

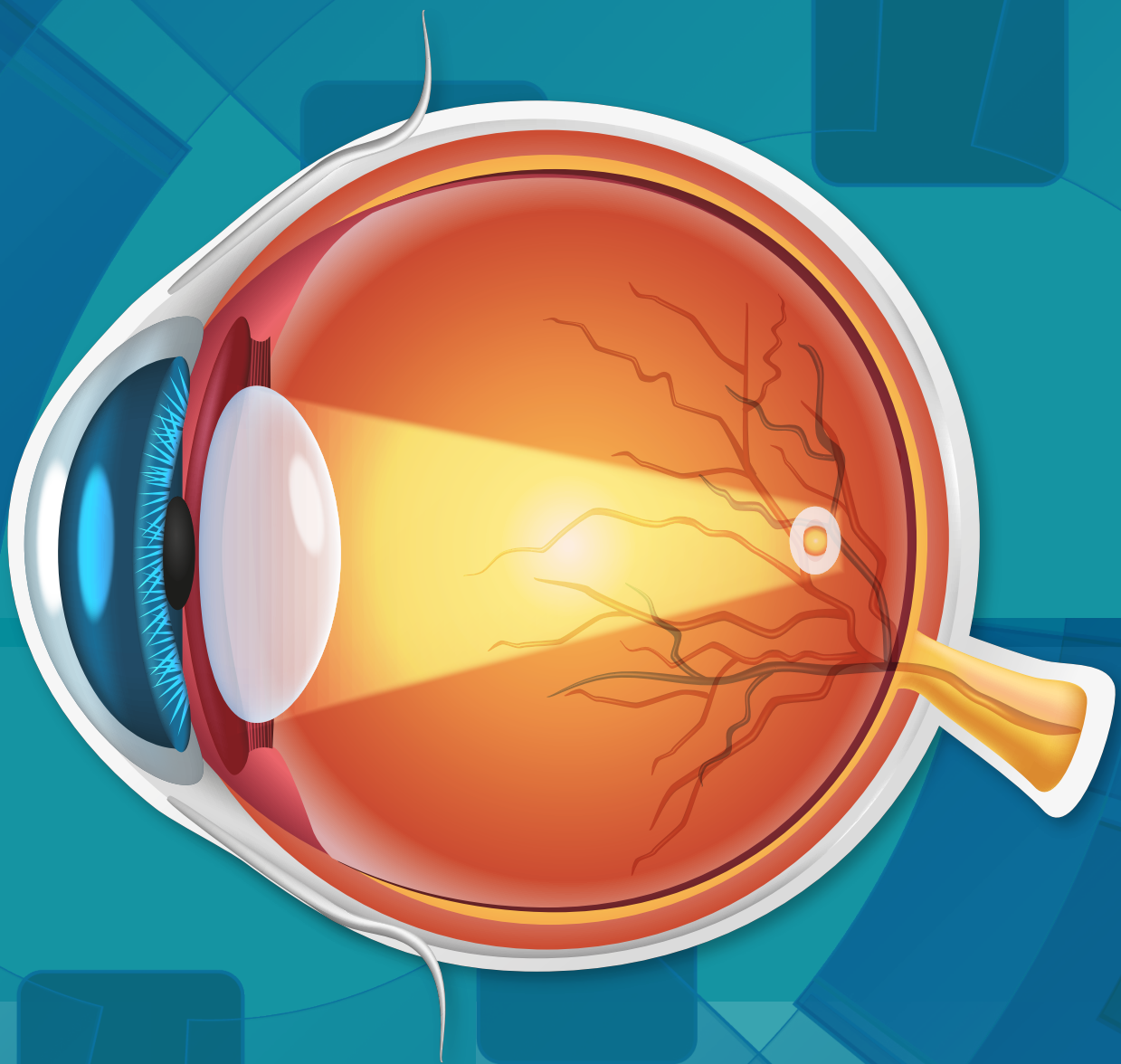


กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วารสาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 64 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2565 • Vol. 64 No. 2 April - June 2022



ISSN 0125-684X

E-ISSN 2697-4525

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข	
ที่ปรึกษาด้านบริหาร	นพ.ศุภกิจ ศิริลักษณ์ นพ.บัลลังก์ อุปพงษ์	นพ.พิเชฐ บัญญัติ นพ.ปิยะ ศิริลักษณ์
ที่ปรึกษาด้านวิชาการ	นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท ดร.ปนัดดา ชิลวา ดร.บุษราวรรณ ศรีวรรณะ	ดร.สุมล ปวีตรานนท์ ดร.เดือนถนนม พรหมชาติแก้ว
บรรณาธิการบริหาร	ดร.ประไพ วงศ์สินคงมั่น	
บรรณาธิการ	ดร.อภิวัฏ ธวัชสิน	
รองบรรณาธิการ	นางสิริภากร แสงกิจพร ดร.นวลจันทร์ วิจิตรจินดา	ดร.อุรุยากร จันทร์แสง
คณะบรรณาธิการ	ศ.เกียรติคุณ ดร.พิไลพันธ์ พุฒวัฒนะ ศ.ดร.นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล ดร.दनัย ทิวาเวช ภญ.สุวรรณา จารุณช ศ.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร ศ.ดร.พรพิมล กองทิพย์ รศ.ดร.ศรีสุรางค์ ตันติมาวานิช ดร.สุณี ศิริวิชัยกุล รศ.ดร.ภญ.ชนิตรา ธูจิตต์ รศ.ดร.ภญ.พิมพ์ทิพย์ พงษ์เพชร ดร.สลักจิต ชุตติพงษ์วิเวท ดร.อุษาวดี ถาวระ นายสุธน วงษ์ชัย นางวิษชุดา จริยะพันธุ์ ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา รศ.ดร.นวลฉวี เวชประสิทธิ์ ดร.วันทนา ปวีณกิตติพร ดร.ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์	มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ฝ่ายจัดการ	นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ นางสาวประสาน จุลวงษ์ นางสาวอภิมน จีรพงศ์ธร นายนาวิ ศรีวรรณย์ นางสาวภาวิณี สุขเจริญ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
สำนักงานวารสาร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 88/7 ซอยติวานนท์ 14 ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000 โทร. 0-2951-0000 โทรสาร 0-2951-1297	
พิมพ์ที่	บริษัท ธนอรุณการพิมพ์ จำกัด 457/6-7 ถนนพระสุเมรุ แขวงบวรนิเวศ เขตพระนคร กรุงเทพฯ 10200 โทร. 0-2282-6033-4	

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 64 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2565

Vol. 64 No. 2 April - June 2022

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- ระบาดวิทยาของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 สายพันธุ์เบต้า (B.1.351) และปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดอาการรุนแรง ในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย ช่วงเมษายน-กันยายน 2564 81
สวรรรยา จันทูตานนท์ และ ชูพงศ์ แสงสว่าง
- การคัดกรองฤทธิ์ต้าน SARS-CoV-2 และโมเลกุลเป้าหมายการออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรไทย 93
ศรายุทธ ระดาพงษ์ ตัญญาณี สาหัด ณัฐภัทร หาญกิจ พรราว ศุภจริยาวัตร
พิไลลักษณ์ อัครไพบุลย์ โอภาตะ วันดี มีฉลาด พรชัย สันเจริญโกโคย สมจิตร เนียมสกุล
เสกขตกร บัวเบา ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง Kenneth J. Ritchie และ ศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์
- การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างคลอโรมีควอต ไคควอต 106
เมพิควอต และพาราควอต ในผักและผลไม้โดยเทคนิค LC-MS/MS
เสาวณีย์ วาจาสิทธิ์ สุวิมล หมวดหมี อัจฉรี อินแก้ว กัญญารัตน์ เชื้อกุลชาติ
วิทวัส วังแก้วศิริยุ สกุรัตน์ สมสันติสุข และ ทองสุข ปายะนันท์
- การประเมินคุณภาพสารมาตรฐาน Factor VIII แบบผงแห้งเพื่อทดสอบค่าความแรง 121
โสมมริสา พวงพรศรี อัครรรย์ อาเมน ปัทมา บุณนาค จิตาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์
ชาญวิทย์ ชูแก้ว และ ไพศาล พังจันทน์
- การพัฒนากระบวนการเตรียม DMSc Stem Pro: Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells สำหรับการศึกษาวิจัยทางคลินิก 133
อัจฉราพร คำบัว ลีริภากร แสงกิจพร ละอองศรี อัมชะนียะสกุล อารีรัตน์ ขอไชย
อดิศักดิ์ ตีรนาวรัตน์ สาวิตร์ ตังเรือง ศุภลักษณ์ บัวศรีแก้ว อภิชาติ โชติชูศรี พัทธราภรณ์ บุญชู
ชลลดา ยอดทัพ พัทธราภรณ์ นพปรังค์ ปัญญกมล จันทรสภา และ สมชาย แสงกิจพร

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 64 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2565

Vol. 64 No. 2 April - June 2022

CONTENTS

Page

Original Articles

- Epidemiology of SARS-CoV-2 Beta Variant (B.1.351) and Risk Factors for Severe Illness in the Southernmost Provinces of Thailand, April-September 2021** 81

Sawanya Chantutanon and Choopong Sangsawang

- Anti-SARS-CoV-2 Activity Screening of the Selected Thai Medicinal Plants and Potential Host-target Molecules** 93

Sarayut Radapong, Tiyanee Sahad, Nathaphat Harnkit, Praw Suppajariyawat, Pilailuk Akkpaiboon Okada, Wandee Meechalad, Pornchai Sincharoenpokai, Somchit Niumsukul, Sekrachatakorn Buaboa, Sakwichai Ontong, Kenneth J. Ritchie, and Siriwan Chaisomboonpan

- Method Development and Validation of Chlormequat, Diquat, Mepiquat, and Paraquat Residue Determination in Vegetables and Fruits by LC-MS/MS Technique** 106

Saovanee Wajazit, Suwimol Muadmah, Atcharee Inkaew, Kanyarat Chuakunchat, Witthawat Wangkaewhiran, Sakulrat Somsuntisuk, and Thongsuk Payanan

- Evaluation of Factor VIII Freeze-Dried Reference Standard for Potency Testing** 121

Soammarisa Paungpornsri, Assajun Amen, Pattama Bunnag, Titaporn Pootipinyawat, Chanwit Chukaeo, and Paisan Pangjunan

- Manufacturing Process Development of DMSc Stem Pro: Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells for Clinical Research** 133

Acharaporn Dambua, Siripakorn Sangkitporn, La-ongsri Atchaneeyasakul, Areerat Khorchai, Adisak Trinavarat, Sawitree Duangrueng, Suppaluk Buasriekaw, Apichat Chotichusree, Patcharaporn Boonchu, Chonlada Yodtup, Phatcharaphon Nopprang, Panyakamol Chandrasakha, and Somchai Sangkitporn



บรรณาธิการแถลง



วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ฉบับที่ 2 ปีที่ 64 พุทธศักราช 2565 ในฉบับนี้ยังคงมีเนื้อหาบทความวิชาการที่ให้ความรู้และน่าสนใจหลายเรื่อง ได้แก่ ระบาดวิทยาของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 สายพันธุ์เบต้า (B.1.351) และปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดอาการรุนแรง ในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย ช่วงเมษายน-กันยายน 2564, การคัดกรองฤทธิ์ต้าน SARS-CoV-2 และโมเลกุลเป้าหมายการออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรไทย, การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างคลอโรมีควอต ไคควอต เมพิควอต และพาราควอต ในผักและผลไม้โดยเทคนิค LC-MS/MS, การประเมินคุณภาพสารมาตรฐาน Factor VIII แบบผงแห้งเพื่อทดสอบค่าความแรง และการพัฒนากระบวนการเตรียม DMSc Stem Pro: Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells สำหรับการศึกษาวิจัยทางคลินิก

กองบรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบคุณผู้สนับสนุนทุกท่านที่ส่งบทความมาให้พิจารณาตีพิมพ์เผยแพร่องค์ความรู้และงานวิจัย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปฏิบัติงานด้านการพัฒนาวิทยาศาสตร์การแพทย์และสาธารณสุขของประเทศ ขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านในการพิจารณาบทความ (peer review) ที่ให้ข้อเสนอแนะในการปรับปรุงแก้ไขบทความวิจัยต่างๆ ให้มีความถูกต้องทางวิชาการและอ่านได้เข้าใจง่ายขึ้น และขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนในการจัดทำวารสารฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี กองบรรณาธิการหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวารสารฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้อ่านทุกท่านในการเสริมสร้างองค์ความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์และสาธารณสุข และโปรดติดตามความรู้และงานวิจัยจากวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ฉบับต่อไป ซึ่งจะเผยแพร่ภายในเดือนกันยายน 2565

ดร.อภิวิชญ์ ธวัชสิน

บรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์



คำแนะนำสำหรับผู้สนับสนุน

ระบาดวิทยาของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 สายพันธุ์เบต้า (B.1.351) และปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดอาการรุนแรงในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย ช่วงเมษายน-กันยายน 2564

สวรรยา จันทูตานนท์¹ และ ชุพงศ์ แสงสว่าง²

¹สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 สงขลา สงขลา 90000

²ศูนย์ฝึกอบรมนักระบาดวิทยาภาคสนาม (FETC) สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 สงขลา สงขลา 90000

บทคัดย่อ การวิจัยนี้เป็นการศึกษาทางระบาดวิทยาของโรคโควิด 19 สายพันธุ์เบต้าที่ระบาดใน 7 จังหวัดภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย เป็นการศึกษาแบบภาคตัดขวางในผู้ป่วยยืนยันสายพันธุ์เบต้า โดยทบทวนข้อมูลเฝ้าระวังและรายงานสอบสวนโรค ของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 สงขลา ระหว่างวันที่ 1 เมษายน-30 กันยายน 2564 พบว่าผู้ป่วยยืนยันสายพันธุ์เบต้า 551 ราย (ร้อยละ 18.93) จากผู้ป่วยยืนยันที่ทราบสายพันธุ์ 2,911 ราย จังหวัดที่พบสัดส่วนสายพันธุ์เบต้าสูงสุด ได้แก่ นราธิวาส สตูล และปัตตานี (ร้อยละ 50.78, 34.13 และ 13.66 ตามลำดับ) เพศชาย 294 ราย หญิง 217 ราย อายุระหว่าง 1-100 ปี (มัธยฐาน 34 ปี) เชื้อชาติไทยร้อยละ 99.27 นับถือศาสนาอิสลามร้อยละ 96 พบผู้ป่วยยืนยันกลุ่มแรกในเดือนพฤษภาคม ระบาดสูงสุดในเดือนกรกฎาคม ปัจจัยเสี่ยงสำคัญ คือ กิจกรรมรวมกลุ่มทางศาสนาอิสลาม และศึกษาเชิงวิเคราะห์แบบ retrospective cohort study ค้นหาปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดอาการรุนแรงของโรคหรือเสียชีวิต ทบทวนเวชระเบียนผู้ป่วยยืนยันสายพันธุ์เบต้าที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลของรัฐ จังหวัดนราธิวาสและสตูล ระหว่างวันที่ 1 เมษายน-30 กันยายน 2564 ผู้ป่วยทั้งหมด 286 ราย มีอาการรุนแรงหรือเสียชีวิต 14 ราย ปัจจัยที่สัมพันธ์กับอาการรุนแรงหรือเสียชีวิต ได้แก่ ผู้ที่อายุ ≥ 60 ปี (adjusted OR = 11.26, 95% CI: 2.42-52.59) ผู้ที่มีโรคประจำตัวเรื้อรัง (adjusted OR = 23.80, 95% CI: 1.23-458.61) และเพศชาย (adjusted OR = 7.36, 95% CI: 1.02-52.76) การระบาดเชื้อสายพันธุ์เบต้าในภาคใต้ตอนล่างเกี่ยวข้องกับการลักลอบเข้าประเทศและกิจกรรมรวมกลุ่มทางศาสนาอิสลาม ควรเพิ่มมาตรการเฝ้าระวังพื้นที่ชายแดน เน้นมาตรการป้องกันควบคุมโรคในกลุ่มหลบหนีเข้าเมือง งดกิจกรรมการรวมกลุ่มทางศาสนา และความครอบคลุมการให้วัคซีนในผู้สูงอายุและผู้มีโรคเรื้อรัง

คำสำคัญ : โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019, สายพันธุ์เบต้า, ปัจจัยเสี่ยงต่ออาการรุนแรงของโรค, ภาคใต้ตอนล่าง

Corresponding author E-mail: sawanya.sc@gmail.com

Received: 3 February 2022

Revised: 11 May 2022

Accepted: 17 May 2022

บทนำ

โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (Coronavirus disease 2019 หรือ COVID-19) เกิดจากการติดเชื้อไวรัสโคโรนาใน Family Coronaviridae มีระยะฟักตัวเฉลี่ย 5-6 วัน ถึง 14 วัน สามารถแพร่กระจายเชื้อจากคนสู่คนโดยการสัมผัส กับสารคัดหลั่งจากทางเดินหายใจ หรือแพร่กระจายเชื้อของฝอยละอองน้ำมูก น้ำลายจากผู้ป่วยที่มีเชื้อโดยการไอหรือจาม ผู้ที่ติดเชื้อส่วนใหญ่ไม่แสดงอาการร้อยละ 45 และหากมีอาการมักจะแสดงอาการเล็กน้อยเท่านั้น เช่น ไข้ ไอ น้ำมูก สูญเสียการได้กลิ่น การรับรส เป็นต้น เพียงร้อยละ 10 ที่มีอาการรุนแรงตั้งแต่เกิดภาวะปอดอักเสบ (pneumonia) จนทำให้เสียชีวิตได้ โดยกลุ่มเสี่ยงที่พบจะมีภาวะปอดอักเสบรุนแรงจนเสียชีวิตได้แก่ กลุ่มผู้สูงอายุ ผู้มีโรคประจำตัว เช่น โรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง โรคระบบทางเดินหายใจเรื้อรัง และผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง⁽¹⁾ ปัจจุบันมีหลายวิธีในการตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 เพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 แต่วิธีมาตรฐานที่ยอมรับที่สุดในปัจจุบันโดยศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคแห่งสหรัฐอเมริกา (US CDC) และองค์การอนามัยโลก คือ Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)⁽²⁾ พบผู้ป่วยรายแรกด้วยโรคปอดอักเสบไม่ทราบสาเหตุ จากเมืองอู่ฮั่น (Wuhan) มณฑลหูเป่ย์ (Hubei) สาธารณรัฐประชาชนจีน เมื่อปลายเดือนธันวาคม 2562 ต่อมาในเดือนมกราคม 2563 ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคแห่งสาธารณรัฐประชาชนจีน (Chinese Center for Disease Control and Prevention; China CDC) ได้ประกาศอย่างเป็นทางการถึงสาเหตุของโรคปอดอักเสบดังกล่าวเกิดจากเชื้อไวรัสโคโรนาชนิดใหม่ หลังจากนั้น The International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ประกาศชื่อใหม่ของไวรัสเป็นไวรัสซาร์ส-โควี-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2; SARS-CoV-2) และในเดือนถัดมาจึงตั้งชื่อโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสดังกล่าว เป็นโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 หรือโรคโควิด 19 (Coronavirus disease 2019; COVID-19)⁽³⁾ การระบาดของโรคโควิด 19 ได้กระจาย

เป็นวงกว้างอย่างรวดเร็ว จากเริ่มแรกมีการระบาดในสาธารณรัฐประชาชนจีนเพียงประเทศเดียว ต่อมาได้กระจายไปยังประเทศและภูมิภาคอื่นๆ ทั่วโลก โดยในวันที่ 11 มีนาคม 2563 องค์การอนามัยโลก จึงได้ประกาศให้โรคโควิด 19 เป็นโรคระบาดใหญ่ทั่วโลก (pandemic)⁽⁴⁾ ประเทศไทยเริ่มพบผู้ป่วยโรคโควิด 19 รายแรกเป็นนักท่องเที่ยวหญิงชาวจีน อายุ 61 ปี เข้ามาในประเทศไทย เมื่อเดือนมกราคม 2563⁽⁵⁾ นับแต่นั้นมาจึงเริ่มมีการระบาดภายในประเทศ

องค์การอนามัยโลก ร่วมมือกับพันธมิตรนานาชาติ เครือข่ายผู้เชี่ยวชาญ และนักวิจัยของหน่วยงานต่างๆ ทั่วโลก ติดตามและประเมินวิวัฒนาการของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ตั้งแต่เดือนมกราคม 2563 ถึงช่วงปลายปี 2563 เกิดโควิดหลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งองค์การอนามัยโลกได้ตั้งชื่อและกำหนดสายพันธุ์ต่างๆ เป็น 2 กลุ่มคือ สายพันธุ์ที่น่าวิตก (Variants of Concern: VOC) และสายพันธุ์ที่ต้องเฝ้าระวัง (Variants of Interest: VOI) สายพันธุ์กลุ่ม VOC จะก่อให้เกิดการแพร่ระบาดในวงกว้างได้อย่างรวดเร็วและรุนแรง ลดภูมิคุ้มกันและประสิทธิภาพวัคซีน ได้แก่ 1) สายพันธุ์ Alpha (B.1.1.7) พบครั้งแรกในประเทศอังกฤษ 2) สายพันธุ์ Beta (B.1.351) พบครั้งแรกในประเทศแอฟริกาใต้ ทั้งสองสายพันธุ์เริ่มมีการแพร่ระบาดเมื่อเดือนกันยายน 2563 3) สายพันธุ์ Delta (B.1.617.2) เป็นการกลายพันธุ์ของสายพันธุ์อินเดีย (B.1.617.1) ต่อมาแพร่ระบาดอย่างรวดเร็วไปหลายประเทศ ได้แก่ อเมริกา อังกฤษ ตุรกี ในเดือนมีนาคม 2564 และขยายไปทั่วโลก 4) สายพันธุ์ Gamma (P.1) พบครั้งแรกในประเทศบราซิล⁽⁶⁻⁹⁾ สำหรับประเทศไทยพบผู้ติดเชื้อโรคโควิด 19 สายพันธุ์กลุ่ม VOC ได้แก่ สายพันธุ์อัลฟา (Alpha) เริ่มระบาดในช่วงเดือนเมษายน 2564 สายพันธุ์เบต้า (Beta) พบรายแรกเป็นผู้เดินทางมาจากประเทศแทนซาเนีย และสายพันธุ์เดลต้า (Delta) เริ่มพบการระบาดในเดือนพฤษภาคม 2564

ระหว่างเดือนเมษายน-กันยายน 2564 พบการระบาดของสายพันธุ์เบต้าในประเทศไทยใน 4 จังหวัดภาคใต้ตอนล่าง ได้แก่ นราธิวาส สตูล ยะลา และปัตตานี จากข้อมูลการเฝ้าระวังการกลายพันธุ์ของเชื้อโรคโควิด 19 ในพื้นที่เขตสุขภาพที่ 12 พบว่าเริ่มมีการ

ระบาดของสายพันธุ์เบต้า ในคลัสเตอร์ตำบลเกาะสะท้อน อำเภอดงขี้เหล็ก จังหวัดนราธิวาส พบผู้ติดเชื้อรายแรกมีประวัติเดินทางมาจากประเทศมาเลเซีย ในช่วง 14 วันก่อนมีอาการ โดยการลักลอบเข้าออกผ่านช่องทางธรรมชาติจึงไม่ได้รับการกักกันและคัดกรองตามแนวทางปกติ ต่อมาเริ่มแพร่ระบาดไปยังจังหวัดใกล้เคียง ซึ่งส่วนใหญ่มีความเชื่อมโยงกับคลัสเตอร์อำเภอดงขี้เหล็ก แต่ไม่พบการแพร่ระบาดในภูมิภาคอื่นๆ ในประเทศ จึงมีความสนใจในการศึกษาระบาดวิทยาโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์เบต้าที่ระบาดในภาคใต้ตอนล่าง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่ออธิบายลักษณะการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์เบต้าในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง ความรุนแรงของโรคและค้นหาปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรครุนแรงหรือเสียชีวิต

วัสดุและวิธีการ

การศึกษาระบาดวิทยาของไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์เบต้า ใน 7 จังหวัด ภาคใต้ตอนล่าง (สงขลา สตูล พัทลุง ตรัง ปัตตานี ยะลา และนราธิวาส)

ดำเนินการศึกษาแบบภาคตัดขวาง (cross-sectional study) โดยรวบรวมข้อมูลทุติยภูมิจากฐานข้อมูลเฝ้าระวังสายพันธุ์โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 สงขลา ทบทวนรายงานสอบสวนโรคตามแบบฟอร์ม Novelcorona 2 กรมควบคุมโรค รายงานสอบสวนการระบาดของผู้ติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์เบต้า และข้อมูลรายงานผลการตรวจสายพันธุ์ของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี MassARRAY จากศูนย์จีโนมทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี และผลวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมแบบ whole genome sequencing จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

ประชากรศึกษา ได้แก่ ผู้ติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ที่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี RT-PCR และยืนยันพบสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธี MassARRAY และ whole genome sequencing ที่เข้ารับการรักษาในหน่วยบริการในพื้นที่ 7 จังหวัดภาคใต้ตอนล่าง ได้แก่ สงขลา ปัตตานี ยะลา นราธิวาส สตูล พัทลุง และตรัง และรายงานเข้าฐานข้อมูลเฝ้าระวัง

สายพันธุ์โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 สงขลา ระหว่างวันที่ 1 เมษายน-30 กันยายน 2564 โดยมีนิยามผู้ติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์อัลฟา เบต้า และเดลต้า หมายถึง ประชากรศึกษาที่ยืนยันพบเชื้อ SARS-CoV-2 สายพันธุ์อัลฟา (B.1.1.7) สายพันธุ์เบต้า (B.1.351) และสายพันธุ์เดลต้า (B.1.617.2) การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล ตัวแปรที่เก็บรวบรวม ได้แก่ เพศ อายุ สัญชาติ จังหวัดที่รักษา วันที่เก็บตัวอย่าง วันที่รายงานผล ผลการรักษา วิเคราะห์ข้อมูลการกระจายของโรคตามบุคคล เวลา สถานที่ โดยใช้โปรแกรม excel นำเสนอผลในรูปแบบร้อยละ ค่ามัธยฐาน และค่าพิสัย

การวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดอาการรุนแรงของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์เบต้า

ดำเนินการศึกษาแบบ retrospective cohort study ในผู้ติดเชื้อ SARS-CoV-2 สายพันธุ์เบต้า ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลของรัฐจังหวัดนราธิวาสและจังหวัดสตูล ระหว่างวันที่ 1 เมษายน-30 กันยายน 2564 กำหนดพื้นที่ศึกษา ได้แก่ โรงพยาบาลทั่วไป 2 แห่ง และโรงพยาบาลชุมชน 6 แห่ง มีจำนวนผู้ติดเชื้อรวม 375 ราย รวบรวมข้อมูลโดยทบทวนเวชระเบียนผู้ป่วย ทบทวนรายงานสอบสวนผู้ป่วยตามแบบฟอร์ม Novelcorona 2 กรมควบคุมโรค และข้อมูลรายงานผลการตรวจสายพันธุ์ของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี gene sequencing จากศูนย์จีโนมทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เก็บข้อมูลสำคัญ ได้แก่ ข้อมูลลักษณะบุคคล ประวัติโรคประจำตัว ประวัติการรับวัคซีนโควิด 19 ข้อมูลทางคลินิกแรกรับ และหลังเข้ารับการรักษา อัตราการหายใจ การตรวจวัดค่า oxygen saturation (O_2 sat) ผลตรวจ chest x-ray ภาวะแทรกซ้อนและการรักษา ปัจจัยที่นำมาศึกษาเชิงวิเคราะห์ ได้แก่ เพศ อายุ โรคประจำตัวเรื้อรัง ดัชนีมวลกาย (Body mass index: BMI) การตั้งครรภ์ การรับวัคซีนโควิด 19 ผลลัพธ์ที่สนใจ คือ ความรุนแรงของโรค โดยกำหนดนิยามโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนาที่มีอาการไม่รุนแรง

ได้แก่ 1) ผู้ติดเชื้อไม่แสดงอาการ (asymptomatic infection) คือ ผู้ติดเชื้อยืนยันที่ไม่มีอาการ และผลตรวจเอกซเรย์ปอด (CXR) ปกติ 2) ผู้ติดเชื้ออาการเล็กน้อย (mild illness) คือ ผู้ติดเชื้อยืนยันที่มีอาการข้อใดข้อหนึ่ง ได้แก่ ไข้ ไอ เจ็บคอ น้ำมูก ล้นไม่รับรส จมูกไม่ได้กลิ่น มีผื่น หรือถ่ายเหลว ร่วมกับไม่มีอาการหอบเหนื่อย และไม่มีปอดอักเสบจากผลตรวจเอกซเรย์ปอด และ 3) ผู้ติดเชื้ออาการปานกลาง (moderate illness) ได้แก่ ปอดอักเสบ และค่า room air O_2 sat > 93% นิยามโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนาที่มีอาการรุนแรง (severe or critical illness) คือ ผู้ติดเชื้อที่มีอาการข้อใดข้อหนึ่ง ได้แก่ อัตราหายใจ > 30 ครั้ง/นาที, ค่า room air O_2 sat $\leq$ 93% พบรอยโรคในปอด > 50% ภาวะหายใจล้มเหลว อวัยวะล้มเหลว หรือเสียชีวิต การวิเคราะห์หาขนาดความสัมพันธ์ระหว่างการสัมผัสปัจจัยและการเกิดโรครุนแรง โดยเปรียบเทียบสัดส่วนการเกิดโรครุนแรงในผู้สัมผัสและไม่สัมผัสปัจจัยใช้สถิติ chi-square โดยนำตัวแปรที่มีค่า p -value < 0.20 จาก univariate analysis มาวิเคราะห์ด้วยวิธี multiple logistic regression คำนวณค่า adjusted odd ratio (OR) ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผล

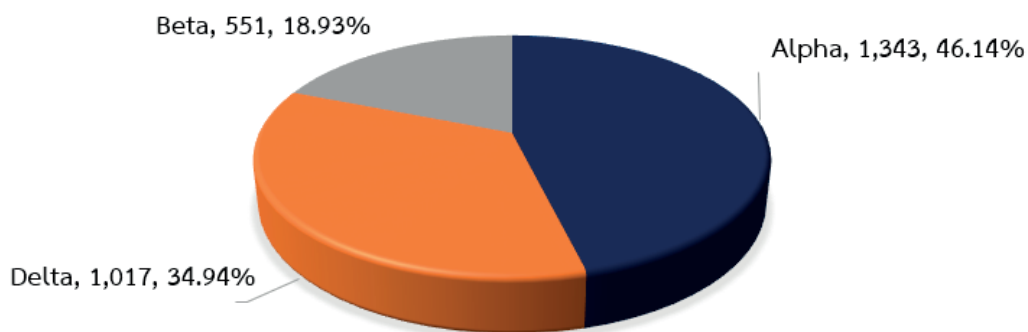
การระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์เบต้า ใน 7 จังหวัด ภาคใต้ตอนล่าง ระหว่าง 1 เมษายน - 30 กันยายน 2564

ขนาดปัญหาและการกระจายของโรคตามเวลา วันที่ 1 เมษายน-30 กันยายน 2564 มีผู้ติดเชื้อทั้งหมด 114,204 ราย ส่งตรวจยืนยันสายพันธุ์ได้ทั้งหมด 2,911 ราย (ร้อยละ 2.55) เป็นเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์อัลฟา 1,343 ราย เดลต้า 1,017 ราย และเบต้า 551 ราย คิดเป็นร้อยละ 46.14, 34.94 และ 18.93 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1 รายงานผู้ติดเชื้อสายพันธุ์อัลฟา เป็นกลุ่มแรกที่อำเภอดำรงวิทยะ จังหวัดสงขลา ส่วนใหญ่มีประวัติเดินทางมาจากกรุงเทพฯ สำหรับผู้ติดเชื้อสายพันธุ์เบต้าพบรายแรกในเดือนพฤษภาคม 2564 สัดส่วนการพบเชื้อสายพันธุ์เบต้าสูงสุดช่วงเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม 2564 และมีแนวโน้มลดลงในเดือน

