residues in food online database. [online]. 2021; [cited 2021 Oct 2]; [2 screens]. Available from: URL: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/en>.
17. Ministry of Public Health Notification. No. 387 B.E. 2560. RE: Food containing pesticide residues (Pesticide residues in food). *Government Gazette* 2017; 138(228ng): 8-33.
18. Department of Medical Science. Regulations of the Department of Medical Sciences on analysis and service rate. *Government Gazette* 2020; 137(98ng): 1-18.
19. Eurachem. EURACHEM/CITAC Guide CG 4. Quantifying uncertainty in analytical measurement, 3rd ed [online]. 2012; [cited 2021 Oct 2]; Available from: URL: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf.
20. Ferrer C, Lozano A, Agüera A, Girón AJ, Fernández-Alba AR. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *J Chromatogr A* 2011; 1218(42): 7634-9.
21. Thai Agricultural Standard. Methods of sampling for the determination of pesticide residues TAS 9025-2008. Chatuchak, Bangkok: National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards, Ministry of Agriculture and Cooperatives; 2008.
22. Gonzalez-Curbelo MA, Socas-Rodriguez B, Herrera-Herrera AV, Gonzalez-Salamo J, Hernandez-Borges J, Rodriguez-Delgado MA. Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC Trends Anal Chem* 2015; 71: 169-85.

Method Development and Validation for the Determination of Fipronil and Its Metabolite Residues in Eggs and Products

Weerawut Wittayanon and Thoranit Chaimongkol

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

ABSTRACT Fipronil is an insecticide whose degradation products are highly neurotoxic for humans. In Thailand, fipronil is approved to use for plant protection but not as a veterinary drug. It was found that, egg contamination by fipronil in Europe in 2017 has generated concerns in Thai consumers. Thus, an analytical method is required for the investigation of the fipronil residues in commercialized egg and egg products in Thailand. Fipronil was extracted by a developed procedure based on EN 15662:2018 QuEChERS, detected by selected reaction monitoring techniques in GC-MS/MS and quantified by matrix-matched calibration curve. The validation of the method to detect fipronil and two metabolites, fipronil-desulfinyl, and fipronil-sulfone, in chicken and duck eggs showed that the LOD and the LOQ were 0.002 and 0.005 mg/kg, respectively. Satisfactory recoveries were obtained in the range of 92.9–111.6% in spiked samples at 0.005, 0.05 and 0.1 mg/kg with RSD lower than 8.6%. The relative standard uncertainty value was less than 20% and the method working ranges were between 0.005–0.5 mg/kg which were acceptable. This method was sensitive, precise, reliable, and suitable for use in the laboratory. The validated method was further applied for the analysis of 66 egg and egg product samples collected from Bangkok Metropolitan Region in 2021. The result showed no detectable fipronil residues in any samples. Overall results indicated that the described method would be applied for detecting the fipronil and its metabolite residues in the future.

Keywords: Fipronil, Eggs, GC-MS/MS, Method development and validation

เว็บไซต์และแอปพลิเคชันการทดสอบความชำนาญ ห้องปฏิบัติการของสำนักยาและวัตถุเสพติด

ศิริพร เหล่ามานะเจริญ มาศวลัย ลิขิตธนเศรษฐ์ และ อังคณา กริชพิทักษ์เงิน
สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ สำนักยาและวัตถุเสพติด เป็นผู้จัดการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการด้านยาและยาเสพติด มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบ และเป็นหลักฐานแสดงถึงความน่าเชื่อถือผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการ การดำเนินงานในระยะแรกติดต่อกับประสานงานกับสมาชิกผ่านหนังสือราชการส่งทางไปรษณีย์และโทรสาร พบปัญหาการสูญหายของเอกสาร การเสียค่าใช้จ่ายจัดทำและจัดส่งเอกสารจำนวนมาก และความยุ่งยากในการบริหารจัดการและจัดเก็บเอกสารในรูปแบบกระดาษ ในปี พ.ศ. 2560 และ 2561 ได้พัฒนาการดำเนินงานโดยใช้เว็บไซต์และแอปพลิเคชันตามลำดับ จากข้อมูลการดำเนินงานจัดการทดสอบระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง 2563 พบว่าค่าใช้จ่ายในการจัดทำเอกสารและค่าขนส่ง ปริมาณการใช้กระดาษและระยะเวลาที่ใช้ในการจัดการเอกสาร เปรียบเทียบระหว่างการใช้และไม่ใช้เว็บไซต์ในการดำเนินงาน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้ paired sample t-test ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความพึงพอใจของสมาชิกต่อเว็บไซต์ในแต่ละปี (พ.ศ. 2560-2563) พบว่าไม่แตกต่างกัน สมาชิกมีความพึงพอใจมากที่สุด เรื่องการมีระบบความปลอดภัยโดยการใช้รหัสผ่าน เว็บไซต์และแอปพลิเคชันการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการสำนักยาและวัตถุเสพติด ช่วยให้การดำเนินงานมีความสะดวก รวดเร็ว และลดค่าใช้จ่ายในการดำเนินงาน นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมการดำเนินงานที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และมีความปลอดภัยในสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ด้วยการลดการสัมผัส สามารถสร้างภาพลักษณ์ที่ดีในการดำเนินงานและมีความทันสมัยด้วยการใช้เทคโนโลยีสารสนเทศสอดคล้องกับนโยบายไทยแลนด์ 4.0

คำสำคัญ : การทดสอบความชำนาญ, เว็บไซต์, แอปพลิเคชัน, สำนักยาและวัตถุเสพติด

Corresponding author E-mail: siriphorn.l@dmsc.mail.co.th

Received: 16 August 2021

Revised: 6 February 2022

Accepted: 28 February 2022

บทนำ

ในอดีต ประเทศไทยไม่มีหน่วยงานที่ให้บริการทดสอบความชำนาญด้านยาและยาเสพติด ห้องปฏิบัติการจึงต้องเข้าร่วมกิจกรรมจากต่างประเทศที่มีค่าใช้จ่ายสูงและเป็นอุปสรรคสำหรับห้องปฏิบัติการจากภาครัฐหรือหน่วยงานขนาดเล็กที่ต้องการประเมินความสามารถและเพื่อประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการ สำนักงานและวัตถุเสพติดมีการติดตามกฎหมาย คือ เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงระดับชาติ มีหน้าที่ส่งเสริมและสนับสนุนกิจกรรมเพื่อพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ยา ห้องปฏิบัติการตรวจสารเสพติดในปัสสาวะและสถานตรวจพิสูจน์ยาเสพติดภายในประเทศ เห็นถึงความสำคัญเรื่องนี้ จึงริเริ่มเป็นผู้จัดบริการทดสอบความชำนาญในแผนงานด้านยาและยาเสพติดตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 สาเหตุที่การทดสอบความชำนาญมีความสำคัญ เนื่องจากห้องปฏิบัติการที่จัดทำระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 และต้องขอรับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการ ต้องเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ (Proficiency testing: PT)⁽¹⁾ เพื่อเป็นการประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบ และเป็นหลักฐานแสดงถึงความน่าเชื่อถืออย่างเป็นรูปธรรมสามารถสะท้อนได้ว่าห้องปฏิบัติการนั้นมีการพัฒนาปรับปรุงการปฏิบัติงานต่างๆ อย่างต่อเนื่อง

ปัจจุบันมีสมาชิกทั้งภายในและภายนอกประเทศทั้งภาครัฐและเอกชนจำนวนประมาณ 1,300 แห่ง เปิดให้บริการทดสอบความชำนาญ จำนวน 4 แผนงาน คือ ด้านยา ด้านสารเสพติดในปัสสาวะ ด้านยาเสพติดให้โทษในของกลาง และด้านวัตถุออกฤทธิ์ในของกลาง โดยด้านยามีหน่วยงานในประเทศภูมิภาคอาเซียนเข้าร่วมกิจกรรมด้วย ในแต่ละปีเปิดให้บริการทดสอบความชำนาญ 6-10 โปรแกรม ซึ่งได้รับการรับรองอย่างต่อเนื่องและขยายขอบข่ายการรับรองการเป็นผู้จัดบริการทดสอบความชำนาญตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17043:2010⁽²⁾ เมื่อมีการทบทวนระบบบริหารคุณภาพ (management review) พบว่างานด้านระบบคุณภาพมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง และงานด้านบริการยังมีโอกาสพัฒนาได้ การบริหารจัดการงานบริการทดสอบความชำนาญ มีกระบวนการที่ต้องสื่อสารเพื่อให้ข้อมูลกับ

