



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วารสาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 65 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2566 • Vol. 65 No. 2 April - June 2023



Approved by TCI during (2022-2024)

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 พรหมชาติแก้ว
บรรณาธิการบริหาร	ดร.ประไพ วงศ์สินคงมั่น	
บรรณาธิการ	ดร.นวลจันทร์ วิจิตรจินดา	
รองบรรณาธิการ	ดร.อภิวัฏ ธวัชสิน ดร.ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์	นางสิริภากร แสงกิจพร
คณะบรรณาธิการ	ศ.เกียรติคุณ ดร.พิไลพันธ์ พุฒิมณะ 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 ศ.ดร.พญ.ชนิตรา ธวัจจิตต์ รศ.ดร.ภญ.พิมพ์ทิพย์ พงษ์เพชร ดร.สลักจิต ชุตติพงษ์วิเวท ดร.อุษาวดี ถาวรระ นายสุธน วงษ์ชัย นางวิษชุดา จิตตางกูร ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา รศ.ดร.นวลฉวี เวชประสิทธิ์ ดร.วันทนา ปวีณกิตติพร ดร.อรุณญากร จันทร์แสง	มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ
ฝ่ายจัดการ	นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ นางสาวประสาน จุลวงษ์ นางสาวอภิมน จิรพงศ์ธร นายนาวิ ศรีธรรมย์ นางสาวภาวิณี สุขเจริญ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
สำนักงานวารสาร	สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 88/7 ซอยติวานนท์ 14 ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000 โทร. 0-2951-0000 ต่อ 99662 โทรสาร 0-2951-1297 E-mail : bull.dmsc@dmsc.mail.go.th	
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 65 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2566

Vol. 65 No.2 April - June 2023

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- สถานการณ์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในยาสมุนไพรและยาแผนโบราณของประเทศไทย
ปี พ.ศ. 2564 45
สิริดา ปงเมืองมูล ชุตินา จิตตประสาธศิลป์ ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์ และ ลัดดา พูลสวัสดิ์
- การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์พาราควอต ไคควอต คลอร์มีควอต และเมพิควอต ในเนื้อสัตว์
นม และไข่ โดยเทคนิค LC-MS/MS 68
รัตติยากร ศรีโคตร ภรพรรณ สงศรี และ นิชนันท์ บุญนิม
- การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาแผนปัจจุบันที่ปลอมปนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร
โดยเทคนิค Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) 84
กัญญารัตน์ เชื้อกุลชาติ วิทวัส วังแก้วหิรัญ อัจฉรี อินแก้ว เสาวณีย์ วาจาสิทธิ์ สุวิมล หมวดหมี
สกุลรัตน์ สมสันติสุข และ ทองสุข ปายะนันท์
- การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ไบวาดีไฮด์ เอ และสเตียโรไฮด์ในน้ำหวาน
ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง 101
สุทธาทิพย์ วิทย์ชัยวัฒน์วงศ์ และ ศิริธร พุ่มซ้อน
- การเตรียมจุลินทรีย์มาตรฐานแห้งแบบแช่เยือกแข็งและการควบคุมคุณภาพ 114
กมลวรรณ กันตัง อัจฉรา อยู่คง และ กนกชน สุภาพรหม

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

- การระบุขอบข่ายชนิดผลิตภัณฑ์ยา เครื่องสำอาง และเครื่องมือแพทย์ ในใบรับรอง 125
ความสามารถห้องปฏิบัติการของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
สุวรรณ ชื่นใจ อวิรุทธ์ เขจรนิตย์ เสาวนีย์ อารมย์สุข สุรศักดิ์ หมั่นพล และ ภัทรวีร์ สร้อยสังวาลย์

บทความทั่วไป

การศึกษาย้อนหลัง: ถอดบทเรียนและปัจจัยหลักแห่งความสำเร็จในการส่งเสริม

136

การผลิตยาแผนไทยในโรงพยาบาลของรัฐ

นพดล เหลืองภิรมย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 65 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2566

