



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วารสาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 64 ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม 2565 • Vol. 64 No. 4 October - December 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.เดือนถนนอม พรหมขัติแก้ว
บรรณาธิการบริหาร	ดร.ประไพ วงศ์สินคงมั่น	
บรรณาธิการ	ดร.อภิวัฏ ธวัชสิน	
รองบรรณาธิการ	นางสิริภากร แสงกิจพร ดร.นวลจันทร์ วิจิตรณจินดา	ดร.อุรุยากร จันทร์แสง
คณะบรรณาธิการ	ศ.เกียรติคุณ ดร.พิไลพันธ์ พุฒวัฒน์ 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.พินทิพย์ พงษ์เพชร ดร.สลักจิต ชูติพงษ์วิเวท ดร.อุษาวดี ถาวระ นายสุธน วงษ์ขีรี 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 นักวิชาการอิสระ 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 4 ตุลาคม - ธันวาคม 2565

Vol. 64 No. 4 October - December 2022

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การกลายพันธุ์ของยีนฟีนิลอะลานีนไฮดรอกซีเลส ในทารกไทยที่สงสัยเป็นโรคฟีนิลคีโตนูเรีย 223
รจนาพรรณ ปั่นกาญจนโต ภาวิณี อินนาค มะลิวัลย์ นุ่มนวล อีระยุทธ สมบุญ
สุภาพร นามมูลน้อย นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา ھرรษา ไทยศรี และ สุรัคเมธ มหาศิริมงคล
- การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-dimethoxyflavone 237
ในสารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
สุนันทา ศรีโสภณ สมจิตร เนียมสกุล นวรัตน์ จัดเจน ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง อธิณิน สุภาไชยกิจ
สมชาย แสนหลวงอินทร์ และ ศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

- ผลของระยะทางกับค่าปริมาณรังสีกระเจิงจากเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ในกรุงเทพมหานคร 253
สมุทรสาคร และเขตสุขภาพที่ 4
สุรัชย์ ตั๊ยด้าง และ สุภาพร สะอาด

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 64 ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม 2565

Vol. 64 No. 4 October - December 2022

CONTENTS

Page

Original Articles

- Mutations of the Phenylalanine Hydroxylase Gene in Thai Neonates with Suspected Phenylketonuria** 223

Rotjanapan Pankanjanato, Pawinee Innark, Maliwan Numnuan, Thirayut Sombun, Supaporn Nammoonnoy, Nuanjun Wichukchinda, Hansa Thaisri, and Surakameth Mahasirimongkol

- Method Development and Validation of 5,7-Dimethoxyflavone Content of Black Ginger Rhizome Aqueous Extract Using Ultra High Performance Liquid Chromatography** 237

Sununta Srisopon, Somchit Niumsakul, Nawarat Chadchen, Sakwichai Ontong, Tissanin Supachaiyakit, Somchai Sanlaung-in, and Siriwan Chaisomboonpan

Laboratory Findings

- Effects of Distance and Radiation Dose Scattering from Mobile X-ray Machines used in Hospitals in Bangkok, Samut Sakhon, and the 4th Health Service Area** 253

Surachai Tuidung and Supaporn Saard



บรรณาธิการแถลง



วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ฉบับนี้ เป็นฉบับประจำปีี่ 64 ฉบับที่ 4 ส่งท้ายปีพุทธศักราช 2565 ซึ่งผมได้ทำหน้าที่บรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มาทั้งสิ้น จำนวน 9 ฉบับ เป็นระยะเวลา 2 ปี 3 เดือน ตอนนี้ถึงเวลาส่งมอบตำแหน่งให้กับ ดร.นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา เพื่อรับหน้าที่เป็นบรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตั้งแต่ฉบับประจำปีี่ 65 ฉบับที่ 1 เป็นต้นไป ผมจำได้ว่าในบทบรรณาธิการฉบับแรกของผม ตอนหนึ่งมีใจความว่า “เราจะสานต่องานสรรหาความรู้ที่มีคุณค่าทางวิชาการมาให้คุณผู้อ่านตลอดไป” นี่คือการกิจที่สำคัญซึ่งผมคิดว่าได้ดำเนินการเกี่ยวกับวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มาอย่างเต็มความสามารถที่มีอยู่ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา โดยที่ได้รับทั้งคำติและคำชมจากผู้ที่เกี่ยวข้องและผู้อ่านอย่างกว้างขวาง ซึ่งผมก็ได้น้อมรับคำติชมเหล่านั้นนำมาปรับปรุงการทำงานอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา อย่างไรก็ตามหนึ่งในความภาคภูมิใจในระหว่างการทำหน้าที่บรรณาธิการของผม ก็คือ การที่วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้รับการรับรองคุณภาพเลื่อนเป็นวารสารกลุ่มที่ 1 โดยศูนย์ดัชนีการอ้างอิงวารสารไทย (Thai Journal Citation Index: TCI) ซึ่งสะท้อนถึงความสำเร็จในการมุ่งมั่นพัฒนาคุณภาพของวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มาอย่างต่อเนื่อง และภารกิจนี้ก็จะได้รับการสานต่อจากบรรณาธิการคนใหม่ต่อไป

กองบรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบคุณผู้สนับสนุนทุกท่านที่ส่งบทความมาให้พิจารณาตีพิมพ์ เผยแพร่องค์ความรู้และงานวิจัย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปฏิบัติงานด้านการพัฒนาวิทยาศาสตร์การแพทย์และสาธารณสุขของประเทศ ขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านในการพิจารณาบทความ (peer review) ที่ให้ข้อเสนอแนะในการปรับปรุงแก้ไขบทความวิจัยต่างๆ ให้มีความถูกต้องทางวิชาการและอ่านได้เข้าใจง่ายขึ้น และขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนในการจัดทำวารสารฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี กองบรรณาธิการหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้อ่านทุกท่านในการเสริมสร้างองค์ความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์และสาธารณสุขต่อไป

ดร.อภิวัฏ ธวัชสิน

บรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์



คำแนะนำสำหรับผู้สนับสนุน

การกลายพันธุ์ของยีนฟีนิลอะลานีนไฮดรอกซีเลส ในทารกไทยที่สงสัยเป็นโรคฟีนิลคีโตนูเรีย

รจนาพรรณ ปั่นกาญจนโต¹ ภาวิณี อินนาค¹ มะลิวัลย์ นุ่มนวล¹ อีระยุทธ สมบุญ¹ สุภาพร นามมูลน้อย¹
นวลจันทร์ วัจกษณ์จินดา² ھرรษา ไทยศรี¹ และ สุรัคเมธ มหาศิริมงคล¹

¹สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

²สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ โรคฟีนิลคีโตนูเรียเป็นโรคหายาก เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมในยีนฟีนิลอะลานีนไฮดรอกซีเลส ซึ่งทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ย่อยกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนไปเป็นไทโรซีน การสะสมของฟีนิลอะลานีนในร่างกายส่งผลให้เซลล์สมองถูกทำลายและสติปัญญาบกพร่อง เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนฟีนิลอะลานีนไฮดรอกซีเลสในทารกไทย คณะผู้วิจัยได้นำตัวอย่างกระดากซ์เลือดแห้งที่เหลือจากการตรวจในงานประจำของศูนย์ปฏิบัติการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดแห่งชาติ ที่สงสัยเป็นโรคฟีนิลคีโตนูเรียจากการตรวจคัดกรองและมีผลการตรวจยืนยันค่าฟีนิลอะลานีนในซีรัมมากกว่า 2.3 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และอัตราส่วนของฟีนิลอะลานีนต่อไทโรซีนมากกว่า 2 จำนวน 32 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าว พบการกลายพันธุ์ 2-5 ตำแหน่ง ในทุกตัวอย่างรวม 17 รูปแบบ ซึ่งเป็นแบบเปลี่ยนรหัสเบสหนึ่งตำแหน่ง แบ่งเป็นหลังแปลรหัสแล้วเปลี่ยนกรดอะมิโน 13 รูปแบบ เป็นกรดอะมิโนเดิม 3 รูปแบบ และแบบที่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน 1 รูปแบบ โดยการกลายพันธุ์ชนิดเปลี่ยนกรดอะมิโนพบใน 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 53.12) และมีผลตรวจวิเคราะห์ฟีนิลอะลานีนในซีรัมมากกว่า 5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรขึ้นไป เนื่องจากข้อจำกัดของการหาลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger sequencing และมีการตรวจพบการกลายพันธุ์หลายตำแหน่ง จึงอาจนำเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสสมัยใหม่มาใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะยีนเป้าหมาย เพื่อวินิจฉัยโรคฟีนิลคีโตนูเรียให้มีประสิทธิภาพต่อไป

คำสำคัญ: การกลายพันธุ์, ยีนฟีนิลอะลานีนไฮดรอกซีเลส, โรคฟีนิลคีโตนูเรีย, ทารกไทย

Corresponding author E-mail: rotjanapan.p@dmasc.mail.go.th

Received: 25 August 2022

Revised: 20 October 2022

Accepted: 31 October 2022

บทนำ

โรคฟีนิลคีโตนูเรีย (phenylketonuria, PKU) เป็นโรคหายากทางพันธุกรรมแบบยีนด้อย (autosomal recessive) ที่การกลายพันธุ์ทำให้การผลิตเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนไฮดรอกซิเลส (phenylalanine hydroxylase, PAH) บกพร่อง มีผลทำให้ผู้ที่ป่วยเป็นโรคนี้ไม่สามารถย่อยสลายกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (phenylalanine, Phe) ไปเป็นไทโรซีน (tyrosine, Tyr) ได้เหมือนคนปกติ เกิดการสะสมของ Phe ในร่างกายมากผิดปกติ รวมทั้งมีการดฟีนิลไพรูวิก (phenylpyruvic acid) และกรดอินทรีย์ (organic acid) อื่นๆ ปนมาในปัสสาวะ แม้ PKU เป็นโรคที่พบได้ค่อนข้างน้อย แต่หากไม่ได้รับการรักษา อาจทำให้เกิดปัญหาสุขภาพร้ายแรง อาการที่อาจพบได้แก่ สัน ซัก สมาธิสั้น ไม่อยู่นิ่ง ผิวซีด ผอมส่อน หรืออาจมีแผลที่เกิดจากผิวหนังอักเสบ ลมหายใจ ผิว และปัสสาวะมีกลิ่นสาบหนู ทารกมีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ อาการมีตั้งแต่ระดับน้อยจนถึงระดับรุนแรง ที่ทำให้ระบบประสาทและสมองเกิดความเสียหายและสติปัญญาบกพร่อง โรคนี้พบได้มากในคนผิวขาว (อุบัติการณ์ประมาณ 1 ต่อ 10,000) ประเทศไทยพบได้น้อย (อุบัติการณ์ประมาณ 1 ต่อ 200,000) หากผู้ป่วยมีอาการที่อาจเป็นสัญญาณของโรคนี้ แพทย์จะสั่งตรวจเลือดหาปริมาณ Phe เพื่อการวินิจฉัยโรค และอาจตรวจยืนยันเพิ่มเติมด้วยวิธีอื่น เช่น ตรวจปัสสาวะหรือตรวจทางพันธุกรรม เป็นต้น กรณีที่ผู้ป่วยหรือคนในครอบครัวเคยมีประวัติเป็นโรคนี้ ก่อนวางแผนมีบุตรควรไปปรึกษาแพทย์หรือผู้เชี่ยวชาญทางพันธุศาสตร์⁽¹⁻³⁾

ปัจจุบันทารกแรกเกิดในประเทศไทยร้อยละ 95 ได้รับการตรวจคัดกรองโรค PKU โดยทางโรงพยาบาล ทำการเก็บตัวอย่างเลือดของทารกแล้วหยดบนกระดาษซับเลือด จากนั้นส่งกระดาษซับเลือดแห้ง (dried blood spot, DBS) ตรวจที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข หากพบ Phe ในเลือดมีค่าเกิน 20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (mg/dL) วินิจฉัยว่าเป็นโรค PKU ในคนปกติค่า Phe ต่ำกว่า 2 mg/dL แต่ในรายที่เป็นโรคไม่รุนแรง Phe อาจอยู่ที่ค่าตั้งแต่ 5 mg/dL ขึ้นไป ซึ่งอาจทำให้ระดับไอคิวต่ำกว่าคนปกติ แพทย์จะรักษาตามอาการและป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อน โดย

ให้ผู้ป่วยควบคุมอาหารและต้องรับประทานอาหารตามแพทย์หรือนักโภชนาการแนะนำ สำหรับผู้ป่วยวัยทารกสามารถรับประทานนมแม่ได้ตามปกติ เนื่องจากนมแม่มีระดับ Phe ต่ำ ส่วนเด็กโตแพทย์จะแนะนำให้ดื่มนมที่มีโปรตีนสูง เช่น เนื้อสัตว์ ไข่ ถั่ว หรือเนย และควรรับประทานอาหารจำพวกผัก ผลไม้ และอาหารที่มี Phe ในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งอาจแนะนำให้รับประทานอาหารเสริม Tyr ด้วย นอกจากนี้ผู้ป่วยควรหลีกเลี่ยงยาบางชนิดที่อาจมีส่วนประกอบของแอสปาร์แตม วิตามิน หรืออาหารเสริมบางชนิดที่อาจมีส่วนผสมของกรดอะมิโนหรือนมผงขาดมันเนย ทั้งนี้ผู้ป่วยควรไปตรวจติดตามผลเป็นประจำ เพื่อให้แพทย์ประเมินผลและวางแผนการรักษาอย่างเหมาะสมต่อไป⁽³⁻⁶⁾

เอนไซม์ PAH ถูกสร้างที่เซลล์ตับ ทำหน้าที่ย่อยกรดอะมิโน Phe เป็น Tyr โดยมีเตตราไฮโดรไบโอเทอริน (tetrahydrobiopterin, BH₄) เป็นตัวช่วยเร่งในการย่อย เอนไซม์ PAH ถูกสร้างจากยีน PAH (Gene ID: 5053) ที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 12 (12 q22-24.1) ประกอบไปด้วย 13 เอ็กซอน (exons) ขนาดความยาว 90 กิโลเบส (kb) ปัจจุบันในฐานข้อมูล The PAH Mutation Analysis Consortium มีข้อมูลการกลายพันธุ์ของยีน PAH จากคนป่วยโรค PKU ที่แตกต่างกันมากกว่า 520 ตำแหน่ง^(7,8)

การเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมหรือการกลายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในระดับยีนที่มีนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ในสายดีเอ็นเอ (DNA) เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งอาจส่งผลให้โปรตีนเสียสภาพการทำงานหรือมีการสร้างโปรตีนที่ผิดปกติ ประเภทของการกลายพันธุ์แบ่งเป็น แบบการขาดหายไป (deletion) หรือแบบการแทรกเพิ่ม (insertion) ของนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่หนึ่งเบสขึ้นไป แบบเปลี่ยนรหัสเฉพาะตำแหน่ง (point mutation) ซึ่งอาจเป็นเบสเดียวหรือเบสจำนวนไม่มาก ทำให้ได้โปรตีนที่มีคุณสมบัติเปลี่ยนไปจากเดิม (missense mutation) หรือได้โปรตีนตัวเดิม (silent mutation) แบบเปลี่ยนเป็นรหัสหยุด (nonsense mutation) ทำให้ได้โปรตีนสั้นลงกว่าเดิม แบบเลื่อนกรอบแปลรหัส (frameshift mutation) จากการมีเบสแทรกเพิ่มหรือขาดหายไปแบบไม่ครบโคดอน

(1 codon = 3 นิวคลีโอไทด์) และแบบส่งผลต่อการแสดงออกของยีน(transcriptional mutation) ที่ทำให้เกิดจากความผิดปกติในกระบวนการสังเคราะห์และตกแต่งเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ส่งผลให้การสังเคราะห์โปรตีนผิดปกติไปโดยเฉพาะบริเวณที่ควบคุมการแสดงออกของยีน(regulatory elements) ได้แก่ โปรโมเตอร์ (promoter) เอนแฮนเซอร์ (enhancer) และตำแหน่งแคป (cap site) เป็นต้น⁽⁹⁾

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) เป็นเทคนิคที่ใช้อย่างแพร่หลายเพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่สนใจศึกษาหรือต้องการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ชิ้นส่วน DNA ว่าถูกต้องหรือไม่ DNA sequencing เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) สำหรับใช้ยืนยันผลของทุกเทคนิคที่เป็นการตรวจคัดกรองการกลายพันธุ์ DNA sequencing มีหลายวิธีแต่วิธีที่นิยมคือ เทคนิคของแซงเกอร์ (Sanger sequencing) ซึ่งมีข้อจำกัดในการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้สูงสุดไม่เกิน 1,000 คู่เบส (bp) และต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ที่อยู่บริเวณปลายหรือบริเวณขนาบข้างของบริเวณที่ศึกษาเพื่อออกแบบไพรเมอร์ (primer) และจำเป็นต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนั้นในคนปกติทั่วไป (reference sequence) เพื่อนำมาใช้เปรียบเทียบในกรณีตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป⁽¹⁰⁾

ประเทศไทยมีการนำเทคนิค DNA sequencing มาใช้ศึกษาโรค PKU จากการตรวจยีน PAH และยีนที่เกี่ยวข้องกับการพร่อง BH₄ ที่เป็นตัวช่วยในการทำงานของเอนไซม์ ปี พ.ศ. 2560 มีรายงานการศึกษาในผู้ป่วย 4 ราย พบการกลายพันธุ์ของยีน PAH 2 ราย และยีน 6-pyrovoyl-tetrahydropterinsynthase (PTS) 2 ราย รวม 8 รูปแบบ⁽¹¹⁾ และปี พ.ศ. 2564 มีรายงานการศึกษาคุณสมบัติของยีน PAH ที่มีการกลายพันธุ์ 11 รูปแบบ ในคนป่วยโรค PKU 13 ราย พบว่ามีประสิทธิภาพน้อยกว่าเอนไซม์ปกติ⁽¹²⁾ ศูนย์ปฏิบัติการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดแห่งชาติ ให้บริการตรวจคัดกรองโรคฟีนิลคีโตนูเรียใน DBS ด้วยวิธีของกัทธรี (guthrie) ซึ่งเป็นตัวอย่างของทารกแรกเกิดอายุตั้งแต่ 48 ชั่วโมงขึ้นไป และได้รับนมแล้ว กรณีพบค่า Phe มีแนวโน้มผิดปกติ (ตั้งแต่ 4 mg/dL ขึ้นไป)