สมาชิก โดยสามารถดำเนินการผ่านสื่อต่างๆ ที่มีความเหมาะสม เช่น การสื่อสารในรูปแบบอิเล็กทรอนิกส์⁽³⁾ จากการที่สำนักงานและวัตถุเสพติดเป็นสมาชิกกับผู้ให้บริการทดสอบความชำนาญอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นหน่วยงานจากต่างประเทศ เช่น European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care (EDQM)⁽⁴⁾ และ United Nation Office on Drugs and Crime (UNODC)⁽⁵⁾ พบว่ามีการใช้เทคโนโลยีสารสนเทศในการสื่อสารกับสมาชิกและการเข้าถึงข้อมูลผ่านระบบเว็บไซต์ (website) ในขั้นตอนการประชาสัมพันธ์โปรแกรมการทดสอบ ส่งผลการทดสอบ และการดาวน์โหลด (download) รายงานผลการทดสอบ ในปี พ.ศ. 2559 เริ่มพัฒนาระบบบริการทดสอบความชำนาญของสำนักงานและวัตถุเสพติด จากการดำเนินงานและสื่อสารกับสมาชิกในรูปแบบกระดาษเอกสารผ่านทางขนส่งไปรษณีย์และทางโทรสาร เปลี่ยนเป็นรูปแบบเว็บไซต์เต็มรูปแบบ ตั้งแต่การรับสมัครจนถึงดาวน์โหลดใบประกาศนียบัตรเพื่อใช้งานกับคอมพิวเตอร์แบบตั้งโต๊ะและโน้ตบุ๊กคอมพิวเตอร์ (notebook computer) รวมถึงพัฒนาแอปพลิเคชัน (application) ควบคู่กันไป สามารถใช้งานบนโทรศัพท์เคลื่อนที่แบบสมาร์ทโฟน (smart phone) และแท็บเล็ต (tablet) โดยเปิดใช้เว็บไซต์และแอปพลิเคชันอย่างเป็นทางการในปี พ.ศ. 2560 และ 2561 ตามลำดับ และมีการปรับปรุงพัฒนาอย่างต่อเนื่องทุกปี (พ.ศ. 2560-2563) เพื่อเป็นการเข้าถึงผู้รับบริการและสามารถเลือกใช้งานตามความสะดวก โดยข้อมูลสามารถเชื่อมโยงและจัดเก็บที่เดียวกัน ซึ่งปัจจุบันควรมีรูปแบบการให้บริการที่สนับสนุนผู้ใช้งานให้สามารถทำงานได้ทุกที่ทุกเวลา เป็นการตอบสนองความต้องการและสร้างความพึงพอใจให้ผู้รับบริการตามนโยบายไทยแลนด์ 4.0

วัตถุประสงค์และวิธีการ

การจัดทำเว็บไซต์และแอปพลิเคชันเพื่อเป็นตัวกลางในการสื่อสารและดำเนินงานบริการทดสอบความชำนาญของสำนักงานและวัตถุเสพติด กลุ่มผู้ใช้งานหลักคือ สมาชิกห้องปฏิบัติการทดสอบความชำนาญ ซึ่งเป็น

กลุ่มเฉพาะของแต่ละแผนงาน รูปแบบการเข้าถึงกระบวนการทดสอบความชำนาญ เป็นการแยกช่องทางการเข้าถึงโดยเลือกผ่านเมนู และกำหนดสีที่แตกต่างกันในแต่ละแผนงาน นอกจากนี้มีเมนูหรือพื้นที่ประชาสัมพันธ์และแจ้ง ข่าวสารสมาชิกทราบ โดยมีองค์ประกอบของเนื้อหาและคุณลักษณะเป็นไปตามมาตรฐานเว็บไซต์ภาครัฐ (Government Website Standard)^(6, 7) มีระบบการดำเนินงานจัดบริการทดสอบความชำนาญที่สามารถติดต่อสื่อสารและแจ้งสมาชิกทราบรายละเอียดในแต่ละขั้นตอน เช่น การรับสมัครเข้าร่วมทดสอบ การส่งตัวอย่างทดสอบ การส่งผลทดสอบ การส่งรายงานผลการทดสอบ และการรักษาความลับของสมาชิกให้เป็นไปตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17043:2010⁽²⁾

การออกแบบและพัฒนาเว็บไซต์และแอปพลิเคชันดำเนินการโดยรวบรวมข้อมูลต่างๆ จากขั้นตอนแรกประเมินและวางระบบ เพื่อให้ได้โครงสร้างข้อมูล นำไปสร้างแผนผังเว็บไซต์และแอปพลิเคชัน รูปแบบของเมนูระบบการเข้าถึงข้อมูลส่วนบุคคล ขั้นตอนการดำเนินงานแบบฟอร์มอิเล็กทรอนิกส์ การจัดรูปแบบและองค์ประกอบของภาพและกราฟฟิคที่เหมาะสม ระบบจัดการเว็บไซต์หรือระบบหลังบ้าน (back-office) ที่ใช้บริหารจัดการข้อมูล และระบบการตั้งสิทธิการเข้าถึงเพื่อบริหารจัดการระบบหลังบ้าน โดยมอบหมายงานให้ผู้รับจ้างดำเนินการจัดทำเว็บไซต์และแอปพลิเคชันตามระบบที่วางไว้ ดำเนินการตรวจสอบ แก้ไข และทดลองระบบเพื่อให้มั่นใจว่าสามารถใช้งานได้

การประชาสัมพันธ์เผยแพร่เว็บไซต์และแอปพลิเคชันและเปิดการใช้งานในการประชุมสัมมนาสมาชิกประจำปี โดยประชาสัมพันธ์ให้สมาชิกทราบผ่านทางหนังสือราชการและโปรชนีย์อิเล็กทรอนิกส์

การสำรวจความพึงพอใจการให้บริการทดสอบความชำนาญ ดำเนินการผ่านทางเว็บไซต์และแอปพลิเคชันเป็นประจำทุกปี จากห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ที่สมัครเป็นสมาชิกเข้าใช้งานเว็บไซต์และแอปพลิเคชัน และเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ โดยสำรวจความพึงพอใจทั้งความเหมาะสมของรูปแบบและความสะดวกในการใช้งาน ประเมินผลโดยใช้สถิติไคสแควร์ (χ^2 -test) พิจารณาความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$

การประเมินความคุ้มค่าของการใช้เว็บไซต์และแอปพลิเคชัน ดำเนินการโดยการรวมข้อมูลการทดสอบความชำนาญระหว่างปี พ.ศ. 2560-2563 ในด้านค่าใช้จ่ายในการจัดทำเอกสารและการขนส่งทางไปรษณีย์, ปริมาณการใช้กระดาษ และระยะเวลาที่ใช้ในการจัดการเอกสารสำหรับจัดส่งไปรษณีย์ โดยเปรียบเทียบระหว่างการดำเนินงานแบบใช้และไม่ใช้เว็บไซต์ ประเมินความคุ้มค่าของการใช้เว็บไซต์และแอปพลิเคชัน คำนวณค่าเฉลี่ยต่อปีของค่าจัดทำเอกสารและค่าขนส่งไปรษณีย์ ปริมาณการใช้กระดาษ และระยะเวลาที่ใช้ในการจัดการเอกสารสำหรับส่งไปรษณีย์ โดยใช้สถิติ paired sample t-test พิจารณาความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$

การบำรุงรักษา ปรับปรุง และพัฒนา ดำเนินการโดยมีการรวบรวมปัญหาที่พบในปีที่ผ่านมา ทั้งในส่วน of เนื้อหา โครงสร้างและการออกแบบ เพื่อปรับปรุงความสะดวกในการใช้งานและผู้ใช้งานมีความรู้สึกถึงการเปลี่ยนแปลงที่ทันสมัยอยู่เสมอ ทบทวนและปรับเปลี่ยนระบบการสำรองข้อมูล (backup data) ที่เหมาะสม รวมทั้งความถี่ในการสำรอง และปรับปรุงข้อมูลให้เป็นปัจจุบัน