Vol. 65 No.2 April - June 2023

CONTENTS

Page

Original Articles

- Thailand's Situation of Microbial Contamination in Traditional, and Herbal Medicines in 2021** 45
Sirada Pongmuangmul, Chutima Jittaprasatsin, Piyada Wangroongsarb, and Ladda Poolsawat
- Analytical Method Development of Paraquat, Diquat, Chlormequat, and Mepiquat in Meat, Milk and Eggs by LC-MS/MS** 68
Rattiyakorn Srikote, Phornphan Songsri and Nichanan Boonnim
- The Method Development of Modern Drugs Adulterated in Dietary Supplement Products by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)** 84
Kanyarat Chuakunchat, Witthawat Wangkaewhiran, Atcharee Inkaew, Saovane Wajasit, Suwimol Muadmah, Sakulrat Somsuntisuk, and Thongsuk Payanan
- Method Validation of Rebaudioside A and Stevioside Determination in Syrup by High Performance Liquid Chromatography** 101
Suthatip Vitchaivutivong and Sirithorn Putsorn
- Lyophilization of Reference Microorganisms Preparations and Its Quality Control** 114
Kamonwan Kantaeng, Atchara Ukhong and Kanokchon Supaprom

Laboratory Finding

- Specifying of Pharmaceutical Products, Cosmetics and Medical Devices
in the Accredited Laboratory Certificate of the Bureau of Laboratory
Quality Standards, Department of Medical Sciences** 125

*Suwan Chuenjai, Awiruth Khejonnit, Saovanee Aromsook, Surasak Muenphon,
and Patrabee Soisangwan*

General Articles

- Retrospective Study: Lessons Learned and Key Success Factors in
the Promotion of the Production of Thai Traditional Medicines
in Public Hospitals** 136

Nophadon Luangpirom

สถานการณ์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในยาสมุนไพร และยาแผนโบราณของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2564

สิรดา ปงเมืองมูล¹ ชุติมา จิตตประสาธศิลป์² ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์³ และ ลัดดา พูลสวัสดิ์⁴

¹ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นครสวรรค์ 60000

²สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ³สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ ⁴สำนักยาและวัตถุเสพติด

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ ปัจจุบันรัฐบาลและกระทรวงสาธารณสุข ส่งเสริมให้มีการใช้ยาจากสมุนไพรและยาแผนโบราณซึ่งเป็นภูมิปัญญาพื้นบ้าน ประกอบกับกระแสความนิยมในการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ผู้ผลิตและหน่วยงานรัฐจึงต้องใส่ใจคุณภาพ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ใช้เป็นแนวทางการจัดการและยืนยันคุณภาพผลิตภัณฑ์ ปี พ.ศ. 2564 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ได้สำรวจสถานการณ์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรและยาแผนโบราณ จากผู้ผลิต 58 ราย ในพื้นที่ 43 จังหวัด จำแนกเป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนสกัดเข้มข้น ผลิตภัณฑ์ที่มียอจดจำหน่ายสูง และผลิตภัณฑ์เด่น จำนวน 26, 11 และ 23 ตามลำดับ รวม 60 ตัวอย่าง ผลการตรวจวิเคราะห์และประเมินผลตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยฉบับปี 2020 พบไม่ผ่านเกณฑ์ จำนวน 13, 3 และ 12 ตัวอย่าง รวม 28 ตัวอย่าง (52 รายการ) คิดเป็นร้อยละ 46.7 สาเหตุ ได้แก่ total aerobic microbial count, *Clostridium* spp., bile-tolerant gram-negative bacteria, total combined yeast and mold count และ *Salmonella* spp. จำนวน 19, 19, 12, 1 และ 1 รายการ ตามลำดับ แบ่งเป็นตัวอย่างที่ผลิตจากโรงพยาบาลรัฐ 31 ตัวอย่าง ไม่ผ่านเกณฑ์ 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25.8) และผู้ประกอบการเอกชน 29 ตัวอย่าง ไม่ผ่านเกณฑ์ 20 ตัวอย่าง (ร้อยละ 69.0) โดยพบผลิตภัณฑ์จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือไม่ผ่านเกณฑ์สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 61.5 ดังนั้นผู้ผลิตจึงควรปฏิบัติตามมาตรฐาน GMP ตัวอย่างเช่น การล้างวัตถุดิบด้วยน้ำสะอาด ป้องกันฝุ่นละอองในระหว่างกระบวนการผลิต ควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสม หรือใช้การฉายรังสีแกมมา จะช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ ข้อมูลสถานการณ์นี้เป็นประโยชน์กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในการวางแผนพัฒนาศักยภาพผู้ประกอบการและคุณภาพผลิตภัณฑ์ เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรและยาแผนโบราณของไทยมีคุณภาพมาตรฐาน แพทย์มีความเชื่อมั่นในการใช้และผู้บริโภคมีความปลอดภัย