จะขอตัวอย่างใหม่เป็นชนิดซีรัม เพื่อตรวจยืนยันผลด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี (mass spectrometry) ซึ่งหากสามารถตรวจยืนยันจาก DBS ได้ จะช่วยให้แพทย์วินิจฉัยและวางแผนการดูแลรักษาทารกได้เร็วขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้นำ DBS มาสกัด DNA หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing และวิเคราะห์ความผิดปกติของยีน PAH ที่เป็นสาเหตุของโรค PKU ในทารกไทย เพื่อดูอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีน PAH ซึ่งอาจนำมาใช้ออกแบบการตรวจวิเคราะห์ยีนสำหรับวินิจฉัยโรค PKU ให้มีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

ดำเนินการสืบค้นข้อมูลการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดย้อนหลัง ในระบบสารสนเทศของห้องปฏิบัติการตรวจคัดกรอง (NNSPLims) ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2554–2564 โดยใช้เกณฑ์ผลการตรวจยืนยันค่า Phe ในซีรัมมากกว่า 2.3 mg/dL และ Phe/Tyr มากกว่า 2 ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Tandem mass spectrometer (Waters, United states) จำนวน 32 ตัวอย่าง ซึ่งเป็น DBS ที่เหลือจากการตรวจคัดกรองที่จัดเก็บได้ในคลังตัวอย่างที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±5°C และได้รับอนุญาตให้ใช้ตัวอย่างตามหลักเกณฑ์การใช้ประโยชน์จากคลังตัวอย่างกระดาษซับเลือดที่จัดเก็บได้จากกิจกรรมการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดแห่งชาติของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พ.ศ. 2563⁽¹³⁾

การวิจัยนี้ได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เลขที่ สธ 0625/EC082 รหัสโครงการวิจัยที่ 16/2564 เมื่อวันที่ 16 กันยายน 2564

เจาะ DBS ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.2 มิลลิเมตร จำนวน 6 วง เพื่อนำไปสกัด DNA ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสารกำกับชุดน้ำยา QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Germany)⁽¹⁴⁾ ได้ตัวอย่าง DNA ปริมาตร 50 µL ตรวจสอบคุณภาพ DNA ด้วยวิธี gel electrophoresis และ/หรือวัดปริมาณด้วยเครื่อง Nanodrop 2000/2000c Spectrophotometers (Thermo Scientific, United states) เก็บรักษาตัวอย่าง DNA ที่ -20°C จนถึงขั้นตอนการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยใช้ primers สำหรับ 13 exons ของยีน *PAH* อ้างอิงจากงานวิจัยก่อนหน้า^(15,16) และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAH* อ้างอิง (reference sequence, Ref) ตาม GenBank: Accession no.NG008690.2 จากฐานข้อมูล NCBI (The National Center for Biotechnology Information)⁽¹⁷⁾ ดังแสดงในตารางที่ 1 เตรียมส่วนผสม PCR master mix ของ KAPA2G Fast Multiplex PCR Kit (KAPA Biosystems, United states) โดยใช้ primer ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 200 nM และตัวอย่าง

DNA 10 ng ในปฏิกิริยา ปริมาตร 25 μ L ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสารกำกับน้ำยา⁽¹⁸⁾ นำเข้าเครื่อง Thermal cycle (รุ่น ProFlex PCR System, Applied Biosystems, United states) ตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นในการทำ PCR ที่ 95°C นาน 3 นาที หลังจากนั้นเพิ่มปริมาณ DNA จำนวน 35 รอบ โดยตั้งอุณหภูมิที่ 95°C นาน 15 วินาที ที่ 60°C นาน 30 วินาที และที่ 72°C นาน 45 วินาที เมื่อครบเพิ่มที่ 72°C นาน 1 นาที และตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis

ตารางที่ 1 รายละเอียด Forward และ Reverse primers สำหรับ 13 exons ของยีน *PAH*

Primer Name	Sequence (5' to 3')	Position (Ref: NG008690.2)	Length (bp)	Tm (°C)	PCR Product size (bp)
1F	CCTCCTGCGTCAGGACAAC	46093-111	19	59.1	454
1R	AAAGCCACCGAGGACAGAT	46528-46	19	56.4	
2F	TGATCATTTAATTGCCCTGGA	50320-40	21	51.1	490
2R	TGGAAAACTGAAGCTCAGA	50790-809	20	50.9	
3F	TCTCCATTTTGTGCGTTAGG	68392-412	21	52.8	470
3R	AATCCCCCAAACAGTCTTCC	68841-61	21	54.8	
4F	CCGGTTTCTAAGGAAAATG	85687-705	19	47.8	407
4R	CCAGCCCTCGTGTAATAG	86075-93	19	52.7	
5F	GCCCCCATTCAAAGCATT	96668-85	18	53.5	233
5R	CCATCCTCAACTGGATGA	96883-900	18	50.9	
6F	TGAAATTCAGTGTAGCAAGT	107953-72	20	48.2	466
6R	TTCCTGGAGGAATCAACCTG	108399-418	20	54.2	
7F	TGGGAATTTACTTGATCCAGAT	110273-94	22	50.4	492
7R	GATGGAGCAAATCTCCAGAA	110745-64	20	51.8	
8F	GCCTTTTATGATCCCAACC	111489-507	19	50.8	383
8R	ACCACACACCCATTTCAGGT	111852-71	20	56.8	
9F	ATGGCCAAGTACTAGGTTGG	116386-405	20	54.3	223
9R	GGAAAGTTTCAAAGACCTGAGGGC	116565-88	24	58.5	
10F	TCATCCAGTCAAGGTGA	118910-26	17	49.1	297
10R	ACTGGAGAATGAGTTCCC	119189-206	18	50.9	
11F	GCATTTGGGCTGTGATGTAG	119503-22	20	54.1	462
11R	GTGTGTGCAAAGGTCAGCAT	119945-64	20	56.2	
12F	GCTGTTGAAGACCCTGCTCTA	122766-86	21	57.0	478
12R	TGGAGTGGAATCTAGGAAGG	123214-33	20	53.2	
13F	TGAGGCTGTAAGCTCCTTGAA	124048-68	21	55.8	507
13R	CTTGAATGAAGCAGGTCCC	124536-54	19	53.5	

หมายเหตุ: Tm = melting temperature, F = Forward primer, R = Reverse primer

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสารกำกับน้ำยา ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (ThermoFisher, United states)⁽¹⁹⁾ จากนั้นทำ sequencing reaction ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสารกำกับชุดน้ำยา BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher, United states)⁽²⁰⁾ โดยตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 96°C นาน 1 นาที ที่ 96°C นาน 10 วินาที ที่ 50°C นาน 5 วินาที และที่ 60°C นาน 4 นาที จำนวน 25 รอบ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสารกำกับชุดน้ำยา D-Pure dye terminator removal kit (NIMAGEN, Netherlands)⁽²¹⁾ ดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ปริมาตร 15 µL ใส่ในเพลทวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องอ่านนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ 3500XL genetic analyzer (Applied Biosystems, United states) ประมวลผลเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้กับยีน *PAH* อ้างอิงตาม GenBank: Accession no.NG008690.2 ด้วยโปรแกรม SeqScape version 3.0 (Applied Biosystems, United states) นำเสนอข้อมูลด้วยสถิติเชิงพรรณนา แสดงความถี่ของรูปแบบการกลายพันธุ์เป็นจำนวนและร้อยละที่ตรวจพบ โดยแต่ละตัวอย่างแสดงผลการตรวจยืนยันค่า Phe ในซีรัม (mg/dL) เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบและค่า Phe ในซีรัม (mg/dL)

ผล

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis ของ DNA ที่สกัดจาก DBS พบผลิตภัณฑ์ PCR ทั้ง 13 exons ของยีน *PAH* มีขนาดตามต้องการ ดังแสดงในภาพที่ 1

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 13 exons ของยีน *PAH* ที่ได้จาก 32 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับยีน *PAH* อ้างอิงตาม GenBank: Accession no.NG008690.2 พบทุกตัวอย่างมีการกลายพันธุ์ 2–5 ตำแหน่ง โดยมีนิวคลีโอไทด์แตกต่างไปจากยีน *PAH* อ้างอิง 17 รูปแบบ ซึ่งเป็นแบบเปลี่ยนรหัสเบสหนึ่งตำแหน่งทั้งชนิด homozygous mutation และ heterozygous mutation แบ่งเป็นหลังแปลรหัสแล้วเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนตัวใหม่ (missense mutation) 13 รูปแบบ ซึ่งพบใน 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 53.1) ได้กรดอะมิโนตัวเดิม (silence mutation) 3 รูปแบบ พบในทุกตัวอย่าง (ร้อยละ 100) และแบบที่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน (transcriptional mutation) 1 รูปแบบ ที่อยู่บริเวณควบคุมการแสดงออกของยีน (regulatory element) พบใน 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25.0) เมื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการกลายพันธุ์และค่าความเข้มข้น Phe ในซีรัมของแต่ละตัวอย่างจากมากไปน้อย พบการกลายพันธุ์แบบ missense เฉพาะตัวอย่างที่มีค่าความเข้มข้น Phe ในซีรัมตั้งแต่ 5.7 mg/dL ขึ้นไป ดังแสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 1 ผลลัพธ์ PCR ทั้ง 13 exons ของยีน *PAH* โดยใช้ DNA ที่สกัดจากตัวอย่าง DBS

Lane 1 – DNA Marker 1 kb ladder

Lane 3 – PCR Product Exon-2 (490 bp)

Lane 5 – PCR Product Exon-4 (407 bp)

Lane 7 – PCR Product Exon-6 (466 bp)

Lane 9 – PCR Product Exon-8 (383 bp)

Lane 11 – PCR Product Exon-10 (297 bp)

Lane 13 – PCR Product Exon-12 (478 bp)

Lane 2 – PCR Product Exon-1 (454 bp)

Lane 4 – PCR Product Exon-3 (470 bp)

Lane 6 – PCR Product Exon-5 (233 bp)

Lane 8 – PCR Product Exon-7 (492 bp)

Lane 10 – PCR Product Exon-9 (223 bp)

Lane 12 – PCR Product Exon-11 (462 bp)

Lane 14 – PCR Product Exon-13 (507 bp)

ตารางที่ 2 ค่า Phe (เรียงจากมากไปน้อย) ค่า Phe/Tyr Ratio และข้อมูลการกลายพันธุ์ 17 รูปแบบ ที่ตรวจพบใน 32 ตัวอย่าง

Sample No.	Phe (mg/dL)	Phe/Tyr Ratio	Transcript																
			Missense																
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	53.1	31.4	c.(-71)A>C (Regulatory)	c.143T>C (p.Leu48Ser)	c.473G>A (p.Arg158Gln)	c.493G>C (p.Ala165Pro)	c.506G>T (p.Arg169Leu)	c.561G>C (p.Trp187Cys)	c.611A>G (p.Tyr204Cys)	c.674C>T (p.Pro225Leu)	c.728G>A (p.Arg243Gln)	c.754C>T (p.Arg252Trp)	c.809G>A (p.Arg270Lys)	c.842C>T (p.Pro281Leu)	c.1222C>T (p.Arg408Trp)	c.1223G>A (p.Arg408Gln)	c.696A>G (p.Gln232Gln)	c.735G>A (p.Val245Val)	c.1155C>G (p.Leu385Leu)
2	50.5	37.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	48.0	33.5	-	-	-	homo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	48.0	22.9	-	-	-	-	-	-	-	-	homo	-	-	-	-	-	-	-	-
5	48.0	6.4	-	-	-	-	-	-	-	-	homo	-	-	-	-	-	-	-	-
6	40.7	21.8	hetero	-	-	-	-	-	-	-	-	hetero	-	-	-	-	-	-	-
7	40.2	16.4	-	-	-	-	-	hetero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	35.4	17.7	homo	-	-	-	-	-	-	-	homo	-	-	-	-	-	-	-	-
9	35.2	30.0	-	-	hetero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	hetero	-	-	-	-
10	34.5	35.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	32.8	26.9	-	-	-	-	-	-	-	hetero	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	22.8	2.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	22.2	11.1	-	-	-	-	-	-	-	-	homo	-	-	-	-	homo	-	-	-
14	13.8	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	12.3	5.8	-	-	hetero	-	-	-	-	-	-	-	-	hetero	-	-	-	-	-
16	12.3	1.5	-	-	homo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	12.1	7.3	-	hetero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	homo	homo	homo

ตารางที่ 2 ค่า Phe (เรียงจากมากไปน้อย) ค่า Phe/Tyr Ratio และข้อมูลการกลายพันธุ์ 17 รูปแบบ ที่ตรวจพบใน 32 ตัวอย่าง (ต่อ)

Sample No.	Phe (mg/dL)	Phe/Tyr Ratio	Transcript		Missense																	Silence																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
Exon1	Exon2	Exon5	Exon5	Exon5	Exon6	Exon6	Exon6	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Ex

วิจารณ์

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAH* ในทารกไทยที่สงสัยเป็นโรค PKU จำนวน 32 ราย เปรียบเทียบกับยีน *PAH* อ้างอิงตาม GenBank: Accession no. NG008690.2 ในฐานข้อมูล NCBI พบการกลายพันธุ์ในทุกตัวอย่าง 2–5 ตำแหน่ง รวมทั้งหมด 17 รูปแบบ โดยทั้งหมดเป็นการกลายพันธุ์ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ ในฐานข้อมูล *PAH*vd⁽²²⁾ ซึ่งตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *PAH* ที่พบมีดังนี้

ตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่พบเป็นส่วนใหญ่ (> ร้อยละ 80) ได้แก่ c.696A>G (p.Gln232Gln) ของเอ็กซอน 6 พบจำนวน 28 ราย (ร้อยละ 87.5) c.735G>A (p.Val245Val) ของเอ็กซอน 7 พบจำนวน 26 ราย (ร้อยละ 81.2) และตำแหน่ง c.1155C>G (p.Leu385Leu) ของเอ็กซอน 11 พบจำนวน 31 ราย (ร้อยละ 96.9) โดยทั้ง 3 ตำแหน่ง เป็นการกลายพันธุ์แบบ silence จึงไม่ใช้การกลายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยก่อนหน้านี้ในมณฑลชานซีของประเทศจีน ในปี พ.ศ. 2555 มีรายงานการถูกตรวจพบความผิดปกตินี้ทั้งในเด็กป่วยที่เป็นโรค PKU และเด็กสุขภาพดี⁽²³⁾

การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง c.(-71)A>C ของเอ็กซอน 1 พบจำนวน 8 ราย (ร้อยละ 25.0) โดย 5 รายที่ไม่พบการกลายพันธุ์ร่วมชนิด missense mutation จะมีค่า Phe ในช่วง 2.4–3.5 mg/dL และ 2 รายซึ่งพบการกลายพันธุ์ร่วมชนิด missense mutation มีค่า Phe สูง (35.4 และ 53.1 mg/dL) อย่างไรก็ตามมี 1 รายที่ไม่พบการกลายพันธุ์ร่วมชนิด missense mutation แต่กลับมีค่า Phe สูงถึง 53.1 mg/dL เนื่องจากการกลายพันธุ์นี้อยู่ที่ตำแหน่ง 71 เบส ก่อนถึง start codon ซึ่งเป็นบริเวณ upstream ที่มีลำดับเบสจำเพาะต่อการเข้าจับของ DNA-binding protein ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน (regulatory element) จึงอาจยับยั้งหรือกระตุ้นให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์ mRNA (transcription) ที่ผิดปกติได้⁽²⁴⁾

ตำแหน่ง c.143T>C (p.Leu48Ser) ของเอ็กซอน 2 พบจำนวน 2 ราย (ร้อยละ 6.2) มีค่า Phe 12.1 และ 50.5 mg/dL มีรายงานพบการกลายพันธุ์นี้ปี พ.ศ. 2551 ในคนเกาหลีที่เป็นโรค PKU ชนิดรุนแรง⁽⁸⁾

ปี พ.ศ. 2558 พบในคนอิหร่านที่ป่วยเป็นโรค PKU 1 ราย (ร้อยละ 2.6)⁽¹⁶⁾ และปี พ.ศ. 2559 พบในคนโรมาเนียที่ป่วยเป็นโรค PKU 14 ราย (ร้อยละ 17.3) ที่มีผลการตรวจคัดกรองค่า Phe ตั้งแต่ 4–32 mg/dL⁽²⁵⁾

ตำแหน่ง c.473G>A (p.Arg158Gln) ของเอ็กซอน 5 พบจำนวน 1 ราย (ร้อยละ 3.1) ที่มีค่า Phe 35.2 mg/dL ปี พ.ศ. 2555 มีรายงานพบการกลายพันธุ์นี้ในคนไซปรัสที่เป็นโรค PKU 1 ราย (ร้อยละ 8.3) โดยมีค่าพลาสมา Phe 5.6 mg/dL และวินิจฉัยว่าเป็นโรค PKU ชนิดไม่รุนแรง⁽²⁶⁾

ตำแหน่ง c.493 G>C (p.Ala165Pro) ของเอ็กซอน 5 พบจำนวน 1 ราย (ร้อยละ 3.1) ที่มีค่า Phe 48.0 mg/dL ปี พ.ศ. 2559 มีรายงานพบการกลายพันธุ์นี้ในคนฝรั่งเศสที่เป็นโรค PKU แต่ไม่สามารถอธิบายการกลายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากพบผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการให้ BH₄ ร้อยละ 30–40⁽²⁷⁾

ตำแหน่ง c.506G>T (p.Arg169Leu) ของเอ็กซอน 5 พบจำนวน 6 ราย (ร้อยละ 18.8) ที่มีค่า Phe 5.7–12.3 mg/dL ปี พ.ศ. 2564 มีรายงานพบการกลายพันธุ์นี้ในคนไทยที่ป่วยเป็นโรค PKU จำนวน 5 ราย (ร้อยละ 38.5) โดยเป็นแบบไม่รุนแรง⁽¹²⁾