ผล

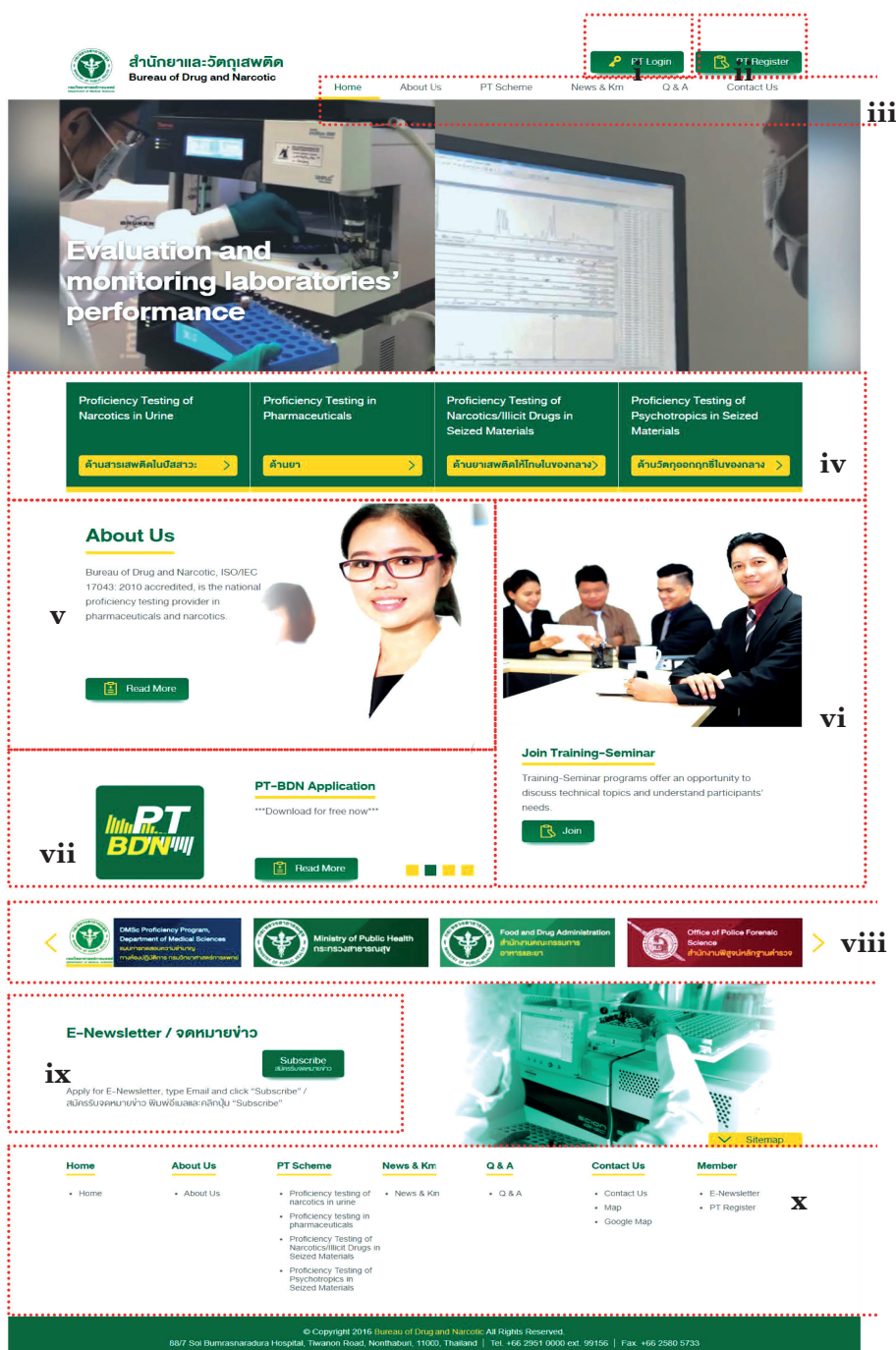
เว็บไซต์และแอปพลิเคชันใช้ในการสื่อสารและดำเนินงานบริการจัดการทดสอบความชำนาญ โดยมีกลุ่มผู้ใช้งานเป็นห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ของ 4 แผนงาน คือ ด้านยา ด้านสารเสพติดในปัสสาวะ ด้านยาเสพติดให้โทษในของกลาง และด้านวัตถุออกฤทธิ์ในของกลาง โดยมีช่องทางการเข้าถึงผ่านเมนูและกำหนดสีที่แตกต่างกันในแต่ละแผนงาน คือ ด้านยาเป็นสีเขียว ด้านปัสสาวะเป็นสีเหลือง ด้านยาเสพติดให้โทษในของกลางเป็นสีแดง และด้านวัตถุออกฤทธิ์ในของกลางเป็นสีน้ำเงิน มีการป้องกันรักษาความลับโดยใช้รหัสผ่าน (password) ก่อนเข้าสู่ระบบ นอกจากนี้มีพื้นที่ประชาสัมพันธ์และแจ้ง ข่าวสารให้สมาชิกทราบ

การแสดงผลเป็น 2 ภาษา คือ ภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ในลักษณะรูปแบบข้อความภาษาอังกฤษกำกับด้วยภาษาไทย โดยชื่อเมนูใช้เครื่องหมายทับ (/) คั่นระหว่างภาษา ส่วนล่างของเว็บไซต์ทุก ๆ หน้าแสดงข้อมูลได้แก่ ชื่อหน่วยงานและที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์หมายเลขโทรสาร คำสงวนลิขสิทธิ์ (copyright) และหน้าแรกของ

เว็บไซต์ (Home) ดังแสดงในภาพที่ 1 ประกอบด้วย

- i) ช่องทางสมัครสมาชิกเว็บไซต์ (PT register)
- ii) ช่องทางเข้าสู่ระบบเว็บไซต์ (PT login)
- iii) เมนูหลัก 6 เมนู ได้แก่ Home, About us, PT scheme, News&KM, Q&A และ Contact us
- iv) ทางลัดเข้าสู่เมนูแผนการทดสอบ
- v) ทางลัดเข้าสู่เมนูเกี่ยวกับหน่วยงาน (About us)

- vi) ช่องทางเข้าสู่การสมัครเข้าร่วมประชุมสัมมนาสมาชิก
- vii) พื้นที่ประชาสัมพันธ์ข้อมูลและข่าวสาร
- viii) เว็บลิงก์ (web link)
- ix) ช่องทางการสมัครรับจดหมายข่าว (E-Newsletter)
- x) ผังเว็บไซต์ (Site map)



ภาพที่ 1 เว็บไซต์การทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการ สำนักงานและวัตถุเสพติด

เว็บไซต์จัดชื่อโดเมน (Domain name) ในหมวด go.th และตั้งชื่อโดเมน <https://bdn.go.th/pt> ที่สื่อความหมายชื่อของหน่วยงาน โดยใช้อักษรย่อชื่อภาษาอังกฤษของสำนักยาและวัตถุเสพติด (Bureau of Drug and Narcotic: BDN) และงานบริการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing: PT) ซึ่งเป็นคำเฉพาะที่เข้าใจและคุ้นเคยสำหรับกลุ่มผู้ใช้งานง่ายต่อการจดจำ

เมนู “About us/เกี่ยวกับเรา” มีเมนูย่อยประกอบด้วย Our history/ประวัติของเรา แสดงข้อมูลความเป็นมาจุดเริ่มต้นของการจัดงานบริการทดสอบความชำนาญของสำนักยาและวัตถุเสพติด, Quality standards/มาตรฐานคุณภาพ แสดงข้อมูลมาตรฐานคุณภาพที่ใช้ในการดำเนินงานบริการทดสอบความชำนาญของสำนักยาและวัตถุเสพติด และการได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2010, Our team/คณะทำงาน แนะนำผู้ดำเนินงานบริการทดสอบความชำนาญ

เมนู “News & KM/ข่าวสารและความรู้” มีเมนูย่อยประกอบด้วย News/ข่าวสาร แสดงข้อมูลข่าวสารประชาสัมพันธ์ทั่วไป กิจกรรมของหน่วยงาน และแจ้งช่องทางการร้องเรียนและอุทธรณ์โดยสามารถกำหนดให้แสดงที่หน้าแรกของเว็บไซต์ได้ เพื่อให้เข้าถึงได้ง่าย KM/คลังความรู้ แสดงบทความทั่วไปทางวิชาการ

เมนู “Q&A/ถาม-ตอบ” แสดงคำถามและคำตอบที่มีผู้นิยมสอบถาม โดยทำในรูปแบบช่องคำตอบและแสดงคำตอบเมื่อคลิกที่คำถามนั้น

เมนู “Contact us/ติดต่อเรา” แสดงช่องทางที่ผู้ใช้บริการสามารถส่งข้อความสอบถามหรือข้อสงสัยมายังผู้จัดงานบริการทดสอบความชำนาญ สำนักยาและวัตถุเสพติด และได้รับคำตอบผ่านทางไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ และแสดงข้อมูลที่อยู่ ช่องทางติดต่อผู้จัดงานบริการทดสอบความชำนาญผ่านทางโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ นอกจากนี้ยังแสดงตำแหน่งที่ตั้งของสำนักยาและวัตถุเสพติดในรูปแบบแผนที่ภาพและแผนที่อิเล็กทรอนิกส์ผ่าน Google Map

เว็บลิงก์เชื่อมต่อหน่วยงานที่เกี่ยวข้องและเว็บไซต์อื่นที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบความชำนาญ เช่น เว็บไซต์แผนการทดสอบความชำนาญกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เว็บไซต์กระทรวงสาธารณสุข เว็บไซต์สำนักงานคณะ

กรรมการอาหารและยา เว็บไซต์สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ เว็บไซต์สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ เว็บไซต์กรมราชทัณฑ์ เว็บไซต์กรมคุมประพฤติ เว็บไซต์สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ เว็บไซต์สำนักงานว่าด้วยยาเสพติดและอาชญากรรมแห่งสหประชาชาติ เว็บไซต์สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด และเว็บไซต์กรมวิทยาศาสตร์บริการ

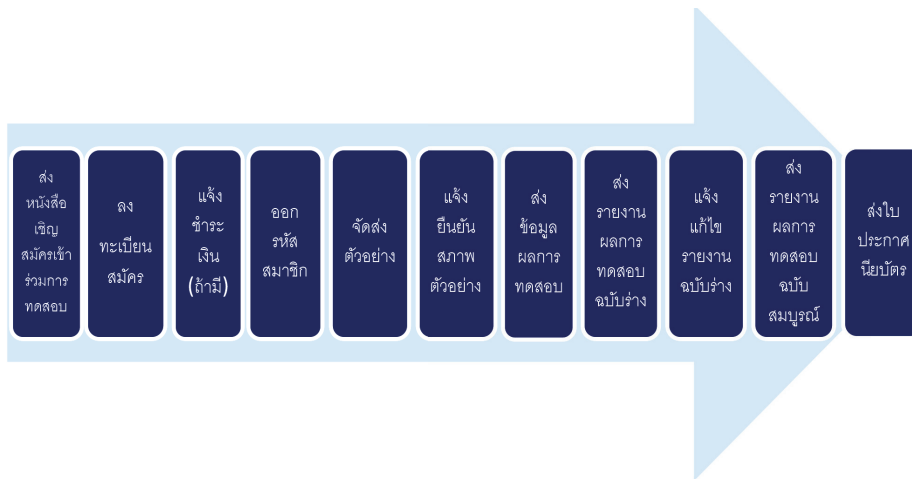
ผังเว็บไซต์เป็นส่วนที่แสดงแผนผังเว็บไซต์ทั้งหมดเพื่ออธิบายโครงสร้างทั้งหมดของเว็บไซต์ จัดทำให้ผู้ใช้บริการสามารถเข้าถึงข้อมูลที่ต้องการได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