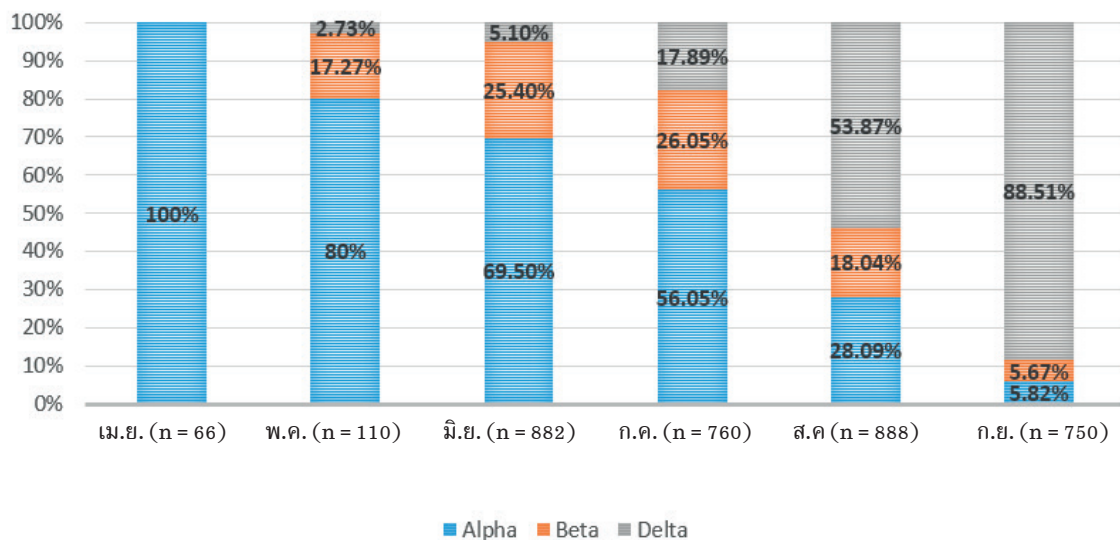
กันยายน 2564 พร้อมๆ กับการเพิ่มสูงขึ้นของการระบาด ของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์เดลต้า ดังแสดง ในภาพที่ 2 มีรายงานผู้ติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์ เบต้ากระจายไปในพื้นที่ 7 จังหวัดภาคใต้ตอนล่าง จังหวัดที่พบสัดส่วนการติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์เบต้าจากทุกสายพันธุ์ในแต่ละจังหวัดสูงสุด 3 ลำดับแรกได้แก่ นราธิวาส 50.78, 34.13 และ 13.66 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3 ผู้ติดเชื้อยืนยันสายพันธุ์เบต้า 551 ราย เป็นเพศชาย 294 ราย เพศหญิง 217 ราย อายุระหว่าง 1-100 ปี (มัธยฐานอายุ 34 ปี) เชื้อชาติไทย ร้อยละ 99.27 (547 ราย) และนับถือศาสนาอิสลาม ร้อยละ 96 จากการวิเคราะห์ข้อมูลรายงานการสอบสวนโรคของ ทีมสอบสวนโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 จังหวัดสงขลา พบว่ามีการระบาดของผู้ติดเชื้อ ไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์เบต้าที่เป็นคลัสเตอร์ ขนาดใหญ่ 2 เหตุการณ์ ได้แก่ 1) การระบาดกลุ่มก้อนแรก ที่อำเภอดำรงวิทยะ จังหวัดนราธิวาส เริ่มมีรายงานตั้งแต่วันที่ 26 เมษายน-23 พฤษภาคม 2564 มีรายงานผู้ติดเชื้อ จำนวน 364 ราย ส่งตรวจยืนยันสายพันธุ์พบเป็น สายพันธุ์เบต้าจำนวน 85 ราย อัตราส่วนเพศชายต่อ หญิงเท่ากับ 1:1 (43/42) อายุระหว่าง 10 เดือน-86 ปี (มัธยฐาน 29 ปี) ผลการสอบสวนพบว่าผู้ป่วยรายแรก เป็นเพศชายอายุ 32 ปี ทำธุรกิจส่วนตัว เริ่มมีไข้ ปวดกล้ามเนื้อวันที่ 26 เมษายน 2564 เข้ารับการรักษา ที่โรงพยาบาลชุมชนแห่งหนึ่งวันที่ 30 เมษายน 2564 และไปตรวจยืนยันพบเชื้อที่โรงพยาบาลเอกชนวันที่ 4 พฤษภาคม 2564 ระยะ 14 วัน ก่อนป่วยมีประวัติเดินทาง ข้ามชายแดนไทย-มาเลเซีย ผ่านช่องทางธรรมชาติ การค้นหาผู้ป่วยเพิ่มเติมด้วยวิธี contact tracing พบอัตราการติดเชื้อในผู้สัมผัสเสี่ยงสูงร้อยละ 11.8 (81/683) และอัตราการติดเชื้อในผู้สัมผัสเสี่ยงต่ำ ร้อยละ 1.9 (3/160) กิจกรรมเสี่ยงสำคัญ ได้แก่ การสัมผัส ในครอบครัว การเยี่ยมผู้ป่วย และกิจกรรมการรวมกลุ่ม วันงานพิธีทางศาสนา (เทศกาลฮารีรายอ) เมื่อวันที่ 13 พฤษภาคม 2564 2) เหตุการณ์การระบาดเป็นกลุ่มก้อน ในโรงเรียนสอนศาสนาแห่งหนึ่ง ซึ่งตั้งอยู่ในศูนย์มัสกิส ยะลา อำเภอมะนัง จังหวัดยะลา เกิดการแพร่กระจาย กว้างขวางในพื้นที่จังหวัดภาคใต้ตอนล่าง พบรายงาน

ผู้ป่วยยืนยันโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 เมื่อวันที่ 9 มิถุนายน 2564 ในกลุ่มนักเรียนประจำชายล้วนประมาณ 500 คน จาก 17 จังหวัดทั่วประเทศ ส่วนใหญ่มีภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดภาคใต้ตอนล่าง การระบาดพบในกลุ่มนักเรียนประจำที่มาทำกิจกรรมในโรงเรียนเพื่อรื้อเปิดภาคเรียน จังหวัดยะลาได้มีการเลื่อนเปิดภาคเรียนทำให้นักเรียนเดินทางกลับภูมิลำเนา และมีรายงานนักเรียนที่กลับไปตรวจพบเชื้อที่จังหวัดภูมิลำเนา ได้แก่ นราธิวาส ปัตตานี สงขลา สตูล กระบี่ พัทลุง นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี พังงา ตรัง และภูเก็ต รวมทั้งมีกลุ่มก้อน

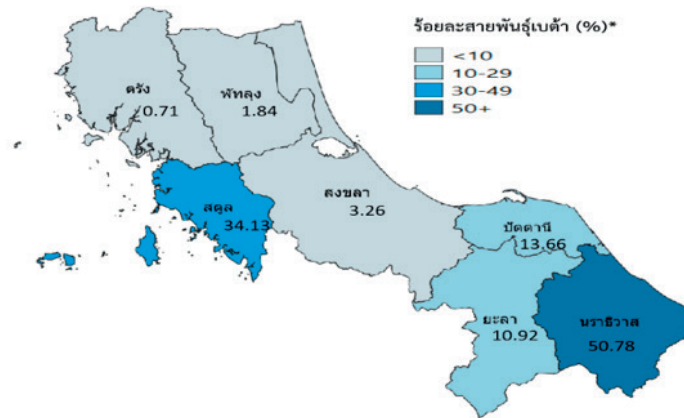
การระบาดตามมาในหลายจังหวัด ผลตรวจเชื้อหาสาเหตุพบทั้งสายพันธุ์อัลฟาและสายพันธุ์เบต้า และพบความเชื่อมโยงกับแหล่งระบาดแรกที่อำเภอตากใบ โดยมีนักเรียนจากอำเภอตากใบมาเข้าร่วมกิจกรรมในโรงเรียนหลังกลับจากเทศกาลฮารีรายอ ปัจจัยเสี่ยงการแพร่โรคในโรงเรียน ได้แก่ การอยู่ร่วมกันอย่างแออัด การสัมผัสใกล้ชิดระหว่างทำกิจกรรมในโรงเรียน การรับประทานอาหารร่วมกันโดยใช้มือหยิบอาหาร การพูดคุยระยะน้อยกว่า 2 เมตร โดยไม่สวมหน้ากากอนามัย เป็นต้น



ภาพที่ 1 สัดส่วนชนิดสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ภาคใต้ตอนล่าง เดือนเมษายน-กันยายน 2564 (n = 2,911)



ภาพที่ 2 สัดส่วนชนิดสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ภาคใต้ตอนล่าง เดือนเมษายน-กันยายน 2564 (n = 2,911)

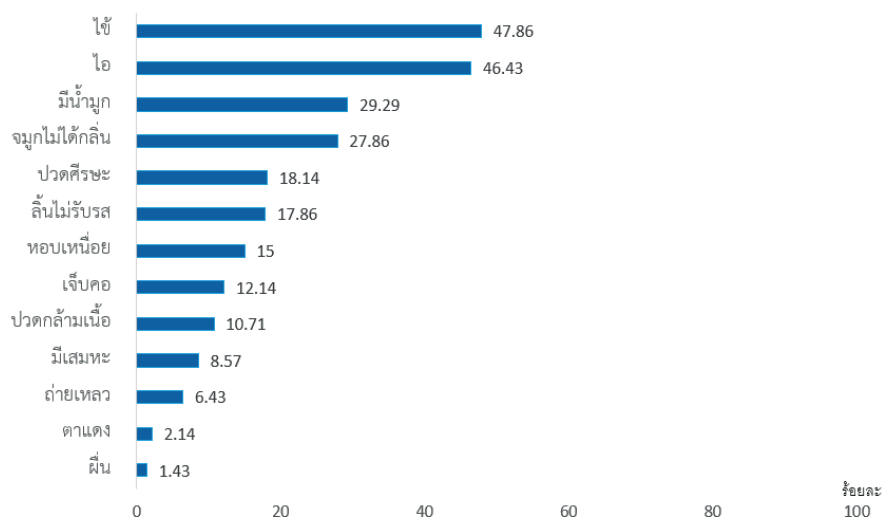


ภาพที่ 3 สัดส่วนเชื้อสายพันธุ์เบต้าจากตัวอย่างที่ยืนยันสายพันธุ์ทั้งหมดรายจังหวัดภาคใต้ตอนล่าง เดือนเมษายน-กันยายน 2564 (n = 551)

ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดอาการรุนแรงของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์เบต้า

จากการทบทวนเวชระเบียนผู้ติดเชื้อ SARS-CoV-2 สายพันธุ์เบต้าในพื้นที่ศึกษาจังหวัดนราธิวาส และจังหวัดสตูล จำนวน 286 ราย คิดเป็นร้อยละ 74.93 ของผู้ติดเชื้อยืนยันสายพันธุ์เบต้าทั้งหมด (286/375) เป็นผู้ติดเชื้ออาการไม่รุนแรง 272 ราย จำแนกเป็นผู้ติดเชื้อไม่มีอาการร้อยละ 51.05 (146/286) อาการเล็กน้อยร้อยละ 39.30 (113/286) และอาการปานกลางร้อยละ 6.29 (18/286) เป็นผู้ติดเชื้ออาการรุนแรงหรือวิกฤตร้อยละ 4.90 (14/286) ในจำนวนนี้เสียชีวิต 6 ราย คิดเป็นอัตราป่วยเสียชีวิตร้อยละ 2.10 (6/286) ร้อยละอาการที่พบมากที่สุด ได้แก่ ไข้ ไอ มีน้ำมูก

จมูกไม่ได้กลิ่น และปวดศีรษะ ดังแสดงในภาพที่ 4 ผู้ติดเชื้ออาการรุนแรงส่วนใหญ่ไม่ได้รับวัคซีน (ร้อยละ 92.86) เป็นเพศชาย (ร้อยละ 71.43) อายุ 60 ปีขึ้นไป (ร้อยละ 64.29) โรคประจำตัวที่พบสัดส่วนสูงสุด คือ โรคเบาหวานและความดันโลหิตสูง (ร้อยละ 28.57) ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มป่วยจนได้รับยา favipiravir 0-8 วัน (มัธยฐาน 3 วัน) ดังแสดงในตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์แบบ multivariate analysis พบว่าปัจจัยที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรครุนแรง ได้แก่ ผู้ที่มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 60 ปี (adjusted OR = 11.26, 95%CI 2.42-52.59) มีประวัติเป็นโรคปอดเรื้อรัง (adjusted OR = 23.80, 95%CI 1.23-458.61) และเพศชาย (adjusted OR = 7.36, 95%CI 1.02-52.76) ดังแสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 4 ร้อยละผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์เบต้าจำแนกตามอาการ จังหวัดนราธิวาสและสตูล เดือนเมษายน-สิงหาคม 2564 (n = 140)

ตารางที่ 1 ลักษณะทางระบาดวิทยาของผู้ติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์เบต้า จังหวัดนราธิวาสและสตูล
เดือนเมษายน-กันยายน 2564 (n = 286)

ปัจจัย		จำนวนทั้งหมด (n = 286)	อาการรุนแรง (n = 14)
เพศ	ชาย	146 (51.05)	10 (71.43)
	หญิง	140 (48.95)	4 (28.57)
อายุ	< 15 ปี	61 (21.33)	0 (0.00)
	15-59 ปี	199 (69.58)	5 (35.71)
	≥ 60 ปี	26 (9.09)	9 (64.29)
โรคเรื้อรัง	เบาหวาน	11 (3.85)	4 (28.57)
	โรคหัวใจ	6 (2.10)	1 (7.14)
	ไตวายเรื้อรัง	3 (1.05)	2 (14.29)
	โรคปอดเรื้อรัง	4 (1.40)	2 (14.29)
	หลอดเลือดสมอง	3 (1.05)	2 (14.29)
	ความดันโลหิตสูง	22 (7.69)	4 (28.57)
BMI	≥ 30	212 (74.13)	8 (57.14)
	< 30	22 (7.69)	1 (7.14)
	ไม่ทราบ	52 (18.18)	5 (35.72)
ตั้งครรภ์	ใช่	2 (0.70)	0 (0.00)
	ไม่ใช่	284 (99.30)	14 (100.00)
วัคซีนโควิด 19	ไม่ได้รับ	280 (97.90)	13 (92.86)
	1 เข็ม/2 เข็มไม่ถึง 14 วัน	4 (1.40)	1 (7.14)
	2 เข็มเกิน 14 วัน	2 (0.70)	0 (0.00)
Favipiravir	ได้รับ	3 (11.19)	8 (57.14)
	ไม่ได้รับ	254 (88.81)	6 (42.86)
Dexamethaxone	ได้รับ	13 (4.92)	8 (57.14)
	ไม่ได้รับ	251 (95.08)	6 (42.86)
วันพบเชื้อถึงรับยา Favipiravir (มัธยฐาน/พิสัย)		3 วัน (0-10 วัน)	3 วัน (0-8 วัน)
วันพบเชื้อถึงรับยา Dexamethaxone (มัธยฐาน/พิสัย)		2 วัน (0-9 วัน)	3 วัน (0-8 วัน)

ตารางที่ 2 ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดอาการรุนแรงของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์เบต้า จังหวัดนราธิวาส และสตูล เดือนเมษายน-กันยายน 2564 (n = 286)

ปัจจัย	อาการรุนแรง	อาการไม่รุนแรง	Crude RR (95%CI)	Adjusted OR (95%CI) [†]
เพศ				
หญิง	4	136	1	1
ชาย	10	136	2.40 (0.77-7.47)	7.36 (1.02-52.76)*
อายุ				
< 60 ปี	5	255	1	1
≥ 60 ปี	9	17	18.00 (6.51-49.73)*	11.26 (2.42-52.59)*
โรคเบาหวาน				
ไม่มี	10	265	1	1
มี	4	7	10.00 (3.71-26.93)*	6.12 (0.48-78.43)
ความดันโลหิตสูง				
ไม่มี	10	254	1	1
มี	4	18	4.8 (1.64-14.06)*	1.16 (0.15-8.99)
โรคหัวใจ				
ไม่มี	13	267	1	1
มี	1	5	3.59 (0.55-23.20)	0.39 (0.01-16.20)
โรคปอดเรื้อรัง				
ไม่มี	12	270	1	1
มี	2	2	11.75 (3.81-36.21)*	23.80 (1.23-458.61)*
โรคหลอดเลือดสมอง				
ไม่มี	12	271	1	1
มี	2	1	15.72 (5.94-41.60)*	21.95 (0.93-518.7)
BMI ≥ 30				
ไม่มี	8	204	1	-
มี	1	21	1.20 (0.16-9.19)	
วัคซีน ≥ 1 เข็ม				
ไม่ได้รับ	13	267	1	-
ได้รับ	1	5	3.59 (0.56-23.20)	

หมายเหตุ * หมายถึง มีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$, [†]วิเคราะห์ multivariate analysis เฉพาะตัวแปรที่ $p\text{-value} < 0.2$ จาก univariate analysis

วิจารณ์

การระบาดของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์เบต้าพบในทั้ง 7 จังหวัดภาคใต้ตอนล่าง ได้แก่ นราธิวาส สตูล ปัตตานี ยะลา สงขลา พัทลุง และตรัง โดยการระบาดเริ่มต้นปลายเดือนเมษายน 2564 ตรวจพบครั้งแรกเดือนพฤษภาคม 2564 พบการระบาดสูงสุดในเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม 2564 หลังจากนั้นสัดส่วนการพบเชื้อแนวโน้มลดลง สัดส่วนการพบเชื้อสะสมของสายพันธุ์เบต้าในจังหวัดภาคใต้ตอนล่างน้อยกว่าสายพันธุ์อัลฟาและเดลต้า ซึ่งเป็นสายพันธุ์หลักของการระบาดระลอกเดือนเมษายน 2564 ระหว่างเดือนเมษายน-กรกฎาคม และเดือนสิงหาคม-กันยายน 2564 ตามลำดับ สอดคล้องกับข้อมูลทางวิชาการที่พบว่าความสามารถการแพร่โรคของสายพันธุ์เบต้าเพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ดั้งเดิมร้อยละ 50 ส่วนสายพันธุ์อัลฟาเพิ่มขึ้นร้อยละ 40-80 และเดลต้าเพิ่มขึ้นสูงสุดร้อยละ 97 โดยมีค่า reproductive number ของสายพันธุ์เดลต้าระหว่าง 3.2-8.0 (เฉลี่ย 5.08)⁽¹⁰⁻¹²⁾ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าผู้ติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์เบต้าส่วนใหญ่อาการไม่รุนแรง มีผู้ติดเชื้อไม่แสดงอาการร้อยละ 50 และอัตราป่วยตายร้อยละ 2.1 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่รายงานว่าเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์เบต้า ไม่ได้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม⁽¹¹⁾

ผลการสอบสวนพบแหล่งโรคแรกของการระบาดสายพันธุ์เบต้า เกิดจากการนำเชื้อเข้าจากประเทศเพื่อนบ้าน ซึ่งพบการระบาดของสายพันธุ์ดังกล่าวในขณะนั้น โดยการลักลอบเข้าออกผ่านช่องทางธรรมชาติ จึงไม่ได้รับการกักกันและคัดกรองตามแนวทางปกติ ซึ่งเป็นหนึ่งในปัญหาสำคัญ ทำให้ประสิทธิภาพการสกัดกั้นการนำเข้าจากต่างประเทศของจังหวัดชายแดนภาคใต้ตอนล่างลดลง ผู้ป่วยรายแรกไปรับการรักษาที่สถานพยาบาลแห่งที่หนึ่ง หลังเริ่มป่วย 4 วัน ด้วยอาการเริ่มต้นมีไข้ ปวดกล้ามเนื้อแต่ไม่ได้รับการวินิจฉัย จนกระทั่งไปตรวจที่โรงพยาบาลแห่งที่สอง จึงถูกวินิจฉัยยืนยันโรคโควิด 19 จากรายงานสอบสวนโรคสมมติฐานเกิดจากการไปโรงพยาบาลครั้งแรก ผู้ป่วยยังไม่มีอาการระบบทางเดินหายใจชัดเจนและไม่ได้ให้ประวัติความเสี่ยงเรื่องการเดินทาง

หรือประวัติการสัมผัสโรค ทำให้แพทย์ผู้รักษาไม่ได้ส่งตรวจยืนยัน ดังนั้นประวัติการเดินทาง ประวัติเสี่ยงต่อการสัมผัสโรคมีความสำคัญมาก ถ้าผู้ป่วยและบุคลากรการแพทย์มีความตระหนัก สื่อสารกันได้ชัดเจนจะทำให้การวินิจฉัยเร็วขึ้นและลดการแพร่เชื้อในวงกว้าง

ปัจจัยสำคัญหนึ่งในการแพร่ระบาดของสายพันธุ์เบต้าในวงกว้างของภาคใต้ตอนล่าง คือ การสัมผัสใกล้ชิดผ่านกิจกรรมรวมกลุ่มทางศาสนา ได้แก่ การรวมกลุ่มในวันอีฎิ้ลฟิตริ และการรวมกลุ่มในโรงเรียนสอนศาสนา เช่นเดียวกับการระบาดระลอกแรกของภาคใต้ตอนล่างซึ่งพบว่าการรวมกลุ่มทางศาสนาเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญ⁽¹³⁾ การสร้างความเข้าใจ ความตระหนักให้เกิดการยอมรับมาตรการเว้นระยะห่าง สวมหน้ากาก ล้างมือ หลีกเลี่ยงการรวมกลุ่มในสถานการณ์ระบาด รวมทั้งมาตรการคัดกรองตรวจหาเชื้อในกลุ่มเสี่ยงจึงมีความสำคัญมากในการป้องกันการระบาดในภาคใต้ตอนล่างในอนาคต

การศึกษานี้พบปัจจัยที่สัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อโรครุนแรง ได้แก่ ผู้ที่มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 60 ปี ผู้ที่มีประวัติโรคปอดเรื้อรังและเพศชาย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาระบาดของผู้เสียชีวิตจากโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 จำนวน 58 รายแรกของประเทศไทยพบว่าอัตราป่วยตายเพิ่มสูงขึ้นในผู้สูงอายุและพบอัตราป่วยตายเพศชายสูงกว่าเพศหญิง⁽¹⁴⁾ จากการศึกษาในประเทศจีนพบว่าผู้สูงอายุมากกว่า 60 ปี อัตราป่วยตายร้อยละ 3.6-14.8 สูงกว่ากลุ่มอายุต่ำกว่า ซึ่งมีอัตราป่วยตายระหว่างร้อยละ 0.2-1.3⁽¹⁵⁾ และผู้ป่วยที่มีประวัติเป็นโรคปอดเรื้อรัง มีอัตราป่วยตายเท่ากับร้อยละ 6.3 สูงกว่าผู้ไม่มีโรคประจำตัวซึ่งอัตราป่วยตายเท่ากับ 0.9⁽¹⁵⁾ จากข้อมูลทางวิชาการพบว่าผู้มีโรคเรื้อรังอื่นๆ ได้แก่ โรคเบาหวาน โรคหัวใจ และหลอดเลือด โรคหลอดเลือดสมอง รวมทั้งภาวะอ้วนเพิ่มความเสี่ยงต่อการป่วยด้วยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ที่มีอาการรุนแรง⁽¹⁶⁾ แต่จากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ในการวิเคราะห์แบบ multivariate analysis เนื่องจากขนาดกลุ่มตัวอย่างที่มีอาการรุนแรงน้อยไม่เพียงพอที่จะทำให้เห็นความแตกต่าง⁽¹⁷⁾

สรุป

ระหว่างวันที่ 1 เมษายน-30 กันยายน 2564 พบผู้ติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์เบต้าในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง จำนวน 551 ราย จากผู้ป่วยยืนยันทุกสายพันธุ์ 2,911 ราย คิดเป็นร้อยละ 18.93 อายุมีฐาน 34 ปี นับถือศาสนาอิสลามร้อยละ 96 พบสูงสุดใน 3 จังหวัด ได้แก่ นราธิวาส สตูล และปัตตานี ในกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 สายพันธุ์เบต้าจำนวน 286 ราย มีอาการรุนแรงหรือเสียชีวิต 14 ราย ปัจจัยที่สัมพันธ์กับการเกิดโรครุนแรงหรือเสียชีวิต ได้แก่ ผู้ที่มีอายุตั้งแต่ 60 ปี และผู้ที่มีโรคประจำตัวเรื้อรัง การระบาดของเชื้อ SARS-CoV-2 สายพันธุ์เบต้าในภาคใต้ตอนล่างเกี่ยวข้องกับการลักลอบเข้าประเทศ และกิจกรรมรวมกลุ่มทางศาสนา ควรเพิ่มมาตรการเฝ้าระวังพื้นที่ชายแดน การป้องกันการป่วยรุนแรง และเสียชีวิตเน้นมาตรการป้องกันควบคุมโรคและความครอบคลุมวัคซีนในผู้สูงอายุและผู้มีโรคเรื้อรัง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดนราธิวาส สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดปัตตานี สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสตูล สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดยะลา สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสงขลา สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดตรัง และสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดพัทลุง ที่ให้ความอนุเคราะห์ อำนวยความสะดวกแก่ผู้ศึกษาในการรวบรวมข้อมูลในครั้งนี้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19). [online]. 2021; [cited 2021 Dec 24]. Available from: URL: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19>.
2. Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. Laboratory diagnosis of COVID-19: current issues and challenges. J Clin Microbiol 2020; 58(6): e00512-20.
3. World Health Organization. Origin of SARS-CoV-2. [online]. 2020; [cited 2021 Aug 14]; [2 screens]. Available from: URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332197/WHO-2019-nCoV-FAQ-Virus-origin-2020.1-eng.pdf>.
4. World Health Organization. WHO-convened global study of origins of SARS-CoV-2: China part. [online]. 2021; [cited 2021 Aug 14]; [120 screens]. Available from: URL: <https://www.who.int/publications/i/item/who-convened-global-study-of-origins-of-sars-cov-2-china-part>.
5. ProMED-mail. Novel coronavirus (02): Thailand ex China (HU) WHO. Archive Number: 20200113.6886644. [online]. 2020; [cited 2022 Jan 19]. Available from: URL: <https://promedmail.org/promed-post/?id=20200113.6886644>.
6. Cov-lineages.org. Lineage list. [online]. 2019; [cited 2022 Jan 19]. Available from: URL: https://cov-lineages.org/lineage_list.html.
7. World Health Organization. Episode #39-update on virus variants. [online]. 2021; [cited 2022 Jan 14]. Available from: URL: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/media-resources/science-in-5/episode-39---update-on-virus-variants>.
8. World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants. [online]. 2021; [cited 2022 Jan 19]. Available from: URL: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>.
9. World Health Organization. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. [online]. 2020; [cited 2022 Jan 14]; [2 screens]. Available from: URL: <https://www.who.int/emergencies/>

- [diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it.](#)
10. Liu Y, Rocklöv J. The reproductive number of the Delta variant of SARS-CoV-2 is far higher compared to the ancestral SARS-CoV-2 virus. *J Travel Med* 2021; 28(7): taab124. (3 pages).
 11. Manatu H. Covid-19 variants update. [online]. 2021; [cited 2021 Nov 28]; [67 screens]. Available from: URL: https://www.health.govt.nz/system/files/documents/pages/variants-update-27-april-2022_0.pdf.
 12. Paredes MI, Lunn SM, Famulare M, Frisbie LA, Painter I, Burstein R, et al. Associations between SARS-CoV-2 variants and risk of COVID-19 hospitalization among confirmed cases in Washington State: a retrospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2022; ciac279. (19 pages).
 13. Phiriyasart F, Chantutanon S, Salaeh F, Roka A, Thepparat T, Kaesaman S, et al. Outbreak investigation of coronavirus disease (COVID-19) among Islamic missionaries in southern Thailand, April 2020. *OSIR Journal* 2020; 13(2): 48-54.
 14. Chailek C, Taweewigyakarn P, Yimchoho N, Saritapirak N, Namwat C, Sawanpanyalert N. Epidemiological characteristics and medical visits of the first 58 COVID-19 deaths, January-June 2020, Thailand. *OSIR Journal* 2021; 14(1): 1-11.
 15. Team E. The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19)-China, 2020. *China CDC Wkly* 2020; 2(8): 113-22.
 16. Centers for Disease Control and Prevention. COVID-19. [online]. 2022; [cited 2022 May 08]. Available from: URL: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov>.
 17. Mysiak K. The relationship between significant, power, sample size & effect size. [online]. 2020; [cited 2022 May 08]; [9 screens]. Available from: URL: <https://towardsdatascience.com/the-relationship-between-significant-power-sample-size-effect-size-899fcf95a76d>.

Epidemiology of SARS-CoV-2 Beta Variant (B.1.351) and Risk Factors for Severe Illness in the Southernmost Provinces of Thailand, April–September 2021

Sawanya Chantutanon¹ and Choopong Sangsawang²

¹ Office of Disease Prevention and Control 12 Songkhla, Songkhla 90000, Thailand

² Field Epidemiology Training Center (FETC), Office of Disease Prevention and Control 12 Songkhla, Songkhla 90000, Thailand

ABSTRACT This study aimed to explore the epidemiology of the SARS-CoV-2 Beta variant (B.1.351) outbreak in the seven southernmost provinces of Thailand. A cross-sectional study was conducted on confirmed Beta variant cases. The surveillance and case investigation data of the Office of Disease Prevention and Control 12 Songkhla were reviewed from 1 April to 30 September 2021. The Beta variant was confirmed in 551 cases (18.93%) out of 2,911 lineage-known SARS-CoV-2 cases. The top three highest proportions of Beta-variant cases were found in Narathiwat, Satun and Pattani provinces at 50.78%, 34.13% and 13.66%, respectively. Of all cases, 294 were male and 217 were female. The age range was 1–100 years (median 34 years). Most of cases were Thai (99.27%), most of whom were Muslim (96%). The first cluster of Beta variant was found in May 2021, while the peak of cases occurred in July 2021. Risk factors of the outbreak were gatherings in Islamic activities. The retrospective cohort study was conducted by reviewing outpatient cards and investigation documents of 286 patients (including 14 severely ill cases or deaths) who were diagnosed with Beta variant in Narathiwat and Satun from 1 April to 30 September 2021. The risk factors of severe or dead cases were age over 60 years (adjusted OR = 11.26, 95%CI: 2.42–52.59), chronic lung diseases (adjusted OR = 23.80, 95%CI: 1.23–458.61) and male gender (adjusted OR = 7.36, 95%CI: 1.02–52.76). Risk factors of the Beta variant outbreak were illegal influx across the Thai-Malaysian border and Islamic gatherings. Thus, the following should be undertaken: strengthening border surveillance to prevent illegal influx; banning religious gatherings, and improving vaccination coverage in elderly and chronically ill persons.

Keywords: COVID-19, Beta variant, Risk factors for severe illness, Southernmost provinces of Thailand

Anti-SARS-CoV-2 Activity Screening of the Selected Thai Medicinal Plants and Potential Host-target Molecules

Sarayut Radapong,¹ Tiyanee Sahad,¹ Nathaphat Harnkit,¹ Praw Suppajariyawat,¹ Pilailuk Akkpaiboon Okada,² Wandee Meechalad,² Pornchai Sincharoenpokai,¹ Somchit Niumsukul,¹ Sekrachatakorn Buaboa,¹ Sakwichai Ontong,¹ Kenneth J. Ritchie³, and Siriwan Chaisomboonpan¹

¹Medicinal Plant Research Institute, ²National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

³Center for Natural Products Discovery (CNPD), Liverpool John Moores University, Byrom Street, Liverpool L3 3AF, United Kingdom

ABSTRACT Coronavirus disease 2019 (COVID-19), the pandemic, is caused by a virus called SARS-CoV-2. The objective of this study was to investigate the anti-SARS-CoV-2 properties of some selected medicinal plants used as antipyretic in Thai traditional medicines. They were screened for anti-SARS-CoV-2 activity using plaque reduction assay. The extracts were further investigated for activity in enzymatic inhibition and gene expression assays of several host-target molecules. The results revealed that the aqueous extracts of *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze (HSF, HSD) and *Helicteres isora* L. (HID) at the highest concentrations of 5, 5 and 10 mg/mL showed the highest anti-SARS-CoV-2 activities of 100%, 100% and 99.49%, respectively. Rosmarinic acid (RA), one of the phytochemicals found in *M. suaveolens* (L.) Kuntze and *H. isora* L., at 0.625 mg/mL, gave an antiviral activity of 94.49%. RA also showed the highest relative ACE2 inhibition of 70.25% at 100 µg/mL with no toxicity to the cells, whereas the other extracts showed a lower level of relative ACE2 inhibition. RA also reduced the expression of ACE2 and TMPRSS2 but not PIKfyve or cathepsin L in Calu-3, lung epithelial cell lines. In conclusion, HSF, HSD, HID and RA provided anti-SARS-CoV-2 activity, which could limit the viral infection in the early phase. The extracts should be further investigated for anti-SARS-CoV-2 activity in animals and clinical trials for development as herbal drugs.