ตำแหน่ง c.561 G>C (p.Trp187Cys) ของเอ็กซอน 6 พบจำนวน 1 ราย (ร้อยละ 3.1) ที่มีค่า Phe 40.2 mg/dL ปี พ.ศ. 2565 มีรายงานพบการกลายพันธุ์นี้ในคนเปรูและสเปนที่ป่วยเป็นโรค PKU ซึ่งวินิจฉัยว่าเป็นโรค PKU ชนิดรุนแรง⁽²⁸⁾

ตำแหน่ง c.611A>G (p.Tyr204Cys) ของเอ็กซอน 6 พบจำนวน 1 ราย (ร้อยละ 3.1) ที่มีค่า Phe 11.3 mg/dL มีรายงานพบการกลายพันธุ์นี้ในผู้ป่วย PKU ของคนไทย โดยปี พ.ศ. 2564 พบจำนวน 2 ราย (ร้อยละ 15.4) ที่มีอาการรุนแรง⁽¹²⁾ และปี พ.ศ. 2560 พบจำนวน 1 ราย (ร้อยละ 25.0)⁽¹¹⁾ ปี พ.ศ. 2551 พบในคนเกาหลีที่เป็น PKU ชนิดรุนแรงจำนวน 3 ราย (ร้อยละ 9.1)⁽⁸⁾ และปี พ.ศ. 2534 พบในคนจีนและคนญี่ปุ่น คิดเป็นร้อยละ 13 และร้อยละ 5 ของคนเอเชียตะวันออกที่เป็นโรค PKU ตามลำดับ เมื่อนำยีนที่มีการกลายพันธุ์นี้มาสังเคราะห์โปรตีน พบว่ามีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับเอนไซม์ PAH ปกติ แต่การกลายพันธุ์นี้

เกิดเฉพาะโครโมโซมของคนเป็นโรค PKU จึงเป็นประโยชน์ในการใช้ตรวจคัดกรองผู้ที่เป็พาทะของโรค PKU⁽²⁹⁾

ตำแหน่ง c.674 C>T (p.Pro225Leu) ของเอ็กซอน 6 พบจำนวน 1 ราย (ร้อยละ 3.1) ที่มีค่า Phe 32.8 mg/dL ปี พ.ศ. 2554 มีรายงานพบการกลายพันธุ์นี้ในคนญี่ปุ่นที่เป็นโรค PKU โดยตำแหน่งนี้เป็น 1 ใน 22 ตำแหน่งที่ถูกพบว่าเป็นการกลายพันธุ์รูปแบบใหม่⁽³⁰⁾

ตำแหน่ง c.728G>A (p.Arg243Gln) ของเอ็กซอน 7 พบจำนวน 4 ราย (ร้อยละ 12.5) ที่มีค่า Phe 22.2, 35.4 และ 48.0 mg/dL ปี พ.ศ. 2551 มีรายงานพบการกลายพันธุ์นี้ในคนเกาหลีที่เป็นโรค PKU ชนิดรุนแรงจำนวน 4 ราย (ร้อยละ 12.1)⁽⁸⁾ และปี พ.ศ. 2534 พบในคนจีน คิดเป็นร้อยละ 18 ของคนเอเชียตะวันออกที่เป็นโรค PKU เมื่อนำยีนที่มีการกลายพันธุ์นี้มาสังเคราะห์โปรตีน พบว่ามีประสิทธิภาพน้อยกว่าร้อยละ 10 ของเอนไซม์ PAH ปกติ และถ้าเป็นกลายพันธุ์แบบ homozygous mutation ผู้ป่วยจะมีอาการรุนแรง⁽²⁹⁾

ตำแหน่ง c.754C>T (p.Arg252Trp) ตำแหน่ง c.842C>T (p.Pro281Leu) ของเอ็กซอน 7 และตำแหน่ง c.1222C>T (p.Arg408Trp) ของเอ็กซอน 12 โดยพบตำแหน่งละ 1 ราย (ร้อยละ 3.1) โดยมีค่า Phe 40.7, 12.3 และ 35.2 mg/dL ตามลำดับ ปี พ.ศ. 2559 มีรายงานพบการกลายพันธุ์ 3 แบบนี้ในคนโรมาเนียที่ป่วยเป็นโรค PKU โดยพบ 1 ราย (ร้อยละ 1.2) 11 ราย (ร้อยละ 13.6) และ 45 ราย (ร้อยละ 55.6) ตามลำดับ⁽²⁵⁾ และปี พ.ศ. 2564 พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง c.842 C>T ในคนไทยที่ป่วยเป็นโรค PKU จำนวน 1 ราย (ร้อยละ 7.7) โดยเป็นแบบไม่รุนแรง⁽¹²⁾

ตำแหน่ง c.809 G>A (p.Arg270Lys) ของเอ็กซอน 7 พบจำนวน 1 ราย (ร้อยละ 3.1) ที่มีค่า Phe 50.5 mg/dL ปี พ.ศ. 2565 มีรายงานพบการกลายพันธุ์นี้ในคนสเปนที่ป่วยเป็นโรค PKU ซึ่งวินิจฉัยเป็นโรค PKU ชนิดไม่รุนแรง⁽²⁸⁾

ตำแหน่ง c.1223G>A (p.Arg408Gln) ของเอ็กซอน 12 พบจำนวน 2 ราย (ร้อยละ 6.2) ที่มีค่า Phe 7.2 และ 22.2 mg/dL ปี พ.ศ. 2564 มีรายงานพบการกลายพันธุ์นี้ในคนไทยที่ป่วยเป็นโรค PKU จำนวน

4 ราย (ร้อยละ 30.8) โดยเป็นแบบไม่รุนแรงจนถึงแบบปานกลาง⁽¹²⁾

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการกลายพันธุ์และค่าความเข้มข้นของ Phe พบว่ารายที่มีค่าความเข้มข้นของ Phe ในซีรัมมากกว่า 5 mg/dL ขึ้นไป จะมีการกลายพันธุ์แบบ missense mutation ซึ่งกรดอะมิโนเปลี่ยนไปมีผลทำให้เอนไซม์ PAH ที่สร้างขึ้นมีรูปร่างและการทำงานผิดปกติ⁽⁹⁾ จึงไม่สามารถย่อยกรดอะมิโน Phe ได้ ทำให้มีปัญหาคั่งของ Phe ในเลือด ทั้งนี้ในทุกตัวอย่างยังพบการกลายพันธุ์ 2-5 ตำแหน่ง ซึ่งอาจมีผลต่อการแสดงออกของยีนทั้งในแง่ส่งเสริมหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PAH ได้

ข้อจำกัดในการศึกษานี้ คือ ไม่สามารถติดตามข้อมูลระดับอาการป่วยของโรค PKU ในทารกกลุ่มศึกษา ทำให้ไม่สามารถเชื่อมโยงการกลายพันธุ์กับความรุนแรงของโรคได้ นอกจากนี้การทำ DNA sequencing จากผลิตภัณฑ์ PCR 13 exons ที่ได้จากการออกแบบ primers เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นเพียงร้อยละ 6.64 ของความยาวยีน PAH ทั้งหมด (5,332 ใน 80,356 นิวคลีโอไทด์) และไม่ครอบคลุมส่วน promoter ของยีนที่ตำแหน่ง 47079-138 (Ref: NG008690.2)⁽³¹⁾ และส่วน splicing site ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ไม่พบการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับค่า Phe และ Phe/Tyr ratio ในตัวอย่าง เช่น ตัวอย่างที่มีค่า Phe มากกว่า 10 mg/dL (ตัวอย่างที่ 1, 10, 12, 14 และ 19) บางรายพบเพียงการกลายพันธุ์แบบ silence หรือ transcriptional element mutation เท่านั้น การศึกษาเพิ่มเติมให้ครอบคลุมทั้งยีน โดยนำเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสสมัยใหม่ (next generation sequencing, NGS) มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งยีน PAH และนำการกลายพันธุ์ที่พบมาศึกษาการแสดงออกของยีน เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ PAH ที่ได้จากการกลายพันธุ์กับเอนไซม์ปกติ ทั้งนี้ควรศึกษา DNA sequencing เพิ่มเติมในทารกที่มีค่า Phe และ Phe/Tyr ratio ปกติ เพื่อเป็นกลุ่มควบคุมการพบการกลายพันธุ์ของยีน PAH ของทารกที่สงสัยเป็นโรค PKU ด้วย

สรุป

DNA ที่สกัดจากกระดาดำซึ่งเลือดที่เหลืจากการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดของตัวอย่างที่สงสัยเป็นโรค PKU จากเกณฑ์ค่า Phe ในซีรัมมากกว่า 2.3 mg/dL และอัตราส่วนของ Phe ต่อ Tyr มากกว่า 2 จำนวน 32 ตัวอย่าง สามารถเพิ่มขยายยีน *PAH* ได้ทั้ง 13 exons เมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sanger sequencing และวิเคราะห์การกลายพันธุ์เทียบกับลำดับเบสในยีน *PAH* อ้างอิง พบทุกตัวอย่างมีการกลายพันธุ์ 2–5 ตำแหน่ง รวมทั้งหมด 17 รูปแบบ ซึ่งเป็นแบบเปลี่ยนรหัสเบสหนึ่งตำแหน่ง หลังแปลรหัสแล้วเป็น missense mutation 13 รูปแบบ silence mutation 3 รูปแบบ และ transcriptional mutation บริเวณ regulatory element ของยีน 1 รูปแบบ ซึ่งการกลายพันธุ์ที่พบมีระบุในฐานข้อมูล *PAH*vdb แล้ว การกลายพันธุ์ชนิดเปลี่ยนกรดอะมิโนพบใน 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 53.12) และมีผลตรวจวิเคราะห์ Phe ในซีรัมตั้งแต่ 5 mg/dL ขึ้นไป งานวิจัยนี้จึงไม่พบการกลายพันธุ์แบบใหม่ อาจเนื่องจากข้อจำกัดของจำนวนตัวอย่าง ($n = 32$) และเทคนิคการหาลำดับเบสด้วย Sanger sequencing ที่ยังไม่ครอบคลุมการกลายพันธุ์ทั้งหมดของยีน *PAH* การนำเทคโนโลยี NGS มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะส่วนเอ็กโซม (exome sequencing) หรือเฉพาะยีนเป้าหมาย (targeted sequencing) อาจช่วยให้การวินิจฉัยโรค PKU มีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์การแพทย์จีโนมิกส์ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และชุดน้ำยาต่างๆ ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ใช้งบประมาณในการทำวิจัย และขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ ผู้อำนวยการศูนย์ปฏิบัติการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดแห่งชาติ ที่ปรึกษาโครงการวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย และผู้ร่วมวิจัยทุกท่าน ที่เป็นแรงผลักดันและให้ความร่วมมือในการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขนิพนธ์ต้นฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Williams RA, Mamotte CD, Burnett JR. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. Clin Biochem Rev 2008; 29(1): 31–41.
- Loeber JG. Neonatal screening in Europe; the situation in 2004. J Inherit Metab Dis 2007; 30(4): 430–8.
- Pangkanon S, Charoensiriwatana W, Janejai N, Boonwanich W, Chaisomchit S. Detection of phenylketonuria by the newborn screening program in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2009; 40(3): 525–9.
- Diamond A. Phenylalanine levels of 6–10 mg/dl may not be as benign as once thought. Acta Paediatr Suppl 1994; 407: 89–91.
- Nelwan ML. Phenylketonuria: Genes in phenylketonuria, diagnosis, and treatments. Afr J Bio Sc 2020; 2(1): 1–8.
- Mitchell JJ, Trakadis YJ, Scriver CR. Phenylalanine hydroxylase deficiency. Genet Med 2011; 13(8): 697–707.
- Hoang L, Byck S, Prevost L, Scriver CR. PAH mutation analysis consortium database: a database for disease-producing and other allelic variation at the human PAH locus. Nucleic Acids Res 1996; 24(1): 127–31.
- Lee YW, Lee DH, Kim ND, Lee ST, Ahn JY, Choi TY, et al. Mutation analysis of PAH gene and characterization of a recurrent deletion mutation in Korean patients with phenylketonuria. Exp Mol Med 2008; 40(5): 533–40.
- วรทัย ไหมศรีขาว. การตรวจกรองการกลายพันธุ์และการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน COMT ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปกตรัม [วิทยานิพนธ์]. สาขาวิชาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ, คณะวิทยาศาสตร์. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2553; หน้า 10.

10. Valencia CA, Pervaiz MA, Husami A, Qian Y, Zhang K. Sanger sequencing principles, history, and landmarks. In: Next generation sequencing technologies in medical genetics. New York: Springer; 2013. p. 3-11.
11. Chaiyasap P, Ittiwut C, Srichomthong C, Sangsin A, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. Massive parallel sequencing as a new diagnostic approach for phenylketonuria and tetrahydrobiopterin-deficiency in Thailand. BMC Med Genet 2017; 18: 102. (6 pages).
12. Ngiwsara L, Vatanavicharn N, Sawangareetrakul P, Liammongkolkul S, Ratanarak P, Boonyawat B, et al. Molecular characterization of Thai patients with phenylalanine hydroxylase deficiency and in vitro functional study of two novel PAH variants. Mol Biol Rep 2021; 48(3): 2063-70.
13. ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง หลักเกณฑ์การใช้ประโยชน์จากคลังตัวอย่างกระดาศับเลือดที่จัดเก็บได้ตามกิจกรรมการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดแห่งชาติของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พ.ศ. 2563. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 138 ตอนพิเศษ 69 ง (วันที่ 26 มีนาคม 2564). หน้า 17.
14. QIAamp DNA blood mini kit – QIAGEN. [online]. 2022; [cited 2022 Sep 26]; [10 screens]. Available from: URL: <https://www.qiagen.com/us/landing-pages/microbiome-rna-research-workflow/sample-disruption/qiaamp-dna-blood-mini-kit>.
15. Vilarinho L, Esteves S, Ramos E, Amorim A, Azevedo L. PAH mutational spectrum: still expanding. Open J Genet 2011; 1(2): 9-12.
16. Biglari A, Saffari F, Rashvand Z, Alizadeh S, Najafipour R, Sahmani M. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in Iranian patients with phenylketonuria. Springerplus. 2015; 4: 542. (5 pages).
17. National Library of Medicine. Homo sapiens phenylalanine hydroxylase (PAH), RefSeqGene on chromosome 12. [online]. 2022; [cited 2022 Sep 26]. Available from: URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_008690.2.
18. Kapa Biosystems. KAPA2G fast multiplex PCR kit. [online]. 2016; [cited 2022 Sep 26]; [4 screens]. Available from: URL: <https://www.n-genetics.com/products/1104/1023/12664.pdf>.
19. Thermo Fisher Scientific. ExoSAP-IT™ PCR product cleanup reagent. [online]. 2017; [cited 2022 Sep 26]; [2 screens]. Available from: URL: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2F78200b.pdf>.
20. Applied Biosystems. BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit. [online]. 2010; [cited 2022 Sep 26]; [72 screens]. Available from: URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_081527.pdf.
21. NimaGen BV. D-Pure™ Dye Terminator removal kit. [online]. 2018; [cited 2022 Sep 26]; [4 screens]. Available from: URL: https://www.nimagen.com/gfx/brands/D-Pure/D-pure_protocol%20v2.pdf.
22. BIOPKUdb: database of patients and genotypes causing HPA/PKU. [online]. 2022; [cited 2022 Sep 26]. Available from: URL: <http://www.biopku.org/home/biopku.asp>.
23. Zhou YA, Ma YX, Zhang QB, Gao WH, Liu JP, Yang JP, et al. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in patients with phenylketonuria in Shanxi, China. Genet Mol Biol 2012; 35(4): 709-13.
24. กวี สุจิตฺติ. บทที่ 8 การควบคุมการแสดงออกของยีน. ใน: พันธุศาสตร์โมเลกุลเบื้องต้น. [online]. 2547; [สืบค้น 11 ต.ค. 2565]; [34 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://conf.agi.nu.ac.th/webnewasp/ereading/gene/unit8.pdf>.

25. Gemperle-Britschgi C, Iorgulescu D, Mager MA, Anton-Paduraru D, Vulturar R, Thöny B. A novel common large genomic deletion and two new missense mutations identified in the Romanian phenylketonuria population. *Gene* 2016; 576(1): 182-8.
26. Georgiou T, Ho G, Vogazianos M, Dionysiou M, Nicolaou A, Chappa G, et al. The spectrum of mutations identified in Cypriot patients with phenylalanine hydroxylase deficiency detected through neonatal screening. *Clin Biochem* 2012; 45(7-8): 588-92.
27. Jeannesson-Thivisol E, Feillet F, Chéry C, Perrin P, Battaglia-Hsu SF, Herbeth B, et al. Genotype-phenotype associations in French patients with phenylketonuria and importance of genotype for full assessment of tetrahydrobiopterin responsiveness. *Orphanet J Rare Dis* 2015; 10: 158. (22 pages).
28. Martín-Rivada Á, Palomino Pérez L, Ruiz-Sala P, Navarrete R, Cambra Conejero A, Quijada Fraile P, et al. Diagnosis of inborn errors of metabolism within the expanded newborn screening in the Madrid region. *JIMD Rep* 2022; 63(2): 146-61.
29. Wang T, Okano Y, Eisensmith RC, Lo WH, Huang SZ, Zeng YT, et al. Missense mutations prevalent in Orientals with phenylketonuria: molecular characterization and clinical implications. *Genomics* 1991; 10(2): 449-56.
30. Okano Y, Kudo S, Nishi Y, Sakaguchi T, Aso K. Molecular characterization of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency in Japan. *J Hum Genet* 2011; 56(4): 306-12.
31. Eukaryotic Promoter Database - PAH_1 viewer [online]. 2019; [cited 2022 Oct 7]; [2 screens]. Available from: URL: https://epd.epfl.ch/cgi-bin/get_doc?db=hgEpdNew&format=genome&entry=PAH_1.