การรับฟังความคิดเห็น ข้อเสนอแนะต่องานบริการทดสอบความชำนาญ และการใช้บริการผ่านเว็บไซต์ รวมถึงความต้องการจากผู้ให้บริการ ทำในรูปแบบสำรวจออนไลน์ (online survey) และประชาสัมพันธ์การสำรวจในเมนู News & KM/ข่าวสารและความรู้ เช่น แบบสำรวจความพึงพอใจ

ระบบการให้บริการ ออกแบบให้มีการลงทะเบียนแบบออนไลน์ (register online) เพื่อสมัครเป็นสมาชิกก่อนการใช้งานเว็บไซต์โดยการกรอกข้อมูลในแบบฟอร์มอิเล็กทรอนิกส์ ข้อมูลที่จำเป็นของสมาชิกสำหรับการลงทะเบียน เช่น ชื่อหน่วยงาน ประเภทของหน่วยงาน ที่อยู่ชื่อผู้ประสานงาน และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ เพื่อใช้ในการติดต่อประสานงาน มีการใช้ CAPTCHA (Completely Automated Public Turing test to tell Computers and Humans Apart) ซึ่งเป็นการรักษาความปลอดภัยในการสมัครใช้บริการเว็บไซต์ และการลงทะเบียนต้องมีการยอมรับในประกาศนโยบายรักษาข้อมูลส่วนบุคคลก่อน เมื่อมีการลงทะเบียนแล้วจะมีการตรวจสอบข้อมูลสมาชิก เพื่อพิจารณาอนุมัติการเป็นสมาชิก ระบบการสมัครสมาชิก ออกแบบให้ผู้สมัครสามารถกำหนดไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์และรหัสผ่านสำหรับใช้เข้าสู่ระบบ รวมทั้งสามารถแก้ไขเปลี่ยนแปลงได้ด้วยตัวเอง เมื่อเข้าใช้งานเว็บไซต์ระบบจะตรวจสอบและยืนยันตัวตนผู้ใช้งานด้วยไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์และรหัสผ่าน มีการแจ้งเตือนกรณีที่ถูกกรอกไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์หรือรหัสผ่านไม่ถูกต้อง กรณีที่ผู้ใช้ลืมรหัสผ่าน ระบบจะส่งรหัสผ่านให้ทางไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ที่ได้ลงทะเบียนไว้ กระบวนการทดสอบความชำนาญมีส่วนของงานบริการ

ที่ต้องสื่อสาร ติดต่อบริการ-ส่งข้อมูลกับสมาชิกทุกขั้นตอนจนกระทั่งดำเนินการแล้วเสร็จ และเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้น

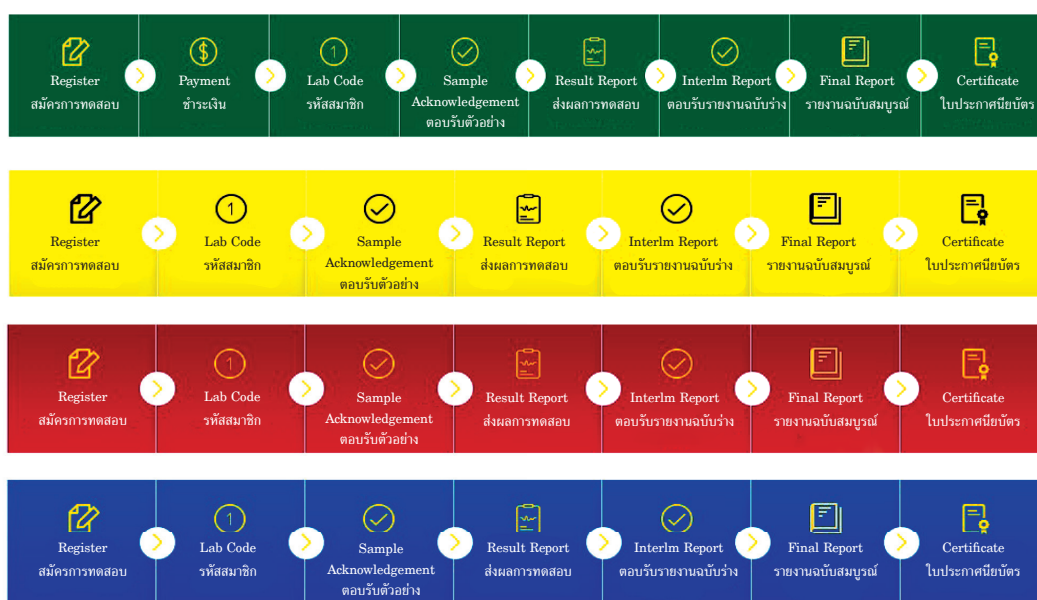
เหมือนกันในทุกแผนงาน โดยขั้นตอนต่างๆ ในงานบริการทดสอบความชำนาญ ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการให้บริการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการ สำนักยาและวัตถุเสพติด

ขั้นตอนดังกล่าวออกแบบให้มีลักษณะเป็นผังขั้นตอนการให้บริการ (tracking bar) และกำหนดสีของ tracking bar และหน้าเว็บไซต์ของแต่ละแผนงานแตกต่างกัน สมาชิกสามารถติดตามสถานะปัจจุบันของแผนการทดสอบที่สมัครได้ เมื่อดำเนินการในแต่ละขั้นตอนจะมีไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ตอบกลับอัตโนมัติ (auto reply E-mail) แจ้งยืนยันดำเนินการ แผนผังขั้นตอนการให้บริการ (tracking bar) มีกิจกรรมรวม 8 ขั้นตอน ดังแสดงในภาพที่ 3 (ยกเว้นแผนด้านสารเสพติด

ในปีสภาวะ ด้านยาเสพติดให้โทษในของกลาง และด้านวัตถุออกฤทธิ์ในของกลาง มี 7 ขั้นตอนเนื่องจากไม่มีขั้นตอนการชำระเงิน) ได้แก่ Register/สมัครการทดสอบ, Payment/ชำระเงิน, Lab Code/รหัสสมาชิก, Sample Acknowledgement/ตอบรับตัวอย่าง, Result Report/ส่งผลการทดสอบ, Interim Report/ตอบรับรายงานฉบับร่าง, Final Report/รายงานฉบับสมบูรณ์ และ Certificate/ใบประกาศนียบัตร



ภาพที่ 3 Tracking bar ของแผนการทดสอบความชำนาญด้านยา (สีเขียว) ด้านสารเสพติดในปัสสาวะ (สีเหลือง) ด้านยาเสพติดให้โทษในของกลาง (สีแดง) และด้านวัตถุออกฤทธิ์ในของกลาง (สีน้ำเงิน)

ขั้นตอนการให้บริการ 8 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

1. Register/สมัครการทดสอบ สมาชิกเลือกโปรแกรมที่ต้องการสมัครจากรายการที่เปิดให้บริการ และศึกษาข้อมูลรายละเอียดของแต่ละโปรแกรมได้จากคู่มือการทดสอบ (PT Protocol) โดยกดปุ่ม Protocol Download เมื่อเลือกสมัครโปรแกรมแล้วระบบจะบันทึกเป็นกิจกรรมแรกตามผังขั้นตอนการให้บริการ (tracking bar)

2. Payment/ชำระเงิน สมาชิกแนบไฟล์หลักฐานการชำระเงินได้ทั้งในรูปแบบ PDF และ JPEG จากนั้นผู้ให้บริการทดสอบความชำนาญ ตรวจสอบและยืนยันความถูกต้องในขั้นตอนการชำระเงิน

3. Lab Code/รหัสสมาชิก ผู้ให้บริการทดสอบความชำนาญออกรหัสสมาชิกก่อนจัดส่งตัวอย่างทดสอบ เพื่อให้สมาชิกใช้รหัสนี้อ้างอิงในการตรวจสอบผลการประเมิน โดยเป็นรหัสเฉพาะของสมาชิกแต่ละรายและออกรหัสใหม่ในแต่ละโปรแกรมการทดสอบที่สมาชิกสมัคร

4. Sample Acknowledgement/ตอบรับตัวอย่าง เมื่อจัดส่งตัวอย่างทดสอบให้สมาชิกแล้ว สมาชิกตรวจสอบสภาพตัวอย่างและตอบรับตัวอย่างทดสอบโดยกรอกรายละเอียดของตัวอย่าง วันที่ได้รับตัวอย่าง สภาพตัวอย่างที่ได้รับในแบบฟอร์มตอบรับตัวอย่าง กรณีตัวอย่างที่ได้รับมีสภาพไม่ปกติสามารถระบุรายละเอียดสภาพตัวอย่างและแนบไฟล์รูปภาพประกอบได้ เพื่อให้ผู้ให้บริการทดสอบความชำนาญพิจารณาการจัดส่งตัวอย่างใหม่ให้สมาชิก