Keywords: Anti-SARS-CoV-2 activity, ACE2 inhibition, Target molecules, COVID-19

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

Received: 31 January 2022

Revised: 9 March 2022

Accepted: 2 June 2022

Introduction

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is caused by a virus called SARS-CoV-2. Patients will develop respiratory symptoms, including fever, cough, and shortness of breath or difficulty breathing.⁽¹⁾ It can cause complications such as pneumonia, kidney failure or even death. It was first detected in December 2019 in Wuhan, China. The World Health Organization then declared an international public health emergency and a global pandemic in March 2020. Currently, Thailand has cumulatively 2.8 million infected cases and 22,849 deaths, whereas globally there have been 285 million cases and 5.4 million deaths (February 2022).⁽¹⁾ The Economist magazine reported the value of global economic losses in 2020–2021 due to the coronavirus pandemic at \$10.3 trillion based on a 6.6% drop in global GDP compared to forecasts in the absence of COVID-19. The total economic damage to Thailand is estimated at 18.4 trillion baht.⁽²⁾ The COVID-19 outbreak now has a huge impact on the people and economies around the world. The Thai government has issued various policies and measures to help alleviate the suffering of the affected people by developing or adopting vaccines, medicines and related medical products. It is very important for the treatment and prevention of this virus. However, vaccine and drug development takes a long time and costs a lot of money. The use of herbal medicines or traditional medicines that could prevent, cure or reduce illnesses from COVID-19 is another alternative measure. Thus, such health products or modern drugs have to be developed.

From such events, some people have turned to use medicinal plants or alternative

medicines, which are recorded in the Thai Herbal Pharmacopoeia or other traditional pharmacopoeia. Most of them showed antipyretic property and alleviating viral diseases including *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees (Family Acanthaceae), *Cinnamomum verum* J.Presl. (Family Lauraceae), *Cinnamomum bejolghota* (Buch.-Ham.) Sweet (Family Lauraceae), *Houttuynia cordata* Thunb. (Family Saururaceae), *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels (Family Menispermaceae), *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze (Family Lamiaceae), *Cinchona calisaya* Wedd. (Family Rubiaceae), *Helicteres isora* L. (Family Malvaceae) or even *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker (Family Zingiberaceae). Some of them were reported to alleviate symptoms or inhibit the coronavirus. *A. paniculata* (Burm.f.) Nees extract capsules containing 60 mg andrographolide were reported to reduce fever, cough, sore throat, sputum volume and headache in COVID-19 clinical trials.⁽³⁾ *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. (Family Zingiberaceae) and *Zingiber officinale* Roscoe (Family Zingiberaceae) extracts showed potent activity against COVID-19 *in vitro* in the pre-entry and post-infection stages.⁽⁴⁾ Procyanidin A2, procyanidin B1 and cinnamtannin B1 in *C. verum* J.Presl. posed activity against SARS-CoV by inhibiting clathrin-mediated endocytosis.⁽⁵⁾ Moreover, quercetin, the active compound in *H. cordata* Thunb., was found to inhibit chymotrypsin-like cysteine protease (3CLpro) of SARS-CoV-2.⁽⁶⁾

The infection process of the virus begins with the virus entering the cell by attaching a spike (S) glycoprotein to human receptor cells. The main receptor is the host angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor, which is

cleavaged together with transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2) before endocytosis. Once it enters the cell, the virus also needs the PIKfyve enzyme to form an endosome and transport virus particles in the cytoplasm. This process also needs cathepsin L protease, which is responsible for endosome maturity. The inhibition of PIKfyve and cathepsin L protease has been shown to be effective against SARS-CoV-2, Ebola virus (EBOV) and African swine fever in the early and middle stages of the infection. The virus then gets disassembled to release the nucleocapsid and the viral genome. The transcription process utilizes RNA-dependent RNA synthesis to generate mRNAs to translate into structural and non-structural proteins. Finally, the virion progeny is generated via rough ER, Golgi apparatus and exocytosis.⁽⁷⁾

This research, therefore, aimed to investigate the antiviral property of the medicinal plant extracts to the main host receptors and proteases focusing on ACE2 and others such as TMPRSS2, PIKfyve and cathepsin L, which were involved in the pre-entry and early phases of infection.

Materials and Methods

Cell culture

Vero E6 cells, African green monkey kidney epithelial cells (ATCC, NY, USA), were used in antiviral property investigation. Calu-3, lung epithelial cell line (ATCC, NY, USA), was used in the gene expression assay. The cells were grown in Eagle's minimum essential medium (EMEM) (Gibco, NY, USA) containing 2 mM L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acid, 1 mM sodium pyruvate and 10% fetal bovine serum at 37°C in a 5% CO₂ incubator.

Virus

SARS-CoV-2 (Delta variant/EPI_ISL_3797061) was obtained from a human nasopharyngeal swab. The virus was propagated in Vero E6 cells by three passages to establish a high-titer stock and stored at -80°C for use in all experiments. Virus titration as TCID₅₀ titer/mL was performed. All the experiments with live SARS-CoV-2 were performed at a certified biosafety level 3 facility of the National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Thailand.

Standards

Rosmarinic acid (RA) (> 98% HPLC grade) and quinine sulfate (QS) (> 98% HPLC grade) from Merck KGaA (Darmstadt, Germany) were used.

Plant Materials

Fresh aerial parts of *M. suaveolens* (L.) Kuntze and green-brown fruits of *H. isora* L. were collected from Kanchanaburi province, Thailand, in February 2019 and September 2020, respectively, while fresh leaves of *T. triandra* (Colebr.) Diels, fresh bark of *C. calisaya* Wedd. and fresh rhizomes of *K. parviflora* Wall. ex Baker were from Phetchaburi, Chiang Mai and Tak provinces, Thailand, in October 2020, December 2020 and January 2021, respectively. The plants were identified by Mr. Sakwichai Ontong, a botanist, based on the plant identification handbook of Royal Botanic Gardens, Kew, London, United Kingdom. Voucher specimens were collected as DMSC5291, DMSC5270, DMSC5240, DMSC5295 and DMSC5285 for *M. suaveolens* (L.) Kuntze, *H. isora* L., *T. triandra* (Colebr.) Diels, *C. calisaya* Wedd. and *K. parviflora*

Wall. ex Baker, respectively. All of them were deposited at the DMS International Herbarium, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health.

Plant Extraction

The plant parts were cleaned up with tap water, cut into small pieces about 1 cm in length. For the dried plant extraction of *M. suaveolens* (L.) Kuntze, *H. isora* L., and *K. parviflora* Wall. ex Baker, the materials were dried in a hot air oven at 45–50 °C for 24–48 hours and then ground into powder. The dried powder then was refluxed with distilled water (360 g of the powder in 3 L of water), the plant part was filtered and passed through the extraction process with distilled water two times consecutively. The aqueous extract of each plant, *M. suaveolens* (L.) Kuntze, *H. isora* L., and *K. parviflora* Wall. ex Baker, was then pooled, concentrated and dried by rotary evaporation yielding HSD, HID and KPD extracts, respectively. The dried extracts were collected and kept in a light protective bottle at –20 °C until use. For the fresh parts extraction of *M. suaveolens* (L.) Kuntze, *T. triandra* (Colebr.) Diels and *C. calisaya* Wedd., fresh small pieces were ground and then the extractions were conducted using the same procedure, but with lyophilization instead of rotary evaporation to dry the powder, and yielding HSF, TTF and CCF extracts, respectively.

The extracts were also analyzed for its phytochemical compounds with quality control using high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector. Rosmarinic acid was used as a standard for HSF, HSD and HID, whereas quercetin, quinine sulfate and 5-hydroxy-7-methoxy flavanone were used for TTF, CCF and KPD, respectively. The plant extractions with the quality control were

conducted at the Herbal Quality Assurance Center, Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences. The data will be further published elsewhere.

MTT assay

The cells were seeded at 5×10^3 cells in 100 μ L medium per well of 96-well plates and left in the incubator for 24 hours. The medium was removed and the cells were treated with eight different concentrations of each compound in triplicate and then incubated for 48 hours. The medium was replaced with 200 μ L MTT reagent and then continued to incubate for 4 hours. The MTT solution was discarded and 200 μ L DMSO was added to each well to dissolve the purple formazan product. The absorbance of the formazan product of viable cells was read using the microplate reader at 570 nm. The background absorbance was reduced by the blank and %viability was calculated compared to the control.

Anti-SARS-CoV-2 activity screening using plaque reduction assay

This assay was designed to investigate the antiviral property at the pre-entry phase modified from Kanjanasirirat, P. *et al.*, (2020).⁽⁴⁾ The extracts were pre-incubated with SARS-CoV-2 at 37 °C for 1 hour before transferring 200 μ L of the solution with virus particles onto the monolayer of vero E6 cells. Viral adsorption was allowed for 1 hour in the CO₂ incubator. The cells were washed with a fresh medium to remove both the unbound viral particles and the extract/compound. Then 3 mL overlaid medium was added into the wells. The semi-solid medium was allowed to set and all plates were placed in the incubator for 7 days. The overlaid

medium was discarded and cells were fixed with 5% formaldehyde and then stained with 0.5% (w/v) crystal violet. The excess colour was washed with tap water. The plaques were counted and % inhibition was calculated compared to the controls (without the compound). All extracts were used at previously determined non-toxic concentrations.

ACE2 inhibition assay

The enzymatic inhibition assay was conducted using angiotensin II converting enzyme (ACE2) activity assay kit (Abcam, MA, USA) at the Toxicology Laboratory, Department of Medical Sciences. The enzyme solution and reagents were prepared following the procedure described in the manufacturer's protocol. The plant extracts were diluted with water at the highest concentration, which was not toxic to Calu-3 cells. Totally, 48 μ L of ACE2 assay buffer was mixed with 2 μ L diluted ACE2 enzyme solution and then the solution was added to the diluted extracts or the standard inhibitor (the background and enzyme controls were also tested). The mixed solutions were placed at room temperature for 15 min. Totally, 40 μ L ACE2 substrate mix was then added to the wells and immediately placed in spectrofluorometer and the fluorescence signal (Ex/Em = 320/420 nm) was measured after being in kinetic mode for 1 hour. The relative inhibition activity (%) of the sample was calculated using a relative fluorescence unit (RFU) compared to enzyme control.

Gene expression using real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Calu-3 cells were seeded at 5×10^5 cells/well in 6-well plates for 24 hours and then treated with the compounds or extracts at concentrations

that were not toxic to the cells for 24 hours. Total RNA of each sample was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). According to the manufacturer's protocol, RNA was re-suspended in 30 μ L of nuclease-free water and then the products were run on agarose gels to check the quality of the RNA. cDNA was synthesized using QuantiTect Rev. Transcription Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's protocol. Briefly, 2 μ g template RNA was added to the reverse-transcription master mix and then the samples tubes were incubated at 42 °C for 15 min. The cDNA samples were tested in triplicate with quantitative PCR using a QuantiTect SYBR Green PCR Reagents kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Totally, 2 μ L of each sample was mixed with SYBR Green PCR Master Mix and 10x QuantiTect Primers (Qiagen, Valencia, CA, USA), and then the real-time PCR (RT-qPCR) was performed using the manufacturer's protocol in Thermal cycler (PCR) (Analytik Jena GmbH, Valencia, Jena, Germany). mRNA ratios relative to the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) housekeeping gene were calculated for the standardization of gene expression levels. A melting curve analysis was also performed to verify the specificity and identity of PCR products. For selected genes, the data were analyzed using the equation described by Livak and Schmittgen⁽⁸⁾ as follows: the amount of target = $2^{-\Delta\Delta Ct}$. The average ΔCt from the untreated cells is a calibrator for each gene tested. This assay was conducted at the Toxicology Laboratory, Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences.

Statistical analysis

The total percentage of plaque reduction assay was expressed in the mean of duplicated

experiments. The percentage of relative ACE2 inhibition and relative quantity of mRNA expression was expressed as mean $\pm$ SD (n = 3). Statistical analysis of ACE2 enzymatic inhibition and gene expression of mRNA was carried out using the one-way analysis of variance followed by Dunnett's test.

Results

The six aqueous extract - HSF, HSD, HID, TTF, CCF and KPD - were obtained using reflux method and dried with rotary evaporation or

using lyophilization technique. The highest percentage yield was for TTF at 20.74%, while those for HSD, HID, KPD, CCF, and HSF were 20.11%, 14.32%, 11.72%, 10.12% and 2.18%, respectively. RA quantities determined by using HPLC analysis in HSF, HSD and HID extracts were 0.35 $\pm$ 0.02%, 0.18 $\pm$ 0.01% and 0.29 $\pm$ 0.01% (w/w), respectively. The weight of the plant materials and the percentage yields for the six extracts were shown in Table 1 and the chemical profiles of RA in HSF, HSD and HID were provided in Figure 1.

Table 1 Percentage yields of the herbal extracts

Extracts	Plant	Parts used	Weight		Yield (%)
			Plant materials (g)	Extracts (g)	
HSF	<i>M. suaveolens</i> (L.) Kuntze	Fresh aerial parts	1,200	26.20	2.18
HSD	<i>M. suaveolens</i> (L.) Kuntze	Air-dried aerial parts	360	72.42	20.11
HID	<i>H. isora</i> L.	Air-dried fruits	800	114.56	14.32
TTF	<i>T. triandra</i> (Colebr.) Diels	Fresh leaves	160	33.19	20.74
CCF	<i>C. calisaya</i> Wedd.	Fresh barks	500	55.60	10.12
KPD	<i>K. parviflora</i> Wall. ex Baker	Air-dried rhizomes	600	70.33	11.72

The activities of the plant extracts to reduce the pre-entry phase of SARS-CoV-2 were evaluated. Vero E6 cells were used as host cells for the virus. The percentage of the plaque reduction was calculated compared with the virus controls. HSD and HSF showed the highest plaque reduction of 100% at 5 mg/mL

while HID, TTF, CCF, KPD and RA gave lower plaque reduction of 99.49%, 95.95%, 88.95%, 85.24% and 94.49% at 10, 10, 0.625, 2.5 and 0.625 mg/mL, respectively. The anti-viral activities at different concentrations of the six extracts were shown in Table 2.

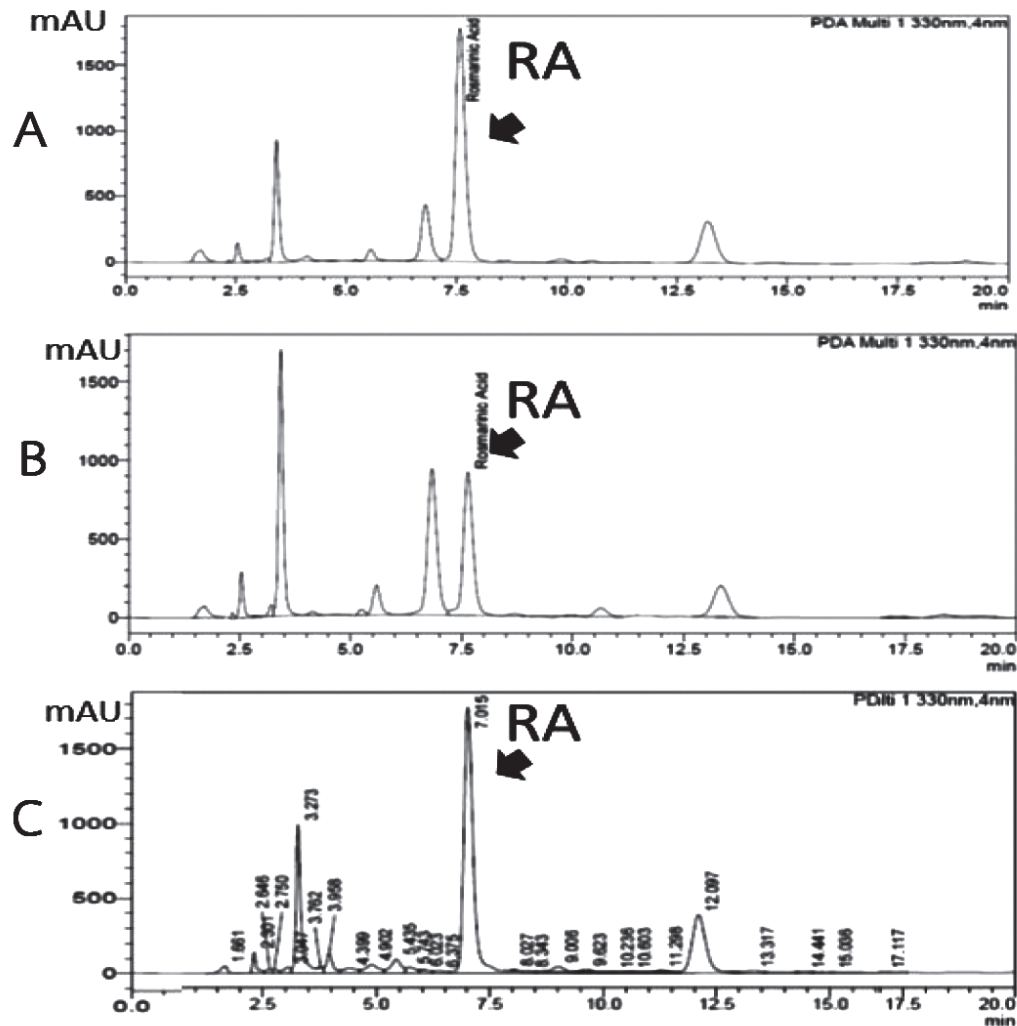


Figure 1 Chromatograms of rosmarinic acid in the three extracts, inj. vol. 10 μ L, monitored at 330 nm A) HSF at 0.836 mg/mL; B) HSD at 0.479 mg/mL; C) HID at 0.747 mg/mL.

Table 2 Antiviral activities at the highest concentrations of the herbal aqueous extracts which were not toxic to the cells. The data was expressed as the mean, n = 2.

Herbal extracts/ compounds	The highest concentration tested (mg/mL)	Plaque reduction (%)
HSD	5.000	100.00
HSF	5.000	100.00
HID	10.000	99.49
TTF	10.000	95.95
CCF	0.625	88.95
KPD	2.500	85.24
RA	0.625	94.49
QS	0.250	81.65

ACE2 enzymatic inhibition of the extracts was evaluated at the highest concentration, which was not toxic to Calu-3 cells. HSD, HID and RA showed the inhibition activities in the dose-response relationship. RA showed the highest activity compared to others giving the relative inhibition values of 70.25%, 55.03% and 40.00% at the doses of 100, 50 and 25 $\mu\text{g/mL}$,

respectively. HSD showed the inhibition values of 40.37%, 25.83% and 11.20% at the doses of 200, 100 and 50 $\mu\text{g/mL}$, respectively, while HID's inhibition values were 20.88%, 18.53% and 12.79% at the doses of 50, 25 and 12.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively. ACE2 enzymatic inhibition values at different concentrations of HSD, HID and RA were shown in Figure 2.

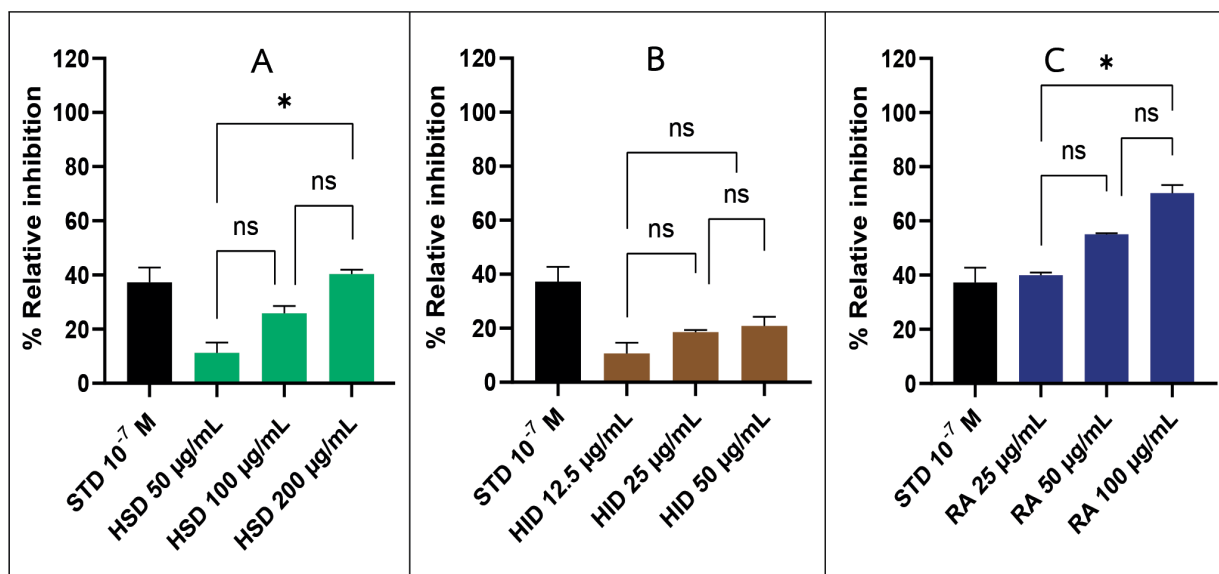


Figure 2 ACE2 enzymatic inhibitory activity at the concentrations which were not toxic to Calu-3 cells of the standard inhibitor (STD), (A) HSD, (B) HID and (C) RA. The data was expressed as mean $\pm$ SD, $n = 3$. Statistical analysis was carried out using One-Way analysis of variance followed by Dunnett's test ($*p < 0.5$).

Gene expression assay of four main genes for viral entry and progression processes was conducted. The lung cells were treated with RA at the concentrations of 25, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$. ACE2 and TMPRSS2 genes were down-regulated compared to the untreated control and demonstrated a dose-response relationship, whereas the expression of PIKfyve and cathepsin L

remained the same at the doses of 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$. At the highest concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$, RA up-regulated PIKfyve and cathepsin L (around 1.4- to 2-fold increase at 100 $\mu\text{g/mL}$). The mRNA expression data of ACE2, TMPRSS2, PIKfyve and cathepsin L in Calu-3 cells treated with different RA concentrations were shown in Figure 3.

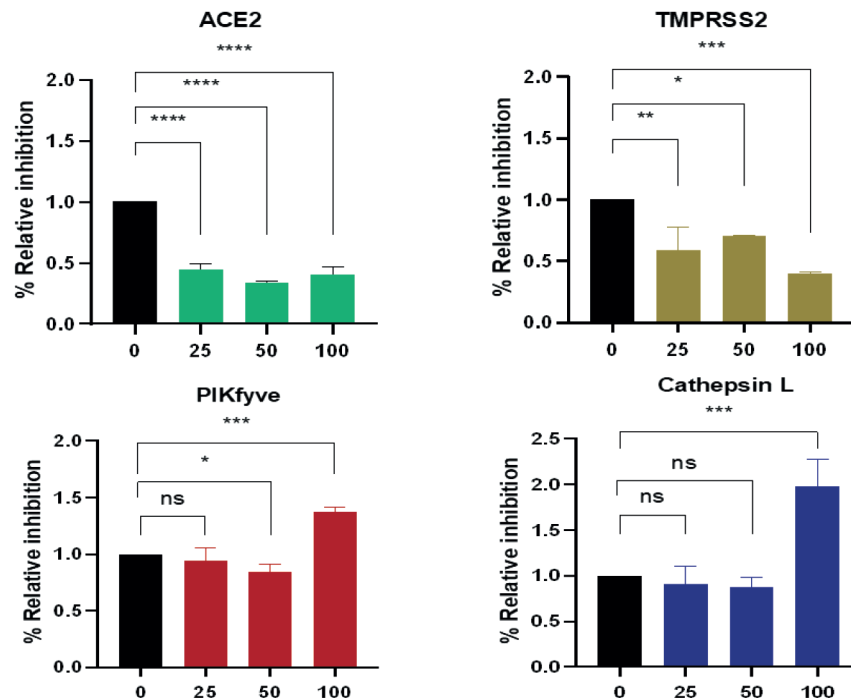


Figure 3 Relative quantity of mRNA expression of ACE2, TMPRSS2, PIKfyve and cathepsin L in Calu-3 cells treated with RA at 25, 50 and 100 µg/mL versus control data set for 24 h. The data was expressed as mean±SD, n = 3. Statistical analysis was carried out using One-Way analysis of variance followed by Dunnett's test (* $p < 0.5$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$ and **** $p < 0.0001$).

Discussion

Various Thai medicinal plants with traditional uses against viral diseases and antipyretic properties were screened for anti-SARS-CoV-2 activity. The aqueous extracts of *M. suaveolens* (L.) Kuntze and *H. isora* L. were reported here to pose anti-SARS-CoV-2 activity for the first time. The aqueous crude extracts were derived from fresh and air-dried plant parts. The fresh one has imitated the traditional extraction method⁽⁹⁾ using fresh plants and then the filtrate was dried using lyophilization to reduce the effect of heat. On the other hand, the air-dried plant extraction was undertaken and then the filtrate was concentrated and dried using rotary evaporation.

RA is one of the constituents quantified in HSF and HSD. RA content determined in HSF was about twice that in HSD. RA in HSD might be degraded during the drying process. The extracts were screened for antiviral properties at high concentrations, which were not toxic to vero cells. HSF and HSD posed high anti-SARS-CoV-2 activity of 100% plaque reduction at 5 mg/mL. RA also showed anti-SARS-CoV-2 activity of 94.49% at 0.625 mg/mL. RA, therefore, may contribute to the antiviral property of the extracts. RA and its derivatives were reported to be the constituents of *M. suaveolens* (L.) Kuntze and *H. isora* L.,^(10,11) which could cause the aqueous extract of *H. isora* L. exhibit the

activity. Besides, *M. suaveolens* (L.) Kuntze is an aromatic herb containing various compounds such as essential oils, phenolics, diterpenoids, triterpenoids, steroids, alkaloids and flavonoids.⁽¹⁰⁾ Ursolic acid is one of the phytochemicals in the plants reported to show antispasmodic⁽¹¹⁾ and antiviral activity against rotaviruses, HIV, influenza and hepatitis B and C viruses.⁽¹²⁻¹⁵⁾ Moreover, ursolic acid was identified as a strong protease inhibitor to the main protease (Mpro) of SARS-CoV-2 based on the molecular docking approach.⁽¹⁶⁾

RA inhibited ACE2 enzymatic reaction. However, the concentrations of HSD and HID depended on cytotoxic level of the extracts. ACE2 inhibition property of RA might be one of the important mechanisms contributing to the antiviral activity. Gene expression was investigated in Calu-3, lung epithelial cells, which expressed ACE2, TMPRSS2, PIKfyve and cathepsin L. The expression showed that RA down-regulated ACE2 and TMPRSS2 in the dose-response relationship but not PIKfyve and cathepsin L. The highest dose of RA was likely to up-regulate PIKfyve and cathepsin L expression but not higher than twofold. RA was also reported to show high efficacy in terms of molecular interaction and drug-likeness properties against ACE2 and TMPRSS2⁽¹⁷⁾ or SARS-CoV 3CLpro⁽¹⁸⁾ by molecular docking analysis. The mRNA expression analysis showed that the compound inhibited ACE2 along with TMPRSS2 which had been highlighted in recent studies to be one of the main targets of SARS-CoV-2 infection.^(19,20) We also reported here for the first time that the aqueous extracts of fresh leaves of *T. triandra* (Colebr.) Diels (TTF), *C. calisaya* Wedd. (CCF) and *K. parviflora*

Wall. ex Baker (KPD) were also found to possess *in vitro* anti-SARS-CoV-2 activity. *T. triandra* (Colebr.) Diels has been generally used in cuisine and traditional medicine in Southeast Asia. The main compounds of the aqueous extracts were analyzed as quercetin, cyanidin, gallic acid, chlorophyll, rutin, tannic acid and catechin.⁽²¹⁾ Some sources reported that chlorophyll derivatives and quercetin could be potential therapeutic agents for treating COVID-19.^(6,22) *C. calisaya* Wedd. has been identified to be the primary source of quinine, used as antimalarial. Quinine was reported that it targeted 6LU7 COVID-19 protease resulting in inhibition of the viral infection by *in silico* analysis.⁽²³⁾ *K. parviflora* Wallich. ex Baker belongs to the family Zingiberaceae, the same as *B. rotunda* (L.) Mansf. and *Z. officinale* Roscoe. This plant family has been reported to be the source of phytochemicals which were active against SARS-CoV-2 such as 6-gingerol from *Z. officinale* Roscoe and panduratin A from *B. rotunda* (L.) Mansf.⁽⁴⁾

Currently, the SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) is being targeted by several inhibitors such as favipiravir, remdesivir and molnupiravir; and there are some pieces of evidence of drug resistance.⁽²⁴⁾ HSF, HSD, HID and RA provided anti-SARS-CoV-2 activity targeting the host molecules, which could limit the viral infection in the early phase and drug resistance. These extracts might be developed as anti-SARS-CoV-2 candidates in pre-clinical and clinical trials. Moreover, these phytochemical compounds should also be further isolated from the six extracts which were investigated for anti-SARS-CoV2 activity.

Conclusion

Based on the results, the two extracts of *M. suaveolens* (L.) Kuntze (HSF, HSD) showed the highest inhibitory activity (with no toxicity to the cells) against SARS-CoV-2 at 100% with the concentration of 5 mg/mL, while HID, TTF, CCF and KPD gave lower levels of plaque reduction of 99.49%, 95.95%, 88.95% and 85.24% at the doses of 10, 10, 0.625 and 2.5 mg/mL, respectively. HSD and HID showed ACE2 enzymatic inhibition. RA, one constituent of *M. suaveolens* (L.) Kuntze and *H. isora* L., also showed potent inhibition. RA down-regulated the expression of ACE2 and TMPRSS2 but not PIKfyve or cathepsin L in Calu-3 which were involved in the pre-entry and early phases of infection. The phytochemicals reported here in these selected medicinal plants should be developed as anti-SARS-CoV-2 candidates in animals and clinical trials or further isolated for other potential compounds against SAR-CoV-2. This is the first report on the *in vitro* anti-SARS-CoV-2 properties with detailed mechanisms of action of the selected Thai medicinal plant extracts.

Acknowledgements

This research was supported by the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health.

References

1. Department of disease control. Corona virus 2019 (COVID-19). [online]. 2022; [cited 2022 Jan 17]. Available from: URL: <https://ddc.moph.go.th/viralpneumonia>.

2. พรายพล คุ่มทรัพย์. ความสูญเสียทางเศรษฐกิจจาก โควิด-19. [online]. 2022; [cited 2022 Jan 17]; [4 screens]. Available from: URL: <https://www.bangkokbiznews.com/news/detail/938335>.
3. Benjaponpithak A, Visithanon K, Sawaengtham T, Thaneerat T, Wanaratna K. Short communication on use of andrographis herb (Fa Thalai Chon) for the treatment of COVID-19 patients. J Thai Trad Alt Med 2021; 19(1): 229-33.
4. Kanjanasirirat P, Suksatu A, Manopwisedjaroen S, Munyoo B, Tuchinda P, Jearawutanakul K, et al. High-content screening of Thai medicinal plants reveals *Boesenbergia rotunda* extract and its component Panduratin A as anti-SARS-CoV-2 agents. Sci Rep 2020; 10: 19963. (12 pages).
5. Remali J, Aizat WM. A review on plant bioactive compounds and their modes of action against coronavirus infection. Front Pharmacol 2021; 11: 589044. (13 pages).
6. Chiow KH, Phoon MC, Putti T, Tan BK, Chow VT. Evaluation of antiviral activities of *Houttuynia cordata* Thunb. extract, quercetin, quercetrin and cinanserin on murine coronavirus and dengue virus infection. Asian Pac J Trop Med 2016; 9(1): 1-7.
7. Gil C, Ginex T, Maestro I, Nozal V, Barrado-Gil L, Cuesta-Geijo MÁ, et al. COVID-19: drug targets and potential treatments. J Med Chem 2020; 63(21): 12359-86.
8. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 2001; 25(4): 402-8.
9. Faculty of Pharmacy, Ubonratchathani university. *H. suaveolens*. [online]. 2022; [cited 2022 Jan 17]; [5 screens]. Available from: URL: <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=268>.