Mutations of the Phenylalanine Hydroxylase Gene in Thai Neonates with Suspected Phenylketonuria

Rotjanapan Pankanjanato,¹ Pawinee Innark,¹ Maliwan Numnuan,¹ Thirayut Sombun,¹ Supaporn Nammoonnoy,¹ Nuanjun Wichukchinda,² Hansa Thaisri,¹ and Surakameth Mahasirimongkol¹

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

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

ABSTRACT Phenylketonuria (PKU) is a rare genetic disease caused by mutations of the phenylalanine hydroxylase (*PAH*) gene. This gene produces an enzyme, which metabolizes phenylalanine (Phe) into tyrosine (Tyr). Accumulation of Phe in the body leads to brain damage and mental retardation. To study *PAH* mutation in PKU-suspected Thai neonates, DNA extraction and sequencing were performed using leftover dried blood spot samples from the routine work of The Neonatal Screening Operating Centre. We selected 32 DBS which had confirmed Phe in serum > 2.3 mg/dL and Phe/Tyr ratio > 2 (n = 32). The sequencing results showed all samples had 2–5 point mutations. From the total of 17 mutation types; 13 were missense mutations, 3 were silence mutations and 1 was a mutation at regulatory element. Especially, missense mutations were found in 17 samples (53.12%) with Phe in serum > 5 mg/dL. Due to the limitation of Sanger sequencing and many point mutations found, Next Generation Sequencing (NGS) may be used for targeted gene sequencing to diagnose PKU effectively.

Keyword: Mutations, Phenylalanine hydroxylase gene, Phenylketonuria, Thai neonates

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ปริมาณ 5,7-dimethoxyflavone ในสารสกัดน้ำ จากเหง้ากระชายดำด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง

สุนันตา ศรีโสภณ สมจิตร เนียมสกุล นวรัตน์ จัดเจน ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง อธิณิน สุภาไชยกิจ
สมชาย แสนหลวงอินทร์ และ ศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์
สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ กระชายดำ (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker) มีสรรพคุณในทางการแพทย์แผนไทย โดยใช้บำรุงกำลัง เพิ่มสมรรถภาพทางเพศ ช่วยให้ระบบไหลเวียนโลหิตดีขึ้น และแก้ปวดกระเพาะอาหาร ซึ่งมีสารสำคัญ คือ 5,7-dimethoxyflavone (5,7-DMF) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านอักเสบ และต้านมะเร็ง ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการควบคุมคุณภาพของปริมาณสารสำคัญในสารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (UHPLC) ตรวจวัดด้วย photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร โดยใช้คอลัมน์ ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD (2.1×50 mm, 1.8 μ m) และวัฏภาคเคลื่อนที่ของ (A) 0.2% glacial acetic acid ในน้ำ และ (B) methanol แบบ gradient การเตรียมสารละลายตัวอย่างโดยสกัดด้วยวิธี sonicate ใน methanol เป็นเวลา 30 นาที ผลการศึกษาพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะ มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.06–0.36 mg/ml โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากกว่า 0.999 ร้อยละการคืนกลับ (%recovery) อยู่ในช่วง 98.31–105.12 ความเที่ยงจากการทำซ้ำในวันเดียวกันและระหว่างนักวิเคราะห์มีค่าที่ยอมรับได้ (%RSD < 2, %RSD < 4 และ HORRAT < 2 ตามลำดับ) ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.04 mg/ml วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-DMF เพื่อควบคุมคุณภาพของสารสกัดน้ำกระชายดำที่มีการจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ได้

คำสำคัญ: การพัฒนาวิธีวิเคราะห์, การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์, 5,7-dimethoxyflavone, สารสกัดน้ำ
เหง้ากระชายดำ, UHPLC

Corresponding author E-mail: sununta.s@dmisc.mail.go.th

Received: 8 December 2021

Revised: 23 September 2022

Accepted: 6 October 2022

บทนำ

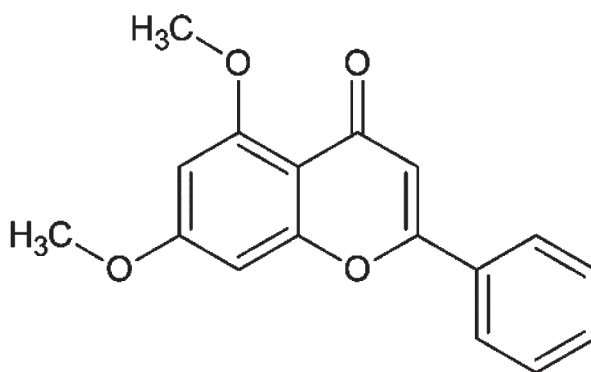
กระชายดำ มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae⁽¹⁾ ชื่ออังกฤษ คือ Black ginger⁽²⁾ ส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์ทางยา คือ เหง้า ซึ่งมีลักษณะกลม เรียงต่อกัน อวบน้ำ ผิวสีน้ำตาล เนื้อมีสีม่วงอ่อน ม่วงเข้ม จนถึงสีม่วงดำ สรรพคุณในทางการแพทย์แผนไทยใช้บำรุงกำลัง เพิ่มสมรรถภาพทางเพศ เป็นยาอายุวัฒนะ ช่วยให้ระบบไหลเวียนโลหิตดีขึ้น ขับลม แก้อักเสบ แก้ปวดกระเพาะอาหาร เป็นต้น⁽²⁾ ดังแสดงในภาพที่ 1

สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยจากเหง้ากระชายดำ คือ borneol การสกัดเหง้ากระชายดำด้วยตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูง เช่น methanol และ ethanol พบสารกลุ่ม flavonoids⁽³⁾

เช่น 5,7-dimethoxyflavone (5,7-DMF) ซึ่งเป็นองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ⁽⁴⁾ ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยสารนี้มีรายงานว่ามียฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ human cervical cancer HeLa cell line และ human gastric adenocarcinoma AGS cell line⁽⁵⁾ ฤทธิ์ต้านอักเสบ โดยยับยั้งการแสดงออกของ iNOS, COX-2 และ Rel A mRNA⁽⁶⁾ ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดและต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถป้องกันความเสียหายของ ischaemia-refusion⁽⁷⁾ ต้านการอักเสบและ degranulation ของ basophilic leukemia cell ของหนู⁽⁸⁾ และยับยั้ง human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) ได้⁽⁹⁾ ด้วยฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญของกระชายดำ ทำให้กระชายดำได้รับการขนานนามว่า โสมเมืองไทย



ภาพที่ 1 เหง้ากระชายดำสด



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ 5,7-dimethoxyflavone

แผนแม่บทแห่งชาติว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพร ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2560–2564 โดยกระทรวงสาธารณสุข และองค์การภาครัฐ-เอกชน กำหนดสมุนไพรที่มีศักยภาพ เป็น product champion ซึ่งกระชายดำได้รับการคัดเลือกให้เป็นสมุนไพรเป้าหมายเพื่อขับเคลื่อนแผนดังกล่าว^(10–12) ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหลายยี่ห้อ ในท้องตลาดมีส่วนประกอบของสารสกัดกระชายดำ ซึ่งจากข้อมูลโครงการศึกษาโอกาสทางการตลาดสารสกัดสมุนไพรเป้าหมายปี พ.ศ. 2561 พบว่าสารสกัดกระชายดำ มีมูลค่าการตลาดประมาณ 34 ล้านบาท ส่วนใหญ่ประมาณ ร้อยละ 69 เป็นการจำหน่ายไปยังอุตสาหกรรมยาแผนโบราณ และรองลงมาประมาณร้อยละ 24 จำหน่ายไปยังอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร⁽¹³⁾ ดังนั้น การควบคุมคุณภาพสมุนไพรสารสกัดกระชายดำ จึงมีความจำเป็น เพราะจะทำให้ผู้บริโภคได้รับประโยชน์ จากการใช้สมุนไพรและทำให้มั่นใจถึงประสิทธิภาพที่ได้รับด้วย การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสมุนไพร เป็นวิธีการควบคุมคุณภาพทางเคมีซึ่งการใช้ UHPLC ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ⁽¹⁴⁾ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนา และทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจปริมาณ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำกระชายดำ เพื่อให้ได้วิธีที่น่าเชื่อถือเพียงพอ และสามารถนำไปใช้ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัดน้ำกระชายดำ

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างสารสกัดน้ำกระชายดำ

วัตถุดิบกระชายดำ จำนวน 5 ตัวอย่าง ประกอบด้วย เหง้ากระชายดำสด จำนวน 1 ตัวอย่าง จากแหล่งปลูก อำเภอลำดวน จังหวัดเพชรบูรณ์ ได้รับการระบุชื่อ วิทยาศาสตร์ ตามหลักอนุกรมวิธานพืชจากสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยมีหมายเลข Herbarium specimen DMSC 5285 วัตถุดิบผงกระชายดำ จำนวน 4 ตัวอย่าง ชื้อจากร้านขายยาสมุนไพร ในเขตกรุงเทพมหานคร

การเตรียมตัวอย่างจากเหง้ากระชายดำสด โดยนำวัตถุดิบเหง้ากระชายดำสดจากแหล่งปลูกมาคัดแยก ล้าง หั่น และตากให้แห้ง นำไปอบแห้งในตู้อบร้อนที่

อุณหภูมิ 45–50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบดเป็นผง และผ่านแรงเบอร์ 180 เก็บตัวอย่างที่ได้ในขวดแก้วสีชา ปิดสนิท การเตรียมตัวอย่างจากวัตถุดิบผงกระชายดำ ที่ได้จากร้านขายยาสมุนไพร โดยนำวัตถุดิบผงกระชายดำ มาผ่านแรงเบอร์ 180 และเก็บในขวดแก้วสีชาปิดสนิท ปิดฉลากระบุชื่อ แหล่งที่มา และหมายเลขตัวอย่าง

การเตรียมสารสกัดน้ำกระชายดำ โดยชั่งตัวอย่าง 500 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วกันกลมขนาด 4 ลิตร เติมน้ำกลั่น 3.5 ลิตร จากนั้นนำไป reflux แล้วกรองด้วย กระดาษกรองเบอร์ 4 สกัดด้วยการ reflux ซ้ำ จำนวน 3 ครั้ง ทำให้อุณหภูมิของสารสกัดน้ำกระชายดำเข้มข้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศและทำให้แห้งด้วยวิธีระเหิดด้วยความเย็น (freeze drying) เก็บสารสกัดน้ำกระชายดำในขวดสีชาปิดสนิทที่อุณหภูมิ 2–8 องศาเซลเซียส ปิดฉลากระบุชื่อ แหล่งที่มา วิธีเตรียม และหมายเลขตัวอย่าง จากนั้นนำสารสกัดน้ำกระชายดำไปพัฒนาวิธีวิเคราะห์และทดสอบความใช้ได้ของวิธีต่อไป

สารมาตรฐาน

5,7-DMF ความบริสุทธิ์ 99.95% (Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd., China, Lot. PRF20082101)

สารเคมี

methanol (HPLC grade), น้ำ (ultra purified water), glacial acetic acid (AR grade) และ ethanol (AR grade)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง UHPLC รุ่น 1290 Infinity II (Agilent Technologies®, Germany), guard column ชนิด Eclipse XDB-C18 ขนาด 2.1×5 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร และ Extend-C18 ขนาด 2.1×5 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร, column ชนิด ZORBAX Eclipse C18 Rapid Resolution HT ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร และ ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD ขนาด 2.1×50 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร (Agilent®, USA), เครื่องชั่งความละเอียด 0.1–0.01 มิลลิกรัม (Mettler Toledo®, Switzerland), เครื่องระเหยสุญญากาศ (Eyela®, USA), ตู้บร้อน

(Memmert[®], Germany), อ่างน้ำร้อน (Contherm scientific Ltd., New Zealand), sonicator (Ney[®], ULTRA sonik[™], USA), freeze dryer (Labconco[®], USA), PVDF syringe membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร และกระดาดกรองเบอร์ 4

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

การศึกษาระบบการวิเคราะห์ด้วย UHPLC

สารละลายตัวอย่าง เตรียมโดยชั่งสารสกัดน้ำกระชายดำ (จากเหง้ากระชายดำสด) 500 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 25 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่าน PVDF syringe membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สารละลายมาตรฐาน เตรียมโดยชั่ง 5,7-DMF 1 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 10 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่าน PVDF syringe membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

ความยาวคลื่น ศึกษาโดยนำสารละลายมาตรฐานและสารละลายสารสกัดน้ำกระชายดำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC การเลือกความยาวคลื่นพิจารณาจากความยาว

คลื่นสูงสุด (λ_{max}) ในการดูดกลืนแสงของ 5,7-DMF และพื้นที่ใต้พีคของ 5,7-DMF เมื่อเปรียบเทียบกับสารอื่นโดยใช้ความยาวคลื่น 264 และ 308 นาโนเมตร

วัฏภาคเคลื่อนที่ ศึกษาโดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานด้วย UHPLC ใช้วัฏภาคคงที่ชนิด ZORBAX Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่แบบ gradient ได้แก่ 0.2% glacial acetic acid ในน้ำ และ methanol การตัดสินผลวิเคราะห์พิจารณาจาก tailing factor เมื่อได้ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นของ glacial acetic acid ที่แตกต่างกัน จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานและสารละลายสารสกัดน้ำกระชายดำไปวิเคราะห์ เปรียบเทียบผลการศึกษาระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่แบบ gradient ของ 0.2% glacial acetic acid ในน้ำ และ methanol ระบบที่ 1 ดังแสดงในตารางที่ 1 และระบบที่ 2 ดังแสดงในตารางที่ 2 การตัดสินผลวิเคราะห์พิจารณาจาก resolution

วัฏภาคคงที่ ศึกษาโดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำกระชายดำด้วย UHPLC เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่าง

ตารางที่ 1 วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 1

Time (minute)	0.2% Glacial acetic acid in water (%)	Methanol (%)
0	45	55
1	45	55
7	15	85
8	15	85
11	45	55
12	45	55

ตารางที่ 2 วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2

Time (minute)	0.2% Glacial acetic acid in water (%)	Methanol (%)
0	50	50
1	50	50
9	15	85
10	15	85
13	50	50
15	50	50

วัฏภาคคงที่ซึ่งมีลักษณะของอนุภาคภายในแตกต่างกัน ได้แก่ วัฏภาคคงที่ชนิด ZORBAX Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2 ดังแสดงในตารางที่ 2 กับวัฏภาคคงที่ชนิด ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD ขนาด 2.1×50 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 3 ดังแสดงในตารางที่ 3 การตัดสินผลวิเคราะห์พิจารณาจาก resolution และ tailing factor จากนั้นศึกษาเปรียบเทียบผลการปรับสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างระบบที่ 3 ดังแสดงในตารางที่ 3 และระบบที่ 4 ดังแสดงในตารางที่ 4 เพื่อให้มีการแยกที่ดีขึ้น การตัดสินผลวิเคราะห์พิจารณาจาก resolution และ tailing factor

การศึกษาปัจจัยในการเตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำกระชายดำสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-DMF ชนิดของตัวทำละลาย ซึ่งสารสกัดน้ำกระชายดำ 500 มิลลิกรัม เติมตัวทำละลาย ethanol หรือ methanol 20 มิลลิลิตร นำไป reflux นาน 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วระเหยสารละลายให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย methanol ให้ได้ 25 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่าน PVDF syringe membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์

ระยะเวลาการสกัด ซึ่งสารสกัดน้ำกระชายดำ 500 มิลลิกรัม เติมตัวทำละลาย methanol 20 มิลลิลิตร นำไป reflux นาน 30 นาที หรือ 60 นาที กรองผ่านกระดาษ

ตารางที่ 3 วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 3

Time (minute)	0.2% Glacial acetic acid in water (%)	Methanol (%)
0	50	50
0.5	50	50
5	25	75
6	25	75
7	50	50
8	50	50

ตารางที่ 4 วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 4

Time (minute)	0.2% Glacial acetic acid in water (%)	Methanol (%)
0	50	50
0.5	50	50
7	25	75
8	25	75
9	50	50
10	50	50

กรองเบอร์ 4 แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 25 มิลลิลิตร จากนั้นกรองสารละลายที่ได้ผ่าน PVDF membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์

วิธีการสกัด ชั่งสารสกัดน้ำกระชายดำ 500 มิลลิกรัม เติมน้ำ methanol 20 มิลลิลิตร นำไป reflux นาน 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 50 มิลลิลิตร จากนั้นกรองสารละลายที่ได้ผ่าน PVDF membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC เปรียบเทียบกับอีกวิธี คือ ชั่งสารสกัดน้ำกระชายดำ 500 มิลลิกรัม เติมน้ำ methanol 40 มิลลิลิตร นำไป sonicate 30 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 50 มิลลิลิตร จากนั้นกรองสารละลายที่ได้ผ่าน PVDF membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ความจำเพาะ (specificity)

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานและสารละลายสารสกัดน้ำกระชายดำด้วย UHPLC แล้วเปรียบเทียบผลของ UV spectrum และการปนเปื้อนของสารอื่น

ความเป็นเส้นตรง (linearity)

ชั่งสารมาตรฐาน 5,7-DMF 60 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 100 มิลลิลิตร ได้ stock standard solution จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐาน 6 ระดับความเข้มข้นโดยเปิด stock standard solution จำนวน 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิลิตร ตามลำดับ เจือจางและปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 10 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์ sample blank ทำโดยชั่ง sample blank 500 มิลลิกรัม (7 ขั้ว) เติมน้ำ methanol 40 มิลลิลิตร นำไป sonicate 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร กรองสารละลายที่ได้ผ่าน PVDF membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.30 และ 0.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

กรองสารละลายที่ได้ผ่าน PVDF membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC โดยวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ขั้ว สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น (แกน x) กับ peak area (แกน y) พิจารณาความเป็นเส้นตรงของช่วงที่ทำการทดสอบจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) และ residual plot โดยเกณฑ์การยอมรับความเป็นเส้นตรง คือ $r > 0.99^{(15)}$, $R^2 > 0.99$ และ residual plot ที่ได้จากผลต่างของความเข้มข้นสังเกตและค่าความเข้มข้นประมาณ (y-residual) ของทุกระดับความเข้มข้นมีการกระจายตัวรอบ ๆ ค่าศูนย์⁽¹⁶⁾

ความแม่นยำ (accuracy)