5. Result Report/ส่งผลการทดสอบ เมื่อทดสอบตัวอย่างแล้ว สมาชิกส่งผลการทดสอบโดยกรอกรายละเอียดในแบบฟอร์มอิเล็กทรอนิกส์ ซึ่งมีรูปแบบเฉพาะสำหรับแต่ละโปรแกรม ขึ้นอยู่กับชนิดและลักษณะของข้อมูล เช่น ข้อมูลตัวเลขและสัญลักษณ์พิเศษ ข้อมูลตัวหนังสือ กรอกรายละเอียดหรือเลือกคำตอบอย่างใดอย่างหนึ่ง โดยข้อมูลที่บังคับกรอกจะแสดงเครื่องหมายดอกจัน (*) สีแดงกำกับ ซึ่งเป็นข้อมูลที่ใช้สำหรับการประเมินผล

6. Interim Report/ตอบรับรายงานฉบับร่าง เมื่อผู้ให้บริการทดสอบความชำนาญจัดทำรายงานฉบับ

ร่างเสร็จ นำขึ้นแสดงบนเว็บไซต์ เพื่อให้สมาชิกสามารถเรียกดูและบันทึกในรูปแบบไฟล์ PDF รวมทั้งแจ้งการแก้ไขหรือข้อเสนอแนะต่อรายงานฉบับร่าง

7. Final Report/รายงานฉบับสมบูรณ์ เมื่อผู้ให้บริการทดสอบความชำนาญจัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์เสร็จ นำขึ้นแสดงบนเว็บไซต์ เพื่อให้สมาชิกสามารถเรียกดูและบันทึกในรูปแบบไฟล์ PDF รวมทั้งตอบรับรายงานฉบับสมบูรณ์

8. Certificate/ใบประกาศนียบัตร สมาชิกที่ส่งผลการทดสอบและได้รับการประเมินจะได้รับใบประกาศนียบัตร เพื่อแสดงถึงการเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญกับสำนักยาและวัตถุเสพติด สามารถเรียกดูและบันทึกในรูปแบบไฟล์ PDF ได้ โดยใบประกาศนียบัตรมีทั้งฉบับภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

การให้บริการ 8 ขั้นตอนดังกล่าว เมื่อสมาชิกดำเนินการเสร็จในแต่ละขั้นตอน จะมีระบบส่งไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ตอบกลับอัตโนมัติแจ้งเพื่อให้สมาชิกทราบและยืนยันการดำเนินการ การนำข้อมูลแสดงบนเว็บไซต์และการรับข้อมูลจากผู้ใช้งานเว็บไซต์ มีระบบจัดการเว็บไซต์หรือระบบหลังบ้าน (back-office) เพื่อบริหารจัดการ เก็บรวบรวมข้อมูลและส่งออก (export) ข้อมูลนำมาประมวลผลผ่าน <https://bdn.go.th/pt/weadmin/index.php> โดยกำหนดผู้ที่สามารถเข้าใช้งานระบบหลังบ้าน รวมถึงการกำหนดสิทธิในการเข้าถึงข้อมูลเพื่อรักษาความปลอดภัย ซึ่งการกำหนดสิทธินี้เป็นไปตามหน้าที่ของผู้ปฏิบัติงาน ที่เกี่ยวข้องกับระบบคุณภาพผู้จัดโปรแกรมการทดสอบความชำนาญ ได้แก่ Administrator คือ ผู้จัดการคุณภาพหรือรองผู้จัดการคุณภาพ ISO/IEC 17043 มีหน้าที่ดูแลระบบและบริหารจัดการเว็บไซต์การทดสอบความชำนาญ ห้องปฏิบัติการสำนักยาและวัตถุเสพติด สามารถนำเข้า ลบ และส่งออกข้อมูลได้ Webmaster คือ ผู้ประสานแผนการทดสอบความชำนาญ (coordinator) หรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย มีหน้าที่บริหารจัดการนำเข้า ลบ และส่งออกข้อมูลบนเว็บไซต์เฉพาะในส่วนที่เกี่ยวข้องกับแผนการทดสอบที่รับผิดชอบ และ Assistant คือ ผู้ร่วมดำเนินแผนการทดสอบความชำนาญ มีหน้าที่เป็นผู้ช่วย webmaster สามารถเห็นและส่งออกข้อมูลบนเว็บไซต์เฉพาะในส่วนที่เกี่ยวข้องกับแผนการทดสอบที่รับผิดชอบ

สำนักยาและวัตถุเสพติด ได้พัฒนาแอปพลิเคชัน การทดสอบความชำนาญ ให้สามารถใช้ได้กับระบบปฏิบัติการ iOS และ Android ซึ่งสามารถดาวน์โหลดผ่านรหัสคิวอาร์ (QR code) รูปภาพที่ใช้แทนแอปพลิเคชันหรือไอคอน (icon) ออกแบบโดยใช้สีโทนเดียวกับเว็บไซต์ คือ สีเขียวและเหลือง มีตัวอักษร PT BDN สื่อความหมายชื่อภาษาอังกฤษของสำนักยาและวัตถุเสพติด และงานบริการทดสอบความชำนาญ มีภาพกราฟิกที่สื่อถึงแผนภูมิแท่งของ Z-Score สำหรับใช้ประเมินผลการทดสอบความชำนาญ ดังแสดงในภาพ

ที่ 4 ก) รูปแบบการใช้งานและเมนูแอปพลิเคชันมีลักษณะเดียวกับเว็บไซต์ สมาชิกสามารถเข้าสู่ขั้นตอนการดำเนินงานผ่านแอปพลิเคชันได้เช่นเดียวกันกับผ่านเว็บไซต์ โดยแอปพลิเคชันมีระบบการใช้งานที่มากกว่าเว็บไซต์ คือ การแจ้งเตือน (notification) สามารถส่งข้อความสั้นๆ สำหรับแจ้งเตือนสมาชิกในเรื่องต่างๆ ที่เกี่ยวกับการดำเนินงานทดสอบความชำนาญ โดยแสดงบนหน้าจอของโทรศัพท์เคลื่อนที่แบบสมาร์ทโฟนหรือแท็บเล็ต ดังแสดงในภาพที่ 4 ข)



ภาพที่ 4 ก) แอปพลิเคชันการทดสอบความชำนาญ สำนักยาและวัตถุเสพติด และ ข) ตัวอย่างข้อความแจ้งเตือนแสดงบนหน้าจอของโทรศัพท์เคลื่อนที่แบบสมาร์ทโฟน

เมื่อเว็บไซต์มีความพร้อมเปิดใช้งาน จึงเริ่มประชาสัมพันธ์และแนะนำการใช้งานในการประชุมสัมมนาสมาชิกแผนการทดสอบความชำนาญประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 ของแต่ละแผนงานในช่วงพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 ถึง กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2560 ส่วนแอปพลิเคชันเปิดใช้งาน โดยเริ่มประชาสัมพันธ์และแนะนำการใช้งานในการประชุมสัมมนาสมาชิกแผนการทดสอบความชำนาญประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 ของแต่ละแผนงานเมื่อวันที่ 19-20 ธันวาคม พ.ศ. 2560 และประชาสัมพันธ์ให้สมาชิกทราบผ่านทางหนังสือราชการและไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์

ตั้งแต่เริ่มเปิดการใช้งานถึงปี พ.ศ. 2563 มีจำนวนห้องปฏิบัติการสมัครเป็นสมาชิกเข้าใช้เว็บไซต์ประมาณ

1,300 ราย และแอปพลิเคชันประมาณ 370 ราย มีการสำรวจความพึงพอใจการให้บริการทดสอบความชำนาญผ่านทางเว็บไซต์และแอปพลิเคชันเป็นประจำทุกปี โดยมีสมาชิกที่สมัครเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญเฉลี่ยปีละ 878 ราย ตอบแบบสอบถามความพึงพอใจเฉลี่ยปีละ 235 ราย อัตราการตอบกลับแบบสอบถามเฉลี่ยร้อยละ 27 รูปแบบของแบบสอบถามเป็นการเลือกระดับความพึงพอใจ 5 ระดับ ปี พ.ศ. 2560 ซึ่งเปิดใช้เว็บไซต์เป็นครั้งแรก สำรวจความพึงพอใจในประเด็นรูปแบบของเว็บไซต์ เพื่อนำผลสำรวจมาพิจารณาปรับปรุง โดยเป็นการสำรวจรูปแบบด้านความเหมาะสมของการออกแบบ ความถูกต้องของข้อมูลและเนื้อหา การเข้าถึงเว็บไซต์และระบบรักษาความปลอดภัย ความเหมาะสม