10. Mishra P, Sohrab S, Mishra SK. A review on the phytochemical and pharmacological properties of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *Futur J Pharm Sci* 2021; 7: 65. (11 pages).
11. Rattanamaneeerum A, Thirapanmethee K, Nakamura Y, Bongcheewin B, Chomnawang MT. Chemopreventive and biological activities of *Helicteres isora* L. fruit extracts. *Res Pharm Sci* 2018; 13(6): 484-92.
12. Jesus JA, Lago JHG, Laurenti MD, Yamamoto ES, Passero LFD. Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: an update. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015; 2015: 620472. (14 pages).
13. Tohmé MJ, Giménez MC, Peralta A, Colombo MI, Delgui LR. Ursolic acid: a novel antiviral compound inhibiting rotavirus infection *in vitro*. *Int J Antimicrob Agents* 2019; 54(5): 601-9.
14. Khwaza V, Oyediji OO, Aderibigbe BA. Antiviral activities of oleanolic acid and its analogues. *Molecules* 2018; 23: 2300. (14 pages).
15. Kashiwada Y, Nagao T, Hashimoto A, Ikeshiro Y, Okabe H, Cosentino LM, et al. Anti-AIDS agents 38. Anti-HIV activity of 3-O-acyl ursolic acid derivatives. *J Nat Prod* 2000; 63(12): 1619-22.
16. Kumar A, Choudhir G, Shukla SK, Sharma M, Tyagi P, Bhushan A, et al. Identification of phytochemical inhibitors against main protease of COVID-19 using molecular modeling approaches. *J Biomol Struct Dyn* 2021; 39(10): 3760-70.
17. Jindal D, Rani V. In Silico Studies of Phyto-constituents from *Piper longum* and *Ocimum sanctum* as ACE2 and TMRSS2 Inhibitors: Strategies to Combat COVID-19. *Appl Biochem Biotechnol* 2022; 1-18.
18. Sabet R, Sisakht M, Emami L, Sabahi Z. Comparison of COVID-19 virus main protease inhibition activities of phenolic acids by molecular docking. *Trends Pharm Sci* 2021; 7(2): 117-26.
19. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 2020; 181(2): 271-80.
20. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* 2020; 367(6485): 1444-8.
21. Weerawatanakorn M, Rojsuntornkitti K, Pan M-H, Wongwaiwech D. Some phytochemicals and anti-inflammation effect of juice from *Tiliacora triandra* leaves. *J Food Nutr Res* 2018; 6: 32-8.
22. Clark NF, Taylor-Robinson AW. COVID-19 Therapy: could a chlorophyll derivative promote cellular accumulation of Zn²⁺ ions to inhibit SARS-CoV-2 RNA synthesis? *Front Plant Sci* 2020; 11: 1270. (4 pages).
23. Srivastava A, Kumar A, Tiwari G, Kumar R, Misra N. In Silico investigations on the potential inhibitors for COVID-19 protease. *arXiv preprint* 2020: 2003.10642. (12 pages).
24. Vitiello A. Sars-Cov-2 and risk of antiviral drug resistance. *Irish J Med Sci.* [online]. 2021; [cited 2022 Jan 17]; [2 screens]. Available from: URL: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11845-021-02820-y.pdf>.

การคัดกรองฤทธิ์ต้าน SARS-CoV-2 และโมเลกุลเป้าหมายการออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรไทย

ศรายุทธ รัตตพงษ์¹ ตัญญาณี สาหัต¹ ณฐภัทร หาญกิจ¹ พรราว ศุภจริยาวัตร¹ พิไลลักษณ์ อัครไพบูลย์ โอภาตะ² วันดี มีฉลาด² พรชัย สีนเจริญโกโคย¹ สมจิตร เนียมสกุล¹ เสกขตกร บัวเบา¹ ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง¹ Kenneth J Ritchie³ และ ศิริวรรณ ชัยสมบุญพันธ์¹

¹สถาบันวิจัยสมุนไพร ²สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

³Centre for Natural Products Discovery, School of Pharmacy and Biomolecular Sciences, มหาวิทยาลัย Liverpool John Moores, Byrom Street, ลิเวอร์พูล L3 3AF สหราชอาณาจักร

บทคัดย่อ โรคโคโรนาไวรัส 2019 หรือโควิด 19 เป็นโรคระบาดที่เกิดขึ้นทั่วโลกมีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาว่าสมุนไพรไทยอาจมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสดังกล่าว จึงได้คัดกรองฤทธิ์ต้าน SARS-CoV-2 ในหลอดทดลองด้วยวิธี plaque reduction assay ของพืชสมุนไพรบางชนิดที่มีสรรพคุณลดไข้ในตำรายาแผนไทย โดยสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสจะถูกนำมาศึกษาปฏิกิริยายับยั้งเอนไซม์ ACE2 และทดสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์ปอดเพาะเลี้ยง ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดด้วยน้ำของสมุนไพรแมงลักคา (HSF, HSD) และปอปัด (HID) ที่ความเข้มข้นสูงสุด 5, 5 และ 10 mg/mL มีฤทธิ์ต้าน SARS-CoV-2 ได้ 100, 100 และ 99.49% ตามลำดับ rosmarinic acid (RA) ซึ่งเป็นสารฟลาโวนอยด์ชนิดหนึ่งในสมุนไพรแมงลักคาและปอปัดที่ความเข้มข้น 0.625 mg/mL มีฤทธิ์ต้านไวรัสที่ 94.49% และยับยั้งเอนไซม์ ACE2 สูงสุดที่ 70.25% ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL ซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่สารสกัดสมุนไพรอื่นมีค่าการยับยั้งน้อยกว่า ซึ่ง RA ลดการแสดงออกของยีน ACE2 และ TMPRSS2 แต่ไม่ลดการแสดงออกของ PIKfyve หรือ cathepsin L ใน Calu-3 cells จึงสามารถสรุปได้ว่า HSF, HSD, HID และ RA มีฤทธิ์ต้าน SARS-CoV-2 ซึ่ง RA ในสมุนไพรอาจลดการแพร่กระจายไวรัสในระยะแรกของการติดเชื้อได้ ดังนั้นควรมีการศึกษาฤทธิ์ต้าน SARS-CoV-2 ของสารสกัดดังกล่าวในสัตว์ทดลองและทางคลินิกเพื่อพัฒนาเป็นยาสมุนไพรต้านไวรัสต่อไป

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้าน SARS-CoV-2, ฤทธิ์ยับยั้ง ACE2, โมเลกุลเป้าหมาย, โควิด 19

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างคลอร์มีควอต ไโดควอต เมพิควอต และพาราควอต ในผักและผลไม้โดยเทคนิค LC-MS/MS

เสาวณีย์ วาจาสิทธิ์ สุวิมล หมวดหมี อัจฉรี อินแก้ว กัญญารัตน์ เชื้อกุลชาติ วิทวัส วังแก้วหิรัญ
สกุรัตน์ สมสันติสุข และ ทองสุข ปายะนันท์
สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ จากสถิติการนำเข้าสารเคมี กลุ่ม herbicides สารคลอร์มีควอต ไโดควอต เมพิควอต และพาราควอต พบว่ามีการนำมาใช้ในการกำจัดวัชพืชทางการเกษตร โดยไโดควอตและพาราควอตเป็นสารกำจัดวัชพืชที่ใช้ฉีดพ่นในพืชไร่ ส่วนคลอร์มีควอตและเมพิควอตเป็นสารสังเคราะห์ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ผลของการใช้สารเหล่านี้อย่างไม่เหมาะสม โดยเฉพาะพาราควอตก่อให้เกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อม และอาจกระทบต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค องค์การอนามัยโลกได้จัดให้พิษของพาราควอตอยู่ใน class II คือ มีพิษปานกลางและตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2563 จัดเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 4 งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารทั้ง 4 ชนิด ในผักและผลไม้ ซึ่งสารจะถูกสกัดด้วย acidified methanol แล้วนำไปปั่นแยกส่วน ก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วย LC-MS/MS โดยสารทั้ง 4 ชนิด มีค่า limit of detection และ limit of quantitation เท่ากับ 0.005 และ 0.010 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.01–0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่าความแม่นยำในช่วง 66.1–117.2% และค่าความเที่ยงอยู่ระหว่าง 0.4–14.5% พร้อมทั้งวิธีนี้ได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ในปี พ.ศ. 2563 จึงมีความเหมาะสมที่จะนำวิธีนี้มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ เพื่อการคุ้มครองผู้บริโภคและดำเนินการตามกฎหมายต่อไป นอกจากนี้ได้ทำการสำรวจการตกค้างของสารกลุ่มนี้ในผักและผลไม้สดในปี 2563 จำนวน 219 ตัวอย่าง ผลตรวจพบ 3 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเมพิควอต 2 ตัวอย่าง และคลอร์มีควอต 1 ตัวอย่าง และทุกตัวอย่างตรวจไม่พบพาราควอต

คำสำคัญ: คลอร์มีควอต, ไโดควอต, เมพิควอต, พาราควอต, ผักและผลไม้

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

Received: 19 October 2022

Revised: 6 May 2022

Accepted: 19 May 2022

บทนำ

สารเคมีกำจัดวัชพืช (herbicides) หรือที่เรียกกันทั่วไปว่ายาม่าหญ้า มีการใช้กันอย่างแพร่หลายและมีแนวโน้มจะเพิ่มมากขึ้นในประเทศไทย โดยสารเคมีกำจัดวัชพืชแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการทำงานที่แตกต่างกัน โดยไดควอต (diquat, 1, 10-ethylene-2, 20-bipyridinium ion, DQ) และพาราควอต (paraquat, 1,10-dimethyl-4,40-bipyridinium ion, PQ) เป็นสารกำจัดวัชพืช (bipyridyl herbicides) แบบชนิดไม่เลือกทำลาย (non-selective herbicide) ใช้กับวัชพืชใบกว้างและหญ้า คลอร์มีควอต (chlormequat, 2-chloroethyltrimethylammonium ion, CQ) และเมพิควอต (mepiquat, 1,1-dimethylpiperidinium ion, MQ) เป็นสารสังเคราะห์ใช้ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) แต่ไม่จัดเป็นฮอร์โมน มีคุณสมบัติในการกระตุ้น ยับยั้ง หรือเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช เช่น กระตุ้นการออกดอกหรือทำให้พืชทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม⁽¹⁻⁵⁾ ผลของการใช้สารอย่างไม่ระมัดระวัง ขาดความเข้าใจ หรือใช้ไม่ตรงตามฉลากระบุ ก่อให้เกิดปัญหาการตกค้างของสารเหล่านี้ในสิ่งแวดล้อม และเชื่อมโยงห่วงโซ่อาหาร ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกร ผู้ที่ได้รับสัมผัสสารนี้โดยตรงจากการฉีดพ่น และความไม่ปลอดภัยของผู้บริโภค ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของกรมวิชาการเกษตรรายงานปริมาณการนำเข้าสารกำจัดวัชพืชในช่วงปี พ.ศ. 2551-2561 ปริมาณเฉลี่ย 70,000-125,000 ตันต่อปี มีมูลค่ามากกว่าสามหมื่นล้านบาท คิดเป็นร้อยละ 74 ของสารออกฤทธิ์ทั้งหมด รองลงมา คือ สารเคมีกำจัดแมลง⁽⁶⁾

องค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) จำแนกความเป็นพิษของพาราควอต อยู่ใน class II คือ มีอันตรายปานกลาง (moderately hazardous)⁽⁷⁾ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาพิษเรื้อรังระยะยาว โดย The United State Environmental Protection Agency (US EPA) ระบุว่าพาราควอต เป็นสารที่ไม่ก่อให้เกิดมะเร็ง ไม่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ หรือตัวอ่อน ไม่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์⁽⁸⁾ แต่ในส่วนของ

สารไดควอต EU ไม่ต่ออายุให้เป็นสารออกฤทธิ์ (active substance) ในผลิตภัณฑ์อารักขาพืช เนื่องจากพบว่าไดควอตมีความเสี่ยงสูงต่อผู้ใช้งานและนก⁽⁹⁾ ประเทศไทย จัดพาราควอตเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 4 (วอ.4) ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2563 ควบคุมโดยกรมวิชาการเกษตร⁽¹⁰⁾ ซึ่งมีผลบังคับใช้เมื่อวันที่ 1 มิถุนายน 2563 ห้ามผลิต นำเข้า ส่งออก ครอบครอง ซึ่งสอดคล้องตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 419 พ.ศ. 2563 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 3) ระบุต้องตรวจไม่พบวัตถุอันตรายทางการเกษตรชนิดที่ 4 โดยวิธีการตรวจวิเคราะห์และห้องปฏิบัติการที่มีขีดจำกัดของการวัด (limit of detection: LOD) ต้องเป็นไปตามเงื่อนไขของเอกสารแนบท้ายประกาศนี้ (บัญชีหมายเลข 5)⁽¹¹⁾

การวิเคราะห์สารคลอร์มีควอต ไดควอต เมพิควอต และพาราควอต ด้วยคุณสมบัติทางเคมีของสารกลุ่มนี้เป็นแบบมีขั้วสูง (high polar herbicides: HPH) และเป็นไอออนบวกถาวร ทำให้สารมีพฤติกรรมที่จะจับกับพื้นผิวและสารต่างๆ ได้อย่างดี จำเป็นต้องใช้วิธีการสกัดและสภาวะการแยกสารที่มีความจำเพาะเจาะจง รวมทั้งต้องไม่ส่งผลกระทบต่อสารวิเคราะห์ จึงใช้วิธีวิเคราะห์แบบ single residues methods (SRM) จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ส่วนใหญ่เตรียมตัวอย่างโดยวิธี solid phase extraction (SPE), matrix solid phase dispersion (MSPD) และใช้สารสกัดประเภท methanol หรือ methanol ผสมน้ำ, acetonitrile ผสมน้ำ หรือน้ำที่มีสถานะเป็นกรด และ clean up โดยใช้ C18, Florisil, PSA, GCB⁽¹²⁾ เป็นต้น ตรวจวัดชนิดและปริมาณสารด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น HPLC-post column derivatization ซึ่งวิธีนี้จะใช้เวลาในการทดสอบนานเพราะต้องมีการเตรียมสารเพื่อมาทำปฏิกิริยา derivatized หรือ liquid chromatography เช่น mixed mode หรือ ion pair chromatography ซึ่งพบความไม่สม่ำเสมอของผลการวิเคราะห์สารพาราควอต และไดควอต โดยปัญหา chromatographic และ mass spectrometric มาจากการตรวจวัดประจุของสารว่าเป็น [M-H⁺] single charge หรือ [M²⁺] double charge นอกจากนี้ยังมีวิธีวิเคราะห์สำหรับพาราควอต

และไดควอต โดยใช้ isotope labeling standard เพื่อให้ได้ robustness และ accuracy ดีขึ้น^(13,14) ปัจจุบันวิธีการสกัดและการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มที่มีขั้วสูงอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ คือ QuPPE-Method ซึ่งพัฒนาโดย EURL-SRM เนื่องจากมีความเฉพาะเจาะจงกับสารกลุ่มนี้ อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์พร้อมกันได้หลายชนิดในหนึ่งวิธีด้วยเทคนิค LC-MS/MS โดยมี detector เป็นชนิด triple quadrupole ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างในระดับต่ำ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการใช้ interface ที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) ให้เหมาะสมกับสภาพขั้วของสาร (polar compounds)⁽¹⁵⁾

เพื่อควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมายไทยที่ให้อยู่ภายใต้การควบคุมการใช้พาราควอตและเพื่อทราบสถานการณ์การตกค้าง ตลอดจนใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนดำเนินการทางกฎหมายให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่สามารถวิเคราะห์สารทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ คลอร์มีควอต ไดควอต เมพิควอต และพาราควอต ในตัวอย่างผักและผลไม้สดได้พร้อมกัน ในครั้งเดียว ทั้งนี้สามารถเตรียมตัวอย่างได้รวดเร็ว ใช้ปริมาณสารเคมีน้อย ประหยัดค่าใช้จ่าย โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจสอบสารที่มีปริมาณน้อยได้อย่างแม่นยำ โดยใช้ค่าน้ำ ตาลิ่ง ผักกาดขาว หัวไชเท้า มะเขือเทศ ส้ม และแอปเปิ้ล เป็นตัวแทนของ matrix ผักและผลไม้

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน: paraquat dichloride, diquat dibromide, mepiquat chloride และ chlormequat chloride ทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์ของ Dr. Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ > 98% (บริษัทผู้ผลิต LGC labor GmbH, ประเทศเยอรมนี) สารเคมี: methanol (MeOH), acetonitrile (CH_3CN) เป็น HPLC grade, formic acid, ammonium formate (NH_4HCO_2) เป็น AR grade, acidified methanol เตรียมโดยเปิด formic acid 1.0 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ที่มี MeOH และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย MeOH

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐาน stock solution ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานแต่ละชนิด 10 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย MeOH คำนวณความเข้มข้นของสารมาตรฐานเป้าหมาย และเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 100, 10 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย acidified methanol: H_2O (1:1)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 กรัม และ 0.01 มิลลิกรัม, refrigerated centrifuge, vortex mixer, เครื่องบดปั่นตัวอย่าง, micro pipette ขนาด 2–20, 10–200, 20–200 และ 100–1,000 ไมโครลิตร, screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร, micro-spin filter tube 0.45 μm nylon, volumetric flask ชนิด polypropylene ขนาด 10 มิลลิลิตร, vial สีชาชนิด polypropylene ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, เครื่อง LC-MS/MS ประกอบด้วย HPLC รุ่น Agilent 1260 series (บริษัทเอจีเลนต์ เทคโนโลยี, ประเทศสิงคโปร์), MS/MS detector ชนิด triple quadrupole mass spectrometer รุ่น 5500 QTRAP (บริษัท AB SCIEX, ประเทศแคนาดา) และ column: Atlantis[®] HILIC Silica (2.1 mm $\times$ 150 mm, 3 μm)

การเตรียมตัวอย่าง

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ใช้ตัวอย่างค่าน้ำ ตาลิ่ง ผักกาดขาว หัวไชเท้า มะเขือเทศ ส้ม และแอปเปิ้ล เป็นตัวแทนกลุ่มผักและผลไม้ (representative matrix)

การสำรวจปริมาณการตกค้างของสารทั้ง 4 ชนิด ในปี พ.ศ. 2563 รวมทั้งสิ้น 219 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นตัวอย่างจากแหล่งกระจายสินค้าทั่วประเทศทั้ง 77 จังหวัด จำนวนทั้งสิ้น 65 ตัวอย่าง แบ่งเป็นผัก 51 ตัวอย่าง และผลไม้ 14 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากโครงการสำรวจผักและผลไม้สด ซึ่งเป็นวัตถุดิบในการประกอบอาหารของโรงพยาบาล เก็บตัวอย่างจากโรงพยาบาลทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ครอบคลุมพื้นที่ 12 เขตสุขภาพ จำนวน 154 ตัวอย่าง แบ่งเป็นผัก 100 ตัวอย่าง และผลไม้ 54 ตัวอย่าง

หลักการการวิเคราะห์

นำผักและผลไม้บดละเอียดมาเติมน้ำกลั่น จากนั้นสกัดสารตกค้างทั้ง 4 ชนิด จากตัวอย่างด้วย acidified methanol โดยเขย่าต่อเนื่องใน water bath ที่อุณหภูมิ 80 ± 2 องศาเซลเซียส แล้วนำมาตกตะกอนโดยการ centrifuge ดูดส่วนใสใส่ micro spin และนำไป centrifuge เพื่อกรองส่วนใสอีกรอบ จากนั้นนำสารที่สกัดตรวจหาชนิดและปริมาณโดยเทคนิค LC-MS/MS คำนวณปริมาณจาก calibration curve ที่ plot ระหว่าง concentration กับ peak area ของสารมาตรฐาน

วิธีการตรวจวิเคราะห์**การสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ (extraction and clean up)**

ชั่งตัวอย่าง 10.0 กรัม ลงใน screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100% ของค่าความชื้นของตัวอย่าง⁽¹⁵⁾ (ตัวอย่างเช่น ผักกาดขาว มีความชื้นร้อยละ 96.6 ถ้าชั่งตัวอย่างผักกาดขาว 10 กรัม ที่ใช้ในการวิเคราะห์ จะมีปริมาตรน้ำเท่ากับ $((96.6 \times 10) / 100) = 9.66$ กรัม ดังนั้นปริมาตรของน้ำกลั่นที่เติมเท่ากับ $10 - 9.66$ เท่ากับ 340 ไมโครลิตร หรือ 0.34 มิลลิลิตร) ปั่นด้วย vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที เติม acidified methanol 10 มิลลิลิตร ปั่นด้วย vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที เขย่าต่อเนื่องใน water bath ที่อุณหภูมิ

80 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที วางทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไป centrifuge ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่ -10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใส 1 มิลลิลิตร ใส่หลอด micro-spin filters นำไป centrifuge ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ -10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายที่กรองได้ใส่ใน vials พลาสติกสีขาว นำไปตรวจวัดชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง LC-MS/MS

การตรวจวัดชนิดและปริมาณ

เครื่อง Agilent 1260 series 5500 QTRAP MS/MS: มีสภาวะดังนี้ mobile phase: 20 mM ammonium formate และ CH_3CN ใช้โปรแกรม gradient ในการแยกสาร เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 24 นาที โดยมีสภาวะของ mass spectrometer ประกอบด้วย ion spray voltage: 4,500 volts, temperature (TEM): 500 องศาเซลเซียส, collision gas (CAD): nitrogen; medium, curtain gas (CUR): 23 psig, ion spray nebulizer gas (GAS-1): 50 psig และ TIS heater gas (GAS-2): 60 psig โดยสารจะถูกทำให้เป็นไอออนบวกด้วย electro spray ionization (ESI) ไอออนที่ได้จะถูกวิเคราะห์ด้วย multiple reaction monitoring (MRM) โดยศึกษา mass ที่ m/z ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 MS/MS acquisition parameters ของการวิเคราะห์คลอร์มีควอต ไโดควอต เมพิควอต และพาราควอต

component	precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	DP (eV)	EP (eV)	CE (eV)	CXP (eV)
chlormequat	122.0	58.0 (primary)	148.46	7.07	36.65	7.06
	122.0	63.0 (secondary)	148.46	7.07	27.11	10.40
diquat	183.3	168.0 (primary)	81.20	13.10	30.82	10.32
	183.3	157.1 (secondary)	81.20	13.10	22.00	9.79
mepiquat	114.2	98.0 (primary)	254.96	7.84	34.09	13.57
	114.2	58.0 (secondary)	254.96	7.84	32.53	9.17
paraquat	186.3	171.1 (primary)	80.00	11.69	28.00	11.80
	171.1	77.0 (secondary)	156.30	8.00	46.65	9.24

การคำนวณปริมาณ

คำนวณความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบ โดยใช้เทคนิค external calibration เปรียบเทียบกับ calibration curve จากสมการเส้นตรง $Y = aX + b$ ปริมาณสารที่ตรวจพบ $\times$ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เท่ากับ $(Y-b)/a$ โดย Y คือ พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน, a คือ ความชันของกราฟมาตรฐาน และ b คือ จุดตัดแกน Y

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity)

ตรวจสอบ specificity โดยพิจารณาจาก ion ratio และ retention time ของสารละลายตัวอย่างต้องไม่แตกต่างจาก ion ratio และ retention time เฉลี่ยของสารมาตรฐานเกินเกณฑ์การยอมรับ ซึ่ง retention time ของสารคลอร์มีควอต ไดควอต เมพิควอต และพาราควอต ในตัวอย่างแตกต่างจากสารมาตรฐานได้ไม่เกิน 2%⁽¹⁶⁾

การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

เตรียม procedural mixed standard calibration curve โดยใช้ matrix blank จำนวน 6 หลอด แล้วเติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.10 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นทำการสกัดและทำให้บริสุทธิ์เหมือนการสกัดตัวอย่าง สร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง (แกน x) ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน กับ (แกน y) พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน คำนวณหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (pearson correlation coefficient: r) สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination: R^2)

การวิเคราะห์ method blank และ matrix blank

method blank สกัดและวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนา โดยใช้สารเคมีทั้งหมด แต่ไม่มีตัวอย่างสำหรับ matrix blank ที่ใช้จะครอบคลุมตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างคะน้า ตำลึง ผักกาดขาว หัวไชเท้า มะเขือเทศ ส้ม และแอปเปิ้ล สกัดและวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนา จากนั้นฉีดสารสกัด method blank และ matrix blank เข้าเครื่อง

LC-MS/MS เพื่อตรวจสอบว่ามี mass หรือสัญญาณรบกวนตรงสารมาตรฐานหรือไม่ เพื่อป้องกันความผิดพลาดของผลวิเคราะห์

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection: LOD)

กำหนดค่า LOD โดยใช้ค่า 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 419 พ.ศ. 2563 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 3) ทดสอบค่า LOD โดยเติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นยืนยันค่า LOD โดยทำการทดสอบไม่น้อยกว่า 6 ซ้ำ ผลต้องไม่พบ false negative และต้องให้สัญญาณค่า signal/noise > 3

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation: LOQ)

กำหนดค่า LOQ โดยใช้ค่า default limit (0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 387 พ.ศ. 2560 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง เนื่องจากค่าอ้างอิง (target value) ของสารมีค่าแตกต่างกันในแต่ละชนิดพืช ดังนั้นจึงยืนยันค่า LOQ โดยเติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank วิเคราะห์ไม่น้อยกว่า 6 ซ้ำ คำนวณ %recovery กำหนดเกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วง 60–120, %RSD⁽¹⁷⁾ และ HORRAT (Horwitz ratio) กำหนดเกณฑ์ยอมรับตาม Codex และ EU มีค่า ≤ 2 จากสมการ

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

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and working range)

เติมสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดลงใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.10 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่เติมกับค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ตรวจพบ คำนวณหาสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination: R^2)

การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ลงใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละไม่น้อยกว่า 6 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณค่าเฉลี่ย %recovery, %RSD และ HORRAT โดยเกณฑ์ยอมรับความแม่นยำ: mean recovery 60–120% เกณฑ์ยอมรับความเที่ยง: HORRAT $\leq$ 2

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (uncertainty)

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด⁽¹⁸⁾ โดยคำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนทุกแหล่งรวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด แล้วคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตามวิธีที่ได้ทดสอบ ปริมาณสารที่พบหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg) โดยคำนวณความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบจาก calibration curve

ผล

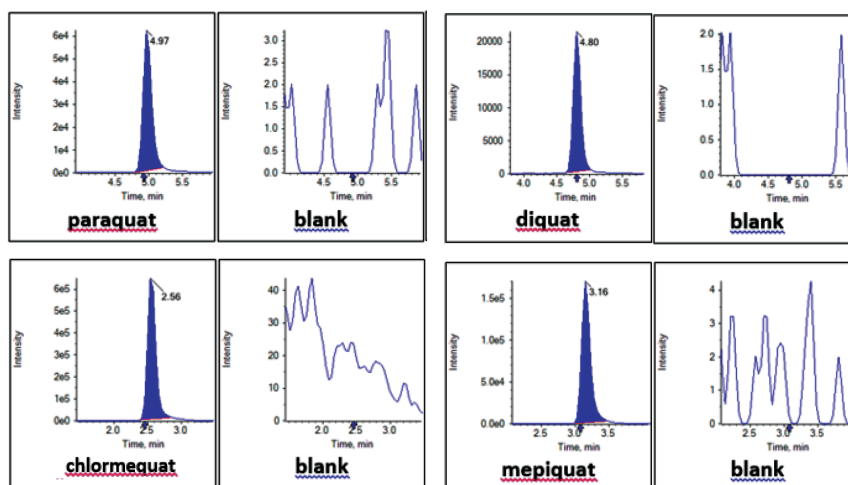
จากการศึกษาการตรวจวิเคราะห์สารทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ คลอร์มีควอต ไโดควอต เมพิควอต และพาราควอต ภายใต้สภาวะที่กำหนด สามารถสร้างกราฟมาตรฐาน procedural mixed standard calibration curve ซึ่งเป็นการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ลงใน matrix blank และทำการสกัดตามขั้นตอนการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง เป็นการชดเชยผลกระทบจากลักษณะตัวอย่างและชดเชยการสูญเสีย

ของสารที่สนใจที่อาจเกิดขึ้นในขั้นตอนการสกัดได้ โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่เติมกับค่าพื้นที่ใต้กราฟ สามารถวิเคราะห์สารดังกล่าวได้ในช่วงความเข้มข้น 0.01–0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้กราฟที่เป็นเส้นตรง โดยค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.975–0.999 เมื่อวิเคราะห์ method blank ของสารเคมีที่ใช้ทั้งหมด และ matrix blank ของตัวอย่างคะน่า ตำลึง ผักกาดขาว หั้วไชเท้า มะเขือเทศ ส้ม และแอปเปิ้ล ไม่พบสัญญาณรบกวนในช่วงของการตรวจวัดสารเป้าหมาย

ผลการตรวจสอบ specificity ค่า ion ratio และ retention time ของสารละลายตัวอย่างไม่แตกต่างจาก ion ratio และ retention time เฉลี่ยของสารมาตรฐาน โดยยังอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ และ retention time ของสารคลอร์มีควอต ไโดควอต เมพิควอต และพาราควอต คือ ค่าจากตัวอย่างแตกต่างจากสารมาตรฐานไม่เกิน 2% ดังแสดงในภาพที่ 1

ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยให้สัญญาณพีดมีค่าสูงกว่า 3 เท่าของ signal to noise ส่วนค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในทุกชนิดสาร ผลการพิสูจน์ค่า LOQ โดยการเติมสารมาตรฐาน วิเคราะห์ 6 ซ้ำ ใช้ตัวอย่างคะน่า ตำลึง ผักกาดขาว หั้วไชเท้า มะเขือเทศ ส้ม และแอปเปิ้ล ได้ค่า mean recovery ในช่วง 69.2–114.4%, HORRAT ในช่วง < 0.1 –0.6 ดังแสดงในตารางที่ 2

ผลการทดสอบช่วงของการวัด (working range) และความเป็นเส้นตรง (linearity) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่เติมกับค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ตรวจพบ ในช่วง 0.01–0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้ค่า R^2 ระหว่าง 0.975–0.999 ดังแสดงในตารางที่ 3



ภาพที่ 1 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน และ blank ที่ m/z 186/171 (พาราควอต), m/z 183/168 (ไดควอต), m/z 122/58 (คลอร์มีควอต) และ m/z 114/98 (เมพิควอต)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบค่า mean recovery, %RSD และ HORRAT ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม ต่อกรัม ของสารคลอร์มีควอต ไดควอต เมพิควอต และพาราควอต ในตัวอย่างคะน้า ตำลึง ผักกาดขาว หัวไชเท้า มะเขือเทศ ส้ม และแอปเปิ้ล

ชนิดตัวอย่าง	chlormequat			diquat			mepiquat			paraquat		
	%Rec.	%RSD	HOR-RAT	%Rec.	%RSD	HOR-RAT	%Rec.	%RSD	HOR-RAT	%Rec.	%RSD	HOR-RAT
คะน้า	112.8	4.2	0.2	74.3	9.9	0.5	92.9	8.8	0.4	73.4	11.4	0.5
ตำลึง	100.4	0.5	< 0.1	105.9	5.2	0.2	100.6	2.5	0.1	77.3	10.4	0.5
ผักกาดขาว	96.5	13.1	0.6	89.5	10.2	0.5	100.9	2.0	0.1	69.2	4.1	0.2
หัวไชเท้า	100.9	8.6	0.4	104.4	7.8	0.4	108.4	7.7	0.4	108.8	3.9	0.2
มะเขือเทศ	92.3	4.0	0.2	106.8	6.7	0.3	93.5	1.7	0.1	90.3	9.7	0.5
ส้ม	99.6	1.6	0.1	76.6	10.0	0.5	90.8	5.5	0.3	83.4	3.5	0.2
แอปเปิ้ล	99.6	3.6	0.2	110.9	4.8	0.2	114.4	1.8	0.1	89.3	9.3	0.4