การเตรียม sample blank นำสารสกัดน้ำกระชายดำทั้ง 5 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-DMF โดยชั่งสารสกัดน้ำกระชายดำ 500 มิลลิกรัม เติมน้ำ methanol 40 มิลลิลิตร นำไป sonicate 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 50 มิลลิลิตร กรองสารละลายที่ได้ผ่าน PVDF membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC แบบ triplicate และหาค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์โดยคำนวณความเข้มข้นของ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำกระชายดำจาก calibration curve กำหนดให้ตัวอย่างที่มีปริมาณ 5,7-DMF น้อยที่สุดเป็น sample blank โดยคำนวณปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของ 5,7-DMF จากสูตรดังนี้

$$\%w/w = \frac{\text{ความเข้มข้น (mg/ml)} \times \text{dilution factor} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (mg)}}$$

การวิเคราะห์ spiked sample โดยเติมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.04, 0.08 และ 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน sample blank ทำซ้ำในแต่ละระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 6 ขั้ว แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC

การวิเคราะห์ analyte ทำโดยวิเคราะห์สารมาตรฐานทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น ด้วย UHPLC คำนวณความเข้มข้นเฉลี่ยของ 5,7-DMF จาก calibration curve ตามสูตรการคำนวณ เกณฑ์การยอมรับความถูกต้อง

ของวิธีวิเคราะห์ คือ ร้อยละของการคืนกลับ (%recovery)

อยู่ในช่วงร้อยละ 95–105⁽¹⁵⁾

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

C_1 คือ ความเข้มข้นที่วัดได้ของสารใน spiked sample

C_2 คือ ความเข้มข้นที่วัดได้ของสารใน unspiked sample

C_3 คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม

ความเที่ยง (precision)

ความเที่ยงของการทวนซ้ำ (repeatability)⁽¹⁶⁾ วิเคราะห์สารสกัดน้ำกระชายดำที่เติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.04, 0.08 และ 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ โดยวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันด้วยนักวิเคราะห์ 1 คน คำนวณร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

ความเที่ยงของการทำซ้ำ (within laboratory reproducibility)⁽¹⁶⁾ วิเคราะห์สารสกัดน้ำกระชายดำที่เติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.04, 0.08 และ 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ โดยนักวิเคราะห์ 2 คน วิเคราะห์ระยะเวลา 2 วัน คำนวณร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

ประเมินค่า Horwitz's equation และ HORRAT เกณฑ์การยอมรับ คือ HORRAT < 2⁽¹⁵⁾

ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

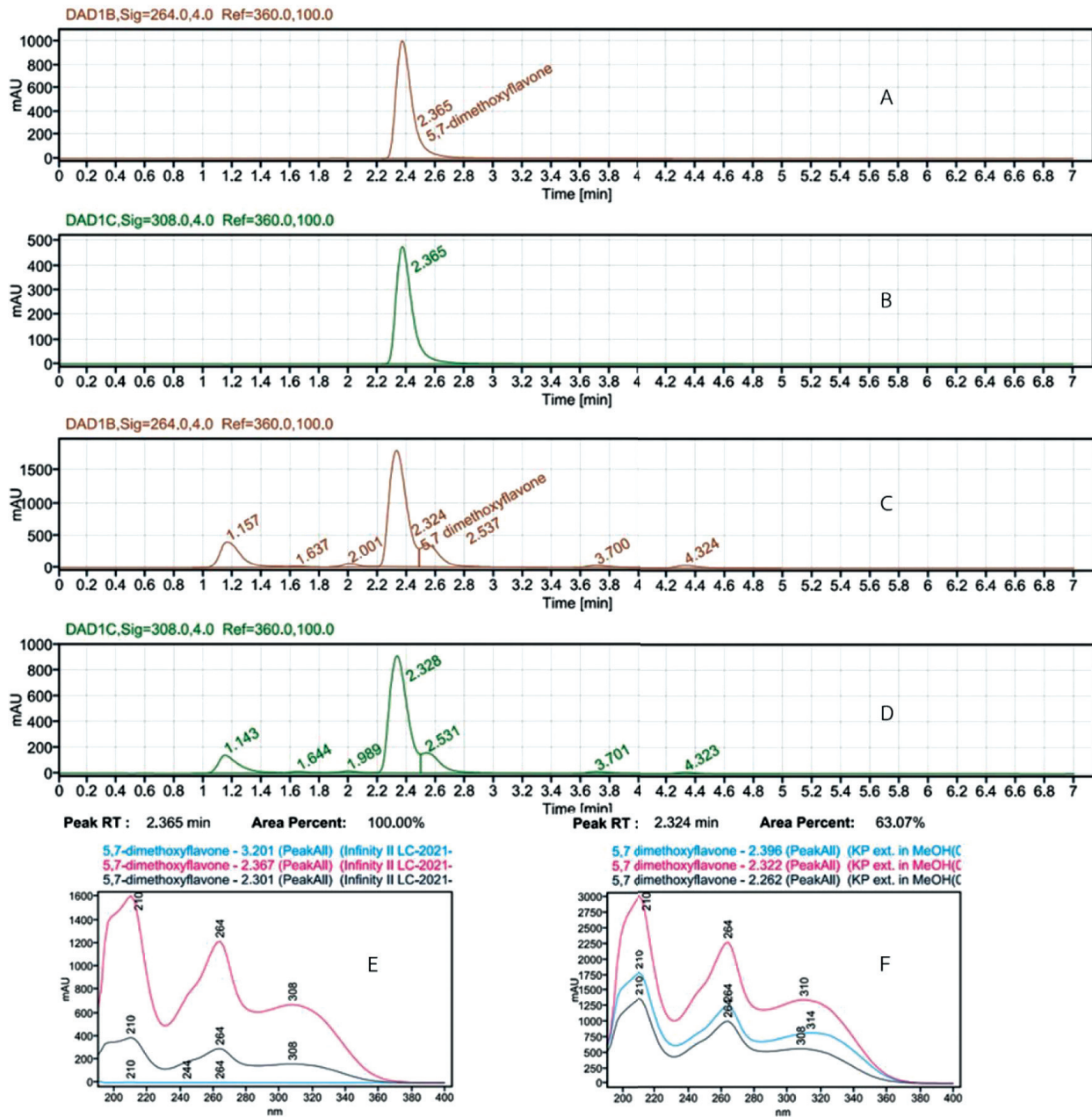
ประมาณค่า LOQ จาก calibration curve วิเคราะห์ sample blank (7 ซ้ำ) จากนั้นเตรียม spiked sample โดยเติมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นเท่ากับค่าประมาณของ LOQ ลงใน sample blank (6 ซ้ำ) วิเคราะห์ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป ใน sample blank (2 ซ้ำ) คำนวณความเข้มข้นของ 5,7-DMF ในตัวอย่างจาก calibration curve ยืนยัน LOQ โดยประเมินค่าความแม่นยำด้วย %recovery และประเมินค่าความเที่ยงด้วย %RSD

ผล

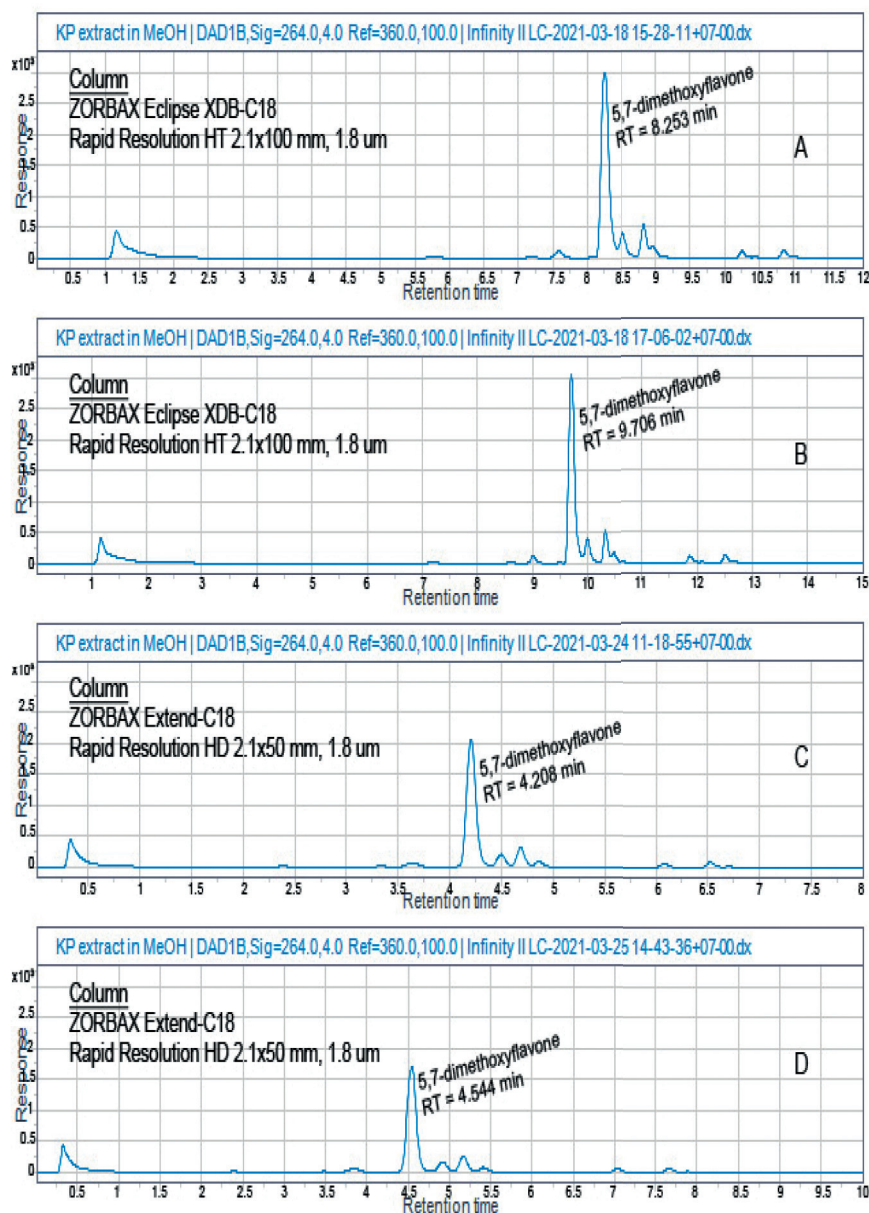
จากผลการศึกษาของการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ ปริมาณ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำกระชายดำ พบว่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ 5,7-DMF สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 264 และ 308 nm เมื่อวิเคราะห์สารสกัดน้ำกระชายดำและพิจารณา chromatogram พบว่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมคือ 264 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 3

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยวิเคราะห์สารมาตรฐานและสารสกัดน้ำกระชายดำระหว่างระบบที่ 1 กับระบบที่ 2 พบว่า resolution เท่ากับ 1.234 และ 1.347 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 ศึกษาวัฏภาคคงที่ระหว่าง column 2 ชนิด พบว่าเมื่อใช้ ZORBAX Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2 ได้ resolution และ tailing factor เท่ากับ 1.347 และ 1.362 ตามลำดับ ในขณะที่ใช้ ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD ขนาด 2.1×50 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 3 ได้ resolution และ tailing factor เท่ากับ 3.054 และ 1.130 ตามลำดับ เมื่อปรับสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่โดยใช้ column ชนิด ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD ขนาด 2.1×50 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร พบว่า resolution และ tailing factor ที่ได้จากระบบที่ 5 เท่ากับ 3.054 และ 1.130 ตามลำดับ resolution และ tailing factor ที่ได้จากระบบที่ 4 เท่ากับ 3.096 และ 1.070 ตามลำดับ ผลการเปรียบเทียบวัฏภาคเคลื่อนที่และวัฏภาคคงที่ ดังแสดงในภาพที่ 4

จากผลการศึกษากระบวนการวิเคราะห์ด้วย UHPLC พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำกระชายดำ ดังแสดงในตารางที่ 5 การศึกษาชนิดของตัวทำละลาย ระยะเวลาการสกัด และวิธีการสกัด พบว่าใช้ methanol เป็นตัวทำละลายและสกัดตัวอย่างด้วยวิธี sonicate นาน 30 นาที เป็นวิธีที่เหมาะสม ผลการศึกษาเปรียบเทียบปัจจัยสำหรับการเตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำกระชายดำ ดังแสดงในตารางที่ 6



ภาพที่ 3 การศึกษาความยาวคลื่นและ UV spectrum สำหรับวิเคราะห์ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำกระชายดำ (A) โครมาโตแกรมของ 5,7-DMF ที่ความยาวคลื่น 264 nm, (B) โครมาโตแกรมของ 5,7-DMF ที่ความยาวคลื่น 308 nm, (C) โครมาโตแกรมของสารสกัดน้ำกระชายดำที่ความยาวคลื่น 264 nm, (D) โครมาโตแกรมของสารสกัดน้ำกระชายดำที่ความยาวคลื่น 308 nm, (E) UV spectrum ของ 5,7-DMF ที่ความยาวคลื่น 264 และ 308 nm และ (F) UV spectrum ของสารสกัดน้ำกระชายดำ ที่ความยาวคลื่น 264 และ 308 nm



ภาพที่ 4 โครมาโตแกรมของสารสกัดน้ำกระชายดำ (A) วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 1, (B) วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2, (C) วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 3 และ (D) วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 4

ตารางที่ 5 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำกระชายดำด้วย UHPLC

วัฏภาคคงที่	ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD ขนาด 2.1×50 มิลลิเมตร
	ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร
อุณหภูมิคอลัมน์	30 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	0.4 มิลลิลิตรต่อนาที
วัฏภาคเคลื่อนที่	(A) 0.2% glacial acetic acid ในน้ำ และ (B) methanol โดยใช้ระบบ gradient ตามระบบที่ 4 (ตารางที่ 4)
ความยาวคลื่น	264 นาโนเมตร
เวลา	10 นาที
ปริมาตรการฉีด	4 ไมโครลิตร

จากผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ปริมาณสาร 5,7-DMF ของสารสกัดน้ำกระชายดำ โดย ศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังนี้

ความจำเพาะ (specificity)

chromatogram ของการวิเคราะห์ 5,7-DMF ใน สารละลายสารสกัดน้ำกระชายดำ พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ มีความจำเพาะโดยไม่พบการปนเปื้อนของสารอื่น ดังแสดงในภาพที่ 5

ความเป็นเส้นตรง (linearity)

กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับ peak area พบว่ามีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.06–0.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์ความเข้มข้น 3 ซ้ำ โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9998 และ residual plot มีการกระจายตัวที่สมมูลของ y-residual ของความเข้มข้นแต่ละระดับรอบๆ ค่าศูนย์ ดังแสดงใน ภาพที่ 6

ความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision)

จากผลการวิเคราะห์สารสกัดน้ำกระชายดำ จำนวน 5 ตัวอย่าง (3 ซ้ำ) พบว่ามีปริมาณ 5,7-DMF เฉลี่ยเท่ากับ 0.0947, 0.1780, 0.1523, 0.1510 และ 0.1675 มิลลิกรัม

ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์สารสกัดน้ำกระชายดำที่มีปริมาณ 5,7-DMF น้อยที่สุด (sample blank) จำนวน 7 ซ้ำ พบว่ามีปริมาณ 5,7-DMF เฉลี่ยเท่ากับ 0.0976 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง ดังแสดง ในตารางที่ 7 ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ พบว่าร้อยละของ การคืนกลับที่ความเข้มข้น 3 ระดับ มีค่าเท่ากับร้อยละ 105.12±1.49, 98.31±0.82 และ 99.07±0.52 ตามลำดับ

ความเที่ยงของการทดสอบ repeatability ที่ ความเข้มข้น 3 ระดับ มีค่า %RSD เท่ากับ 1.14, 1.11 และ 1.07 ตามลำดับ และ HORRAT เท่ากับ 0.70, 0.42 และ 0.40 ตามลำดับ

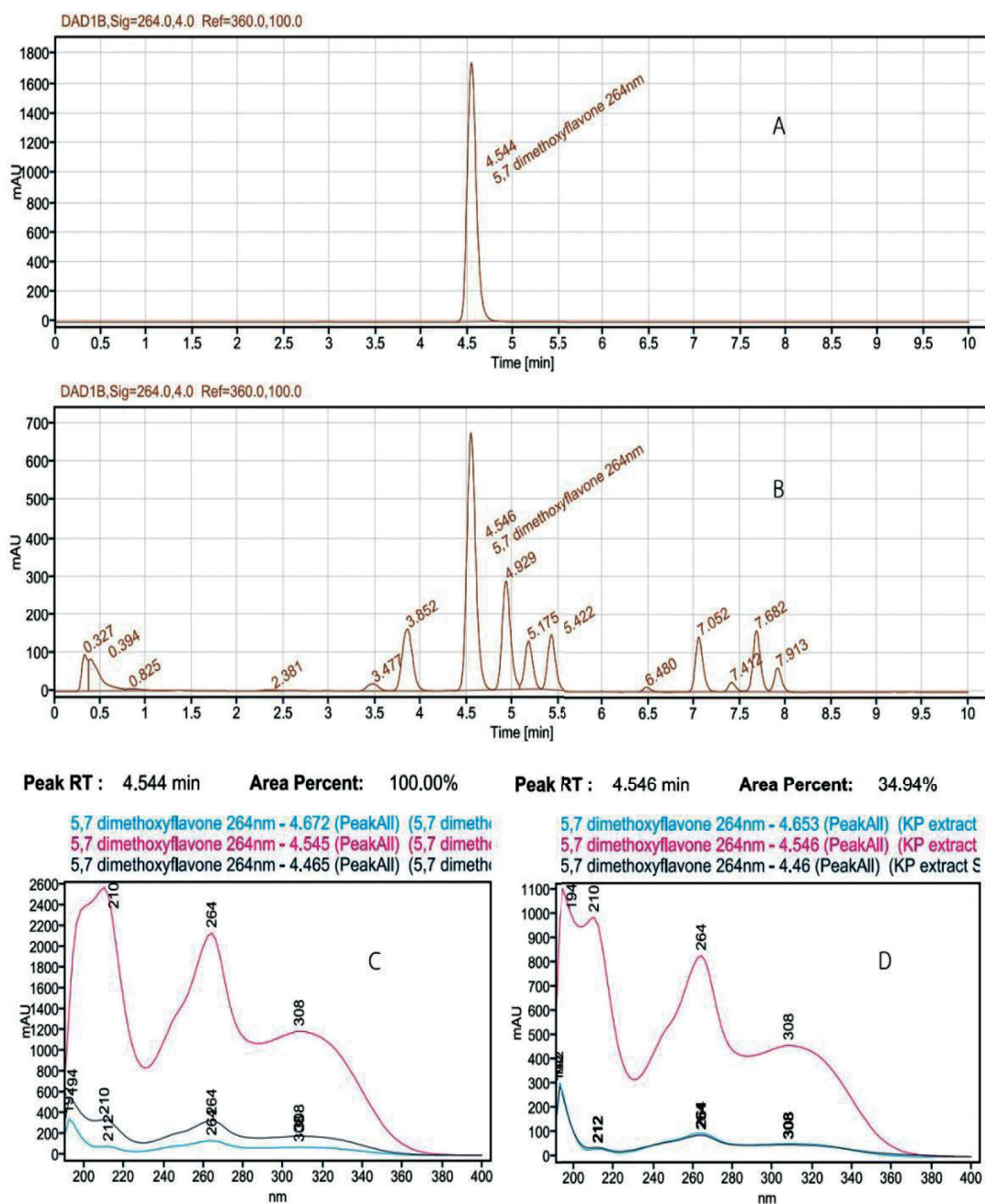
ความเที่ยงของการทดสอบ within laboratory reproducibility ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ มีค่า %RSD เท่ากับ 3.80, 3.67 และ 3.55 ตามลำดับ และ HORRAT เท่ากับ 0.18, 0.89 และ 0.78 ตามลำดับ ดังแสดงใน ตารางที่ 7

ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ พบว่า LOQ มีค่าเท่ากับ 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดย %recovery เท่ากับ 105.12 และ %RSD เท่ากับ 0.44

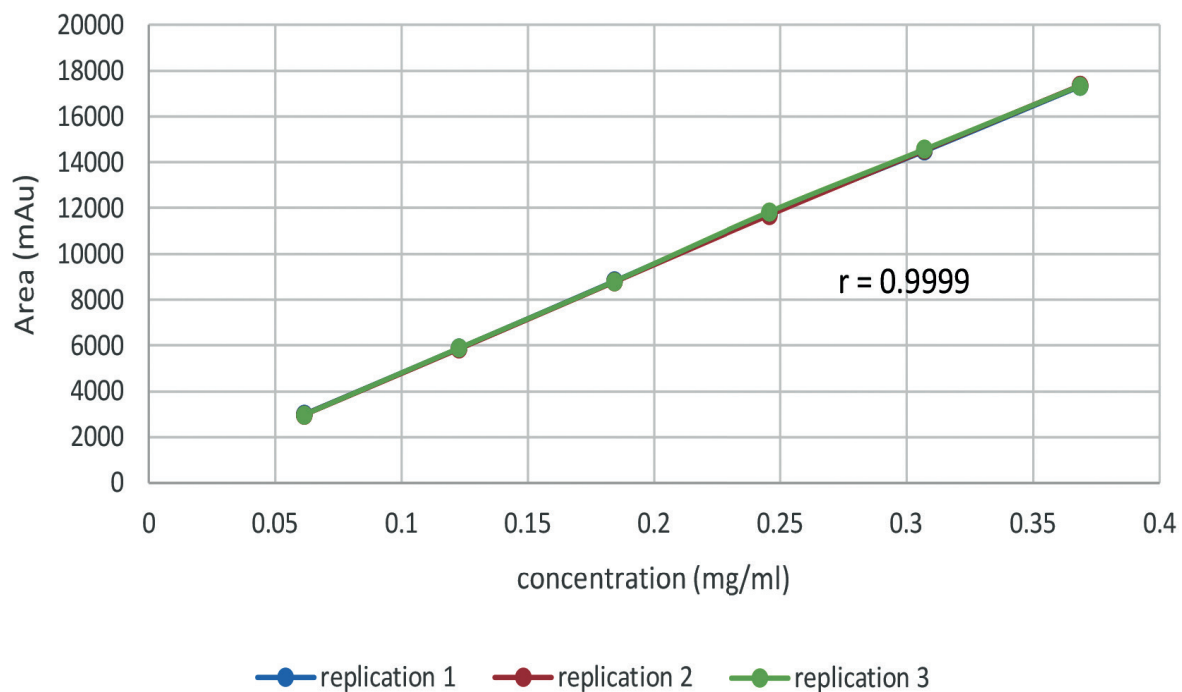
ตารางที่ 6 การศึกษาปัจจัยในการเตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำกระชายดำสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-DMF

ปัจจัยที่ศึกษา	ตัวทำละลาย	ระยะเวลาสกัด (นาที)	วิธีการสกัด	ปริมาณ 5,7-DMF (%w/w)
ชนิดตัวทำละลาย	ethanol	30	reflux	1.3
(n = 1)	methanol	30	reflux	2.1
ระยะเวลา	methanol	30	reflux	2.1
(n = 1)	methanol	60	reflux	2.3
วิธีการสกัด	methanol	30	reflux	1.7
(n = 2)	methanol	30	sonicate	1.3



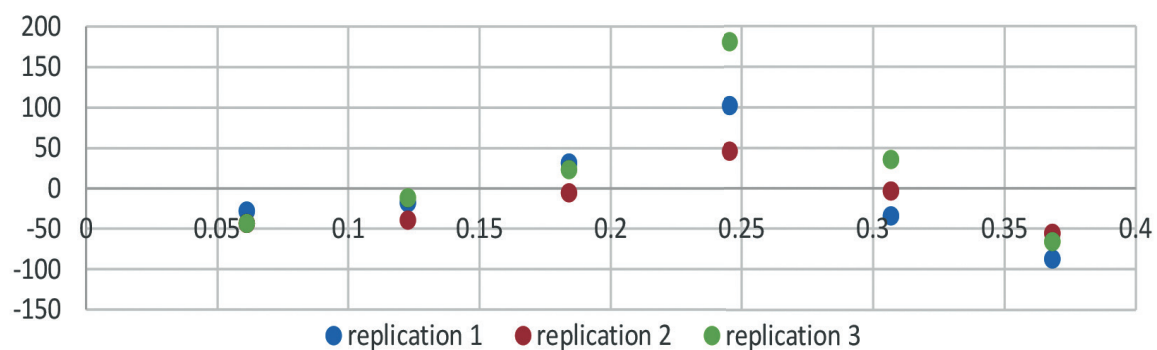
ภาพที่ 5 ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-DMF (A) โครมาโตแกรมของ 5,7-DMF, (B) โครมาโตแกรมของสารสกัดน้ำกระชายดำ, (C) UV spectrum ของ 5,7-DMF และ (D) UV spectrum ของสารสกัดน้ำกระชายดำ

Calibration curve of 5,7-dimethoxyflavone



(B)

Residual plot



ภาพที่ 6 กราฟมาตรฐานของ 5,7-DMF และ residual plot (A) calibration curve ของ 5,7-DMF ช่วงความเข้มข้น 0.06–0.36 mg/ml ($n = 3$) โดย $r = 0.9999$ และ (B) residual plot

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โดยแสดงความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision)

Sample blank (mg/ml)	Spike sample (mg/ml)	Accuracy (n = 6)	Precision (n = 7)			
		%Recovery ^a (mean±SD)	Repeatability within day ^b		Reproducibility within laboratory ^c	
			%RSD	HORRAT	%RSD	HORRAT
0.0976	0.14	105.12±1.49	1.14	0.70	3.80	0.18
	0.17	98.31±0.82	1.11	0.42	3.67	0.89
	0.21	99.07±0.52	1.07	0.40	3.55	0.78

เกณฑ์การยอมรับตาม AOAC guideline⁽¹⁵⁾^aAccuracy: %recovery = 95–105%^bPrecision: repeatability; %RSD < 2 and HORRAT = 0.5–2^cPrecision: within laboratory reproducibility; %RSD < 4 and HORRAT = 0.5–2

วิจารณ์

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดสมุนไพรเป็นวิธีการที่ใช้ควบคุมคุณภาพของสารสกัดสมุนไพร จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า มีการศึกษาวิจัยด้านฤทธิ์ทางชีวภาพและพิษวิทยาของสารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำ^(2, 5, 6, 9, 17) แต่ยังไม่มียูวิธีควบคุมคุณภาพทางเคมีด้วยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำกระชายดำ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำกระชายดำด้วย UHPLC และพบว่าการใช้ column ชนิด ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD ขนาด 2.1×50 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร เป็นวัฏภาคคงที่มีความเหมาะสมมากกว่าการใช้ column ชนิด ZORBAX Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร เนื่องจากสามารถวิเคราะห์ได้ resolution ที่ดีกว่า และ การใช้สัดส่วนแบบ gradient ที่เหมาะสมของ 0.2% glacial acetic acid ในน้ำ และ methanol เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ สามารถวิเคราะห์องค์ประกอบของ 5,7-DMF ในกระชายดำได้รวดเร็วกว่าการศึกษาองค์ประกอบของ polymethoxyflavone ในสารสกัดกระชายดำ⁽⁵⁾ การศึกษา 12 methoxyflavones ในเหง้ากระชายดำ⁽¹⁷⁾

และการศึกษา polymethoxyflavone ในผลิตภัณฑ์กระชายดำ⁽¹⁸⁾ การเตรียมสารละลายสารสกัดน้ำกระชายดำสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-DMF เลือกใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากสามารถละลายสารมาตรฐาน 5,7-DMF ได้ดีกว่าและตรวจพบปริมาณ 5,7-DMF ได้มากกว่าการใช้ตัวทำละลาย ethanol ระยะเวลาการสกัด เพื่อเตรียมตัวอย่างที่ 30 และ 60 นาที ไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน จึงเลือกใช้ระยะเวลาในการสกัดที่ 30 นาที แม้ว่าการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี reflux จะสามารถตรวจพบปริมาณ 5,7-DMF แตกต่างกับวิธี sonicate แต่เลือกใช้วิธี sonicate เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่ายกว่าโดยใช้เวลาเท่ากัน การทดสอบความใช้ได้ของวิธีแสดงให้เห็นว่าวิธีนี้มีความจำเพาะเนื่องจากเมื่อวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำกระชายดำแล้วไม่พบการปนเปื้อนของสารอื่น โดยมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.06–0.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9998 ชีตจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ของ 5,7-DMF มีค่าเท่ากับ 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า %recovery อยู่ในช่วง 95–105 โดยค่า precision พบว่า %RSD ของ repeatability มีค่าเท่ากับ 1.07–1.14 และ HORRAT < 2 ในขณะที่ %RSD ของ within

laboratory reproducibility มีค่าเท่ากับ 3.55–3.80 และ HORRAT < 2 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC guideline⁽¹⁵⁾ ดังนั้นวิธีนี้ จึงเป็นวิธีที่มีความแม่นยำและความเที่ยงที่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน

สรุป

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำกระชายดำด้วย UHPLC ที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว มีความเป็นเส้นตรง มีความแม่นยำ มีความเที่ยง และมีความจำเพาะ สามารถนำไปใช้วิเคราะห์สารสกัดน้ำกระชายดำ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัดน้ำกระชายดำที่มีการจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณการสนับสนุนงบประมาณการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สนับสนุนครุภัณฑ์สำหรับการวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ศูนย์ตรวจสอบและรับรองคุณภาพสมุนไพร สถาบันวิจัยสมุนไพรทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. เต็ม สมิตินันท์, ราชนย์ ภูมา, สมราน สุดดี, บรรณาธิการ. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2557. กรุงเทพฯ: สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2557.
2. สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. สมุนไพรน่ารู้ (4) กระชายดำ. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ; 2552.
3. Muhamad N, Muhmed SA, Yusoff MM, Gimbut J. Influence of solvent polarity and conditions on extraction of antioxidant, flavonoids and phenolic content from *Averrhoa bilimbi*. J Food Sci Eng 2014; 4: 255–60.
4. Pitakpawasutthi Y, Palanuvej C, Ruangrungsi N. Quality evaluation of *Kaempferia parviflora* rhizome with reference to 5,7-dimethoxyflavone. J Adv Pharm Technol Res 2018; 9(1): 26–31.
5. Wongsrikaew N, Kim H, Vichitphan K, Cho SK, Han J. Antiproliferative activity and polymethoxyflavone composition analysis of *Kaempferia parviflora* extracts. J Korean Soc Appl Biol Chem 2012; 55(6): 813–7.
6. Sae-wong C. Anti-inflammatory activity of *Kaempferia parviflora* Rhizomes [Thesis]. Doctoral dissertation, Philosophy in Pharmaceutical Science. Songkla: Prince of Songkla University; 2011.
7. Malakul W, Ingkaninan K, Sawasdee P, Woodman OL. The ethanolic extract of *Kaempferia parviflora* reduces ischaemic injury in rat isolated hearts. J Ethnopharmacol 2011; 137(1): 184–91.
8. Nemidkanam V, Kato Y, Kubota T, Chai-phanawongsaroj N. Ethyl acetate extract of *Kaempferia parviflora* inhibits Helicobacter pylori-associated mammalian cell inflammation by regulating proinflammatory cytokine expression and leukocyte chemotaxis. BMC Complement Med Ther 2020; 20: 124. (10 pages).
9. Sookkongwaree K, Geitmann M, Roengsumran S, Petsom A, Danielson UH. Inhibition of viral proteases by Zingiberaceae extracts and flavones isolated from *Kaempferia parviflora*. Pharmazie 2006; 61(8): 717–21.
10. กระทรวงสาธารณสุข และองค์การภาครัฐ-เอกชน. แผนแม่บทแห่งชาติ ว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2560–2564. นนทบุรี: กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข; 2559.

11. กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, องค์การภาครัฐ-เอกชน. การประชุมวิชาการสมุนไพรแห่งชาติ ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: พุ่มทอง; 2562.
12. กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ. Factsheet สมุนไพรประจำเดือนพฤษภาคม 2564. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 8 มี.ค. 2565]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.ditp.go.th/ditp_web61/article_sub_view.php?filename=contents_attach/739096/739096.pdf&title=739096&cate=1143&d=0.
13. งานแผนกลยุทธ์การตลาด ฝ่ายธุรกิจนวัตกรรมและถ่ายทอดเทคโนโลยี ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ. โครงการศึกษาโอกาสทางการตลาดสมุนไพรไทยเป้าหมาย. ปทุมธานี: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ; 2561.
14. Behnouth B, Sheikhezadi A, Bazmi E, Fattahi A, Sheikhezadi E, Saberi Anary SH. Comparison of UHPLC and HPLC in benzo-diazepines analysis of postmortem samples: a case-control study. *Medicine* 2015; 94(14): 1-7.
15. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. [online]. 2002; [cited 2020 Nov 30]; [38 screens]. Available from: URL: <https://www.farmaciaci.ufmg.br/wp-content/uploads/2015/06/AOAC-Guidelines-for-Single-Laboratory.pdf>.
16. ทิพวรรณ นิงน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
17. Ninomiya K, Matsumoto T, Chaipetch S, Miyake S, Katsuyama Y, Tsuboyama A, et al. Simultaneous quantitative analysis of 12 methoxyflavones with melanogenesis inhibitory activity from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*. *J Nat Med* 2016; 70: 179-89.
18. Burapan S, Kim M, Han J. PMFs analysis Krachaidum products by HPLC and GC. *J Appl Biol Chem* 2014; 57(3): 211-8.

Method Development and Validation of 5,7-Dimethoxyflavone Content of Black Ginger Rhizome Aqueous Extract Using Ultra High Performance Liquid Chromatography

Sununta Srisopon, Somchit Niumsukul, Nawarat Chadchen, Sakwichai Ontong, Tissanin Supachaiyakit, Somchai Sanlaung-in, and Siriwan Chaisomboonpan

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

ABSTRACT Black ginger rhizomes (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker) are used for tonic, erectile dysfunction aid, blood circulation system improvement, and antispasmodic in Thai traditional medicine. The major constituent, 5,7-dimethoxyflavone (5,7-DMF), was reported as antioxidant, anti-inflammation and anti-cancer. Until now, the quantitative determination of black ginger rhizomes aqueous extract has not been specified. The objective of this study was to develop and validate method to analyze the content of 5,7-DMF in the extract using ultra high performance liquid chromatography (UHPLC), detected at 264 nm. The stationary phase was ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD (2.1×50 mm, 1.8 μm). The mobile phase was the mixture of 0.2% glacial acetic acid in water and methanol as a gradient system. The sample was prepared by sonication with methanol for 30 minutes. As a result, this method was specific. The linearity was shown between 0.06–0.36 mg/ml with $r > 0.999$. The %recovery was 98.31–105.12. The precision repeatability within day and reproducibility within laboratory, were acceptable with %RSD < 2 and %RSD < 4 (HORRAT < 2), respectively. The limit of quantitation (LOQ) was equal to 0.04 mg/ml. Therefore, the method can be used for determination of 5,7-DMF content for the quality control of black ginger rhizomes aqueous extracts which are commercially available.