ของเมนูคำสั่ง และความสะดวกในการใช้งานแต่ละลำดับขั้นตอน พบว่าคะแนนความพึงพอใจรูปแบบของเว็บไซต์ในแต่ละด้านคิดเป็นร้อยละ 87.5, 86.8, 86.9, 84.7 และ 85.4 ตามลำดับ ในปี พ.ศ. 2560-2563 พบว่าเมื่อสำรวจความพึงพอใจของสมาชิกต่อเว็บไซต์ในประเด็นการมีข้อมูลและเนื้อหาที่เข้าใจง่าย ครบถ้วน และทันสมัย

ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบความพึงพอใจเว็บไซต์ในแต่ละปี โดยใช้สถิติไคสแควร์ (χ^2 -test) พบว่า χ^2 มีค่าเท่ากับ 20.181, degree of freedom เท่ากับ 12 ดังนั้นในแต่ละปี (พ.ศ. 2560-2563) สมาชิกมีความพึงพอใจต่อเว็บไซต์ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$)

ตารางที่ 1 ผลการสำรวจความพึงพอใจของสมาชิกแผนการทดสอบความชำนาญของสำนักยาและวัตถุเสพติดต่อเว็บไซต์ ระหว่าง ปี พ.ศ. 2560-2563

ปี พ.ศ.	ผลความพึงพอใจเว็บไซต์					รวม	คะแนนร้อยละ
	พอใจมาก	พอใจ	ปานกลาง	ไม่พอใจ	ไม่พอใจมาก		
2560	66	73	8	0	1	148	87.4
2561	155	142	41	3	2	343	86.0
2562	98	90	11	1	0	200	88.5
2563	115	122	12	2	0	251	87.9

ผลการสำรวจความพึงพอใจในภาพรวมของการให้บริการทดสอบความชำนาญ ผ่านทางเว็บไซต์และแอปพลิเคชัน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560-2563 พบว่าสมาชิกมีความพึงพอใจมากที่สุด คือ การมีระบบความปลอดภัยด้วยการใช้รหัสผ่าน และสมาชิกมีความพึงพอใจน้อยที่สุด คือ ความยุ่งยากของขั้นตอนการชำระเงิน และความซับซ้อนของแบบฟอร์มการส่งผลการทดสอบ

เมื่อนำข้อมูลการดำเนินงานจัดโปรแกรมการทดสอบความชำนาญระหว่างปี พ.ศ. 2560-2563 มาประเมินความคุ้มค่าของการใช้เว็บไซต์และ

แอปพลิเคชัน โดยคำนวณค่าเฉลี่ยต่อปีของค่าจัดทำเอกสารและค่าขนส่งทางไปรษณีย์ ปริมาณการใช้กระดาษ และระยะเวลาที่ใช้ในการจัดการเอกสารสำหรับส่งไปรษณีย์ (คิดระยะเวลาการจัดและตรวจสอบความถูกต้องของเอกสารต่อสมาชิก 1 รายเท่ากับ 30 วินาที) เปรียบเทียบระหว่างการใช้และไม่ใช้เว็บไซต์ในการดำเนินงาน (ไม่รวมขั้นตอนการจัดส่งตัวอย่างทดสอบ) โดยใช้สถิติ paired sample t-test ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 2 ความแตกต่างของค่าจัดทำเอกสารและค่าขนส่งทางไปรษณีย์ ปริมาณการใช้กระดาษ และระยะเวลาที่ใช้ในการจัดการเอกสารสำหรับส่งไปรษณีย์ ระหว่างการใช้และไม่ใช้เว็บไซต์ในการดำเนินงานระหว่างปี พ.ศ. 2560-2563

รายการ	ใช้เว็บไซต์	ไม่ใช้เว็บไซต์	ประหยัดได้ (ร้อยละ)	t-value
ค่าเฉลี่ยจัดทำเอกสารและค่าขนส่งทางไปรษณีย์ (บาท)	45,900	268,562	222,662 (82.9)	17.066*
ปริมาณเฉลี่ยการใช้กระดาษ (แผ่น)	1,080	213,294	212,214 (99.5)	12.862*
ระยะเวลาเฉลี่ยที่ใช้จัดการเอกสาร (นาที)	540	1,589	1,049 (66.0)	23.541*

* $p < 0.05$

เมื่อเปิดใช้งานเว็บไซต์แล้วมีการบำรุงรักษา ปรับปรุงและพัฒนาเป็นประจำทุกปี เช่น ปี 2561 การเพิ่มความปลอดภัยของเว็บไซต์ เนื่องจากมีข้อมูลส่วนตัวและข้อมูลการชำระเงินของสมาชิกในฐานข้อมูล รวมทั้งการทดสอบความชำนาญเป็นการประเมินความสามารถของสมาชิก ซึ่งการรักษาความลับเป็นข้อกำหนดที่สำคัญตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2010 ผู้จัดบริการแผนการทดสอบความชำนาญต้องดำเนินการตามข้อกำหนด จึงเปลี่ยนจากการใช้ http (Hypertext Transport Protocol) เป็น https (Hypertext Transfer Protocol over Secure Socket Layer หรือ http over SSL) เพื่อป้องกันการเข้าถึงข้อมูลจากผู้อื่น การปรับรูปแบบของแบบฟอร์มการส่งผลการทดสอบ เนื่องจากบางโปรแกรมการทดสอบมีตัวอย่างทดสอบมากกว่า 1 ตัวอย่าง การจัดเรียงแบบฟอร์มจึงมีลักษณะเรียงต่อกันเป็นแนวยาว ต้องใช้แถบเลื่อนจอภาพเพื่อกรอกข้อมูลให้ครบทุกตัวอย่าง ซึ่งมีความยุ่งยากในการกรอกข้อมูลและมีโอกาสผิดพลาด ดังนั้นจึงออกแบบให้มีลักษณะเป็นแบบฟอร์มของแต่ละตัวอย่างแยกกันและวางซ้อนทับกัน โดยมีแถบค้นแสดงชื่อตัวอย่างสำหรับคลิกเพื่อเลือกแสดงหน้าแบบฟอร์มของตัวอย่างนั้นๆ เป็นการลดระยะการเลื่อนจอภาพให้สั้นลง การใช้หน้าต่างแบบผุดขึ้น (pop-up window) แสดงทางเข้าแบบสำรวจความพึงพอใจซ้อนทับที่หน้าแรกของเว็บไซต์ เพื่อเชิญชวนให้สมาชิกมีส่วนร่วมในการตอบแบบสอบถาม ซึ่งเป็นช่องทางที่สะดวกและเข้าถึงได้ง่าย ในปี 2562 มีการเปลี่ยนภาพประกอบที่หน้าแรกของเว็บไซต์ เนื่องจากในช่วงแรกของการจัดทำเว็บไซต์ใช้ภาพประกอบจากเว็บไซต์รูปภาพที่ไม่มีลิขสิทธิ์และไม่เสียค่าใช้จ่าย เมื่อเปิดใช้งานเว็บไซต์ได้ระยะหนึ่ง จึงมีการเปลี่ยนเป็นภาพประกอบแบบเคลื่อนไหว ที่สื่อถึงกิจกรรมทางห้องปฏิบัติการของสมาชิก โดยเป็นภาพที่ถ่ายจากห้องปฏิบัติการของสำนักยาและวัตถุเสพติด เพื่อให้เว็บไซต์น่าสนใจ มีเอกลักษณ์และทันสมัย ในปี 2563 เพิ่มความถี่ในการสำรองข้อมูล (backup data) เนื่องจากการเพิ่มจำนวนแผนการทดสอบที่เปิดให้บริการและจำนวนสมาชิกที่เพิ่มขึ้น ปริมาณข้อมูลที่จัดเก็บในฐานข้อมูลมีเพิ่มขึ้น จึง

ปรับความถี่ในการสำรองข้อมูลจากทุก 3 วัน เป็นทุกวัน เพื่อป้องกันความเสี่ยงจากการสูญหายและการถูกโจรกรรมข้อมูล การปรับรูปแบบของ tracking bar เนื่องจากในแต่ละแผนงานเมื่อเปิดให้บริการจำนวนหลายโปรแกรมทดสอบพร้อมกัน จะมีกำหนดช่วงเวลา (time-line) แต่ละขั้นตอนของกิจกรรมที่ทับซ้อนกัน สมาชิกที่สมัครหลายโปรแกรมทดสอบอาจไม่สามารถจดจำขั้นตอนได้ จึงใช้ความเข้มของสี tracking bar ช่วยแสดงสถานะปัจจุบัน โดยสีเข้ม 100% แสดงถึงขั้นตอนของกิจกรรมที่ดำเนินการเสร็จเรียบร้อยแล้ว สีเข้ม 50% แสดงถึงขั้นตอนของกิจกรรมที่สามารถดำเนินการได้ แต่สมาชิกยังไม่ได้ดำเนินการ และสีขาวแสดงถึงขั้นตอนของกิจกรรมที่ยังไม่สามารถดำเนินการได้