ตารางที่ 3 ความเป็นเส้นตรง ที่ช่วงความเข้มข้น 0.01–0.20 มิลลิกรัมต่อกรัม

ชนิดตัวอย่าง	R^2			
	chlormequat	diquat	mepiquat	paraquat
คะน้า	0.988	0.986	0.999	0.990
ตำลึง	0.987	0.984	0.990	0.994
ผักกาดขาว	0.999	0.999	0.989	0.975
หัวไชเท้า	0.993	0.989	0.991	0.991
มะเขือเทศ	0.976	0.998	0.988	0.997
ส้ม	0.996	0.996	0.999	0.994
แอปเปิ้ล	0.999	0.998	0.999	0.998

การทดสอบค่าความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 6 ซ้ำ พบว่าความแม่นยำที่ประเมินจาก %recovery เฉลี่ยทั้ง 3 ระดับอยู่ในช่วง 66.1–117.2% และความเที่ยง (precision) ที่ประเมินด้วย %RSD และ HORRAT อยู่ในช่วง 0.4–14.5 และ < 0.1–1.0 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ %recovery และความเที่ยงในการวิเคราะห์ ของสารคลอร์มีควอต ไตควอต เมพิควอต และพาราควอต ในตัวอย่างคะน้า ตำลึง ผักกาดขาว หัวไชเท้า มะเขือเทศ ส้ม และแอปเปิ้ล

Sample type	compound	Spiked level (mg/kg)	Mean Rec. $\pm$ SD	%RSD	HORRAT
คะน้า	chlormequat	0.01	112.8 $\pm$ 0.5	4.2	0.2
		0.05	82.0 $\pm$ 0.3	0.7	< 0.1
		0.20	86.0 $\pm$ 16.7	9.7	0.7
	diquat	0.01	74.3 $\pm$ 0.7	9.9	0.5
		0.05	73.5 $\pm$ 0.7	1.8	0.1
		0.20	80.8 $\pm$ 6.4	4.2	0.3
	mepiquat	0.01	92.9 $\pm$ 0.8	8.8	0.4
		0.05	100.1 $\pm$ 0.6	1.2	0.1
		0.20	113.5 $\pm$ 7.1	3.1	0.2
	paraquat	0.01	73.4 $\pm$ 0.8	11.4	0.5
		0.05	80.2 $\pm$ 0.6	1.5	0.1
		0.20	102.0 $\pm$ 8.4	4.1	0.3
ตำลึง	chlormequat	0.01	100.4 $\pm$ 0.1	0.5	< 0.1
		0.05	101.9 $\pm$ 4.7	9.1	0.6
		0.20	88.4 $\pm$ 7.2	4.1	0.3
	diquat	0.01	105.9 $\pm$ 0.6	5.2	0.2
		0.05	94.3 $\pm$ 5.6	11.9	0.7
		0.20	76.7 $\pm$ 18.6	11.7	0.9
	mepiquat	0.01	100.6 $\pm$ 0.3	2.5	0.1
		0.05	93.1 $\pm$ 6.7	14.5	0.9
		0.20	86.3 $\pm$ 8.3	4.8	0.4
	paraquat	0.01	77.3 $\pm$ 0.8	10.4	0.5
		0.05	85.8 $\pm$ 9.8	8.5	0.6
		0.20	88.7 $\pm$ 15.2	8.5	0.6
ผักกาดขาว	chlormequat	0.01	96.5 $\pm$ 1.3	13.1	0.6
		0.05	91.4 $\pm$ 4.0	8.8	0.5
		0.20	100.2 $\pm$ 0.5	0.5	< 0.1
	diquat	0.01	89.5 $\pm$ 0.9	10.2	0.5
		0.05	100.0 $\pm$ 4.1	8.3	0.5
		0.20	97.2 $\pm$ 7.6	3.9	0.3
	mepiquat	0.01	100.9 $\pm$ 0.2	2.0	0.1
		0.05	92.5 $\pm$ 4.3	9.3	0.6
		0.20	93.4 $\pm$ 5.7	3.0	0.2

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ %recovery และความเที่ยงในการวิเคราะห์ ของสารคลอร์มีควอต ไดควอต เมพิควอต และพาราควอต ในตัวอย่างคะน้า ตำลึง ผักกาดขาว หัวไชเท้า มะเขือเทศ ส้ม และแอปเปิ้ล (ต่อ)

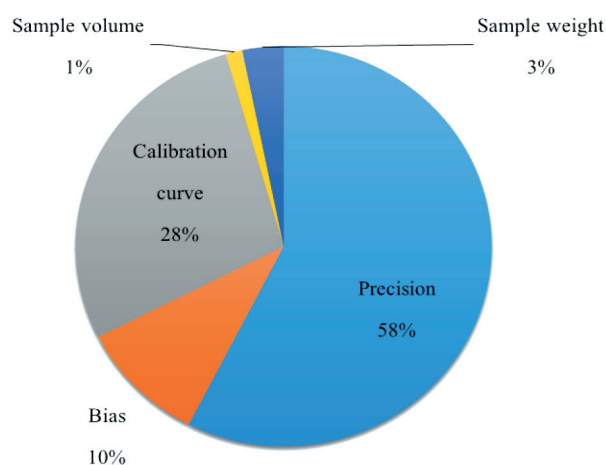
Sample type	compound	Spiked level (mg/kg)	Mean Rec. $\pm$ SD	%RSD	HORRAT
ผักกาดขาว (ต่อ)	paraquat	0.01	69.2 $\pm$ 0.3	4.1	0.2
		0.05	100.7 $\pm$ 1.2	2.4	0.1
		0.20	97.5 $\pm$ 4.8	2.5	0.2
หัวไชเท้า	chlormequat	0.01	100.9 $\pm$ 0.9	8.6	0.4
		0.05	91.2 $\pm$ 0.3	0.8	< 0.1
		0.20	104.2 $\pm$ 2.9	1.4	0.1
	diquat	0.01	104.4 $\pm$ 0.8	7.8	0.4
		0.05	95.1 $\pm$ 1.0	2.0	0.1
		0.20	107.2 $\pm$ 5.9	2.7	0.2
	mepiquat	0.01	108.4 $\pm$ 0.8	7.7	0.4
		0.05	96.2 $\pm$ 0.3	0.7	< 0.1
		0.20	115.5 $\pm$ 3.4	1.5	0.1
	paraquat	0.01	108.8 $\pm$ 0.4	3.9	0.2
		0.05	93.5 $\pm$ 0.2	0.4	< 0.1
		0.20	107.3 $\pm$ 3.0	1.4	0.1
มะเขือเทศ	chlormequat	0.01	92.3 $\pm$ 0.4	4.0	0.2
		0.05	102.8 $\pm$ 1.4	2.7	0.2
		0.20	94.8 $\pm$ 1.6	0.9	0.1
	diquat	0.01	106.8 $\pm$ 0.7	6.7	0.3
		0.05	117.2 $\pm$ 1.0	1.7	0.1
		0.20	96.5 $\pm$ 12.1	6.3	0.5
	mepiquat	0.01	93.5 $\pm$ 0.2	1.7	0.1
		0.05	100.8 $\pm$ 0.3	0.6	< 0.1
		0.20	97.0 $\pm$ 1.3	0.7	0.1
	paraquat	0.01	90.3 $\pm$ 0.9	9.7	0.5
		0.05	105.2 $\pm$ 2.5	4.8	0.3
		0.20	82.2 $\pm$ 6.0	3.7	0.3
ส้ม	chlormequat	0.01	99.6 $\pm$ 0.2	1.6	0.1
		0.05	110.1 $\pm$ 0.8	0.7	< 0.1
		0.20	73.4 $\pm$ 19.6	13.3	1.0
	diquat	0.01	76.6 $\pm$ 0.8	10.0	0.5
		0.05	103.6 $\pm$ 2.4	4.6	0.3
		0.20	86.9 $\pm$ 16.9	3.7	0.3
	mepiquat	0.01	90.8 $\pm$ 0.5	5.5	0.3
		0.05	107.0 $\pm$ 0.9	1.7	0.1
		0.20	66.1 $\pm$ 5.9	4.5	0.3
	paraquat	0.01	83.4 $\pm$ 0.3	3.5	0.2
		0.05	102.2 $\pm$ 2.1	4.0	0.2
		0.20	91.1 $\pm$ 23.8	13.1	1.0

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ %recovery และความเที่ยงในการวิเคราะห์ ของสารคลอร์มีควอต ไโดควอต เมพิควอต และพาราควอต ในตัวอย่างคะน้า ตำลึง ผักกาดขาว หัวไชเท้า มะเขือเทศ ส้ม และแอปเปิ้ล (ต่อ)

Sample type	compound	Spiked level (mg/kg)	Mean Rec. $\pm$ SD	%RSD	HORRAT
แอปเปิ้ล	chlormequat	0.01	99.6 $\pm$ 0.4	3.6	0.2
		0.05	86.9 $\pm$ 0.7	1.6	0.1
		0.20	90.6 $\pm$ 5.2	2.9	0.2
	diquat	0.01	110.9 $\pm$ 0.5	4.8	0.2
		0.05	100.8 $\pm$ 1.9	3.7	0.2
		0.20	107.7 $\pm$ 3.5	1.6	0.1
	mepiquat	0.01	114.4 $\pm$ 0.2	1.8	0.1
		0.05	97.3 $\pm$ 0.6	1.3	0.1
		0.20	103.4 $\pm$ 3.3	1.6	0.1
	paraquat	0.01	89.3 $\pm$ 0.8	9.3	0.4
		0.05	106.7 $\pm$ 2.1	3.9	0.2
		0.20	112.0 $\pm$ 6.9	3.1	0.2

จากการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตามวิธีที่ได้ทดสอบ โดยนำการวิเคราะห์สารพาราควอตในส้มเป็นตัวแทนการคำนวณ พบแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน ได้แก่ การชั่งน้ำหนักของตัวอย่าง (sample weight: Ms) เครื่องแก้ววัดปริมาตรที่ใช้ (sample volume: Vs) ค่า concentration ที่อ่านได้จาก calibration curve และจากการเตรียมสารมาตรฐาน (concentration of sample: Cs) bias และ precision คำนวณค่าความไม่แน่นอนของสารพาราควอต พบว่ามีค่าเท่ากับ $\pm 26.2\%$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

และเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งความไม่แน่นอน ที่ส่งผลต่อปริมาณสารจากมากไปหาน้อย ได้แก่ ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (method precision, 58%) concentration ที่อ่านได้จาก calibration curve และจากการเตรียมสารมาตรฐาน (concentration of sample, 28%) ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (bias, 10%) การชั่งน้ำหนักของตัวอย่าง (sample weight, 3%) และจากเครื่องแก้ววัดปริมาตรที่ใช้ (sample volume, 1%) ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สารพาราควอตในตัวอย่างส้ม

นอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2563 ได้นำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการทดสอบความถูกต้องแล้วมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ผักและผลไม้สด เพื่อสำรวจปริมาณการตกค้างของสารทั้ง 4 ชนิด ในโครงการอาหารปลอดภัยตามนโยบายสำคัญของกระทรวงสาธารณสุข ประกอบด้วย โครงการพัฒนาแหล่งกระจายสินค้าทั่วไทย ซึ่งเก็บตัวอย่างจากแหล่งกระจายสินค้า ตลาดค้าส่ง กลุ่มเกษตรกร และวิสาหกิจชุมชนร้านหรือฟาร์มขายทั้ง 77 จังหวัด เช่น วิสาหกิจชุมชนศูนย์เรียนรู้เศรษฐกิจพอเพียงชุมชนปลูกไม้สายรวมใจจังหวัดนครปฐม, ตลาดไท จังหวัดปทุมธานี, ตลาดสดวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี และตลาดเทศบาลเมืองจังหวัดชุมพร เป็นต้น จำนวนทั้งสิ้น 65 ตัวอย่าง แบ่งเป็นผัก 51 ตัวอย่าง และผลไม้ 14 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบสารกลุ่มควอตินในทุกตัวอย่าง โครงการโรงพยาบาลอาหารปลอดภัย เก็บตัวอย่างจากโรงพยาบาลเป้าหมายครอบคลุมพื้นที่ 12 เขตสุขภาพ จำนวน 154 ตัวอย่าง แบ่งเป็นผัก 100 ตัวอย่าง และผลไม้ 54 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับค่ากำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 387 (พ.ศ. 2560) กำหนดค่าคลอโรมีควอตเป็นดีฟอลต์ลิมิต (default limits) สำหรับพืช 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามบัญชีหมายเลข 3 แนบท้ายประกาศ กรณีนอกเหนือจากนี้ให้ใช้ค่าดีฟอลต์ลิมิตสำหรับพืชได้ไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าผักและผลไม้ตรวจพบ 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.95 โดยพบสารเมพิควอตในถั่วฝักยาวและส้มโชกุนปริมาณ 0.11 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งเกินค่าดีฟอลต์ลิมิตทั้ง 2 ตัวอย่าง และพบสารคลอโรมีควอตในผักโขมแก้ว ปริมาณน้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งน้อยกว่าค่าดีฟอลต์ลิมิต

วิจารณ์

วิธีที่ศึกษานี้สามารถทดสอบสารตกค้างในผักและผลไม้ได้ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ คลอโรมีควอต ไคควอต เมพิควอต และพาราควอต โดยค่า molecular masses ได้แก่ 122.0, 183.3, 114.2 และ 186.3 g.mol⁻¹ ตามลำดับ โดยใช้เครื่อง liquid chromatograph (LC) ซึ่งมี tandem mass spectrometer (MS/MS) เป็นตัวตรวจวัด จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ

LC-MS/MS ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (selectivity) ใช้หลักการ mass spectrometry ตรวจวัดไอออนของสารที่แยกกันด้วยค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio, m/z) ที่แตกต่างกัน ในการวิเคราะห์นี้เลือก interface ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) ชนิด electro spray ionization (ESI) ไอออนที่ได้จะถูกวิเคราะห์ด้วย multiple reaction monitoring (MRM) mode ใช้ตรวจสอบมวลของไอออนที่แตกออกมา (fragment ion, transition ion) จากไอออนตั้งต้น (parent ion) โดยสามารถแยกความแตกต่างของสารที่มีมวลเท่ากันได้ เนื่องจาก fragment ion ที่แตกออกจะเป็นชิ้นส่วนที่จำเพาะของไอออนแต่ละชนิด detector ชนิด tandem mass spectrometer ตรวจวัดโดยเลือก mass ถึง 2 ครั้ง ครั้งแรกเลือก precursor ion หรือ parent ion จากนั้นเกิด fragmentation ได้ product ion หรือ daughter ion เลือก product ion 2 ion ที่มีค่า response สูงและไม่มีสารอื่นรบกวน โดยสารใดควอตจะถูก ionized ในรูป [M+H]⁺ (dehydrogenated molecular ion) ที่ m/z 183.3 เป็น precursor ion และเลือก product ion ที่ m/z 168.0 กับ 157.1 ส่วนคลอโรมีควอต เมพิควอต และพาราควอต จะถูก ionized ในรูป [M]⁺ ที่ m/z 122.0, 114.2 และ 186.3 ตามลำดับเป็น precursor ion เลือกคู่ product ion ที่ m/z 58.0 กับ 63.0, 98.0 กับ 58.0 และ 171.1 กับ 77.0 ตามลำดับ

สำหรับสภาวะเครื่อง LC ผู้วิจัยได้ปรับจากวิธีของ QuPPE-Method โดยใช้โปรแกรม double gradient ในการแยกสาร ทำให้ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์เพิ่มจาก 12 นาที เป็น 24 นาที เพื่อป้องกันการเกิด carry over ในระบบ และใช้ column ชนิด hydrophilic interaction (HILIC) มี particle shape เป็นแบบ spherical ซึ่งมีความพิเศษสามารถทำงาน 2 รูปแบบ ผสมผสานกัน (difunctional bonded) ระหว่าง silica-based C18 ซึ่งเป็น reversed-phase กับ normal phase ทำให้มีความจำเพาะในการหน่วงสารที่มีคุณสมบัติ HPH อยู่ใน column ได้นาน ทำให้ retention time ของสารเป้าหมายมีความเหมาะสม ไม่ออกเร็วเกินไป ส่วนวิธีการสกัด

ผู้วิจัยใช้วิธีของ QuPPE-Method Version 8.1 โดยปัจจัยหลักที่ต้องควบคุมสำหรับขั้นตอนการสกัด คือ สภาวะความชื้นของตัวอย่าง ซึ่งต้องเติมน้ำให้ครบ 100% ของชนิดตัวอย่าง โดยคำนวณปริมาตรน้ำที่ต้องเติม และสกัดภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 80 ± 2 องศาเซลเซียส นอกจากนี้พบว่าวิธีการนี้ทำให้สารบริสุทธิ์ก่อนการฉีดเข้าเครื่อง มีเพียงการตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge และใช้ micro-spin filters ช่วยในการกรองตะกอนเท่านั้น ทั้งนี้ผู้วิจัยพบว่าตัวอย่างผักและผลไม้มี matrix หลากหลาย ทั้งประเภทคลอโรฟิลสูง น้ำตาลสูง ดังนั้นการตกตะกอนด้วยอุณหภูมิห้องไม่สามารถกำจัดสิ่งรบกวนออกได้ทั้งหมด ทำให้รับรบกวนผล ดังนั้นการวิเคราะห์จึงได้ทดลองปรับสภาวะอุณหภูมิขณะตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ในทุกขั้นตอนเป็นอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส พบว่าช่วยทำให้สารสกัดในทุกขั้นตอนใส กำจัดสิ่งรบกวนได้ดี สัญญาณพีคที่ตรวจพบชัดเจน ง่ายต่อการประเมินผลวิเคราะห์ ในการวิเคราะห์ยังได้กำหนดการควบคุมคุณภาพเพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้อง ได้แก่ การเลือก identification point ซึ่งเป็นระบบการคิดคะแนน เพื่อการยืนยันชนิดสารในการแปลผลข้อมูล โดยใช้จำนวน parent ion เริ่มต้น และ daughter ion รวมทั้งกำหนดความแตกต่างสูงสุดที่ยอมรับได้ (maximum permitted tolerance) ของ relative ion intensities ตามที่ European Communities (EC) กำหนด⁽¹⁶⁾ นอกจากนี้ค่า precision ที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%RSD) อยู่ในช่วง 0.4–14.5 โดยมีค่า HORRAT < 2 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ของ Codex กำหนดไว้ นอกจากนี้ยังได้มีการวางแผนการควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control) เพื่อความมั่นใจในผลการวิเคราะห์ตัวอย่างทุก batch โดยกำหนดไว้ไม่เกิน 10 ตัวอย่าง ทำการทดสอบ method blank, matrix blank, duplicate analysis และ spiked sample ในการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ไม่ได้ใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง (certified reference materials: CRM) ในการประกันคุณภาพของผลการทดสอบและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบ แต่ใช้การเติม (spiking) สารมาตรฐานลงใน matrix blank

แทน อย่างไรก็ตามห้องปฏิบัติการมีการควบคุมคุณภาพเพื่อเฝ้าระวังความใช้ได้ของการทดสอบ โดยเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญ การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการในตัวอย่างข้าวโอ๊ต 09130 จัดโดย FAPAS รอบระหว่างเดือนเมษายน–มิถุนายน 2563 พบว่าผลการประเมินอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ ($|Z| < 2$) โดยคลอร์มีควอตและเมพิควอต มีค่า Z score เท่ากับ 0.9 และ -0.1 ตามลำดับ ในปี พ.ศ. 2563 วิธีตรวจวิเคราะห์นี้ได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ แสดงให้เห็นว่าวิธีที่ได้ทดสอบนี้มีความเหมาะสมในการใช้วิเคราะห์สารทั้ง 4 ชนิด ในผักและผลไม้ โดยเทคนิค LC-MS/MS

เมื่อพิจารณาความสมเหตุสมผลของค่าความไม่แน่นอน โดยใช้เกณฑ์การคำนวณจากค่า standard deviation ค่าความไม่แน่นอนที่ควรจะเป็นเท่ากับ 2 predicted Horwitz's RSD⁽¹⁸⁾ เมื่อคำนวณค่าความไม่แน่นอนที่ควรจะเป็น เท่ากับ 31.6% แต่จากวิธีนี้ค่าความไม่แน่นอนที่พิจารณาจากแหล่งความไม่แน่นอนที่มีผลกระทบต่อปริมาณสาร มีค่า 26.2% ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าที่ควรจะเป็น พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้เหมาะสมและสอดคล้องตามเกณฑ์การพิจารณาความสมเหตุสมผลของค่าความไม่แน่นอน

จากผลการสำรวจพบการตกค้างเพียง 3 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 219 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.4 โดยตรวจพบสารเมพิควอตในถั่วฝักยาว 0.11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และส้มโชกุน 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเกินค่าดีฟอลต์ลิมิตที่กำหนดไว้สำหรับพืชได้ไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทั้ง 2 ตัวอย่าง และพบสารคลอร์มีควอตในผักโขมแก้ว ปริมาณน้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งน้อยกว่าค่าดีฟอลต์ลิมิตที่กำหนดไว้ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามบัญชีหมายเลข 3 แนบท้ายประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 387 (พ.ศ. 2560) จากผลการสำรวจดังกล่าวพบว่าจำนวนตัวอย่างที่พบปริมาณการตกค้างน้อยมาก แสดงได้ว่าผู้ผลิตมีความตื่นตัวในการยกระดับมาตรฐานสินค้าและแรงผลักดันของภาครัฐที่มีมาตรการตรวจสอบ ผ่านโครงการสำรวจและเฝ้าระวังการตกค้างของสารเคมี

ป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้สดหลายโครงการ ตลอดจนมาตรฐานการผลิตสินค้าทางการเกษตร (Good Agriculture Practices: GAP) มีศักยภาพเพียงพอที่จะผลักดันให้เกิดวงจรผักผลไม้ปลอดภัย (demand driven) ดังนั้นจากผลการสำรวจเบื้องต้นสะท้อนให้เห็นว่าข้อกำหนดและกฎเกณฑ์ต่างๆ เหล่านี้สามารถสร้างความมั่นใจในคุณภาพและความปลอดภัยของผักและผลไม้ที่จะนำมาบริโภคได้

สรุป

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม herbicides ได้ 4 ชนิด ประกอบด้วย คลอร์มีควอต ไโดควอต เมพิควอต และพาราควอต ซึ่งผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีดังกล่าว พบว่า calibration curve มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.01–0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่า coefficient of determination ในช่วง 0.975–0.999 ค่าเฉลี่ย %recovery อยู่ในช่วง 66.1–117.2% และ HORRAT อยู่ในช่วง < 0.1–1.0 มีค่า LOD และ LOQ ของทุกสารเท่ากับ 0.005 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ มีคุณลักษณะเฉพาะแสดงสมรรถนะที่ผ่านเกณฑ์การยอมรับและเหมาะสม มีความถูกต้อง แม่นยำ มีความไว และความจำเพาะต่อสารที่ต้องการทดสอบ ให้ผลทุกพารามิเตอร์ผ่านเกณฑ์ยอมรับของสากล เหมาะกับการใช้งาน (fitness for intended use) สามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมาย และเพื่อความยุติธรรมแก่ผู้ประกอบการและคุ้มครองผู้บริโภคต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ ที่ช่วยให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ และสนับสนุนการศึกษาวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ฝ่ายยาสัตว์และวัตถุออกฤทธิ์ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ช่วยเตรียมและสกัดตัวอย่าง จนทำให้งานวิจัยบรรลุผลสำเร็จในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Bauer A, Luetjohann J, Rohn S, Kuballa J, Jantzen E. Development of an LC-MS/MS method for simultaneous determination of the quaternary ammonium herbicides paraquat, diquat, chlormequat, and mepiquat in plant-derived commodities. *Food Anal Methods* 2018; 11: 2237–43.
2. Chamkasem N, Morris CJ, Harmon T. Determination of paraquat and diquat in potato by liquid chromatography/tandem mass spectrometer. *J Regul Sci* 2017; 05: 1–8.
3. Pizzutti IR, Vela GM, de Kok A, Scholten JM, Dias JV, Cardoso CD, et al. Determination of paraquat and diquat: LC-MS/MS optimization and validation. *Food Chem* 2016; 209: 248–55.
4. กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. พาราควอต (Paraquat). พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ฝ่ายศูนย์ข้อมูลสารอันตรายและอนุสัญญาการจัดการสารอันตรายและกากของเสีย; 2541. หน้า 7–12.
5. คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล. สารเคมีกำจัดวัชพืช (Herbicides). [ออนไลน์]. 2542; [สืบค้น 25 ม.ค. 2565]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://med.mahidol.ac.th/poisoncenter/th/bulletin/bul99/v7n3/Herb>.
6. กรมวิชาการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร. [ออนไลน์]. 2565; [สืบค้น 25 ม.ค. 2565]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.oae.go.th/view/1/ปัจจัยการผลิต/TH-TH>.
7. World Health Organization. The WHO recommended classification of pesticide by hazard and guidelines to classification 2000–2002 (WHO/IPCS/01.5). [online]. 2002; [cited 25 Jan 2022]; [58 screens]. Available from: URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42524>.
8. United States Environmental Protection Agency. R.E.D. FACTS paraquate dichloride. Prevention, pesticides and toxic substances (7508W). [online]. 1997; [cited 25 Jan 2022]; [12

- screens]. Available from: URL: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-061601_1-Aug-97.pdf.
9. Commission Implementing Regulation (EU) 2018/1532 of 12 October 2018 concerning the non-renewal of approval of the active substance diquat, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending Commission Implementing Regulation (EU) No 540/2011. Official Journal of the European Union 2018: L 257/10–L 257/12.
 10. พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่อง บัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย ฉบับที่ 6 (พ.ศ. 2563). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 117 ง (วันที่ 19 พฤษภาคม 2563) หน้า 56.
 11. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 419 (พ.ศ. 2563) เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง ฉบับที่ 3. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 257 ง (วันที่ 2 พฤศจิกายน 2563) หน้า 27.
 12. Kaczynski P. Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides. Food Chem 2017; 230: 524–31.
 13. Halim N, Kuntom A, Shinde R, Banerjee K. Determination of paraquat residues in palm oil by high-performance liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometry. Eur J Lipid Sci Technol 2019; 121: 1900092. (7 pages).
 14. Esparza X, Moyano E, Galceran MT. Analysis of chlormequat and mepiquat by hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry in food samples. J Chromatogr A 2009; 1216: 4402–6.
 15. European Commission (EURL-SRM). Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in foods of plant origin via LC-MS/MS involving simultaneous extraction with methanol. (QuPPE-Method) version 8.1. [online]. 2015; [cited 25 Jan 2022]; [60 screens] Available from: URL: https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth_QuPPE.pdf.
 16. Commission Decision of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities 2002: L221/8–L221/36.
 17. Fajgelj A, Ambrus A, editors. Principles and practices of method validation. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry; 2000.
 18. Ellison SLR, Williams A, editors. EURACHEM/CITAC guide: quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. United Kingdom: EURACHEM/CITAC; 2012.

Method Development and Validation of Chlormequat, Diquat, Mepiquat, and Paraquat Residue Determination in Vegetables and Fruits by LC-MS/MS Technique

Saovane Wajasit, Suwimol Muadmah, Atcharee Inkaew, Kanyarat Chuakunchat, Witthawat Wangkaewhiran, Sakulrat Somsuntisuk, and Thongsuk Payanan

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

ABSTRACT According to the statistics on imported chemicals, herbicides, including chlormequat, diquat, mepiquat, and paraquat, have been used as weed control agents. Diquat and paraquat are the herbicides, while chlormequat and mepiquat are synthetic substances for controlling plant growth. The inappropriate use of these agents, especially paraquat, can lead to environmental contamination and cause adverse effects on consumers' health. WHO has categorized paraquat's toxicity as class II, which is moderately hazardous; moreover, paraquat is also classified as a category 4 hazardous substance according to the Hazardous Substances Act, B.E. 2563 (2020). This research aimed to develop and validate the analysis method for the four "quat" substances in fruits and vegetables. Firstly, the sample extraction was undertaken by using acidified methanol, and then centrifuged. After that, the extraction solution was examined to identify and quantify the herbicide residues by LC-MS/MS. The results indicated that the LOD and LOQ were 0.005 and 0.010 mg/kg, respectively, and the linearity was shown in the range of 0.01–0.20 mg/kg. The accuracy of this method was approximately 66.2–117.2%, and the precision was between 0.4% and 14.5%. This method has been recognized as ISO/IEC 17025:2017 accredited method since 2020. Therefore, it is suitable to be applied in a laboratory for consumer protection and law enforcement purposes. This method was also used to survey the contamination of these substances in 219 fresh vegetables and fruits in 2020. It was found that three samples contained herbicide residues: mepiquat in two samples and chlormequat in the other one, while paraquat residues were not detected in any of the three samples.