Keywords: Method development, Method validation, 5,7-dimethoxyflavone, Black ginger rhizomes aqueous extract, UHPLC

ผลของระยะทางกับค่าปริมาณรังสีกระเจิงจาก เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ในกรุงเทพมหานคร สมุทรสาคร และเขตสุขภาพที่ 4

สุรัชย์ ตั๋ยด้วง และ สุภาพร สะอาด

สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ถูกนำมาใช้ถ่ายภาพสำหรับผู้ป่วยที่ไม่สามารถเคลื่อนย้ายได้ ซึ่งในการใช้งานเครื่องจะมีปริมาณรังสีกระเจิงมากขึ้นขึ้นอยู่กับเวลาการถ่ายภาพรังสี ระยะทาง และค่าเทคนิคที่ตั้ง ถ้าค่าปริมาณรังสีกระเจิงมากจะมีผลต่อสุขภาพของผู้ได้รับรังสี การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาผลของระยะทางที่ทำให้ปริมาณรังสีกระเจิงลดลงและลักษณะการลดลงของรังสีกระเจิง โดยศึกษาจากเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ที่ใช้ในสถานพยาบาลในกรุงเทพมหานคร และ 6 จังหวัดในเขตสุขภาพที่ 4 และจังหวัดสมุทรสาครในเขตสุขภาพที่ 5 ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 จำนวนทั้งสิ้น 83 เครื่อง (7 ยี่ห้อ 15 รุ่น) โดยตั้งค่าเทคนิคถ่ายภาพรังสีคงที่ 80 kVp และ 32 mAs พบว่าเครื่องเอกซเรย์แบบเคลื่อนที่ที่ทดสอบทั้งหมด มีค่าปริมาณรังสีกระเจิง (mean±SD) ที่ระยะห่าง 1 เมตร อยู่ในช่วง 2,100±1,253 $\mu\text{Sv/hr}$ ถึง 11,500±9,192 $\mu\text{Sv/hr}$ และเมื่อทดสอบที่ระยะห่าง 2 เมตร พบว่าปริมาณรังสีกระเจิงลดลงมาอยู่ในช่วง 800±0 $\mu\text{Sv/hr}$ ถึง 2,940±3,624 $\mu\text{Sv/hr}$ ในขณะที่การทดสอบที่ระยะ 3, 4 และ 5 เมตร พบว่าปริมาณรังสีกระเจิงลดลงอย่างมากซึ่งอยู่ในช่วง 256±0 $\mu\text{Sv/hr}$ ถึง 1,278±1,021 $\mu\text{Sv/hr}$, 131±78 $\mu\text{Sv/hr}$ ถึง 719±575 $\mu\text{Sv/hr}$ และ 84±50 $\mu\text{Sv/hr}$ ถึง 449±387 $\mu\text{Sv/hr}$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าปริมาณรังสีกระเจิงกับระยะทางที่ทำการวัดพบว่าค่าปริมาณรังสีกระเจิงจะลดลงตามระยะทางที่ทำการวัดทุกเครื่อง และรังสีกระเจิงมีลักษณะการลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียลพบว่าที่ระยะตั้งแต่ 2 เมตรขึ้นไป มีค่าไม่เกินขีดจำกัดปริมาณรังสี (dose limit) ประจำบุคคล สำหรับผู้ปฏิบัติงานด้านรังสี ดังนั้นในการปฏิบัติงาน ควรใช้ระยะห่างอย่างน้อย 2 เมตร อย่างไรก็ตาม ขณะปฏิบัติงานถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ควรมีระยะห่างจากเครื่องเอกซเรย์ให้มากที่สุด

คำสำคัญ: เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่, ปริมาณรังสีกระเจิง, ระยะทาง

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

Received: 11 February 2022

Revised: 6 November 2022

Accepted: 10 November 2022

บทนำ

เครื่องเอกซเรย์แบบเคลื่อนที่หรือเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ ได้นำมาใช้ถ่ายภาพสำหรับผู้ป่วยที่ไม่สามารถเคลื่อนย้ายได้ในการเข้ารับบริการที่แผนกรังสีวิทยา เช่น หอผู้ป่วยและแผนกฉุกเฉิน เพื่อสร้างภาพอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกายสำหรับการวินิจฉัยรอยโรค การนำเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่มาใช้ถ่ายภาพรังสีผู้ป่วยจึงสำคัญมาก เนื่องจากห้องถ่ายภาพรังสีไม่ได้ถูกออกแบบสำหรับป้องกันอันตรายจากรังสี เช่น กรณีของหอผู้ป่วย ในขณะที่ทำการถ่ายภาพรังสีผู้ป่วยจะมีผู้ป่วยรายอื่นที่ไม่สามารถเคลื่อนย้ายตัวเองได้ จึงอาจได้รับปริมาณรังสีกระเจิงไปด้วย ซึ่งปริมาณรังสีกระเจิงดังกล่าวขึ้นอยู่กับระยะเวลาการถ่ายภาพรังสี ระยะทาง และค่าเทคนิคที่ตั้งขณะถ่ายภาพทางรังสี การได้รับรังสีบ่อยครั้งหรือได้รับในปริมาณมากเกินไปอาจทำให้เกิดความเสี่ยงต่อเซลล์เกิดความบกพร่องหรือเสื่อมสภาพ นำไปสู่โอกาสเกิดโรคมะเร็งหรืออาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในยีนทำให้มีผลต่อลักษณะทางพันธุกรรมได้⁽¹⁾ สถานพยาบาลบางแห่งไม่ได้ใช้อุปกรณ์ป้องกันรังสีหรือไม่มีการใช้ฉากป้องกันรังสีจึงทำให้มีความเสี่ยงที่จะได้รับรังสี ซึ่งการถ่ายภาพรังสีแต่ละครั้งเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานทางรังสีส่วนใหญ่จะไม่ทราบค่าปริมาณรังสีกระเจิงที่ผู้ปฏิบัติงานมีโอกาสได้รับ โดยที่ค่าจำกัดปริมาณรังสี (dose limit) ประจำบุคคลสำหรับผู้ปฏิบัติงานด้านรังสีจะต้องมีค่าไม่เกิน 20 มิลลิซีเวิร์ตต่อปี (400 ไมโครซีเวิร์ตต่อสัปดาห์) สำหรับประชาชนหรือบุคคลทั่วไปจะต้องมีค่าไม่เกิน 1 มิลลิซีเวิร์ตต่อปี (20 ไมโครซีเวิร์ตต่อสัปดาห์)⁽²⁾

ผลการศึกษาของ Vlachos I, et al⁽³⁾ พบว่าปริมาณรังสีกระเจิงขึ้นกับค่าความต่างศักย์ของหลอดเอกซเรย์ที่ใช้ และมุมมองการวัดรังสีกระเจิงมีผลกับ

ค่าปริมาณรังสีกระเจิงเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีผล เพราะค่าที่วัดได้มีค่าใกล้เคียงกันในการวัดทุกมุมมองจากการศึกษาของ Abrantes A และคณะ⁽⁴⁾ พบว่าระยะทางที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณรังสีกระเจิงลดลง นอกจากนี้ยังพบปัจจัยที่มีผลต่อค่าปริมาณรังสีกระเจิง คือ ค่ากระแสไฟฟ้าของหลอดเอกซเรย์กับเวลาในการถ่ายภาพรังสี หรือ mAs พบว่าถ้า mAs มีค่ามากจะส่งผลให้ปริมาณรังสีกระเจิงมาก ในขณะที่ใช้งานเครื่องเอกซเรย์หากจำเป็นต้องใช้ mAs สูง ให้ใช้ระยะทางช่วยลดปริมาณรังสีกระเจิงและจัดหาวัสดุป้องกันรังสี การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาผลของระยะทางที่ทำให้ปริมาณรังสีกระเจิงลดลงและลักษณะการลดลงของรังสีกระเจิงเมื่อใช้ค่า 80 kV และ 32 mAs เพื่อเป็นข้อมูลให้แก่ผู้ปฏิบัติงานและผู้เกี่ยวข้อง สำหรับเฝ้าระวังและใช้เป็นแนวทางป้องกันอันตรายรังสีจากการปฏิบัติงานโดยใช้เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มศึกษา

ดำเนินการศึกษาเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่จากสถานพยาบาล เช่น โรงพยาบาลและคลินิกทั้งภาครัฐและเอกชนในเขตกรุงเทพมหานคร เขตบริการสุขภาพที่ 4 จำนวน 6 จังหวัด ได้แก่ นนทบุรี ปทุมธานี พระนครศรีอยุธยา นครนายก สระบุรี อ่างทอง และในเขตบริการสุขภาพที่ 5 จำนวน 1 จังหวัด คือ สมุทรสาคร ที่ผ่านมาตรฐานทดสอบความเที่ยงตรงของค่าปริมาณรังสีตามมาตรฐานคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 จำนวน 83 เครื่อง ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยแบ่งเป็นเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ 7 ยี่ห้อ ทั้งหมด 15 รุ่น ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 จำนวนเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ที่ใช้ในการศึกษาจากจังหวัดต่าง ๆ

	กรุงเทพฯ	นนทบุรี	ปทุมธานี	อยุธยา	นครนายก	สระบุรี	อ่างทอง	สมุทรสาคร	รวม
เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ (เครื่อง)	60	4	8	2	2	1	3	3	83

ตารางที่ 2 รายละเอียดการกำหนดสัญลักษณ์ยี่ห้อ-รุ่น ของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ที่ใช้ในการศึกษา

เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่		
ลำดับเครื่องที่	ยี่ห้อ	รุ่น
1	A	I
2	B	I
3	C	I
4	C	II
5	D	I
6	E	I
7	F	I
8	F	II
9	F	III
10	F	IV
11	F	V
12	F	VI
13	F	VII
14	F	VIII
15	G	I

หมายเหตุ: เครื่องเอกซเรย์แต่ละยี่ห้อถูกกำหนดสัญลักษณ์ตามอักษรภาษาอังกฤษ (A-G) และรุ่นต่าง ๆ (I-VIII) โดยไม่อาจเปิดเผยข้อมูลได้ ซึ่งเป็นเครื่องที่มีจำหน่ายและใช้ในประเทศ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องตรวจวัดปริมาณรังสีกระเจิง (survey meter) ใช้สำหรับวัดค่าปริมาณรังสียังผล (effective dose: E) มีหน่วยเป็น ไมโครซีเวิร์ตต่อชั่วโมง ($\mu\text{Sv/hr}$) (ยี่ห้อ Fluke, รุ่น 451P-DE-SI-RYR, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ได้รับการสอบเทียบกับห้องปฏิบัติการรังสีมาตรฐานทุติยภูมิ (มีค่าความแม่นยำ $\pm 10\%$), หุ่นจำลองซึ่งทำจาก PMMA (polymethyl methacrylate) ความหนา 20 เซนติเมตร เพื่อทำให้เกิดการกระเจิงของรังสีเอกซ์

วิธีการศึกษา

การวัดค่าปริมาณรังสีกระเจิงจากเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ โดยตั้งค่าความต่างศักย์หลอดเอกซเรย์ (kV) ที่ 80 kV และค่ากระแสไฟฟ้าของหลอดเอกซเรย์และเวลาในการถ่ายภาพรังสี (mAs) 32 mAs ซึ่งการใช้งานสูงสุดอยู่ที่ 32 mAs โดยทำการเปิดคอลลิเมเตอร์ (collimator) ให้กว้างสุด (ซึ่งค่าปริมาณรังสีกระเจิงขึ้นกับขนาด

ของลำรังสี (field size) ใช้ขนาดตามหลอดเอกซเรย์ที่ตรวจวัดและการกรองรังสีของหลอดเอกซเรย์ จากความหนาครึ่งค่า (half value layer, HVL) โดยกำหนดเทคนิคการตั้งค่าหรือตัวแปรในการทดลองให้เหมือนกัน หรือใกล้เคียง เครื่องเอกซเรย์ที่ทำการเก็บข้อมูลจะมีค่า HVL ที่ 80 kV เป็นไปตามมาตรฐานที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กำหนด คือ มีค่าระดับปริมาณรังสี (mR/mAs) ตามกำหนดและมีค่าความซ้ำ (reproducibility) ไม่เกิน 5% ดังนั้นในการวัดค่าปริมาณรังสีกระเจิงจึงใช้ค่าเฉลี่ยที่ระยะทางต่าง ๆ ของแต่ละยี่ห้อและรุ่นของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ และวัดปริมาณรังสีกระเจิง (หน่วยเป็น $\mu\text{Sv/hr}$) ที่หุ่นจำลอง PMMA โดยใช้เครื่องตรวจวัดปริมาณรังสี (survey meter) ที่ระยะห่าง 1, 2, 3, 4 และ 5 เมตร ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยวางเครื่องมือวัดจัดให้อยู่ในแนวระดับระนาบเดียวกับหลอดเอกซเรย์ โดยแต่ละระยะทำการวัดจำนวน 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย $\pm\text{SD}$ ยกเว้นในบางยี่ห้อที่รุ่นเดียวกัน



ภาพที่ 1 แสดงตำแหน่งที่วัดปริมาณรังสีกระเจิง ณ ตำแหน่งที่ 1-5 เมตร (มองจากด้านบน)

จะมีการหาค่าเฉลี่ย $\pm$ SD อีกครั้ง ดำเนินการเช่นเดียวกันกับทุกเครื่องที่ทำการเก็บข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูล และ สถิติที่ใช้

เปรียบเทียบปริมาณรังสีกระเจิงที่วัดได้ตามระยะทางจากเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ของแต่ละบริษัทผู้ผลิตหรือยี่ห้อและรุ่น เมื่อวัดที่ระยะทางต่างกันโดยใช้ค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel

ผล

เมื่อพิจารณาผลในภาพรวมของเครื่องเอกซเรย์แบบเคลื่อนที่ที่ทดสอบทั้งหมด พบว่าปริมาณรังสีกระเจิง

(mean $\pm$ SD) ที่ระยะห่าง 1, 2, 3, 4 และ 5 เมตร โดยทำการวัด 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยในแต่ละระยะทาง (ยกเว้นในบางยี่ห้อที่รุ่นเดียวกันจะมีการหาค่าเฉลี่ยอีกครั้ง) มีปริมาณรังสีกระเจิงลดลงเมื่อใช้ระยะทางเพิ่มขึ้น โดยเครื่องเอกซเรย์แบบเคลื่อนที่ที่มีค่าปริมาณรังสีกระเจิงอยู่ในระดับสูงมาก ที่ระยะห่าง 1 เมตร ได้แก่ ยี่ห้อ B รุ่น I ยี่ห้อ F รุ่น VII และ ยี่ห้อ A รุ่น I ตามลำดับ ในขณะที่ยี่ห้อ D รุ่น I มีค่าปริมาณรังสีกระเจิงต่ำที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 3

เมื่อนำค่าปริมาณรังสีกระเจิงที่วัดได้ของเครื่องยี่ห้อ B รุ่น I ซึ่งมีค่าปริมาณรังสีกระเจิงมากที่สุด ที่ระยะ 1 เมตร คือ $11,500 \pm 9,192$ $\mu\text{Sv/hr}$ และค่าปริมาณรังสีกระเจิงที่ระยะ 5 เมตร คือ 406 ± 368 $\mu\text{Sv/hr}$ เปรียบเทียบ

ตารางที่ 3 ปริมาณรังสีกระเจิงที่ระยะต่าง ๆ ของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ที่วัดได้ ในการศึกษาที่ระยะต่าง ๆ (1-5 เมตร)

ค่าปริมาณรังสีกระเจิง (mean $\pm$ SD) ที่วัดได้ ($\mu\text{Sv/hr}$) ที่ระยะต่าง ๆ							
ลำดับ เครื่องที่	ยี่ห้อ	รุ่น	1 เมตร	2 เมตร	3 เมตร	4 เมตร	5 เมตร
1	A	I	11,040 $\pm$ 9,447	2,940 $\pm$ 3,624	1,114 $\pm$ 1057	627 $\pm$ 595	401 $\pm$ 381
2	B	I	11,500 $\pm$ 9,192	1,800 $\pm$ 990	1,278 $\pm$ 1,021	719 $\pm$ 575	406 $\pm$ 368
3	C	I	4,250 $\pm$ 71	1,400 $\pm$ 1,697	472 $\pm$ 8	266 $\pm$ 4	170 $\pm$ 3
4	C	II	3,400 $\pm$ 0	1,900 $\pm$ 0	378 $\pm$ 0	213 $\pm$ 0	136 $\pm$ 0
5	D	I	2,100 $\pm$ 1,253	875 $\pm$ 898	233 $\pm$ 134	131 $\pm$ 78	84 $\pm$ 50
6	E	I	2,300 $\pm$ 0	800 $\pm$ 0	256 $\pm$ 0	144 $\pm$ 0	92 $\pm$ 0
7	F	I	4,000 $\pm$ 0	1,600 $\pm$ 0	444 $\pm$ 0	250 $\pm$ 0	160 $\pm$ 0
8	F	II	6,963 $\pm$ 5,968	1,687 $\pm$ 1,529	636 $\pm$ 647	370 $\pm$ 364	237 $\pm$ 233
9	F	III	5,971 $\pm$ 4,993	1,498 $\pm$ 1,954	622 $\pm$ 725	309 $\pm$ 304	197 $\pm$ 195
10	F	IV	7,881 $\pm$ 3,900	2,471 $\pm$ 1,954	883 $\pm$ 733	497 $\pm$ 412	320 $\pm$ 263

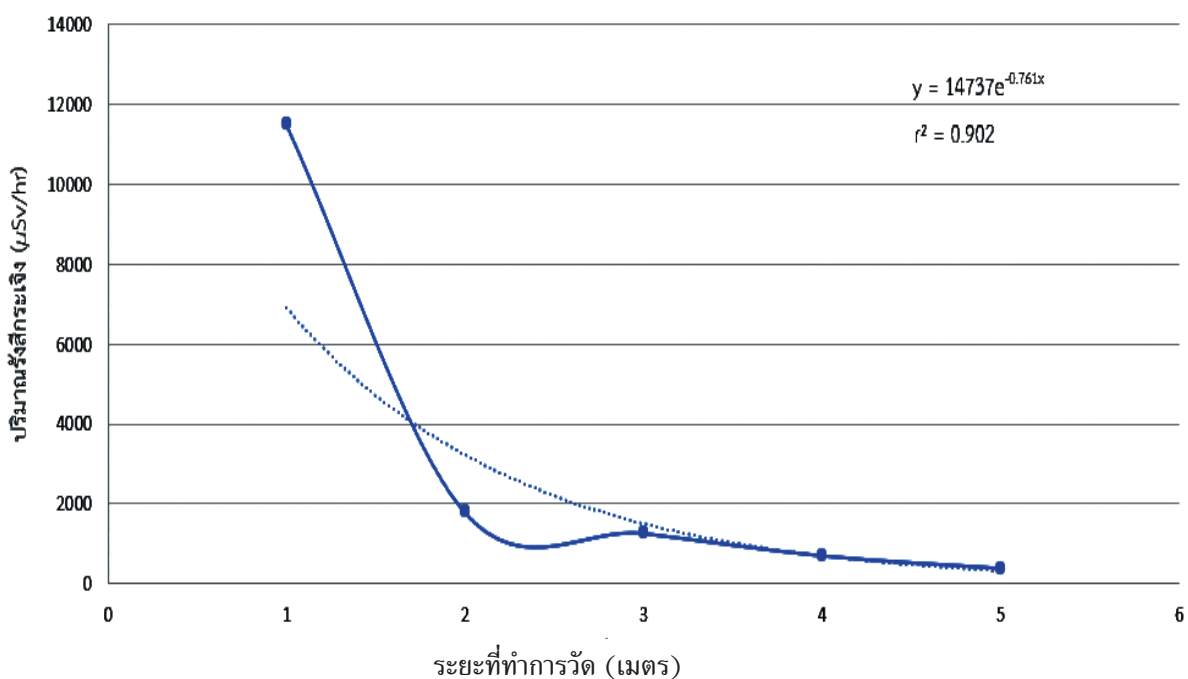
ตารางที่ 3 ปริมาณรังสีกระเจิงที่ระยะต่าง ๆ ของเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ที่วัดได้ ในการศึกษาที่ระยะต่าง ๆ (1-5 เมตร) (ต่อ)