วิจารณ์

การจัดบริการทดสอบความชำนาญของสำนักยาและวัตถุเสพติด เป็นการดำเนินงานที่มีระบบงานหลายขั้นตอนที่เหมือนกันในทุกแผนงาน ส่วนใหญ่เป็นการติดต่อสื่อสารกับสมาชิก ดังนั้นหากมีวิธีจัดการที่ดีจะสามารถออกแบบเว็บไซต์ให้มีลักษณะที่ใช้ได้กับทุกแผนงาน สมาชิกสามารถเข้าใจขั้นตอนการดำเนินงานติดตามสถานะ และไม่พลาดขั้นตอนการเข้าร่วมการทดสอบ เนื่องจากแผนงานเปิดให้บริการเพียงปีละหนึ่งครั้ง สมาชิกจึงอาจจำขั้นตอนไม่ได้ รูปแบบเว็บไซต์จึงออกแบบให้มีสีเฉพาะของแต่ละแผนงานและมีผังขั้นตอนการให้บริการ (tracking bar) แสดงสถานะปัจจุบัน สมาชิกสามารถเข้าถึงข้อมูล เอกสาร และแบบฟอร์มต่างๆ ผ่านทางเว็บไซต์และแอปพลิเคชันได้ตลอดเวลา ทำให้ลดการจัดส่งเอกสารในรูปแบบกระดาษ จึงไม่มีปัญหาการสูญหายของเอกสารและไม่มีการจัดส่งเอกสารช้า ลดภาระงานในการแก้ไขปัญหาเอกสารสูญหายได้ เช่น การแจ้งรหัสสมาชิก ซึ่งใช้สำหรับการตรวจสอบผลการทดสอบในรายงาน ก่อนการดำเนินงานด้วยระบบเว็บไซต์ได้รับการร้องขอจากสมาชิกให้จัดส่งเอกสารแจ้งรหัสสมาชิกอีกครั้งเนื่องจากการสูญหาย เมื่อมีการใช้เว็บไซต์สมาชิกสามารถเข้าถึงข้อมูลด้วยตนเอง การส่งผลทดสอบเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญ เนื่องจากการนำข้อมูลจากสมาชิกลมาประเมินผล ก่อนการดำเนินงานด้วยระบบ

เว็บไซต์ สมาชิกต้องกรอกผลการทดสอบในแบบฟอร์มตามรูปแบบกระดาษที่จัดส่งให้ และส่งกลับไปที่สำนักยาและวัตถุเสพติดทางไปรษณีย์หรือโทรสาร พบว่าเกิดปัญหาความยุ่งยาก การบริหารจัดการแบบฟอร์มที่ได้รับจากสมาชิก ต้องตรวจสอบความถูกต้องของเอกสารก่อนนำข้อมูลไปประเมินผลและต้องมีวิธีจัดการเก็บเอกสารเพื่อรักษาความลับตามข้อกำหนดของมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2010 นอกจากนี้การนำข้อมูลจากสมาชิกมาประเมินผลต้องมีขั้นตอนการถ่ายโอนข้อมูล โดยนำมาพิมพ์จากแบบฟอร์มกระดาษบันทึกเป็นไฟล์คอมพิวเตอร์เพื่อคำนวณผลทางสถิติ จึงมีโอกาสดังกล่าวเกิดความผิดพลาดส่งผลให้การประเมินไม่ถูกต้องและกระทบภาพลักษณ์ความน่าเชื่อถือของหน่วยงาน เมื่อดำเนินงานด้วยระบบเว็บไซต์จะส่งออกข้อมูลจากระบบจัดการเว็บไซต์เป็นรูปแบบไฟล์และนำไปคำนวณได้โดยตรง ทำให้ข้อมูลมีความถูกต้อง ง่ายต่อการบริหารจัดการ การจัดเก็บ และการสืบค้นข้อมูล นอกจากนี้ได้ออกแบบเว็บไซต์ให้มีระบบลงทะเบียนสำหรับการจัดอบรมสัมมนาให้แก่สมาชิก รวมถึงการประชาสัมพันธ์แจ้งข่าวสารที่เกี่ยวข้อง ซึ่งสามารถให้บริการแบบเบ็ดเสร็จภายในเว็บไซต์

จากการดำเนินงานด้วยระบบเว็บไซต์และแอปพลิเคชันช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2560-2563 ได้มีการสำรวจความพึงพอใจของสมาชิกทุกปี เพื่อรับฟังปัญหาข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะ นำมาปรับปรุงพัฒนางานในปี พ.ศ. 2560 เปิดการใช้งานเว็บไซต์พบว่ามียานยนต์ตอบแบบสำรวจจำนวนน้อย เนื่องจากแบบสำรวจแสดงอยู่ในเมนู “News & KM/ข่าวสารและความรู้” อาจทำให้การเข้าถึงแบบสำรวจไม่สะดวก ในปีถัดมาจึงปรับปรุงโดยการให้หน้าต่างแบบผุดขึ้น เพื่อประชาสัมพันธ์การสำรวจความพึงพอใจ สิ่งที่สมาชิกมีความพึงพอใจมากที่สุด คือ การมีระบบความปลอดภัยด้วยการใช้รหัสผ่าน เนื่องจากเว็บไซต์และแอปพลิเคชันเป็นเครื่องมือที่เหมาะสม สามารถนำข้อดีของเทคโนโลยีสารสนเทศ เรื่องการรักษาความปลอดภัยในการเข้าถึงข้อมูลด้วยรหัสผ่านมาช่วยในการดำเนินงาน สามารถสร้างความมั่นใจให้กับสมาชิกว่าไม่มีการรั่วไหลของข้อมูลไปบุคคลอื่นได้ ประเด็นที่สมาชิกมีความพึงพอใจน้อยที่สุด คือ ความยุ่งยากของขั้นตอนการชำระเงินและความซับซ้อนของแบบฟอร์มส่งผลการทดสอบ เนื่องจากขั้นตอนการชำระ

เงินเป็นการแนบไฟล์หลักฐานการชำระเงิน ภายหลังจากสมาชิกดำเนินการชำระเงินที่ธนาคารแล้ว เพื่อนำมาตรวจสอบและดำเนินการตามระเบียบของราชการ ทั้งนี้ได้มีการชี้แจงและสร้างความเข้าใจกับสมาชิก ถึงข้อจำกัดของการปรับเปลี่ยนวิธีการชำระเงินในการประชุมสัมมนาสมาชิกแผนการทดสอบความชำนาญประจำปี ส่วนความซับซ้อนของแบบฟอร์มส่งผลการทดสอบนั้น ได้มีการปรับปรุง แก้ไขแบบฟอร์มให้เหมาะสมอย่างต่อเนื่องเนื่องจากแต่ละโปรแกรมการทดสอบมีข้อมูลรายละเอียดที่สมาชิกต้องกรอกแตกต่างกันไป โดยการออกแบบแบบฟอร์มส่งผลการทดสอบได้คำนึงถึงรูปแบบการกรอก ซึ่งไม่ทำให้สมาชิกเกิดความสับสนและเข้าใจง่าย แต่ต้องได้ข้อมูลจากสมาชิกที่ครบถ้วน ชัดเจน เพื่อนำมาประเมินผลการทดสอบของสมาชิกได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ

การดำเนินงานและการสื่อสารกับสมาชิกในขั้นตอนต่างๆ ผ่านระบบของเว็บไซต์ สามารถลดปริมาณการใช้กระดาษ ลดค่าใช้จ่ายในการจัดทำเอกสารและค่าจัดส่งทางไปรษณีย์ได้อย่างมาก รวมทั้งลดระยะเวลาที่ใช้ในการจัดการ ภายหลังการเริ่มใช้เว็บไซต์ตั้งแต่ พ.ศ. 2560-2563 มีการปรับปรุงพัฒนาเว็บไซต์และมีการขยายงานบริการทดสอบความชำนาญอย่างต่อเนื่อง เช่น เปิดโปรแกรมการทดสอบใหม่ เพิ่มรายการทดสอบตามที่ได้รับบริการรับรองความสามารถการเป็นผู้จัดการทดสอบความชำนาญ การคิดจุดคุ้มทุนระหว่างการประหยัดค่าใช้จ่ายเปรียบเทียบกับค่าจ้างพัฒนา และค่าดูแลรักษาเว็บไซต์ไม่สามารถทำได้อย่างชัดเจน การจัดบริการทดสอบความชำนาญสามารถสร้างรายได้จากการเข้าร่วมทดสอบของสมาชิก ซึ่งมีมูลค่าที่สามารถรองรับค่าจ้างพัฒนาและค่าดูแลรักษาเว็บไซต์ได้ เมื่อเว็บไซต์สามารถให้บริการบริการทดสอบความชำนาญที่ดี มีความน่าเชื่อถือ และสร้างความพึงพอใจให้กับสมาชิก นอกจากจะสามารถรักษารฐานจำนวนสมาชิกที่ใช้บริการเข้าร่วมทดสอบให้คงไว้ได้แล้ว ยังสามารถเพิ่มสมาชิกรายใหม่ได้ในแต่ละปี การประหยัดค่าใช้จ่ายและรายได้ที่สร้างขึ้นจะมีมูลค่าที่มากกว่าค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาเว็บไซต์ ดังนั้นการใช้เว็บไซต์ในการดำเนินงานจัดบริการทดสอบความชำนาญจึงมีความคุ้มค่า