Keywords: Chlormequat, Diquat, Mepiquat, Paraquat, Vegetables and Fruits

การประเมินคุณภาพสารมาตรฐาน Factor VIII แบบผงแห้งเพื่อทดสอบค่าความแรง

โสम्मริสา พวงพรศรี อัครจรรย์ อาเมน ปัทมา บุณนาค จิตาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์ ชาญวิทย์ ชูแก้ว
และ ไพศาล พังจันทน์

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ Factor VIII เป็นยาชีววัตถุสำหรับรักษาโรคฮีโมฟีเลีย ชนิดเอ โดยปริมาณยาที่ฉีดให้ผู้ป่วยขึ้นกับระดับความรุนแรงและความเข้มข้นที่ระบุบนขวดยา ในการทดสอบความแรงโดยวิธีเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอ้างอิงจะทำให้ทราบปริมาณความเข้มข้นที่มีหน่วยเป็น international units (IU) ได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมและประเมินคุณภาพสารมาตรฐาน Factor VIII แบบผงแห้งที่ผลิตโดยสถาบันชีววัตถุ เพื่อนำไปใช้สำหรับการทดสอบค่าความแรงของผลิตภัณฑ์ Factor VIII ผลการประเมินสารมาตรฐานอ้างอิง Factor VIII แบบผงแห้งดังกล่าว พบว่ามีค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนการแบ่งบรรจุเท่ากับ 0.18 ค่าความแรงเฉลี่ยเท่ากับ 16.26 IU/ขวด และค่าร้อยละความชื้นเฉลี่ยเท่ากับ 1.77 ผลการประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันไม่มีความแตกต่าง และมีลักษณะทางกายภาพและความสามารถละลายที่ดี มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8.517 การศึกษาความคงตัวแบบ long term เก็บรักษาในสภาวะปกติอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส พบว่าที่ 150 วัน ค่าความแรงไม่ลดลง การศึกษาความคงตัวในสภาวะเร่งพบลักษณะทางกายภาพและค่าความเป็นกรด-ด่างปกติ มีค่าร้อยละความชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สูงกว่าที่ 4 และ 25 องศาเซลเซียส และความแรงที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส มีค่าลดลงในวันที่ 3 และ 7 ดังนั้น Factor VIII ชนิดผงแห้ง สามารถใช้เป็นสารมาตรฐานสำหรับการทดสอบความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII ได้ โดยมีการนำมาทดสอบค่าความแรงทุก 6 เดือน เพื่อติดตามประสิทธิภาพความคงตัว

คำสำคัญ: สารมาตรฐาน Factor VIII แบบผงแห้ง, ความแรง, ความคงตัว

Corresponding E-mail: soammarisa.p@dmsc.mail.go.th

Received: 18 February 2022

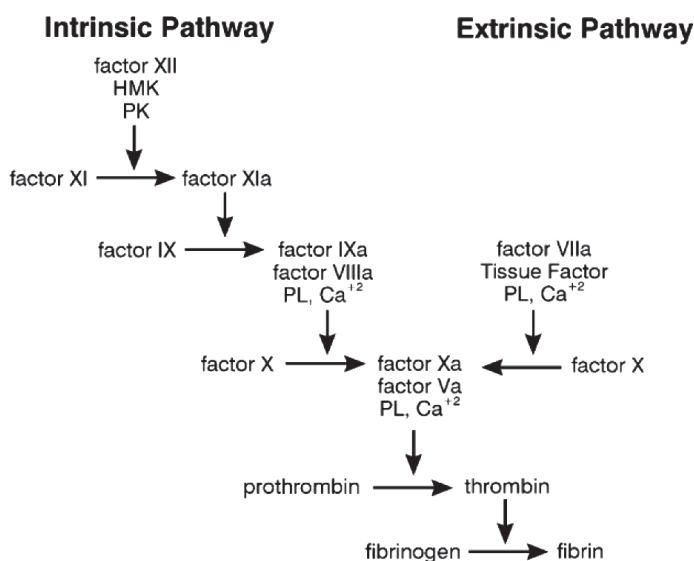
Revised: 11 May 2022

Accepted: 31 May 2022

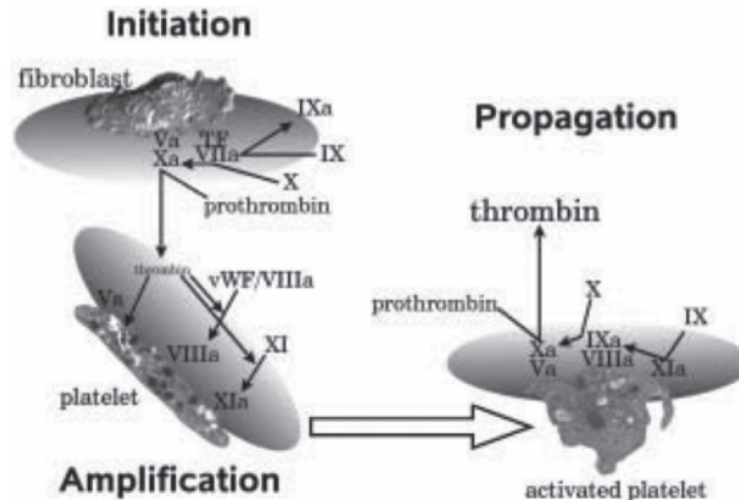
บทนำ

กระบวนการแข็งตัวของเลือดเป็นกลไกสำคัญเพื่อลดการเสียเลือดเมื่อเกิดบาดแผล มีกลไกที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ คือ หลอดเลือด เกิดเลือด และปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (factor) การกระตุ้นกระบวนการทำงานของปัจจัยการแข็งตัวของเลือดมีความซับซ้อน ปัจจัยการแข็งตัวของเลือดส่วนใหญ่ถูกสร้างในรูป inactive form ได้แก่ Factor II, VII, IX, X, XI, XII และ prekallikrein เมื่อมีการบาดเจ็บของผนังหลอดเลือดจะมีการกระตุ้นการสร้างลิ่มเลือด โดยปัจจัยการแข็งตัวของเลือดจะเปลี่ยนรูปเป็น active form เพื่อกระตุ้นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดตัวต่อไป ทำให้ cofactor อื่นๆ เริ่มทำงาน ได้แก่ tissue factor (TF), Ca^{2+} , Factor V และ VIII ซึ่งจะช่วยให้ประสิทธิภาพของกลไกการเกิดลิ่มเลือดจนสุดท้ายทำให้ fibrinogen เปลี่ยนเป็น fibrin เกิดเป็นลิ่มเลือดที่บริเวณบาดแผล จากการศึกษาที่ผ่านมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1964 พบว่ากลไกการแข็งตัวของเลือดอธิบายผ่านกลไกที่เรียกว่า cascade model⁽¹⁾ ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยเชื่อว่าเป็นการกระตุ้นผ่าน intrinsic pathway และ extrinsic pathway ซึ่งทั้งสองส่วนทำงานร่วมกันกระตุ้นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดใน common pathway ได้เป็น fibrin clot มีการ

ศึกษาต่อมาพบว่ารูปแบบนี้มีข้อบกพร่องโดยไม่สามารถอธิบายพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นจริงบางอย่าง เช่น ไม่พบว่ามีภาวะเลือดออกผิดปกติในผู้ที่ขาด contact factor ตั้งแต่กำเนิด จึงนำไปสู่แนวคิดใหม่ของกลไกการแข็งตัวของเลือดที่เรียกว่า cell-based model coagulation ดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งกระบวนการกระตุ้นการเกิดลิ่มเลือดจะเกิดบนผิวเซลล์เป็นหลัก โดยแบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือ 1) initiation phase เมื่อเกิดบาดแผล TF จะกระตุ้น Factor VII เกิดเป็น Factor VIIa (active)/TF complex ที่จะกระตุ้นเปลี่ยน Factor X เป็น Xa ซึ่ง Factor Xa จะเปลี่ยน prothrombin เป็น thrombin ในปริมาณน้อยๆ 2) ระยะ amplification phase ปริมาณ thrombin จากระยะที่ 1 จะกระตุ้นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดชนิด Factor V, VIII, XI และ XIII ให้อยู่ในรูป active form ที่สามารถเปลี่ยน Factor IX เป็น IX ที่ active และเกิดการขยายสัญญาณการกระตุ้นการเกิดลิ่มเลือดให้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และ 3) propagation phase เป็นการทำงานร่วมกันของ Factor IXa และ VIIIa ทำหน้าที่กระตุ้นเปลี่ยน factor X ให้ active สามารถเปลี่ยน prothrombin ให้เป็น thrombin ได้ปริมาณมากๆ ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น fibrinogen ในท้ายที่สุด



ภาพที่ 1 การกระตุ้นการแข็งตัวของเลือดแบบ cascade model แบ่งเป็น 3 ส่วน คือ intrinsic pathway, extrinsic pathway และ common pathway⁽¹⁾



ภาพที่ 2 การกระตุ้นการแข็งตัวของเลือดแบบ cell-based model ประกอบการทำงานต่อเนื่องกัน 3 ระยะ คือ initiation phase, amplification phase และ propagation phase⁽¹⁾

โรคฮีโมฟีเลีย คือ โรคเลือดออกไหลไม่หยุดหรือเลือดออกง่ายหยุดยาก เป็นโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน โรคฮีโมฟีเลียมี 2 ชนิด คือ ฮีโมฟีเลีย A เกิดจากการขาดโปรตีน Factor VIII และ ฮีโมฟีเลีย B เกิดจากการขาดโปรตีน Factor IX สาเหตุของโรคฮีโมฟีเลียเกิดจากความผิดปกติบนโครโมโซมเพศชนิด X ทำให้มักเกิดโรคในเพศชาย และเป็นยีนแฝงในเพศหญิงทำให้โรคสามารถถ่ายทอดความผิดปกติให้บุตรเพศชายได้ อุบัติการณ์ของโรคในประเทศไทยเท่ากับ 1 ต่อ 13,000–20,000 ของประชากร และช่วงอายุผู้ป่วยที่พบมากที่สุด คือ เด็กเล็กอายุน้อยกว่า 2 ปี อาการของโรคจะมีเลือดออกง่าย โดยอาการจะเป็นๆ หายๆ ตั้งแต่เด็ก รวมถึงอาการฟกช้ำ เลือดออกในกล้ามเนื้อและข้อต่อ อาการเลือดออกที่คงอยู่นานหลังการบาดเจ็บเล็กน้อยหรือการผ่าตัด และอาจรุนแรงหากมีเลือดออกในอวัยวะที่สำคัญ เช่น ที่สมอง การวินิจฉัยโดยสังเกตจากอาการ การเจาะเลือดตรวจระดับ Factor VIII และการตรวจชิ้นเนื้อกระดูกหรือการเจาะน้ำคร่ำในระหว่างตั้งครรภ์ ความรุนแรงของโรคสามารถแบ่งเป็น 3 ระดับ คือ ความรุนแรงมาก พบปัจจัยการแข็งตัวของเลือดน้อยกว่า 1% มีโอกาสเลือดออกได้เองหรือเลือดออกภายหลังบาดเจ็บเล็กน้อย ความรุนแรงปานกลาง พบปัจจัยการแข็งตัวของเลือด 1–5% จะมีเลือดออกเมื่อกระทบหรือเกิดการลิ่ม ความรุนแรงน้อย พบปัจจัยการแข็งตัวของ

เลือด 5–40% จะมีเลือดออกมากเมื่อเกิดการบาดเจ็บรุนแรง โรคฮีโมฟีเลียไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ การรักษาโรคฮีโมฟีเลียทำได้โดยการให้ factor ซึ่งช่วยให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น มี 2 รูปแบบ คือ การให้แบบตามอาการ เป็นการให้เมื่อผู้ป่วยได้รับอุบัติเหตุหรือมีเลือดออกจากการกระทบ และการให้แบบป้องกัน เป็นการให้สม่ำเสมอเป็นประจำแม้จะไม่มีอาการ เช่น สัปดาห์ละครั้ง ปริมาณยาที่ให้ผู้ป่วยกำหนดตามความรุนแรงของโรคฮีโมฟีเลีย ซึ่งคำนวณจากปริมาณ Factor VIII ที่ระบุบนขวดยา⁽²⁾

ผลิตภัณฑ์ Factor VIII เป็นยาชีววัตถุ แบ่งได้เป็น 2 ชนิด ตามวิธีการผลิต คือ ชนิดที่ผลิตจากพลาสมามนุษย์ เป็นการนำเลือดที่ได้รับจากการบริจาค นำมาปั่นเก็บพลาสมาและผ่านกระบวนการผลิต โดยแยกสารออกฤทธิ์จากส่วนประกอบอื่นๆ ที่ไม่ต้องการด้วยกระบวนการตกตะกอนโดยการเติมสารเคมี ส่วนอีกชนิดคือ recombinant Factor VIII มีกระบวนการผลิตด้วยเทคโนโลยีทางชีวภาพ เป็นการตัดต่อยีนเข้าไปในเวกเตอร์แล้วนำเข้าไปในเซลล์สิ่งมีชีวิตเพื่อให้ผลิตโปรตีนที่ต้องการ สถาบันชีววัตถุเป็นหน่วยงานภาครัฐทำหน้าที่ควบคุมกำกับยาชีววัตถุที่ใช้ภายในประเทศ การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ทางห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วยการทดสอบลักษณะทางกายภาพ เคมี ความปลอดภัย และความแรง สำหรับการทดสอบความแรง

โดยวิธีตามมาตรฐานสากล European Pharmacopoeia⁽³⁾ จะใช้วิธี chromogenic assay ซึ่งเป็นการทดสอบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอ้างอิงที่ทราบค่าความแรงแล้ววิเคราะห์รายงานค่าความแรงที่มีหน่วยเป็น international unit (IU) ซึ่งสารมาตรฐาน Factor VIII ที่ใช้สำหรับงานทดสอบความแรงของผลิตภัณฑ์ Factor VIII นั้นจะได้รับการสนับสนุนโดยการสั่งซื้อจาก National Institute of Biological Standard and Control (NIBSC) ประเทศสหราชอาณาจักร แต่เนื่องจากเป็นสารมาตรฐานที่ใช้ทั่วโลก NIBSC จึงจำกัดจำนวนการสั่งซื้อ ทำให้มีโอกาสน้อยที่จะเพียงพอต่อการใช้งาน อีกทั้ง Factor VIII เป็นชีวโมเลกุลที่มีความซับซ้อนและมีความคงตัวต่ำเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างง่ายเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น pH หรือ อุณหภูมิ⁽⁴⁾ ดังนั้นเมื่อเปิดใช้งานละลายผงแห้งแล้วไม่สามารถแบ่งเก็บเพื่อนำมาทดสอบซ้ำได้อีก

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมและประเมินคุณภาพสารมาตรฐาน Factor VIII แบบผงแห้งที่ผลิตโดยสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อนำไปใช้สำหรับการทดสอบค่าความแรงของผลิตภัณฑ์ Factor VIII ที่ใช้ในประเทศ

วัสดุและวิธีการ

สารเคมี ตัวอย่าง ชุดนํ้ายาทดสอบ

สารอ้างอิง WHO International Standard 8th INTERNATIONAL STANDARD FACTOR VIII CONCENTRATE NIBSC code: 07/350, ชุดทดสอบ HemosIL Electrachrome Factor VIII (บริษัท Instrumentation Laboratory, USA), ผลิตภัณฑ์ FACTOR VIII TRCS 500 ผลิตโดยศูนย์ผลิตผลิตภัณฑ์จากพลาสมา สภาาชาชาติไทย, formulation buffer (2X) ประกอบด้วย 50 mM Tris buffer pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1% w/v trehalose และ 1% human albumin, fluid thioglycollate broth, tryptic soy broth

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

กล้องจุลทรรศน์ควมคุมอุณหภูมิ รุ่น Axio LabA1 (บริษัท Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany),

เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง รุ่น LyoLab (บริษัท Lyophilization Systems Inc., USA), เครื่องวิเคราะห์ไอออน รุ่น EA940 (บริษัท Orion Inc., USA), เครื่องวิเคราะห์หาปริมาณน้ำแบบคาร์ลพิชเชอร์ รุ่น 852 Titrando (บริษัท Metrohm, Switzerland), เครื่อง Microplate reader รุ่น ELx808 (บริษัท BioTek Instruments, USA), เครื่องทดสอบความปราศจากเชื้อ SteritestTM Compact (บริษัท Merck, Germany), และชุดกรองทดสอบความปราศจากเชื้อ Steritest canister (บริษัท Merck, Germany)

การเตรียม Factor VIII และการบรรจุ

ผลิตภัณฑ์ FACTOR VIII ขนาด 500 IU ได้รับจากศูนย์ผลิตผลิตภัณฑ์จากพลาสมา สภาาชาชาติไทย แล้วนำมาเตรียมสารมาตรฐาน Factor VIII 80 IU/มิลลิลิตรด้วย formulation buffer แบ่งบรรจุปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร (40 IU/ขวด) ลงขวดแก้ว (borosilicate glass type I) ขณะบรรจุให้ผสมโดยใช้แท่งเหล็กกวนตลอดเวลา ปิดจุกยางในระดับครึ่งจุกยาง แล้วนำเข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งภายในห้องปลอดเชื้อ

กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

การทำแห้งแบบเยือกแข็งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง การศึกษาหาค่าปัจจัยที่สำคัญของการทำแห้งแบบเยือกแข็งที่ผ่านมาของการเตรียมสารมาตรฐานแบบแห้งของสถาบันชีววัตถุ^(5,6) ทำโดยตั้งค่าโปรแกรมการทำแห้งของเครื่องดังนี้ กำหนดค่าอุณหภูมิแช่แข็งเท่ากับ -60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการเยือกแข็ง (freeze) โดยสมบูรณ์ ในชั้นปฐมภูมิของกระบวนการทำแห้ง (primary drying process) เพิ่มอุณหภูมิจาก -60 เป็น -40 องศาเซลเซียส และกำหนดความดันที่ 100 mTorr เป็นเวลา 63 ชั่วโมง จากนั้นขั้นทุติยภูมิของกระบวนการทำแห้ง (secondary drying process) ปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 20 องศาเซลเซียส ความดันเท่าเดิม นาน 14 ชั่วโมง สารมาตรฐาน Factor VIII ที่เตรียมเสร็จแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส การนำมาศึกษาคุณภาพให้ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร (water for injection, WFI)

วิธีวิเคราะห์ความแรง chromogenic assay

การวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบ HemosIL Elettachrome Factor VIII โดยนำ factor reagent และ chromogenic substrate ที่เตรียมมาอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ก่อนเริ่มการทดสอบ เจือจางสารอ้างอิงและตัวอย่าง Factor VIII ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ของชุดทดสอบ เป็น 4 ระดับความเข้มข้น คือ 0.000625, 0.00125, 0.0025 และ 0.005 IU/มิลลิลิตร นำแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมลงใน 96 well cell culture plate บ่มเพลทที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที เติม factor reagent ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม บ่มเพลทที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที เมื่อครบเวลาเติม chromogenic substrate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มเพลทที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม 20% acetic acid เพื่อหยุดปฏิกิริยา อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ลบด้วยค่า 490 นาโนเมตร ตามที่ระบุไว้ในคู่มือชุดทดสอบ โดยกลุ่มควบคุมเติมสารละลายบัฟเฟอร์แทนการเติมสารละลายตัวอย่าง ทดสอบความแรงใช้ตัวอย่าง 2 ขวด ทำ 2 ซ้ำ แบบเป็นอิสระต่อกัน คำนวณค่าความแรงเทียบกับสารอ้างอิงด้วยโปรแกรม parallel line analysis

การประเมินประสิทธิภาพ

ก่อนการทำแห้ง

สุ่มชั่งน้ำหนักขวดก่อนและหลังบรรจุตัวอย่างช่วงเริ่ม ช่วงกลาง และช่วงปลายของการบรรจุ จำนวน 10 ขวด เพื่อหาน้ำหนักการแบ่งบรรจุและค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%coefficient of variation, %CV) ของการแบ่งบรรจุ

หลังการทำแห้ง

การทดสอบความแรง

นำสารมาตรฐาน Factor VIII จำนวน 10 ขวด ทดสอบความแรง วิเคราะห์ค่า Geomean เพื่อรายงานเป็นค่าความแรงของสารมาตรฐานที่เตรียมได้ โดยค่า %CV ไม่ควรมากกว่า 10%

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

สุ่มเก็บสารมาตรฐาน Factor VIII จำนวน 10 ขวด ทดสอบความแรง ขวดละ 2 ซ้ำ เป็นอิสระต่อกัน

การทดสอบทางกายภาพ การละลาย ความเป็นกรด-ด่าง

สุ่มสารมาตรฐาน Factor VIII จำนวน 10 ขวด โดยวางที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ ด้วยตาเปล่าภายใต้กล้องสำหรับตรวจทางกายภาพ ซึ่งมีแสงสว่างอยู่ในช่วง 2,000–3,750 ลักซ์ โดยค่อยๆ หมุนขวดและสังเกตลักษณะของตัวอย่างในบริเวณจากหลังสีขาว 5 วินาที และบริเวณจากหลังสีดำ 5 วินาที จากนั้นนำตัวอย่างขวดเดิมตรวจความสามารถในการละลาย โดยใช้ไซริงค์ตัดหัวเข็ม ดูดน้ำ WFI ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ฉีดลงในขวดตัวอย่าง แล้วจดบันทึกเวลาที่ใช้ในการละลาย สำหรับการทดสอบค่าความเป็นกรด-ด่าง นำตัวอย่างที่ผ่านการตรวจการละลายจำนวน 3 ขวด pooled รวมกันแล้ววัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

การทดสอบหาปริมาณความชื้น

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำด้วยวิธี volumetric Karl-Fischer เป็นวิธีการไตเตรทน้ำที่อยู่ในตัวอย่าง ทำปฏิกิริยาระหว่าง HYDRANAL-Composite 5 ซึ่งเป็นสารไทแทนท์ บันทึกค่า KFR (Karl-Fischer reagent mg/mL) แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์น้ำโดยเทียบค่าอ้างอิง KFR ของน้ำ standardization water for injection ที่มีค่า 100% ทำการวิเคราะห์ 3 ขวด

การทดสอบความปราศจากเชื้อ

นำสารมาตรฐาน Factor VIII จำนวน 4 ขวดวิเคราะห์ความปราศจากเชื้อโดยวิธี membrane filtration

เกณฑ์ยอมรับการประเมินการบรรจุ %CV ใช้เกณฑ์กำหนดของ National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) ที่กำหนดไว้ไม่เกิน 1% สำหรับสารที่มีความหนืด เกณฑ์พารามิเตอร์อื่นๆ ใช้เกณฑ์ข้อมูลมาตรฐานการควบคุมคุณภาพของชีววัตถุแบบผงแห้ง ได้แก่ ความสามารถในการละลายเฉลี่ยตามเกณฑ์กำหนดควรน้อยกว่า 3 นาที⁽⁷⁾ การทดสอบ

ความเป็นกรด-ด่าง ควรอยู่ระหว่าง 6–8.5 ค่าความชื้นของชีววัตถุผงแห้งทั่วไปที่ใช้สำหรับฉีดในคนกำหนดไว้ไม่เกินร้อยละ 3⁽⁸⁾

การศึกษาความคงตัว

ความคงตัวในสภาวะปกติ long term stability study เก็บ Factor VIII ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3, 7 และ 150 วัน เมื่อครบเวลานำตัวอย่างตรวจความแรง ลักษณะทางกายภาพ ความเป็นกรด-ด่าง และวิเคราะห์ปริมาณความชื้นที่เหลือ

ความคงตัวในสภาวะเร่ง accelerated stability study เก็บ Factor VIII ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3 และ 7 วัน เมื่อครบเวลานำตัวอย่างตรวจความแรง ลักษณะทางกายภาพ ความเป็นกรด-ด่าง วิเคราะห์ปริมาณความชื้นที่เหลือ

ผล

จากการผลิต Factor VIII พบว่าได้จำนวนสารมาตรฐาน Factor VIII ที่เตรียมเป็นผงแห้ง จำนวน

289 ขวด โดยในขั้นตอนหลังแบ่งบรรจุได้ประเมินประสิทธิภาพความสม่ำเสมอของการบรรจุ พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของสารที่บรรจุเท่ากับ 0.516 กรัม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.001 และร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการแบ่งบรรจุเท่ากับ 0.18 แล้วนำไปประเมินหลังการทำแห้งเพื่อทดสอบค่าความแรง ความเป็นเนื้อเดียวกัน ลักษณะทางกายภาพ และความคงตัว

ค่าความแรงของสารมาตรฐาน Factor VIII แบบผงแห้ง เป็นตัวแปรสำคัญที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของสารมาตรฐาน ผลวิเคราะห์ค่าความแรงต่ำสุดและสูงสุดเท่ากับ 14.6–17.9 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 16.26 IU/ขวด ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 1.13 %CV เท่ากับ 6.90 ดังแสดงในตารางที่ 1

จากผลการประเมินความเป็นเนื้อเดียวกัน พบว่าสารมาตรฐาน จำนวน 289 ขวด มีผลค่าความแรงไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p = 0.058$) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความแรงสารมาตรฐาน Factor VIII แบบผงแห้ง

การทดสอบ	ค่าความแรง (IU/ขวด)
1	17.1
2	16.7
3	17.1
4	17.0
5	17.9
6	16.9
7	14.6
8	15.6
9	15.2
10	14.9
Geomean	16.26
SD	1.13
%CV	6.90

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

ครั้งที่	ค่าความแรง (IU/ขวด)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	15.1	14.9	13.4	16.9	15.9	14.4	14.8	15.9	15	15.2
2	14.0	13.4	15.2	16.9	16.1	15.8	14.4	15.2	15.4	14.6
Geomean	14.54	14.13	14.27	16.90	16.00	15.08	14.60	15.55	15.20	14.90

การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นหลังการทำแห้งพบว่า ได้ค่าร้อยละความชื้นต่ำสุดเท่ากับ 1.70 และสูงสุด 1.88 คิดเป็นค่าร้อยละเฉลี่ยเท่ากับ 1.77 ดังแสดงในตารางที่ 3 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ พบว่ามีลักษณะเป็นก้อนสีขาว เมื่อเคาะไม่เกิดการยุบตัวและไม่แตกเป็นชิ้น ดังแสดงในภาพที่ 3 เมื่อนำมาละลายด้วย

WFI สามารถละลายได้ทันทีโดยไม่ต้องเขย่า มีค่าการละลายอยู่ในช่วง 16–18 วินาที ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 17.64 วินาที เมื่อนำตัวอย่างที่ละลายแล้วมาทดสอบความเป็นกรด-ด่าง มีค่าอยู่ระหว่าง 8.51–8.52 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.517 การทดสอบความปราศจากเชื้อ ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรีย

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบสารมาตรฐาน Factor VIII หลังการทำแห้ง

	สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ของการแบ่งบรรจุ (%CV) (n = 10)	การละลาย (วินาที) (n = 6)	pH (n = 3)	ความชื้น (%) (n = 3)	ความปราศจากเชื้อ (n = 4)
Geomean	0.516	17.64	8.517	1.77	ไม่พบ
SD	0.001	1.03	0.006	0.098	
%CV	0.18	5.85	0.068	5.54	



ภาพที่ 3 ลักษณะทางกายภาพ มีลักษณะเป็นก้อนสีขาว

การศึกษาความคงตัวในสภาวะปกติที่อุณหภูมิ -70°C องศาเซลเซียส เมื่อนำ Factor VIII ออกจากเครื่องทำแห้งและทำการทดสอบโดยนับเป็นวันที่ 0 ของการศึกษาความคงตัว ผลการทดสอบพบลักษณะทางกายภาพปกติ ดังแสดงในตารางที่ 4 ผลการทดสอบค่าความแรงมีแนวโน้มไม่ลดลง ค่าความแรงระยะเวลาที่ 0, 1, 3, 7 และ 150 วัน เท่ากับ 15.29, 15.53, 17.58, 19.33

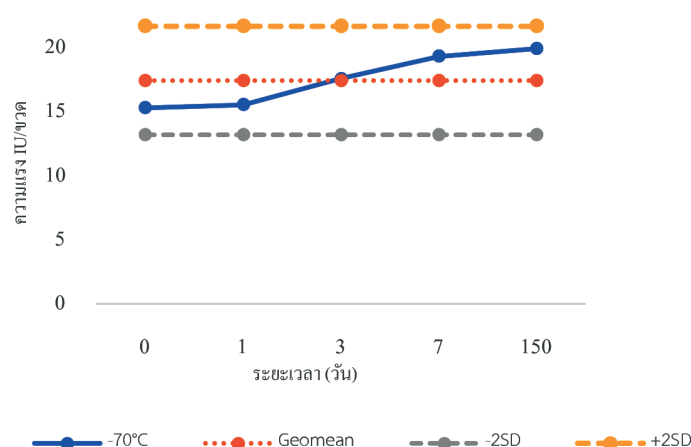
และ 19.92 IU/ขวด ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย $\pm 2\text{SD}$ เท่ากับ 17.43 ± 4.23 ดังแสดงในภาพที่ 4

การศึกษาความคงตัวในสภาวะเร่ง เมื่อนำสารมาตรฐาน Factor VIII เก็บในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูงกว่าปกติ คือ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3 และ 7 วัน ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาความคงตัวในสภาวะปกติ (-70°C องศาเซลเซียส)

การทดสอบ	ระยะเวลา (วัน)				
	0	1	3	7	150
ลักษณะทางกายภาพ	P	P	P	P	P
ความเป็นกรด-ด่าง	8.56	8.51	8.52	8.30	8.54
ความชื้น (%)	1.77	2.06	1.83	ND	ND
ความแรง (IU/ขวด)	15.29	15.53	17.58	19.33	19.92

ND = not done, P = มีลักษณะเป็นก้อนสีขาว เมื่อเคาะไม่เกิดการยุบตัวและไม่แตกเป็นชิ้น



ภาพที่ 4 ผลทดสอบค่าความแรงในสภาวะปกติ (-70°C องศาเซลเซียส) ที่ 1, 3, 7 และ 150 วัน

ตารางที่ 5 ผลการศึกษาความคงตัวในสภาวะเร่ง

การทดสอบ / ระยะเวลา (วัน)	4°C			25°C			37°C		
	1	3	7	1	3	7	1	3	7
ลักษณะทางกายภาพ	P	P	P	P	P	P	P	P	P
ความเป็นกรด-ด่าง	8.56	8.46	8.30	8.39	8.51	8.33	8.40	8.37	8.39
ความชื้น (%)	1.92	1.99	ND	1.96	2.03	ND	2.52	2.78	ND
ความแรง (IU/ขวด)	15.74	15.59	19.77	16.85	15.85	16.58	16.60	14.64	13.77

ND = not done, P = มีลักษณะเป็นก้อนสีขาว เมื่อเคาะไม่เกิดการยุบตัวและไม่แตกเป็นชิ้น

ผลการตรวจทางกายภาพในทุกสภาวะพบมีลักษณะปกติ ผลการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในสภาวะเร่งทั้ง 3 ช่วงอุณหภูมิ ตลอดระยะเวลา 7 วัน พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.977$) ผลการทดสอบค่าความชื้นพบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีค่าร้อยละความชื้นสูงกว่าสารมาตรฐานที่เก็บในสภาวะปกติและสภาวะเร่งที่ 4 และ 25 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.006$) ที่สภาวะ 4 องศาเซลเซียส ค่าความแรงไม่ลดลง ซึ่งต่างจากที่ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ความแรงมีค่าลดลงตั้งแต่วันที่ 3-7

เมื่อเปรียบเทียบค่าความแรงที่สภาวะเร่งในอุณหภูมิต่างๆ เทียบกับค่าความแรงที่เก็บในสภาวะปกติ

-70 องศาเซลเซียส ที่เวลาเดียวกัน (100%) ดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่าที่ 4 องศาเซลเซียส ค่าความแรงที่เวลา 1, 3 และ 7 วัน มีค่าเท่ากับร้อยละ 101, 89 และ 102 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าความแรงในวันที่ 3 และ 7 มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยที่สภาวะ 25 องศาเซลเซียส ค่าความแรงที่เวลา 1, 3 และ 7 วัน เท่ากับร้อยละ 108, 90 และ 86 ตามลำดับ เช่นเดียวกันผลทดสอบเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วันที่ 1, 3 และ 7 มีค่าเท่ากับร้อยละ 107, 83 และ 71 ตามลำดับ

ตารางที่ 6 ผลทดสอบค่าความแรงของการศึกษาความคงตัวเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะปกติ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)/ระยะเวลา (วัน)	ค่าความแรง (%)					
	1 วัน		3 วัน		7 วัน	
	(IU/ขวด)	%	(IU/ขวด)	%	(IU/ขวด)	%
-70	15.53	100	17.58	100	19.33	100
4	15.74	101	15.59	89	19.77	102
25	16.85	108	15.85	90	16.58	86
37	16.60	107	14.64	83	13.77	71

วิจารณ์

จากการเตรียมและประเมินคุณภาพสารมาตรฐาน Factor VIII แบบผงแห้งโดยสถาบันชีววัตถุ พบว่าการทดสอบความแรงสามารถกำหนดค่าความเข้มข้นได้เท่ากับ 16.26 IU/ขวด มีความเป็นเนื้อเดียวกัน ผลการทดสอบทั่วไป ได้แก่ ลักษณะทางกายภาพ ความสามารถในการละลาย ความเป็นกรด-ด่าง และความปราศจากเชื้อ พบว่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับทุกพารามิเตอร์ การทำแห้งแบบเยือกแข็งเป็นวิธีรักษาคุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพของโปรตีนได้ดี สะดวกในการเก็บรักษาและง่ายในการขนส่ง⁽⁹⁾ ในการศึกษาครั้งนี้ก่อนการเตรียมสารมาตรฐาน ได้หาสภาวะการทำแห้งโดยการทดสอบผสม Factor VIII และสูตรบัฟเฟอร์เดียวกับที่เตรียม WHO International Standard 8th INTERNATIONAL STANDARD FACTOR VIII CONCENTRATE⁽¹⁰⁾

มี 1% trehalose และ albumin เป็น stabilizer ผลการทำแห้งได้ลักษณะเป็นก้อนเค้กสีขาว มีความชื้นต่ำและละลายได้ดี ค่าความแรงหลังการทำแห้งน้อยกว่าก่อนทำแห้ง มีความเป็นไปได้เพราะ Factor VIII เป็นชีวโมเลกุลโครงสร้างใหญ่ มีความคงตัวต่ำ ลักษณะโครงสร้างมีความอ่อนไหวจากความกดดันเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น มีระดับ pH หรืออุณหภูมิที่สูงหรือต่ำเกินไป การเตรียมสารมาตรฐานในครั้งนี้นี้จึงเตรียมความเข้มข้นก่อนการแบ่งบรรจุ ให้มีความเข้มข้นสูงในระดับที่ไม่ส่งผลต่อการละลายหลังการทำแห้ง ในการทดสอบเพื่อกำหนดค่าความแรงโดยวิธี chromogenic assay ซึ่งเป็นวิธีที่ผ่านการทวนสอบโดยห้องปฏิบัติการของสถาบันชีววัตถุ ผลการทวนสอบผ่านเกณฑ์มาตรฐานทุกพารามิเตอร์⁽¹¹⁾ ผลทดสอบรายงานมีหน่วยเป็น IU