ลำดับ เครื่องที่	ยี่ห้อ	รุ่น	ค่าปริมาณรังสีกระเจิง (mean±SD) ที่วัดได้ (μSv/hr) ที่ระยะต่าง ๆ				
			1 เมตร	2 เมตร	3 เมตร	4 เมตร	5 เมตร
11	F	V	5,000±0	2,400±0	556±0	313±0	200±0
12	F	VI	6,900±6,870	1,678±1,069	837±781	431±429	276±274
13	F	VII	11,225±9,686	2,796±1,932	1,247±544	702±605	449±387
14	F	VIII	2,600±0	1,000±0	289±0	163±0	104±0
15	G	I	5,633±4,743	1,867±1,001	626±527	352±296	225±189

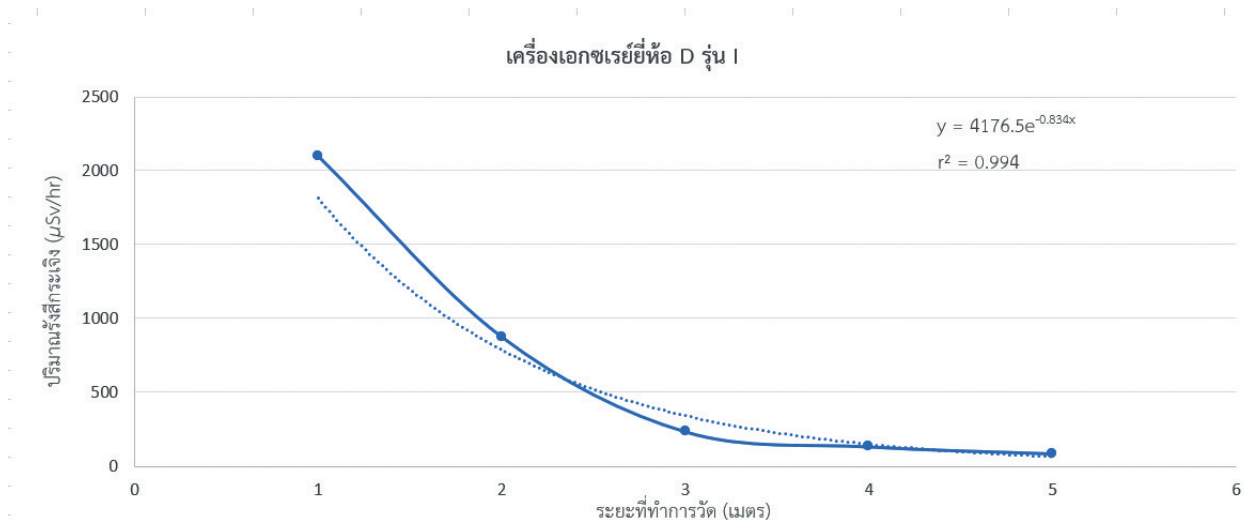
กับระยะทาง พบว่าค่าปริมาณรังสีกระเจิงจะลดลงตามระยะทางที่เพิ่มขึ้น โดยลดแบบผกผันกำลังสอง (inverse square law) คือ หากระยะทางเพิ่มขึ้น ค่าปริมาณรังสีกระเจิงที่วัดได้จะลดลงเป็นสองเท่าจากระยะทางเดิม ลักษณะกราฟที่ได้เป็นแบบเอกซ์โพเนนเชียล (exponential) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.902 ดังแสดงในภาพที่ 2 และเมื่อนำค่าปริมาณรังสีกระเจิง

ที่วัดได้ของเครื่องยี่ห้อ D รุ่น I ที่มีค่าปริมาณรังสีกระเจิงสูงที่สุดที่ระยะ 1 เมตร คือ $2,100\pm1,253$ μSv/hr และค่าปริมาณรังสีกระเจิงที่ระยะ 5 เมตร คือ 84 ± 50 μSv/hr เปรียบเทียบกับระยะทาง ซึ่งมีลักษณะกราฟเป็นแบบเดียวกัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.994 ดังแสดงในภาพที่ 3 กราฟจากทั้งสองเครื่องค่อนข้างเหมือนกัน ถึงแม้ว่าค่าปริมาณรังสีกระเจิงที่วัดได้จะแตกต่างกันมาก

เครื่องเอกซเรย์ยี่ห้อ B รุ่น I



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบค่าปริมาณรังสีกระเจิงที่วัดได้ (μSv/hr) กับระยะทางที่ทำการวัด (เมตร) จากเครื่องยี่ห้อ B รุ่น I ซึ่งวัดค่าปริมาณรังสีกระเจิงได้มากที่สุด



ภาพที่ 3 เปรียบเทียบค่าปริมาณรังสีกระเจิงที่วัดได้ ($\mu\text{Sv/hr}$) กับระยะทางที่ทำการวัด (เมตร) จากเครื่องยี่ห้อ D รุ่น I ซึ่งวัดค่าปริมาณรังสีกระเจิงได้น้อยที่สุด

วิจารณ์

ในการวัดค่าปริมาณรังสีกระเจิงจากเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ที่ใช้ในการศึกษานี้ ดำเนินการตั้งค่ากระแสไฟฟ้าของหลอดเอกซเรย์กับเวลา (mAs) คงที่คือ 32 mAs ซึ่งเป็นค่า mAs สูงสุดที่ใช้งานเป็นส่วนมากในการถ่ายภาพรังสีวินิจฉัย และตั้งค่าความต่างศักย์ของหลอดเอกซเรย์ (kV) คงที่ เท่ากับ 80 kV ทุกเครื่องเอกซเรย์ที่ทำการศึกษา ทั้งนี้เพื่อที่จะได้สามารถเปรียบเทียบค่าปริมาณรังสีกระเจิงที่ระยะต่าง ๆ ด้วยกันได้ สำหรับเครื่องบริษัทผู้ผลิตหรือยี่ห้อและรุ่นเดียวกัน จะใช้ค่าเฉลี่ยที่วัดได้เป็นตัวแทนของกลุ่มเพื่อนำมาเปรียบเทียบ โดยปริมาณการกระเจิงของรังสีขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ยี่ห้อ รุ่น ระยะความสูงของเครื่องตรวจวัดปริมาณรังสี (survey meter) จากพื้นรวมทั้งจากค่าการกรองรังสีครึ่งค่า (HVL) ของหลอดเอกซเรย์ รวมทั้ง output ของปริมาณรังสีที่ออกมา ขนาดของลำรังสี (field size) ของเครื่องเอกซเรย์ หรือการเปิดคอลลิเมเตอร์ (collimator) สำหรับปรับพื้นที่ปริมาณรังสีให้กว้างสุด ซึ่งเครื่องเอกซเรย์แต่ละยี่ห้อมีความกว้างไม่เท่ากัน จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ปริมาณการกระเจิงของรังสีมีค่าแตกต่างกัน

จากการศึกษานี้ นำข้อมูลการวัดค่าปริมาณรังสีกระเจิงมาคำนวณเวลาที่สามารถปฏิบัติงาน โดยเลือกข้อมูลของเครื่องเอกซเรย์ยี่ห้อ B รุ่น I ซึ่งเป็นเครื่องที่วัด

ค่าปริมาณรังสีกระเจิงได้มากที่สุดที่ระยะ 1 เมตร โดยค่าเวลาในการฉายรังสีจากเครื่องมือวัดที่ 32 mAs มีค่า 0.287 sec จะได้ค่ากระแสไฟฟ้าของหลอดเอกซเรย์ 111.50 mA มาคำนวณหาปริมาณรังสีกระเจิงด้วย workload 500 mA-min/week (General Radiographic)⁽²⁾ โดยผู้ปฏิบัติงานด้านรังสีทำงาน 50 week/yr ที่ระยะ 1, 2, 3, 4 และ 5 เมตร คำนวณได้ค่าปริมาณรังสีกระเจิงสูงสุด 42.97 mSv/yr, 6.73 mSv/yr, 4.78 mSv/yr, 2.69 mSv/yr และ 1.52 mSv/yr ตามลำดับ พบว่าที่ระยะตั้งแต่ 2 เมตร ขึ้นไป มีค่าไม่เกินขีดจำกัดปริมาณรังสี (dose limit) ประจำปีบุคคลสำหรับผู้ปฏิบัติงานด้านรังสี

ข้อมูลปริมาณรังสีกระเจิงที่ทำการวัดจากเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ พบว่าปริมาณรังสีกระเจิงขึ้นอยู่กับระยะทาง ซึ่งจะมีปริมาณมากที่ระยะใกล้หลอดเอกซเรย์ และปริมาณรังสีกระเจิงลดตามระยะทางเพิ่มขึ้นเป็นแบบผกผันกำลังสอง ดังแสดงในภาพที่ 2 และ 3 ถึงแม้เครื่องเอกซเรย์ในภาพที่ 2 มีค่าปริมาณรังสีกระเจิงมากที่สุด และภาพที่ 3 เป็นเครื่องที่มีค่าปริมาณรังสีกระเจิงน้อยที่สุด เมื่อดูแนวโน้มของเส้นกราฟทั้งสองภาพ พบว่าค่าปริมาณรังสีจะลดลงตามระยะทางแบบ exponential เช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าระยะทางมีผลต่อการลดลงของค่าปริมาณรังสีกระเจิงอย่างมาก งานวิจัยที่พบในประเทศไทยเรื่องการวัดค่าปริมาณรังสีกระเจิงจากเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่⁽⁵⁾ เป็นการวัดปริมาณรังสีกระเจิงจาก

เครื่องเอกซเรย์ 1 ยี่ห้อ 3 รุ่น โดยวิเคราะห์ปริมาณรังสีกระเจิง ทิศทาง และระยะที่ปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงานด้านรังสีและบุคคลทั่วไป พบว่าปริมาณรังสีแปรผันกับระยะห่างจากผู้ป่วยแต่ไม่ขึ้นกับทิศทาง โดยปริมาณรังสีกระเจิงต่ำสุดและเกณฑ์มาตรฐานระดับความปลอดภัยทางรังสีที่กำหนดไว้ คือ ปริมาณรังสีที่ร่างกายได้รับต้องไม่เกิน 20 mSv/yr สำหรับผู้ปฏิบัติงานด้านรังสี และปริมาณรังสีที่ร่างกายได้รับต้องไม่เกิน 1 mSv/yr สำหรับประชาชนทั่วไป⁽⁶⁾ ผู้ปฏิบัติงานควรอยู่ห่างจากหลอดเอกซเรย์ที่ระยะมากกว่า 4 เมตร และมุมที่ปลอดภัย คือ 0 องศา หรือหลังเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ที่ระยะห่างจากหลอดมากกว่า 4 เมตร เมื่อใช้งานเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่เฉลี่ย 0.5 ชั่วโมงต่อวัน (ระยะเวลาเฉลี่ยที่ทำการเอกซเรย์) โดยใช้งาน 5 วันต่อสัปดาห์ และ 52 สัปดาห์ต่อปี นอกจากนี้หากพื้นที่ควบคุมไม่ปลอดภัยจำเป็นต้องหาอุปกรณ์หรือวัสดุป้องกันรังสีมาใช้งานปฏิบัติงาน เช่น ฉากตะกั่วป้องกันรังสี ปลอกคอตะกั่ว และเสื้อตะกั่ว รวมทั้งอาจใช้สายแฮนด์สวิตช์ (hand switch) หรือรีโมทสวิตช์ (remote switch) เพื่อทำการถ่ายภาพรังสี ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้อาจเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจและต้องการใช้ข้อมูลเพื่อความปลอดภัยในการปฏิบัติงาน โดยเฉพาะในสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 มีการนำเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ไปใช้งานในโรงพยาบาลสนาม และต้องการให้ทางกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ตรวจวัดค่าปริมาณรังสีกระเจิง ซึ่งหากไม่สามารถตรวจวัดได้ไม่ทราบกรณีใด ๆ ทางเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานในพื้นที่สามารถนำข้อมูลจากการศึกษานี้ไปใช้อ้างอิงระยะทางที่ปริมาณรังสีกระเจิงต่ำ ๆ ในการปฏิบัติงานเพื่อความปลอดภัยได้

สรุป

การศึกษานี้พบว่าค่าปริมาณรังสีกระเจิงที่วัดได้จากเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ที่ระยะทางเท่ากัน ในแต่ละยี่ห้อและรุ่นมีค่าแตกต่างกัน ถึงแม้จะตั้งค่าเทคนิคการฉายรังสีเท่ากัน ดังนั้นควรมีการตรวจวัดปริมาณรังสีกระเจิงสำหรับแต่ละเครื่องเอกซเรย์อย่างสม่ำเสมอ ซึ่งค่าปริมาณรังสีกระเจิงจะลดลงตามระยะทางที่เพิ่มขึ้นตามหลักการแปรผกผันกำลังสอง ดังนั้นขณะปฏิบัติงานทุกครั้งผู้ปฏิบัติงานและผู้เกี่ยวข้องควรมีระยะห่างจาก

เครื่องเอกซเรย์ให้มากที่สุด โดยอาจใช้สายแฮนด์สวิตช์หรือรีโมทสวิตช์ เพื่อทำการถ่ายภาพรังสี พร้อมทั้งมีอุปกรณ์หรือวัสดุป้องกันรังสี เช่น ฉากตะกั่วป้องกันรังสี ปลอกคอตะกั่ว และเสื้อตะกั่ว รวมทั้งใช้เวลาการปฏิบัติงานให้น้อยที่สุดเท่าที่จำเป็น ตามหลัก ALARA (as low as reasonably achievable) คือ ความคุ้มค่าที่ต้องคำนึงถึงผลและอันตรายจากรังสีด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บข้อมูล และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ให้ความคิดเห็นทำให้งานนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. การป้องกันอันตรายจากรังสี. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว; 2546.
2. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. มาตรฐานคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: บริษัท บียอนด์ พับลิชชิง; 2562.
3. Vlachos I, Tsantilas X, Kalyvas N, Delis H, Kandarakis I, Panayiotakis G. Measuring scatter radiation in diagnostic X rays for radiation protection purposes. Radiat Prot Dosimetry 2015; 165(1-4): 382-5.
4. Abrantes A, Rebelo C, Sousa P, Rodrigues S, Almeida R, Pinheiro J, et al. Scatter radiation exposure during mobile X-ray examinations. HealthManagement 2017; 17(1): 68-72.
5. วสัน บุตรพา. การวิเคราะห์ปริมาณรังสีกระเจิงและการป้องกันอันตรายจากรังสีเมื่อถ่ายภาพด้วยเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่. วกรรมวิทย พ 2564; 63(3): 660-74.
6. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP publication 103. Ann ICRP 2007; 37(2-4): 9-34.

Effects of Distance and Radiation Dose Scattering from Mobile X-ray Machines used in Hospitals in Bangkok, Samut Sakhon, and the 4th Health Service Area

Surachai Tuidung and Supaporn Saard

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

ABSTRACT Mobile X-ray machines are used to take pictures of immobile patients, which has amount of radiation exposure depends on the radiographic time, distance and technical settings. If the scatteredness of radiation is high, it will affect the health of the radiation recipient. The objective of this study was to study the effect of distance on the degree of scatteredness of radiation doses and the scatteredness characteristics at 80 kVp and 32 mAs of radiographic setting. The study was carried out among mobile X-ray machines used in hospitals in Bangkok and 6 provinces in the 4th Health Service Area and Samut Sakhon province in the 5th Health Service Area, with a total of 83 X-ray machines (7 brands, 15 models) with a fixed radiographic technique value of 80 kVp and 32 mAs. The tested mobile X-ray machines had degree of scatteredness (mean $\pm$ SD) at a distance of 1 meter ranged from 2,100 $\pm$ 1,253 μ Sv/hr to 11,500 $\pm$ 9,192 μ Sv/hr, and when tested at a distance of 2 meters, the degree of scatteredness was reduced to the range of 800 $\pm$ 0 μ Sv/hr to 2,940 $\pm$ 3,624 μ Sv/hr, while the tests at 3, 4 and 5 meters showed a significant decrease in degree of scatteredness, which were in the range of 256 $\pm$ 0 μ Sv/hr to 1,278 $\pm$ 1,021 μ Sv/hr, 131 $\pm$ 78 μ Sv/hr to 719 $\pm$ 575 μ Sv/hr and 84 $\pm$ 50 μ Sv/hr to 449 $\pm$ 387 μ Sv/hr, respectively. When comparing the degree of scatteredness with the measured distance, the results showed that the degree of scatteredness decreased with the distance measured in all machines, and the degree of scatteredness had an exponential reduction pattern. The results also pointed out that at a distance of 2 meters or more, the scatteredness value did not exceed the individual dose limit for radiation workers. In conclusion, the mobile X-ray operation should be carried out at least 2 meters away from the X-ray machine. However, the distance from the X-ray machine should be as far as possible when performing imaging work with any mobile X-ray machines.

Keywords: Mobile X-ray machine, Scatter radiation, Distance

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 Chalermprakit 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	Independent Scholar
	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	



80 ปี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วิจัยและพัฒนา เพื่อสุขภาพที่ดีของคนไทย



<https://bit.ly/BullDmsc>