นอกจากมีการนำระบบเว็บไซต์มาใช้ในการดำเนินงานแล้ว แอปพลิเคชันได้รับการพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ควบคู่ไปกับเว็บไซต์ สามารถใช้งานในการให้บริการทั้ง 8 ขั้นตอนได้เช่นเดียวกับเว็บไซต์ เนื่องจากประโยชน์จากแอปพลิเคชันที่สามารถทำให้สมาชิกเข้าถึงขั้นตอนการดำเนินงานทดสอบความชำนาญได้ง่ายได้ตลอดเวลา ผ่านโทรศัพท์เคลื่อนที่ นอกจากนี้ระบบการแจ้งเตือนผ่านแอปพลิเคชันมีประโยชน์ช่วยให้สมาชิกไม่พลาดในการดำเนินงานแต่ละขั้นตอนของการทดสอบซึ่งมีกำหนดระยะเวลาในการดำเนินงาน แต่แอปพลิเคชันก็มีข้อจำกัดในบางขั้นตอนเช่นการกรอกผลการทดสอบผ่านแอปพลิเคชันบนโทรศัพท์เคลื่อนที่ ซึ่งข้อมูลที่สมาชิกต้องกรอกในบางโปรแกรมทดสอบนั้นมีจำนวนมาก และขนาดของการแสดงผลบนหน้าจอโทรศัพท์เคลื่อนที่นั้น มีจำกัด ทำให้การกรอกผลการทดสอบทางคอมพิวเตอร์ผ่านเว็บไซต์จึงสะดวกกว่าการใช้แอปพลิเคชัน

การนำประโยชน์ของเทคโนโลยีสารสนเทศมาพัฒนางานบริการจัดการทดสอบความชำนาญโดยการจัดทำเว็บไซต์และแอปพลิเคชันนั้น สามารถเปลี่ยนรูปแบบการดำเนินงานให้ทันสมัยและรวดเร็ว สามารถลดค่าใช้จ่ายลดระยะเวลาในการดำเนินงานได้อย่างมาก ผู้จัดการทดสอบความชำนาญต้องมีการตรวจสอบและทวนสอบความถูกต้องของการดำเนินงานผ่านเว็บไซต์และแอปพลิเคชัน ความถูกต้องของข้อมูล มีการจัดเก็บและการรักษาความปลอดภัยของข้อมูลด้วย เพื่อให้การดำเนินงานเป็นผู้จัดบริการทดสอบความชำนาญสอดคล้องกับระบบคุณภาพมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2010 เพิ่มประสิทธิภาพในการดำเนินงานและสร้างความเชื่อมั่นให้กับสมาชิกในการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญกับสำนักยาและวัตถุเสพติด

สรุป

สำนักยาและวัตถุเสพติดได้พัฒนาการดำเนินงานทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการ โดยจัดทำเว็บไซต์และแอปพลิเคชันการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการ เริ่มใช้งานเมื่อ พ.ศ. 2560 และ 2561 ตามลำดับ เปิดให้บริการทดสอบความชำนาญ จำนวน 4 แผนงาน คือ ด้านยา ด้านสารเสพติดในปัสสาวะ

ด้านยาเสพติดให้โทษในของกลางและด้านวัตถุออกฤทธิ์ในของกลางมีสมาชิกประมาณ 1,300 แห่ง เว็บไซต์และแอปพลิเคชันที่พัฒนาขึ้นสามารถช่วยให้การดำเนินงานสะดวกและรวดเร็วขึ้น ลดขั้นตอนการดำเนินงาน เมื่อเปรียบเทียบค่าจัดทำเอกสารและค่าขนส่งทางไปรษณีย์ ปริมาณการใช้กระดาษและระยะเวลาที่ใช้ในการจัดการเอกสารสำหรับส่งไปรษณีย์ ระหว่างการใช้และไม่ใช้เว็บไซต์ในการดำเนินงานด้วยสถิติ paired sample t-test พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยลดค่าใช้จ่ายได้ร้อยละ 82.9 ลดปริมาณการใช้กระดาษได้ร้อยละ 99.5 และลดระยะเวลาการดำเนินงานได้ร้อยละ 66.0 เมื่อเปรียบเทียบความพึงพอใจของสมาชิกต่อเว็บไซต์ในแต่ละปี (พ.ศ. 2560-2563) ประเด็นการมีข้อมูลและเนื้อหาที่เข้าใจง่าย ครบถ้วน และทันสมัย โดยใช้สถิติไคสแควร์ พบว่าสมาชิกมีความพึงพอใจต่อเว็บไซต์ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) นอกจากนี้สามารถสร้างภาพลักษณ์การทำงานที่ดีให้กับสำนักยาและวัตถุเสพติดในฐานะการเป็นผู้จัดการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการ ส่งเสริมการดำเนินงานที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและมีความปลอดภัยในสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ด้วยการลดการสัมผัส ความทันสมัยด้วยการใช้เทคโนโลยีสารสนเทศ สอดคล้องกับนโยบายไทยแลนด์ 4.0

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางสาวสุรชนี เสวตศิลา ผู้อำนวยการสำนักยาและวัตถุเสพติด ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงาน นางอรพิน ทนันทิ และ นางสาวพัชรินทร์ เนื่องสาร ที่ให้คำแนะนำ ทำให้การพัฒนาเว็บไซต์และแอปพลิเคชันการทดสอบความชำนาญสำนักยาและวัตถุเสพติด สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2005.

2. ISO/IEC 17043:2010. Conformity assessment -- General requirements for proficiency testing. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2010.
3. Thompson M, Ellison SL, Wood R. The International Harmonized Protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. Pure Appl Chem 2006; 78(1): 145-96.
4. EDQM Council of Europe. Physico-chemical and biological PTS. [online]. 2021; [cited 2021 Apr 11]; [2 screens]. Available from: URL: <https://www.edqm.eu/en/physico-chemical-and-biological-pts>.
5. UNODC. Quality assurance support International Quality Assurance Programme (IQAP). [online]. 2022; [1 screen]. Available from: URL: <https://www.unodc.org/LSS/Home/ICE>.
6. สำนักงานรัฐบาลอิเล็กทรอนิกส์(องค์กรมหาชน). มาตรฐานเว็บไซต์ภาครัฐ (Government Website Standard). [ออนไลน์]. 2559; [สืบค้น 11 เมษายน 2564]; [83 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.dga.or.th/wp-content/uploads/2016/05/file_a7306e9cc94a76f649511fa3a9bcbac9.pdf.
7. สำนักงานรัฐบาลอิเล็กทรอนิกส์ (องค์กรมหาชน). มาตรฐานเว็บไซต์ภาครัฐ เวอร์ชัน 2.0 (Government Website Standard Version 2.0). [ออนไลน์]. 2560; [สืบค้น 11 เมษายน 2564]; [113 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://www.oic.go.th/FILEWEB/CABI-NFOCENTER6/DRAWER020/GENERAL/DATA0001/00001722.PDF>.

Proficiency Testing Website and Application of the Bureau of Drug and Narcotic

Siriphorn Laomanacharoen, Masvalai Likitthanasrate, and Angkana Kritpitakngoen
Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT The Bureau of Drug and Narcotic provides proficiency testing (PT) for pharmaceutical and narcotic analysis programs. The objective of this study was to evaluate competency of drug and narcotic testing laboratories for use as evidence to indicate the reliability of testing results. Initially, the bureau coordinated with drug and narcotic laboratories by sending formal letters via post and facsimile. It was found that there were problems of document loss, high cost of document preparation and distribution, difficulties with management, and storage of paper documents. In 2017–2018, website and application programs were implemented, respectively, to develop the document management for PT operations. Based on the website and application in PT operation during 2017–2020, the difference of cost of document preparation and distribution, paper and time consumption for document management between the use and non-use periods of the website was found to be statistically significant (paired sample t-test, $p < 0.05$). The difference of website satisfaction in each year (during 2017–2020) was not significant. The most satisfaction was noted for security system by using password. The proficiency testing website and application programs have been found to promote convenient and rapid operations and reduce the operating cost. In addition, it can enhance contactless operations with environmental friendliness and safety during the COVID-19 pandemic, promote good image and modernize the operation by using information technology in accordance with the Thailand 4.0 policy.

Keywords: Proficiency testing, Website, Application, Bureau of Drug and Narcotic

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	
Executive Editor	Prapai Wongsinkongman	
Editor	Apiwat Tawatsin	
Assistant Editor	Siripakorn Sangkitporn	Uryakorn Chansang
	Nuanjan Wichukchinda	
Editorial Board	Pilaipan Puthavathana	Mahidol University
	Prasert Auewarakul	Mahidol University
	Danai Tiwawech	Naresuan University
	Suwanna Charunut	Huachiew Chalermprakiet University
	Padet Siriyasatien	Chulalongkorn University
	Pornpimol Kongtip	Mahidol University
	Srisurang Tantimavanich	Mahidol University
	Sunee Sirivichayakul	Chulalongkorn University
	Chanitra Thuwajit	Mahidol University
	Pintip Pongpech	Independent Scholar
	Salakchit Chutipongvivate	Independent Scholar
	Usavadee Thavara	Independent Scholar
	Suthon Vongsheree	Independent Scholar
	Wichuda Jariyapan	Independent Scholar
	Supanee Duangteraprecha	Independent Scholar
	Nuanchawee Wetprasit	Independent Scholar
	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	



ครบรอบ 80 ปี แห่งคุณภาพ

วิจัยและพัฒนาเพื่อดูแลสุขภาพคนไทย



<https://bit.ly/BullDmsc>