(international units) ที่สามารถสอบกลับได้ ดังนั้นจึงเชื่อได้ว่าค่าความแรงมีความถูกต้องและแม่นยำ สามารถนำมากำหนดเป็นค่าความแรงสารมาตรฐาน Factor VIII ได้ นอกจากนี้ตามข้อกำหนดมาตรฐานการผลิตวัสดุอ้างอิง (ISO Guide 34:2009)⁽¹²⁾ ระบุว่าในการเตรียมสารมาตรฐานจำเป็นต้องมีการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งจากผลวิเคราะห์ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่าสารมาตรฐานแบบผงแห้งทุกขวดมีค่าความแรงเท่ากัน

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นที่เหลือหลังการทำแห้ง พบว่ามีปริมาณความชื้นเหลือเฉลี่ยต่ำกว่าค่าความชื้นของวัคซีนผงแห้งทั่วไปที่ใช้สำหรับฉีดในคนที่กำหนดไว้ไม่เกินร้อยละ 3⁽⁸⁾ และเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอ้างอิงที่ผลิตโดยห้องปฏิบัติการองค์การอนามัยโลกพบว่า อยู่ในช่วงร้อยละ 0.1–2.9 ซึ่งพบว่ามีอายุใช้งานได้นาน 10–20 ปี⁽⁹⁾ สอดคล้องกับการศึกษาของ Duralliu A และคณะ รายงานว่าการเตรียมพลาสมาเข้มข้นแบบผงแห้งที่ความชื้น 3 เปอร์เซ็นต์ มีผลความคงตัวได้มากกว่า 12 เดือน⁽¹³⁾ จากข้อมูลการเตรียมสารมาตรฐาน Factor VIII มีความชื้นหลงเหลืออยู่น้อย จึงเป็นไปได้มากที่สารมาตรฐานนี้น่าจะมีความคงตัวดี

จากประสบการณ์และข้อมูลของ NIBSC พบว่าปัจจัยที่สำคัญที่มีผลทำให้เพิ่มความคงตัวของสารมาตรฐานชีววัตถุแบบผงแห้ง คือ ความแม่นยำ (precision) ของการแบ่งบรรจุ ร่วมกับการทำให้ผงแห้งมีความชื้นน้อยที่สุด ซึ่งจากการทำแห้งสารมาตรฐาน protein C ที่เตรียมจากพลาสมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1987 มีความคงตัวและใช้งานอยู่ได้นานถึง 29 ปี นอกจากนี้ผลการศึกษาจาก NIBSC รายงานว่าสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บสารมาตรฐานจากพลาสมา รวมถึง Factor VIII คือ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และยังสามารถเก็บที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า เช่น -70 หรือ -150 องศาเซลเซียส ได้โดยค่า coagulation activity ยังมีค่าสูงถึง 99% ในเวลาเกิน 5 ปี⁽¹⁴⁾ แสดงให้เห็นว่าที่ -70 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ใช้เก็บสารมาตรฐาน Factor VIII ได้ องค์การอนามัยโลกไม่ได้กำหนดให้ระบุวันหมดอายุของการเตรียมสารมาตรฐาน⁽¹⁵⁾ แต่ให้เฝ้าติดตามโดยวิเคราะห์ข้อมูล trend analysis เพื่อประเมินประสิทธิภาพ trend

analysis คือ วิเคราะห์ทางสถิติเป็นการนำค่าการทดสอบของตัวอย่างจำนวนที่มากเพียงพอ หาค่าเฉลี่ยและค่า $\pm 2SD$ จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความแรงและเวลา แล้วกำหนดเกณฑ์เพื่อการแจ้งเตือนหากค่าเกินนอก $\pm 2SD$ จากการศึกษาพบว่าค่าความแรงที่เก็บในอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 150 มีแนวโน้มสูงขึ้น โดยมีค่าความแรงอยู่ในช่วง $\pm 2SD$ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ จึงจำเป็นต้องติดตามประเมินค่าในช่วงที่มีการนำไปใช้งานด้วยเพื่อให้มั่นใจว่าค่าความแรงยังอยู่ในช่วงที่ใช้งานได้ สำหรับวิธีทดสอบทาง bioassay เป็นวิธีที่มีความแปรปรวน ซึ่งอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้พบผลทดสอบความคงตัวแบบเร่งที่สภาวะ 4 °C มีค่าลดลงในวันที่ 3 และสูงขึ้นในวันที่ 7 ซึ่งจากข้อมูลแล้วอาจจำเป็นต้องเพิ่มระยะเวลาการศึกษาให้นานขึ้น สำหรับการทดสอบทางกายภาพเป็นการดูด้วยตาเปล่าโดยไม่มีการเปิดขวดบรรจุและการทดสอบการละลายหลังเติมน้ำกลั่นเป็นวิธีเดียวกับการเตรียมตัวอย่างชนิดผงแห้งที่ทำก่อนการทดสอบ pH เมื่อพิจารณาต่อค่าการทดสอบ⁽³⁾

สรุป

สารมาตรฐานอ้างอิง Factor VIII แบบผงแห้งสามารถใช้เป็นสารมาตรฐานสำหรับการทดสอบความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII ได้ โดยมีความคงตัวดีเมื่อเก็บรักษาในอุณหภูมิปกติ -70 องศาเซลเซียส เมื่อนำออกจากที่เก็บในสภาวะปกติแล้วควรใช้ทำการทดสอบทันที และเพิ่มความถี่ของการสอบเทียบอย่างน้อยปีละ 2 ครั้ง รวมทั้งการติดตามประสิทธิภาพความคงตัวระยะยาวโดยวิเคราะห์แนวโน้มเหมือนกับชีววัตถุมาตรฐานทั่วไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ดำเนินการโดยใช้งบประมาณของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และขอบคุณ ดร.สุภาพร ภูมิอมร ผู้อำนวยการสถาบันชีววัตถุที่สนับสนุนการดำเนินงานวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. นกขัญ เอื้อประเสริฐ. Current concepts on cell based model of coagulation and roles of factor VIIa and tissue factor on hemostasis, thrombosis, and pathogenesis of other related disease. ว โโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2551; 18(4): 331-41.
2. Bhardwaj R, Rath G, Goyal AK. Advancement in the treatment of haemophilia. Int J Biol Macromol 2018; 118(Pt A): 289-95.
3. Assay of human coagulation factor VIII. In: European Pharmacopoeia 10.0 Vol. 1. Strasbourg, France: Council of Europe; 2020. p. 2844-45.
4. Grillo AO, Edwards KLT, Kashi RS, Shipley KM, Hu L, Besman MJ, et al. Conformational origin of the aggregation of recombinant human factor VIII. Biochemistry 2001; 40(2): 586-95.
5. อัครชัย อาเมน, จิรเดช ปัจฉิม, พรหมจักร เจริญพัฒน์, ณัฐกานต์ มิ่งงามทรัพย์, สุภาพร ภูมิอมร. การศึกษาหาสูตรตำรับที่เหมาะสมในการทำแห้งวัคซีนคางทูมอ้างอิงมาตรฐาน. ว กรมวิทย พ 2554; 53(2): 97-112.
6. สุภาพร ภูมิอมร, อัครชัย อาเมน, จิรเดช ปัจฉิม, สิริรัตน์ ร่วมพร, สุกัลยาณี ไชยมี. การประเมินความคงตัวของวัคซีนปัสสาวะชนิดผงแห้งสำหรับใช้เป็นวัคซีนอ้างอิงมาตรฐานในประเทศไทย. ว วิชาการสาธารณสุข 2557; 23(2): 369-80.
7. Varshney D, Singh M. Lyophilized biologicals and vaccines: modality-based approaches. New York: Springer; 2015.
8. World Health Organization. Requirement for measles, mumps and rubella vaccine and combined vaccine (Live). In: Expert committee on biological standardization; Annex 3: Forty-third report. WHO Technical Report Series 840. Geneva: WHO; 1994.
9. Rey L, May JC, editors. Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Publisher; 2004.
10. WHO International Standard. 8th International Standard Factor VIII Concentrate, NIBSC code: 07/350 Version 1.0. [online]. 2010; [2 screens]. Available from: URL: <https://www.nibsc.org/documents/ifu/07-350.pdf>.
11. โสมมริสา พวงพศรี, วิฑิตาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์, ไพศาล พังจันทน์. การทวนสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบความแรงผลิตภัณฑ์ Factor VIII ด้วยวิธี Chromogenic Assay. ว กรมวิทย พ 2564; 63(3): 721-31.
12. 5.13 Assessment of homogeneity. In: ISO/ Guide 34:2009. General requirements for the competence of reference material producers. Geneva: International Organization for Standardization; 2009.
13. Duralliu A, Matejtschuk P, Stickings P, Hassall L, Tierney R, Williams DR. The influence of moisture content and temperature on the long-term storage stability of freeze-dried high concentration immunoglobulin G (IgG). Pharmaceutics 2020; 12(4): 303. (16 pages).
14. Hubbard AR. International biological standards for coagulation factors and inhibitors. Semin Thromb Hemost 2007; 33(3): 283-9.
15. World Health Organization. Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards (revised 2004). WHO Technical Report Series 2006; 932: 73-131

Evaluation of Factor VIII Freeze-Dried Reference Standard for Potency Testing

Soammarisa Paungpornsri, Assajun Amen, Pattama Bunnag, Titaporn Pootipinyowat, Chanwit Chukaeo, and Paisan Pangjunan

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

ABSTRACT Factor VIII is a biopharmaceutical product for the treatment of haemophilia A patients. The injection dosage varies depending on disease severity and the specified drug label concentration. The potency testing against reference standard leads to the concentration value as international units (IU). The objective of this study was to prepare and evaluate Factor VIII freeze-dried reference standard prepared by the Institute of Biological Products for the potency testing of Factor VIII products. The evaluation of the product revealed that the variation coefficient of packing was 0.18%. The potency value was about 16.26 IU/vial and the moisture content was approximately 1.77%. The homogeneity was not significantly different and it had good physical characteristics and reconstitution. Its pH was approximately 8.517. A long-term stability study in storage condition at -70°C for 150 days suggested that the potency did not decrease. An accelerated stability study suggested that appearance and pH were normal. The moisture content at 37°C was higher than those at 4°C and 25°C and the potency at 25 and 37°C declined on days 3 and 7. Thus, the lyophilized Factor VIII could be used as a reference standard for the potency testing of Factor VIII products and potency testing should be undertaken every 6 months for long-term stability evaluation.

Keywords: Lyophilized reference Factor VIII, Potency, Stability

การพัฒนากระบวนการเตรียม DMSc Stem Pro: Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells สำหรับการศึกษาวิจัยทางคลินิก

อจรรพร คำบัว¹ สิริภากร แสงกิจพร² ละอองศรี อัสชนียะสกุล³ อาริรัตน์ ขอไชย⁴ อติศักดิ์ ตรีนวรัตน์³ สาวิตรี ตัวเรือง⁵ ศุภลักษณ์ บัวศรีแก้ว¹ อภิชาติ โชติชูศรี¹ พชรภรณ์ บุญชู¹ ชลลดา ยอดทัพ¹ พชรภรณ์ นพปรังค์¹ ปัญญกมล จันทรสาขา⁶ และ สมชาย แสงกิจพร⁷

¹สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ ²สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

³คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 10700

⁴โรงพยาบาลสุรินทร์ สุรินทร์ 32000

⁵สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

⁶โรงพยาบาลสัตว์ประจวบคีรีขันธ์ มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม 73170

⁷โรงพยาบาลเพื่อโรคมะเร็งขนาดเล็ก กรุงเทพมหานคร 10530

บทคัดย่อ mesenchymal stem cells (MSC) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีศักยภาพในการเจริญเติบโตเป็นเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ ได้เกือบทุกชนิดในร่างกายเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการวิจัยและพัฒนากระบวนการเตรียม DMSc Stem Pro ซึ่งเป็น MSC จากไขกระดูกสำหรับพัฒนาวิธีการรักษาผู้ป่วย retinitis pigmentosa (RP) โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง MSC รวมถึงการตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการผลิต (process validation) ก่อนเข้าสู่การวิจัยทางคลินิก การเพาะเลี้ยง DMSc Stem Pro ทำในห้องสะอาด (clean room) ระดับ class 100 โดยใช้ DMEM ร่วมกับ 10% FBS เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ บ่มที่ 37°C, 5% CO₂ นาน 36±4.69 วัน (ค่าพิสัยเท่ากับ 31–42) เซลล์ที่ได้มีรูปร่างปลายเรียวแหลม เจริญเติบโต ยึดเกาะพื้นผิวพลาสติก มีจำนวน 8.67±2.23 ล้านเซลล์ (ค่าพิสัยเท่ากับ 6.00–10.62) อัตราการมีชีวิตมากกว่าร้อยละ 90 เซลล์มีการแสดงออกของ CD90, CD105 และ CD73 แต่ไม่มีการแสดงออกของ CD34, CD45 และ HLA-DR สามารถเจริญเติบโตเป็นเซลล์ไขมัน เซลล์กระดูก และเซลล์กระดูกอ่อนได้ ปราศจากการปนเปื้อน endotoxin และจุลชีพ ทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และไมโคพลาสมา กระบวนการทั้งหมดดำเนินการตามหลักเกณฑ์และวิธีการในการผลิตยาแผนปัจจุบัน (GMP) และข้อกำหนดสากลสำหรับการพัฒนายาใหม่ (INDs) อย่างเคร่งครัด DMSc Stem Pro ที่เตรียมจากห้องปฏิบัติการเซลล์ต้นกำเนิดของ

Corresponding author E-mail: acharaporn.d@dmsc.mail.go.th

Received: 18 February 2022

Revised: 19 May 2022

Accepted: 31 May 2022

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นับว่ามีคุณภาพ มีคุณสมบัติสอดคล้องตามข้อกำหนดสากล International Society for Cellular Therapy (ISCT) และปราศจากการปนเปื้อนจุลชีพ สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาวิธีการรักษาผู้ป่วยโรคจอตามีสารสีที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้อย่างมั่นใจ

คำสำคัญ: ไชกระดุก, Mesenchymal stem cells, การตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการผลิต

บทนำ

เซลล์ต้นกำเนิดมีคุณสมบัติในการสร้างเซลล์ทดแทนตนเอง โดยคงสภาพความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และสามารถเจริญเติบโตเป็นเซลล์จำเพาะชนิดต่างๆ ได้ในสภาวะที่เหมาะสม นำไปสู่ความหวังที่จะนำเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้ประโยชน์ในการรักษาหรือซ่อมแซมเนื้อเยื่อและอวัยวะที่ผิดปกติจากการเป็นโรค ความเสื่อม ความสูงอายุ และจากสาเหตุอื่นๆ ได้⁽¹⁾

mesenchymal stem cells (MSC) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดสำหรับเนื้อเยื่อชั้นกลาง ที่มีศักยภาพในการเจริญเติบโตเป็นเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ ได้เกือบทุกชนิดในร่างกายมนุษย์เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม รวมถึงเนื้อเยื่อชั้นกลางและเนื้อเยื่อชั้นนอก MSC สามารถเพาะเลี้ยงได้จากไขกระดูก และมีคุณสมบัติตามข้อกำหนด International Society for Cellular Therapy (ISCT)⁽²⁾ ได้แก่ 1) สามารถยึดเกาะพื้นผิวพลาสติก ภาชนะเพาะเลี้ยง 2) ผิวเซลล์มีการแสดงออกของ CD105, CD90 และ CD73 แต่ไม่มีการแสดงออกของ CD34, CD45, CD11b, CD14, CD19 และ HLA-DR 3) สามารถเจริญเติบโตเป็นเซลล์ไขมัน เซลล์กระดูก และเซลล์กระดูกอ่อน (trilineage in vitro differentiation) MSC มีข้อดีทั้งทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา สามารถลดภูมิคุ้มกันและลดการอักเสบ รวมถึงการมีคุณสมบัติทาง paracrine effect ที่สามารถหลั่งกลุ่มของสารเคมีที่เป็นประโยชน์ในการสื่อสารและส่งเสริมการทำงานของเซลล์ต่างๆ หลายชนิด จากข้อดีหลายประการของ MSC ทำให้นักวิจัยจำนวนมากให้ความสนใจนำ MSC ไปพัฒนาวิธีการรักษาแนวใหม่โดยใช้เซลล์ต้นกำเนิด (stem cell therapy) ในหลายกลุ่มโรค นับตั้งแต่โรคกระดูกและข้อ กลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด กลุ่มโรคทางระบบภูมิคุ้มกัน ทั้ง autoimmune disease

และ graft versus host disease (GVHD) เบาหวาน โรคตับ โรคเอดส์ โรคทางระบบประสาท โรคทางจิตเวช บาดแผลเรื้อรัง และแผลจากการถูกไฟไหม้ เซลล์ต้นกำเนิดชนิด MSC จึงเป็นหนึ่งในกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดที่คาดว่าจะสามารถพัฒนาสู่ทางเลือกใหม่ในการรักษาโรค และฟื้นฟูสภาวะเสื่อมของมนุษยชาติได้^(1,2)

retinitis pigmentosa (RP) หรือโรคจอตามีสารสีที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม เป็นโรคทางพันธุกรรม ที่มีอุบัติการณ์การเกิดโรคของประชากรทั่วโลก ประมาณ 1 ต่อ 3,000 ถึง 4,000⁽³⁾ โดยเกิดจากความผิดปกติของยีนที่ส่งผลให้เซลล์รับแสงในจอตา (photoreceptor cells) ได้แก่ เซลล์ rod และ cone เสื่อมสภาพ ทำให้ผู้ป่วยมีอาการมองเห็นไม่ชัดในเวลากลางคืนและในที่สว่าง ร่วมกับลานสายตาแคบลงเรื่อยๆ จนเหลือเพียงลานสายตาเฉพาะตรงกลาง (tunnel vision) และนำไปสู่ภาวะตาบอดได้ ความผิดปกตินี้อาจเริ่มแสดงอาการตั้งแต่วัยเด็กเล็กหรือวัยอื่นๆ ได้ทุกระยะ ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการใดที่ประสบความสำเร็จในการรักษาโรคนี้ ทำให้ผู้ป่วยและครอบครัวได้รับผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตอย่างมากจากความบกพร่องหรือการสูญเสียการมองเห็น

จากการศึกษาในสัตว์ทดลองที่เป็นโรค RP โดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของสัตว์เองฉีดเข้าในวุ้นตา พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกมีแนวโน้มช่วยคงสภาพการทำงานของเซลล์รับแสงในที่สว่างหรือ cone cell ได้⁽³⁾ จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้ ซึ่งคณะผู้วิจัยได้วิจัยและพัฒนากระบวนการเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดชนิด DMSc Stem Pro ซึ่งเป็น MSC จากไขกระดูกของผู้ป่วยเอง สำหรับนำไปใช้ในการศึกษาความเป็นไปได้และความปลอดภัยของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก เมื่อฉีดเข้าวุ้นตาแก่ผู้ป่วยโรคจอตามีสารสีที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม⁽⁴⁾ โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง MSC

รวมถึงการตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการผลิต (process validation) ก่อนเข้าสู่การวิจัยทางคลินิก กระบวนการทั้งหมดดำเนินการตามหลักเกณฑ์และวิธีการในการผลิตยาแผนปัจจุบัน (Good Manufacturing Practice: GMP)⁽⁵⁾ และข้อกำหนดสากลสำหรับการพัฒนายาใหม่ (Investigational New Drug Applications: INDs)⁽⁶⁾

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการผลิต เป็นตัวอย่างไขกระดูกที่ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล โดยไม่สามารถสืบค้นกลับไปยังตัวบุคคลผู้ให้ไขกระดูกได้ จำนวน 4 ราย ซึ่งผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล เลขที่ Si126/2010 วันที่ 12 กันยายน 2561

ตัวอย่างที่ใช้ในกระบวนการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด MSC เป็นตัวอย่างเซลล์มาตรฐาน human mesenchymal stem cells: HMSC (cell applications, Canada)

การแยกและการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด

นำตัวอย่างไขกระดูกมาเจือจางด้วย sterile PBS pH 7.4 (Invitrogen, USA) แล้วนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Hitachi, Japan) เพื่อเก็บส่วนของ buffy coat นำมาเพาะเลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงชนิด T75cm² (Corning, USA) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ประกอบด้วย Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen, USA) fetal bovine serum (Lonza, USA) antibiotic/antimycotic (Sigma, USA) นำไปบ่มด้วย CO₂ incubator รุ่น NU-5100E (NuAire, Inc, USA) เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3-4 วัน จนกว่าเซลล์จะมีความหนาแน่นประมาณ 90% ของพื้นที่เพาะเลี้ยง จากนั้นทำการย่อยเซลล์ออกจากพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงด้วย 0.25% trypsin/EDTA (Invitrogen, USA) และนำ

เซลล์ที่ได้เพาะเลี้ยงต่อไปใน passage ต่อไป ซึ่งดำเนินการภายใต้ laminar air flow biological safety cabinets รุ่น NU-430 (NuAire, Inc., USA)

สถานที่เพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด เป็นห้องสะอาดระดับ class 100 ณ อาคารปฏิบัติการเซลล์ต้นกำเนิด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีการตรวจติดตามสถานะแวดล้อมทั้งด้านกายภาพและด้านชีวภาพ โดยการติดตามระดับความสะอาดของสถานะแวดล้อมในสถานะไม่มีการปฏิบัติงานและสถานะกำลังปฏิบัติงาน ครอบคลุมการติดตามการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ การติดตามจำนวนอนุภาคในอากาศ ความดัน อุณหภูมิ และการตรวจสอบพารามิเตอร์เหล่านี้โดยช่างเทคนิคเฉพาะด้าน เป็นประจำสม่ำเสมอ ตามมาตรฐานสากล ISO 14644⁽⁷⁾

การตรวจสอบคุณภาพ

การตรวจสอบคุณภาพและคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด ตามข้อกำหนดสากล ISCT ประกอบด้วย การพิสูจน์เอกลักษณ์เซลล์ต้นกำเนิด (identity) การทดสอบความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิด (potency) การทดสอบความบริสุทธิ์ของเซลล์ต้นกำเนิด (purity) การตรวจการปนเปื้อนจุลชีพ (sterility) และการตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ (viability) ดังนี้

การพิสูจน์เอกลักษณ์เซลล์ต้นกำเนิด โดยเทคนิค flow cytometry⁽⁸⁾ อาศัยการตรวจติดตามชนิดแอนติเจนที่จำเพาะบนผิวเซลล์ MSC และตรวจวัดจำนวนเซลล์โดยใช้แสงเลเซอร์กระตุ้น fluorescent ที่ติดฉลากไว้ที่ antibody ให้เกิดการเรืองแสง โดยใช้ anti-CD90 APC (BD Bioscience, USA) anti-CD105 PE (Miltenyi Biotec, USA) anti-CD73 APC (Biolegend®, Canada) anti-CD34 PE (Biolegend®, Canada) anti-CD45 PE (Biolegend®, Canada) anti-HLA-DR APC (Biolegend®, Canada) 7-AAD (BD Pharmingen™, USA) ทำการตรวจวิเคราะห์โดยเครื่อง FACSCanto II (BD Bioscience, USA)

การทดสอบความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดในการเจริญเติบโตเป็นเซลล์อื่นๆ ได้อย่างน้อย 3 ชนิด (trilineage in vitro differentiation) คือ เซลล์ไขมัน

เซลล์กระดูก และเซลล์กระดูกอ่อน โดยเฉพาะเลี้ยง MSC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความจำเพาะ สามารถกระตุ้นให้เจริญเติบโตเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ได้ในสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้ชุดน้ำยา mesenchymal stem cell adipogenesis kit (Chemicon, Canada) ประกอบด้วย adipogenesis medium oil red o solution ชุดน้ำยา mesenchymal stem cell osteogenesis kit (Chemicon, Canada) ประกอบด้วย osteogenesis medium alizarin red solution และชุดน้ำยา NH chondrodiff (Miltenyi, Germany) ประกอบด้วย chondrodiff medium

การทดสอบความบริสุทธิ์ของเซลล์ต้นกำเนิด ดำเนินการตรวจหาปริมาณ endotoxin โดยวิธี limulus amoebocyte lysate (LAL) แบบ kinetic turbidimetric method⁽⁹⁾ อาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดของเลือดแมงดาทะเลกับสาร bacterial endotoxin หากตัวอย่างมี bacterial endotoxin ปนเปื้อนอยู่จะกระตุ้นให้ proenzyme เปลี่ยนแปลงเป็น coagulase ที่สามารถ hydrolyses coagulin ซึ่งมีลักษณะคล้ายเจล การติดตามความขุ่นของการเกิดเจล จึงบ่งบอกถึงปริมาณการปนเปื้อน bacterial endotoxin ได้ โดยใช้ชุดน้ำยา Pyrogen[®] 5000 test kit (Lonza, USA) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง microplate reader model ELX808 TM (Bio Tek[®] Instrument, USA)

การตรวจการปนเปื้อนจุลชีพ⁽¹⁰⁾ ดำเนินการตรวจการปนเปื้อนของแบคทีเรียและเชื้อรา โดยวิธี micro-organism culture ในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soybean broth medium (soybean-casein digest medium) (Difco, USA) สำหรับเชื้อแบคทีเรีย และ fluid thioglycolate medium (Difco, USA) สำหรับเชื้อรา ส่วนการตรวจการปนเปื้อนไมโคพลาสมา⁽¹¹⁾ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ชุดน้ำยา Venor Gem OneStep (Minerva Biolabs, Germany) เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม GeneAmp 5700 (Applied Biosystems, USA) จากนั้นนำไปตรวจสอบ PCR product โดยใช้ 2% agarose gel electrophoresis ภายใต้เครื่องถ่ายภาพเจลภายใต้แสงยูวีรุ่น Bio-Doc-ItTM System (UVP Laboratory Products, USA)

การตรวจสอบอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยการย้อมด้วย trypan blue stain (Invitrogen, USA) สังเกตการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รุ่น TE2000S (Nikon, Japan) โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสีน้ำเงิน ในขณะที่เซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะติดสีย้อม เนื่องจากเซลล์เมมเบรนเกิดการเสื่อมสภาพจึงสามารถติดสีย้อมของ trypan blue ได้

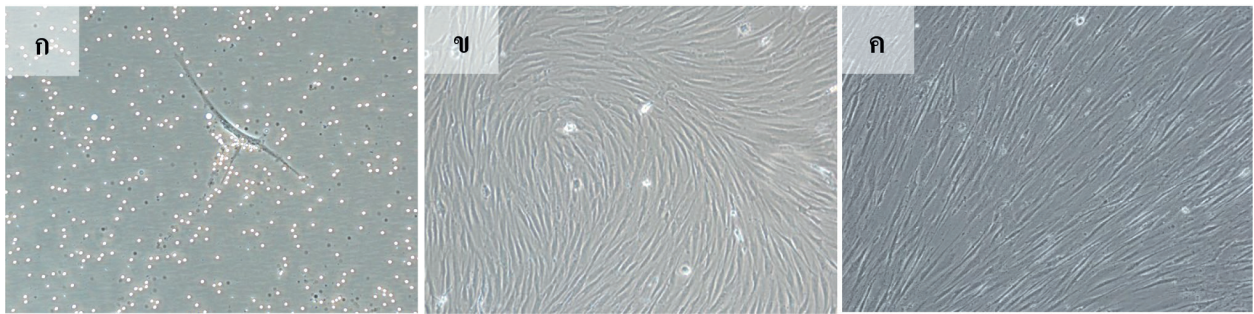
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation: SD)

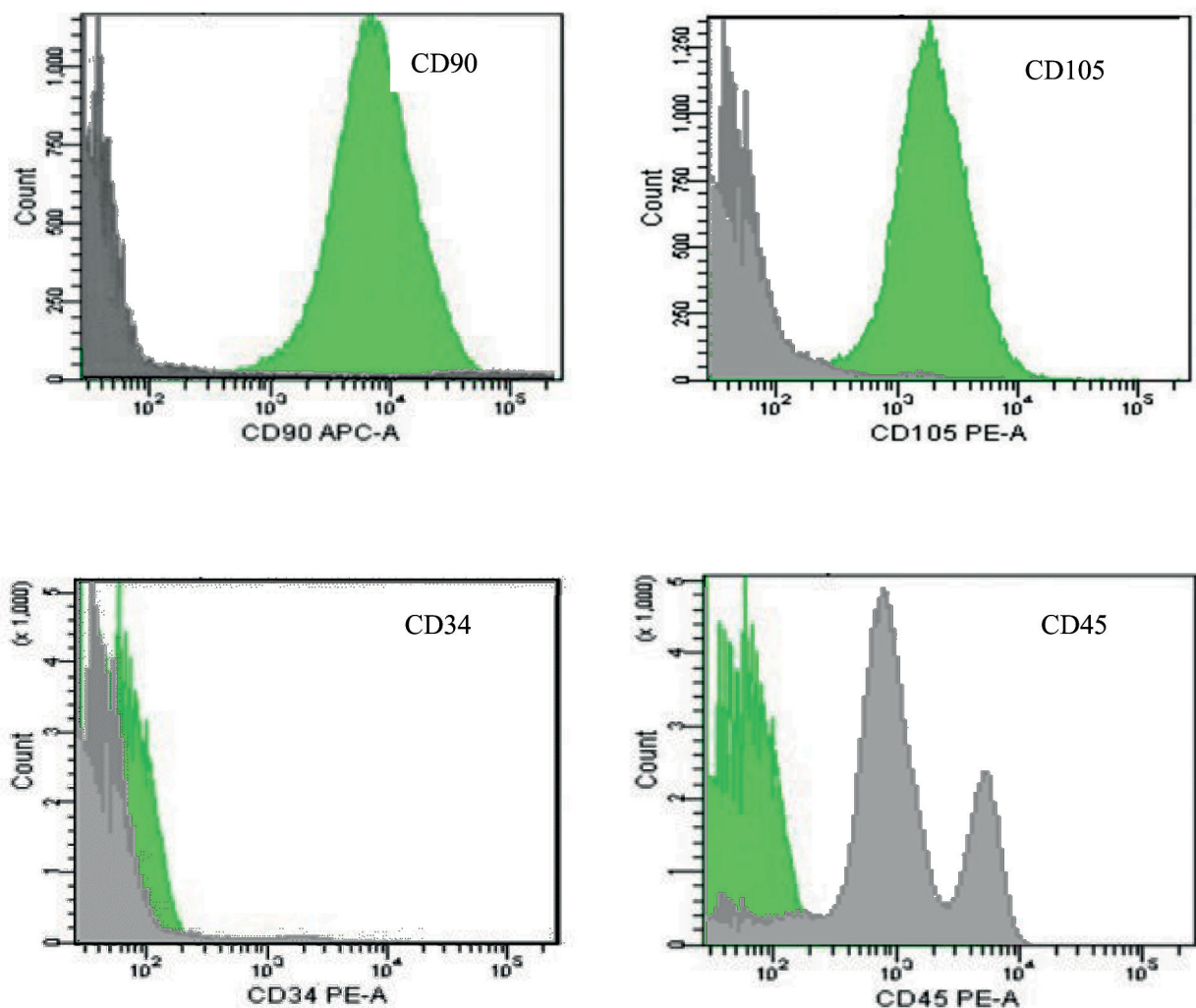
ผล

จากการนำตัวอย่างไขกระดูก จำนวน 4 ราย (20.25 ± 1.71 มิลลิลิตร) มาปั่นแยก buffy coat พบว่าได้ผล mononuclear cell (MNC) เฉลี่ย 26.16 ± 13.45 ล้านเซลล์ ซึ่งมีค่าระหว่าง 7.35–39.15 ล้านเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยง MSC ใน DMEM ร่วมกับ 10% FBS บ่มที่ 37°C , 5% CO_2 และติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ใน 2 วันแรก พบเซลล์ MSC สามารถยึดเกาะที่พื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยง ดังแสดงในภาพที่ 1 ก และเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 5 วัน ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่าเซลล์ที่ไม่ใช่ MSC จะไม่สามารถเกาะพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยง หลังจากเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจะเหลือเฉพาะเซลล์ MSC เท่านั้น และเมื่อเพาะเลี้ยง MSC เป็นระยะเวลา 36 ± 4.69 วัน (ค่าพิสัยเท่ากับ 31–42) พบว่ามีอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ร้อยละ 96.37 ± 2.68 (ค่าพิสัยเท่ากับ 93.64–98.75) เซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้มีรูปร่างปลายเรียวแหลม เจริญเติบโตยึดเกาะพื้นผิวพลาสติก ดังแสดงในภาพที่ 1 ข (passage no. 2) เปรียบเทียบกับเซลล์ MSC ที่เพาะเลี้ยงจากตัวอย่างเซลล์มาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 1 ค