คำสำคัญ: การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์, ยาสมุนไพร, ยาแผนโบราณ

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

Received: 5 February 2023

Revised: 3 May 2023

Accepted: 11 May 2023

บทนำ

ปัจจุบันรัฐบาลและกระทรวงสาธารณสุขส่งเสริมให้มีการผลิตและใช้ยาสมุนไพรและยาแผนโบราณ มีการบรรจุตำรับยาดังกล่าวไว้ในบัญชียาหลักแห่งชาติ จำนวน 71 ตำรับ⁽¹⁾ และจัดทำแผนแม่บทแห่งชาติว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2560-2564 โดยกำหนดรายการสมุนไพรโปรดักส์แชมเปียน (product champion) มิติด้านศักยภาพ 5 ชนิด ได้แก่ กวาวเครือขาว กระชายดำ ขมิ้นชัน บัวบก และมะขามป้อม มิติด้านความต้องการ 7 ชนิด ได้แก่ กระชาย พริก ฟักทะลายโจร กระเจี๊ยบแดง หนุ้าหวาน วานหางจระเข้ และโพล⁽²⁾ ส่งเสริมให้โรงพยาบาลของรัฐผลิตและจ่ายยาให้กับประชาชนผู้มารับบริการ ซึ่งได้รับความนิยมและมีปริมาณการใช้สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยยาสมุนไพรและยาแผนโบราณที่ผลิตในโรงพยาบาลของรัฐไม่ต้องขึ้นทะเบียนตำรับยา ได้รับการยกเว้นตามพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510⁽³⁾ ส่วนผลิตภัณฑ์ที่ต้องขึ้นทะเบียนตำรับ ตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 121 ตอนพิเศษ 43 ลงวันที่ 21 เมษายน พ.ศ. 2547 เรื่อง หลักเกณฑ์การพิจารณาขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนโบราณ เกี่ยวกับมาตรฐานการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และโลหะหนัก⁽⁴⁾ กำหนดว่าผลิตภัณฑ์ต้องไม่พบการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. และ *Clostridium* spp. ซึ่งข้อกำหนดดังกล่าวใช้เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาขึ้นทะเบียนยาแผนโบราณและยาจากสมุนไพรด้านการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ และสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดใช้เป็นเกณฑ์ในการเฝ้าระวังคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ปลายปี 2564 ได้มีการเปลี่ยนแปลงข้อกำหนดด้านจุลินทรีย์ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง เกณฑ์มาตรฐานค่าความบริสุทธิ์ หรือคุณลักษณะอื่นอันมีความสำคัญต่อคุณภาพ สำหรับตำรับผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ขึ้นทะเบียนแจ้งรายละเอียด หรือจดแจ้ง พ.ศ. 2564 ซึ่งได้ประกาศในราชกิจจานุเบกษา วันที่ 1 ธันวาคม 2564 และบังคับใช้เมื่อพ้นกำหนด 90 วัน นับแต่วันประกาศในราชกิจจานุเบกษา⁽⁵⁾ ซึ่งการเฝ้าระวังคุณภาพผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรและยาแผนโบราณเพื่อการคุ้มครองผู้บริโภคของประเทศไทยดำเนินการโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ซึ่งจะมีการสุ่มเก็บตัวอย่างตามแผนเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุขภาพ โดยสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดทั่วประเทศ จังหวัดละ 1 ตัวอย่างต่อปี ส่งตรวจ ณ สำนักยาและวัตถุเสพติดและศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ทั่วประเทศ

จากข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ยาสมุนไพรและยาแผนโบราณ ซึ่งศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ได้รับจากสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดและผู้ประกอบการเอกชนในพื้นที่เขตสุขภาพที่ 3, 4 และตัวอย่างภายใต้โครงการคุณภาพสมุนไพรไทยของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างปี พ.ศ. 2554-2563 จำนวน 422 ตัวอย่าง ตรวจพบ *Clostridium* spp. 110 ตัวอย่าง เมื่อตรวจยืนยันชนิดพันธุ์ด้วยวิธีทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข พบเป็น *Clostridium perfringens*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium sporogenes* และ *Clostridium* sp. จำนวน 69, 19, 5, 3 และ 34 ตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งบางตัวอย่างพบการปนเปื้อนร่วม 2 ชนิดพันธุ์ โดย *C. perfringens* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน เจริญแบบไม่ใช้ออกซิเจน สร้างสปอร์ ทนความแห้งแล้งได้ดี พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ดิน น้ำ ทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) โรคท้องร่วงที่เกี่ยวข้องกับการใช้ยาปฏิชีวนะ (antibiotic-associated diarrhea) โรคท้องร่วง (sporadic diarrhea) เนื้อตายเน่า (gas gangrene) ทำให้ติดเชื้อในกระแสเลือด^(6,7) *C. perfringens* ถูกจำแนกออกเป็น 7 กลุ่ม คือ type A, B, C, D, E, F และ G ตามความสามารถในการสร้างสารพิษ toxinotypes กลุ่มสำคัญชนิดต่างๆ ได้แก่ อัลฟา (Alpha: α), เบตา (Beta: β), เอปไซลอน (Epsilon: ϵ), ไอโอตา (Iota: ι), เอนเทอโรท็อกซิน (enterotoxin CPE) และ necrotic toxin netB⁽⁸⁾ มีรายงานพบ toxinotypes A, F, G, binary enterotoxin (BEC/CPIL) และ beta2 toxin ในตัวอย่างเชื้อ *C. perfringens* จำนวน 585 ตัวอย่าง ที่แยกได้จากผู้ป่วยในฮอกไกโด ประเทศญี่ปุ่น ระหว่างเดือนพฤษภาคม 2562 ถึงธันวาคม 2563 โดยพบ toxinotypes A สูงที่สุดคือ ร้อยละ 68.2 ตามด้วย type F ร้อยละ 31.6 type G

ร้อยละ 0.2 พบ binary enterotoxin (BEC/CPIL) 1 ตัวอย่าง และ beta2 toxin 6 ตัวอย่าง⁽⁶⁾