การพิสูจน์เอกลักษณ์เซลล์ต้นกำเนิด โดยเทคนิค flow cytometry พบว่าผิวเซลล์จากไขกระดูกมีการแสดงออกของ CD34 และ CD45 แต่ไม่พบการแสดงออกของ CD90 และ CD105 หลังจากเพาะเลี้ยงไปเป็น MSC พบว่าผิวเซลล์มีการแสดงออกของ CD90 และ CD105 แต่ไม่พบการแสดงออกของ CD34 และ CD45 ดังแสดงในภาพที่ 2

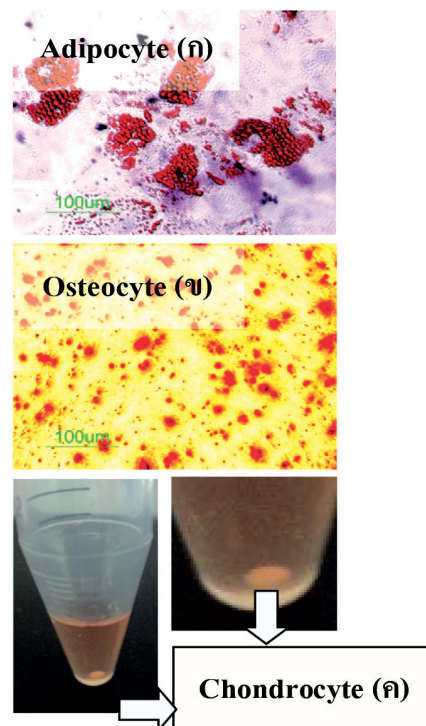
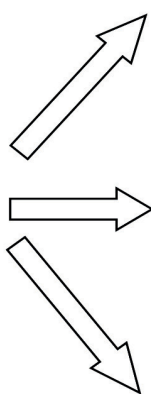
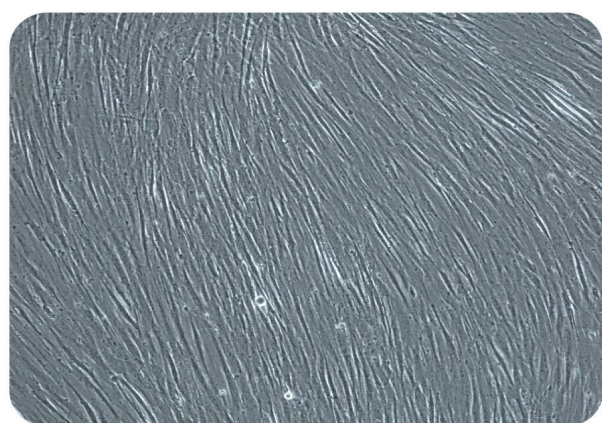


ภาพที่ 1 MSC ที่เพาะเลี้ยงจากตัวอย่างไขกระดูก มีลักษณะรูปร่างปลายเรียวแหลมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยงจากไขกระดูก (ก) passage no. 2 (ข) เปรียบเทียบกับเซลล์ MSC ที่เพาะเลี้ยงจากตัวอย่างเซลล์มาตรฐาน (ค)



ภาพที่ 2 การแสดงออกของแอนติเจนที่จำเพาะบนผิวเซลล์จากไขกระดูก (สีเทา) เปรียบเทียบกับของเซลล์ MSC passage no. 2 (สีเขียว)

การทดสอบความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดในการเจริญเติบโตเป็นเซลล์อื่น 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์ไขมัน เซลล์กระดูก และเซลล์กระดูกอ่อน ผลการศึกษาพบว่าเมื่อนำตัวอย่าง MSC มาเพาะเลี้ยงใน adipogenesis medium มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จาก MSC เป็นเซลล์ไขมัน เมื่อย้อมด้วย oil red o solution จะพบ lipid vacuole ในเซลล์ไขมันติดสีแดง มีลักษณะเหมือนฟององุ่น ในขณะที่นิวเคลียสติดสีน้ำเงินเข้ม ดังแสดง



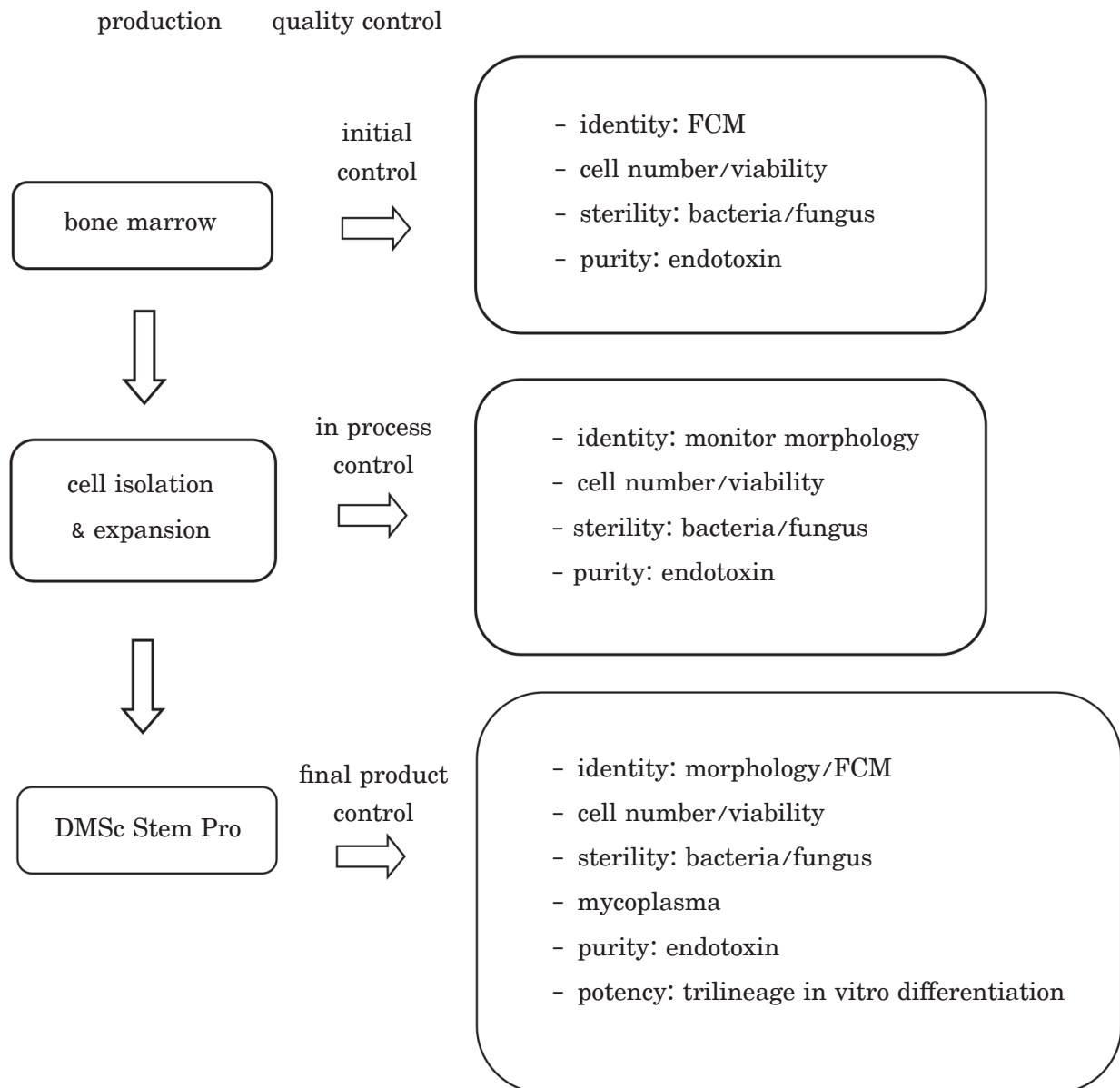
ภาพที่ 3 เซลล์ MSC สามารถเจริญเติบโตเป็นเซลล์ไขมัน (ก) เซลล์กระดูก (ข) และเซลล์กระดูกอ่อน (ค)

การเตรียมความพร้อมในการพัฒนากระบวนการเตรียมเซลล์ เพื่อนำไปใช้สำหรับผู้ป่วยประกอบด้วย ด้านบุคลากร โดยบุคลากรได้รับการฝึกอบรมให้มีความรู้ความสามารถ และได้รับการตรวจสุขภาพและฉีดวัคซีนเพื่อให้มีสุขอนามัยที่ดีเป็นประจำทุกปี ด้านสถานที่เตรียมเซลล์ เป็นห้องสะอาดแรงดันบวกที่มีการควบคุมติดตาม และบันทึกคุณภาพอากาศและการปนเปื้อนพื้นผิวปฏิบัติงานในบริเวณสะอาดอย่างต่อเนื่อง โดยมีอนุภาคขนาด 0.5 ไมครอน จำนวน 789.14 ± 71.53 อนุภาค (ค่าพิสัยเท่ากับ 703.66–867.80) ความดัน 80.68 ± 4.37 ปาสคาล (ค่าพิสัยเท่ากับ 77–87) อุณหภูมิ 21.53 ± 1.12 องศาเซลเซียส (ค่าพิสัยเท่ากับ 20.20–22.50) ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 59.98 ± 2.48 (ค่าพิสัยเท่ากับ

56.70 – 62.70) และการตรวจติดตามจุลชีพอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด รวมถึงมีการสอบเทียบสภาวะแวดล้อมห้องคลีนรูม ตามมาตรฐานสากล ISO 14644 เป็นประจำทุกปี ด้านการปฏิบัติงาน มีการจัดทำมาตรฐานการปฏิบัติงานและแบบบันทึก จำนวน 60 ฉบับ ครอบคลุมทุกขั้นตอนที่มีความสำคัญในการเตรียมและตรวจสอบคุณภาพเซลล์ รวมถึงการดำเนินการจำลองกระบวนการมีเดียฟิลล์จำนวน 4 ครั้ง เพื่อประเมินกระบวนการปราศจากเชื้อโดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาใช้ในกระบวนการผลิตให้ใกล้เคียงกับการปฏิบัติงานประจำ และติดตามความปราศจากเชื้อ ผลการศึกษาพบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์มีลักษณะใสไม่พบตะกอน มีสีส้มแดง ปราศจากการปนเปื้อน endotoxin และจุลชีพ

การศึกษาความถูกต้องของกระบวนการผลิต (process validation) ผู้วิจัยได้ออกแบบกระบวนการผลิตและการควบคุมคุณภาพ ครอบคลุมตั้งแต่การรับตัวอย่างไขกระดูก (initial control) ระหว่างกระบวนการ

ผลิต (in process control) และผลิตภัณฑ์สุดท้าย (final product control) ดังแสดงในภาพที่ 4 และกำหนดเกณฑ์การปล่อยผ่านผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 4 กระบวนการผลิตและการควบคุมคุณภาพ DMSc Stem Pro

ตารางที่ 1 เกณฑ์การปล่อยผ่านผลิตภัณฑ์เซลล์ต้นกำเนิด DMSc Stem Pro

quality control test	product release criteria	reference
cell dose	10 ล้านเซลล์	ตามที่ตกลงกับแพทย์
viability	> 70%	INDs, U.S. FDA 2020 ⁽⁶⁾
sterility		
- bacteria/fungus	no growth	INDs, U.S. FDA 2020 ⁽⁶⁾
- mycoplasma	negative	INDs, U.S. FDA 2020 ⁽⁶⁾
endotoxin	< 0.2 EU/kg	USP 41. Biological test. (85) ⁽¹²⁾
flow cytometry	positive: CD90, CD105, CD73 negative: CD34, CD45, HLA-DR	ISCT 2006 ⁽²⁾
trilineage in vitro differentiation	adipose, osteocyte และ chondrocyte	ISCT 2006 ⁽²⁾

จากการศึกษาความถูกต้องของกระบวนการผลิต (process validation) จำนวน 4 รอบ เพื่อเตรียมความพร้อมก่อนเข้าสู่การวิจัยทางคลินิก พบว่า MSC ที่เพาะเลี้ยงได้มีปริมาณค่าเฉลี่ย $\pm$ SD เท่ากับ 8.67 ± 2.23 ล้านเซลล์ (ค่าพิสัยเท่ากับ 6.00–10.62 ล้านเซลล์) อัตราการมีชีวิตค่าเฉลี่ย $\pm$ SD คิดเป็นร้อยละ 96.37 ± 2.68 (ค่าพิสัยเท่ากับ 93.64–98.75) MSC ที่ได้รูปร่างปลายเรียวยาวแหลม มีคุณสมบัติในการแสดงออกของ CD90, CD105 และ CD73 แต่ไม่มีการแสดงออก

ของ CD34, CD45 และ HLA-DR สามารถเจริญเติบโตเป็นเซลล์ไขมัน เซลล์กระดูก และเซลล์กระดูกอ่อนได้ ปราศจากการปนเปื้อน endotoxin และจุลชีพทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยกระบวนการทั้งหมดดำเนินการตามหลักเกณฑ์และวิธีการในการผลิตยาแผนปัจจุบัน (GMP) และข้อกำหนดสากลสำหรับการพัฒนายาใหม่ (INDs) อย่างเคร่งครัด ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความสะอาด ปลอดภัย ไม่พบการปนเปื้อนของจุลชีพ

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการผลิตเซลล์ต้นกำเนิดชนิด DMSc Stem Pro จำนวน 4 ราย

ตัวอย่างลำดับที่	ปริมาตรไซกระดุก (มิลลิลิตร)	ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง (วัน)	identity (FCM)	sterility (microorganism culture; bacteria and fungus)	mycoplasma (PCR)	endotoxin (LAL)	trilineage in vitro differentiation	%viability (%)
1	22	34	negative: CD34, CD45 positive: CD90, CD105	no growth	negative	< 0.25 EU/ml	✓	93.64
2	20	37	negative: CD34, CD45, HLA-DR positive: CD90, CD105, CD73	no growth	negative	< 0.25 EU/ml	✓	98.60
3	21	42	negative: CD34, CD45, HLA-DR positive: CD90, CD105, CD73	no growth	negative	< 0.25 EU/ml	✓	98.75
4	18	31	negative: CD34, CD45, HLA-DR positive: CD90, CD105, CD73	no growth	negative	< 0.25 EU/ml	✓	94.49

วิจารณ์

โดยทั่วไปกระบวนการเตรียมเซลล์เพื่อนำไปใช้สำหรับผู้ป่วย ทั้งเพื่อการศึกษาวิจัยทางคลินิกและเพื่อการรักษามาตรฐาน จะต้องผ่านการวิจัยต่อยอด (translational research) เพื่อให้มั่นใจว่าผลิตภัณฑ์เซลล์ที่

เตรียมได้มีคุณภาพและปลอดภัยสำหรับผู้ป่วย⁽¹³⁾ ในทางปฏิบัตินักวิจัยควรดำเนินการให้สอดคล้องตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การกำหนดรายละเอียดเกี่ยวกับหลักเกณฑ์และวิธีการในการผลิตยาแผนปัจจุบัน ตามกฎหมายว่าด้วยยา พ.ศ. 2559 รวมถึงมาตรฐานและ

ข้อกำหนดสากลที่เกี่ยวข้อง^(2,5-7) โดยห้องปฏิบัติการต้องจัดให้มีบุคลากร อาคาร สถานที่ สภาวะแวดล้อม เครื่องมือ วัสดุ สารเคมี และน้ำยา ที่จำเป็นในการปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการอย่างเหมาะสม บุคลากรต้องมีสุขอนามัยที่ดี มีคุณสมบัติ ความรู้ และความสามารถอย่างเพียงพอ การออกแบบสถานที่และสภาวะแวดล้อมในการผลิตต้องเป็นไปตามหลักการและข้อกำหนดที่ระบุในหลักเกณฑ์และวิธีการในการผลิตยาฯ ตามกฎหมายว่าด้วยยา พ.ศ. 2559⁽⁵⁾ ภาคผนวก 1 การผลิตยาปราศจากเชื้อ เพื่อเลือกกระบวนขั้นตอนให้มีความลดหลั่นของสิ่งแวดล้อมในการทำงาน และมาตรการในการควบคุมที่เกี่ยวข้องอย่างเหมาะสม ต้องใช้บริเวณที่มีแรงดันเป็นบวกในขั้นตอนการผลิต มีการควบคุม ติดตาม และบันทึกคุณภาพอากาศและการปนเปื้อนพื้นผิวปฏิบัติงานในบริเวณสะอาดเป็นประจำ เครื่องมือที่ใช้ต้องได้รับการบำรุงรักษาให้สะอาดและมีการสอบเทียบอย่างต่อเนื่อง วัสดุ สารเคมี และน้ำยาในกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ต้องมีระดับการผลิตที่เหมาะสมสำหรับใช้ทางคลินิก (clinical grade) หรือเทียบเท่า หากไม่สามารถจัดหาได้ วัสดุ สารเคมี และน้ำยาที่นำมาใช้จะต้องผ่านการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ เพื่อยืนยันว่ามีคุณลักษณะตามที่ห้องปฏิบัติการกำหนด ก่อนนำไปใช้ในกระบวนการผลิตและเก็บรักษาผลิตภัณฑ์^(6,7) และที่สำคัญการพัฒนาระบบการใหม่หรือการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเดิม ต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการผลิต (process validation) ก่อนให้บริการตามใบสั่งของผู้ประกอบวิชาชีพเสมอ⁽⁵⁾

สำหรับการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง MSC โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ร่วมกับ 10% FBS บ่มที่ 37°C, 5% CO₂ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3-4 วัน เป็นเวลา 31-42 วัน เซลล์ที่ได้มีคุณสมบัติสอดคล้องตามข้อกำหนดสากล ISCT⁽²⁾ ทั้งในด้านรูปร่างลักษณะ การแสดงออกของแอนติเจน และศักยภาพในการเจริญเติบโตเป็นเซลล์อื่น 3 ชนิด ปราศจากการปนเปื้อน endotoxin และจุลชีพ จากนั้นจึงเข้าสู่การวิจัยต่อยอดเริ่มตั้งแต่การเตรียมความพร้อมด้านสถานที่ บุคลากร

เครื่องมือ สารเคมี และน้ำยาที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ต้นกำเนิด รวมถึงการออกแบบกระบวนการที่มีการควบคุมคุณภาพทุกขั้นตอนอย่างครบวงจร ตั้งแต่การรับไขกระดูก ต้องมีการตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบตั้งต้น (initial control) ระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงในห้องสะอาด ต้องมีการตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ระหว่างผลิต (in process control) และในวันที่ต้องเตรียมผลิตภัณฑ์ส่งให้แพทย์ ต้องควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ (final product control) ดังแสดงในภาพที่ 4 ทุกกระบวนการที่มีความสำคัญต้องจัดทำมาตรฐานสำหรับใช้ในการปฏิบัติงานอย่างเคร่งครัด จากนั้นจึงทำการศึกษา media fill เพื่อให้มั่นใจว่ากระบวนการผลิตปราศจากการปนเปื้อนจุลชีพก่อนเข้าสู่การตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการผลิต⁽¹⁴⁾

การตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการผลิตเป็นการจำลองกระบวนการปฏิบัติงานตามที่ได้ออกแบบไว้ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้ต้องผ่านเกณฑ์การปล่อยผ่านผลิตภัณฑ์ตามที่แพทย์เห็นชอบ (release criteria) ดังแสดงในตารางที่ 1 ผ่านการขนส่งและส่งมอบให้แพทย์ เช่นเดียวกับการปฏิบัติงานจริง เพียงแต่ผลิตภัณฑ์เซลล์ที่ได้จะไม่ได้นำไปใช้กับผู้ป่วย จะต้องนำกลับมาตรวจสอบคุณภาพโดยละเอียด รวมถึงการศึกษาคงทน (stability) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานก่อนเข้าสู่การวิจัยทางคลินิกต่อไป

การศึกษาคงทนของกระบวนการผลิตต้องดำเนินการให้ผ่านตามคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์อย่างน้อย 3 รอบการผลิตที่ติดต่อกัน⁽⁵⁾ การศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยดำเนินการรวม 4 รอบการผลิต ผลการศึกษาพบว่าผลิตภัณฑ์เซลล์ต้นกำเนิดที่เตรียมได้ผ่านตามข้อกำหนดสากล ISCT ทั้งในด้านรูปร่างลักษณะ การแสดงออกของแอนติเจน และศักยภาพในการเจริญเติบโตเป็นเซลล์อื่น 3 ชนิด ปราศจากการปนเปื้อนของจุลชีพและการตรวจสอบ endotoxin ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด มั่นใจว่ากระบวนการผลิตมีความคงที่ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความสะอาด ปลอดภัย พร้อมเข้าสู่การศึกษาวิจัยทางคลินิกต่อไปได้

การตรวจสอบคุณภาพเซลล์ต้นกำเนิด สามารถตรวจสอบได้ครอบคลุมทั้ง 4 ด้าน ได้แก่ การพิสูจน์เอกลักษณ์เซลล์ต้นกำเนิด การทดสอบความสามารถ

ของเซลล์ต้นกำเนิด การทดสอบความบริสุทธิ์ของเซลล์ต้นกำเนิด และการตรวจการปนเปื้อนจุลชีพ รวมถึงการตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ อย่างไรก็ตามควมมีการพัฒนาการทดสอบเพิ่มเติมในด้านอื่นๆ เช่น การพัฒนาวิธีการตรวจสอบความปลอดภัยของเซลล์ เพื่อทดสอบความเสี่ยงในการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดชนิด MSC เป็นเซลล์มะเร็ง การทดสอบความเสื่อมสภาพของเซลล์⁽¹⁵⁾ การพัฒนาวิธีการตรวจการปนเปื้อน โดยวิธี PCR ที่ได้ผลเร็วขึ้น การตรวจสอบ colony forming unit fibroblast assay (CFU-F) ในการติดตามความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิด⁽¹¹⁾ รวมถึงการพัฒนาวิธีการตรวจสอบ marker โดยการพัฒนาวิธีเพื่อให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง MSC และ fibroblast ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีคุณลักษณะที่คล้ายกัน⁽¹⁶⁾

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเซลล์ ในการศึกษา process validation รายที่ 1 คณะผู้วิจัยได้ศึกษาการแสดงออกของแอนติเจนบนผิวเซลล์โดยเลือกใช้ positive marker 2 ชนิด คือ CD90 และ CD105 ส่วน negative marker 2 ชนิด คือ CD34 และ CD45 เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องงบประมาณและเครื่องมือที่ใช้ อย่างไรก็ตามในรายที่ 2, 3 และ 4 คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการทดสอบการแสดงออกของ CD73 และ HLA-DR บนผิวเซลล์เพิ่มเติม ผลการศึกษาพบว่า DMSc Stem Pro มีการแสดงออกของ CD73, CD90 และ CD105 และไม่พบการแสดงออกของ CD34, CD45 และ HLA-DR ทั้งนี้กระบวนการจากการศึกษาได้ขยายผลสู่การศึกษาวิจัยทางคลินิก เพื่อนำ mesenchymal stem cells จากไขกระดูกของผู้ป่วยเอง นำไปฉีดเข้าวุ้นตาของผู้ป่วย retinitis pigmentosa ซึ่งรายงานโดย Tuekprakhon A. และคณะ⁽⁴⁾ พบว่า MSC ที่ได้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมตามข้อกำหนด ISCT 2006 ปราศจากการปนเปื้อนจุลชีพ และ endotoxin สามารถนำไปใช้ในการวิจัยได้อย่างปลอดภัย

การศึกษาต่อยอดสำหรับ MSC ในครั้งนี้ นอกจากเป็นกระบวนการทางห้องปฏิบัติการ เพื่อให้เกิดความมั่นใจในคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เซลล์ต้นกำเนิดชนิด MSC ก่อนเข้าสู่การวิจัยทางคลินิกแล้วยังจัดเป็นต้นแบบกระบวนการสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์

เซลล์ต้นกำเนิด รวมถึงผลิตภัณฑ์เซลล์บำบัดอื่นๆ เพื่อให้ นักวิจัยด้านเซลล์ต้นกำเนิดและผลิตภัณฑ์การแพทย์ขั้นสูงของประเทศ สามารถดำเนินงานสอดคล้องตามข้อกำหนดสากลได้อย่างเหมาะสม

สรุป

DMSc Stem Pro ที่เตรียมโดยห้องปฏิบัติการเซลล์ต้นกำเนิดของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีคุณสมบัติสอดคล้องตามข้อกำหนดสากล ISCT ทั้งในด้านรูปร่างลักษณะ การแสดงออกของแอนติเจน และศักยภาพในการเจริญเติบโตเป็นเซลล์อื่น 3 ชนิด ปราศจากการปนเปื้อน endotoxin และจุลชีพ กระบวนการทั้งหมดดำเนินงานตามข้อกำหนดคุณภาพสากล ทำให้นักวิจัยมีความมั่นใจในคุณภาพและความปลอดภัยของเซลล์ต้นกำเนิดที่เตรียมได้ พร้อมนำไปใช้พัฒนาวิธีรักษาผู้ป่วยโรคจอตามีสารสีที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้งบประมาณสนับสนุน ขอขอบคุณภาควิชาจุฬารัตนวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล และสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยตลอดการดำเนินโครงการ ขอขอบคุณงานเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ฝ่ายสนับสนุนห้องปฏิบัติการ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ที่ให้ความอนุเคราะห์ทดสอบความปราศจากเชื้อ โดยวิธี microorganism culture และขอขอบคุณงานควบคุมคุณภาพเซลล์ต้นกำเนิด ศูนย์เซลล์ต้นกำเนิด และเวชศาสตร์ฟื้นฟูสภาวะเสื่อม ในการตรวจยืนยันและตรวจสอบคุณภาพของเซลล์ต้นกำเนิดและให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีตลอดการดำเนินงาน

เอกสารอ้างอิง

1. สิริภกร แสงกิจพร, สมชาย แสงกิจพร. DMSc stem cell research: จากห้องทดลองสู่การวิจัยทางคลินิก. นนทบุรี: สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2558.

2. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-7.
3. Delyfer MN, Léveillard T, Mohand-Saïd S, Hicks D, Picaud S, Sahel JA. Inherited retinal degenerations: therapeutic prospects. *Biol Cell* 2004; 96(4): 261-9.
4. Tuekprakhon A, Sangkitporn S, Trinavarat A, Pawestri AR, Vamvanij V, Ruangchainikom M, et al. Intravitreal autologous mesenchymal stem cell transplantation: a non-randomized phase I clinical trial in patients with retinitis pigmentosa. *Stem Cell Res Ther* 2021; 12(1): 52. (15 pages).
5. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การกำหนดรายละเอียดเกี่ยวกับหลักเกณฑ์และวิธีการในการผลิตยาแผนปัจจุบัน และแก้ไขเพิ่มเติมหลักเกณฑ์และวิธีการในการผลิตยาแผนโบราณ ตามกฎหมายว่าด้วยยา พ.ศ. 2559. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 133 ตอนพิเศษ 206 ง (วันที่ 14 กันยายน 2559). หน้า 4.
6. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy investigational new drug applications (INDs). January 2020.
7. คณะทำงานจัดเตรียมข้อมูลเพื่อจัดทำมาตรฐานห้องปฏิบัติการเซลล์. มาตรฐานห้องปฏิบัติการเซลล์ทางการแพทย์. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข: 2563.
8. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KP, et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* 2003; 10(2): 228-41.
9. Williams KL, editor. Endotoxins: pyrogens, LAL testing and depyrogenation. 3rd ed. New York: Informa Healthcare USA, Inc.; 2007.
10. Department of Health and Ageing, Therapeutic Goods Administration. TGA guidelines for sterility testing of therapeutic goods. Australia: Commonwealth of Australia; 2006.
11. van Kuppeveld FJ, van der Logt JT, Angulo AF, van Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58(8): 2606-15.
12. The United States Pharmacopeia USP41 NF36 Volume 2. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2018.
13. ลีรภักร แสงกิจพร, สมชาย แสงกิจพร. Regulation of cell therapy: international standard system for cell therapy manufacturing. ใน: เวชศาสตร์ร่วมสมัย 2559. กรุงเทพฯ: คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย; 2559. หน้า 414-421.
14. Sangkitporn S, Atchaneeyasakul L, Trinavarat A, Khorchai A, Dambua A, Sangkitporn S. Stem cell: therapy and laboratory testing the DMSc stem cell manufacturing process and quality control experience. *J Med Tech Assoc Thailand*. 2019; 47(Supple 1): 105-12.
15. Medeiros Tavares Marques JC, Cornélio DA, Nogueira Silbiger V, Ducati Luchessi A, de Souza S, Batistuzzo de Medeiros SR. Identification of new genes associated to senescent and tumorigenic phenotypes in mesenchymal stem cells. *Sci Rep* 2017; 7: 17837. (13 pages).
16. Denu RA, Nemcek S, Bloom DD, Goodrich AD, Kim J, Mosher DF, et al. Fibroblasts and mesenchymal stromal/stem cells are phenotypically indistinguishable. *Acta Haematol* 2016; 136(2): 85-97.

Manufacturing Process Development of DMSc Stem Pro: Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells for Clinical Research

Acharaporn Dambua¹, Siripakorn Sangkitporn², La-ongsri Atchaneeyasakul³, Areerat Khorchai⁴, Adisak Trinavarat³, Sawitree Duangrueng⁵, Suppaluk Buasrikeaw¹, Apichat Chotichusree¹, Patcharaporn Boonchu¹, Chonlada Yodtup¹, Phatcharaphon Nopprang¹, Panyakamol Chandrasakha⁶, and Somchai Sangkitporn⁷

¹*Medical Life Sciences Institute, ²Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand*

³*Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University 10700, Thailand*

⁴*Surin Hospital, Surin 32000, Thailand*

⁵*National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand*

⁶*Prasu-arthorn Veterinary Teaching Hospital, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand*

⁷*Pink Park Village, Bangkok 10530, Thailand*

ABSTRACT Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent stem cells with the potential to differentiate into various tissue lineages. This study aimed to research and develop a manufacturing process for DMSc Stem Pro, a clinical grade bone marrow MSC for the development of a treatment for retinitis pigmentosa (RP) patients. Optimal conditions for MSC and process validation were studied prior to clinical trials. MSC were isolated and then cultured under GMP conditions with the classical media composition consisting of basal medium DMEM and 10% FBS, and incubated at 37°C with 5% CO₂. The resulting MSC “DMSc Stem Pro” showed fibroblast-like cells which adhered to plastic culture flask. After expansion for 36±4.69 days (range = 31–42), cell numbers were 8.67±2.23 million (range = 6.00–10.62) with more than 90% cell viability. Cell surface antigen test revealed positive expression of CD90, CD105 and CD73, but negative for CD34, CD45 and HLA-DR. Expanded cells revealed multilineage differentiation into adipocyte, osteocyte and chondrocyte. Microbiological assays were demonstrated the absence of bacteria, fungus and

mycoplasma. Endotoxin level was under the critical limit. All the manufacturing processes of DMSc Stem Pro prepared from Stem cell facility of the Department of Medical Sciences were in compliance with the GMP, INDs and ISCT standards. The DMSc Stem Pro prepared by the stem cells laboratory, the Department of Medical Sciences, is of high quality as per the regulations of the International Society for Cellular Therapy (ISCT) and pathogens free. The clinical grade DMSc Stem Pro can be used for clinical study in retinitis pigmentosa patients.

Keywords: Bone marrow, Mesenchymal stem cells, Process validation

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	Uruyakorn 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	



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

80 ปี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วิจัยและพัฒนา เพื่อสุขภาพที่ดีของคนไทย



<https://bit.ly/BullDmsc>