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจสถานการณ์คุณภาพด้านการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรและยาแผนโบราณของประเทศไทย โดยตรวจวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ปนเปื้อน ประกอบด้วยจำนวนของจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตโดยใช้อากาศ (total aerobic microbial count) จำนวนรวมของยีสต์และรา (total combined yeasts and moulds count) แบคทีเรียแกรมลบที่ทนน้ำดี (bile-tolerant gram negative bacteria) *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. และ *Clostridium* spp. จากนั้นประเมินผลตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia 2020; THP 2020)⁽⁹⁾ และตรวจยืนยันชนิดพันธุ์ของเชื้อ *Clostridium* spp. รวมถึงตรวจหาสารพิษของเชื้อ *C. perfringens* ที่พบ เพื่อเป็นข้อมูลนำเข้าไปใช้เป็นแนวทางการจัดการยาสมุนไพรและยาแผนโบราณ เพื่อการคุ้มครองผู้บริโภค พัฒนาศักยภาพผู้ผลิต ยกระดับคุณภาพผลิตภัณฑ์ให้เป็นไปตามกฎหมายกำหนด ส่งเสริมความมั่นคงด้านยาและเวชภัณฑ์และการคุ้มครองผู้บริโภคต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรและยาแผนโบราณจำนวน 60 ตัวอย่าง เก็บโดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 15 แห่ง ทั่วประเทศแห่งละ 4 ผลิตภัณฑ์ โดยคัดเลือกจากผู้ผลิตที่พร้อมให้ข้อมูลในการพัฒนา 58 ราย จากพื้นที่ 43 จังหวัด เก็บตัวอย่างระหว่างเดือนเมษายน ถึง สิงหาคม 2564 ดังนี้

ผลิตภัณฑ์โปรตีนสกัดแช่แข็ง จำนวน 26 ตัวอย่าง ได้แก่ ฟักทะลายโจรแคปซูล ขมิ้นชันแคปซูล และกาวเครือขาวแคปซูล จำนวน 13, 11 และ 2 ตัวอย่างตามลำดับ

ผลิตภัณฑ์ที่มียอดจำหน่ายสูง จำนวน 11 ตัวอย่าง ได้แก่ ชาขงรางจืด ยาบรรเทาโรตีสีดวงทวารแคปซูล ขิงแคปซูล ยาผสมเพชรสังฆาตแคปซูล และมะขามแขกแคปซูล จำนวน 1, 2, 3, 3 และ 2 ตัวอย่าง

ผลิตภัณฑ์เด่นเป็นอัตลักษณ์ของพื้นที่ จำนวน 23 ตัวอย่าง ได้แก่ ยาแผนโบราณชนิดน้ำ ยาแผนโบราณชนิดผง ยาแคปซูลอื่น ๆ และยาลูกกลอน จำนวน 2, 5, 12 และ 4 ตัวอย่าง ตามลำดับ

จำแนกได้เป็นตัวอย่างยาสมุนไพรที่ผลิตจากโรงพยาบาลของรัฐ จำนวน 31 ตัวอย่าง และผลิตจากสถานที่ผลิตเอกชน จำนวน 29 ตัวอย่าง

การตรวจวิเคราะห์หาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ตาม THP 2020⁽⁹⁾: ตรวจวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการยา ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์

เครื่องมือและอุปกรณ์

ตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 22.5±2.5 องศาเซลเซียส (MMM, Germany) ตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 32.5±2.5 องศาเซลเซียส (SHEL LAB, USA) ตู้อบเพาะเชื้อแบบไร้อากาศ อุณหภูมิ 32.5±2.5 องศาเซลเซียส (Hirayama, Japan) ตู้ปราศจากเชื้อ (ESCO, Singapore) เครื่องวัดค่าการนำกระแสไฟฟ้า (Mettler-Toledo, Germany) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Sartorius, Germany) เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (Hirayama, Japan) และเครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany)

เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน

เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานสำหรับทดสอบคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อ (growth-promoting and inhibitory properties of the media) และทดสอบความเหมาะสมของวิธี (suitability of the test) ได้รับจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

สำหรับการทดสอบหาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ตาม THP 2020 ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียที่เจริญโดยใช้ออกซิเจน (aerobic bacteria): *Pseudomonas aeruginosa* DMST 15501, *Bacillus subtilis* DMST 15896, *E. coli* DMST 15537, *S. aureus* DMST 8013 และ *Salmonella* Abony DMST 21863 แบคทีเรียที่เจริญโดยไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria): *C. sporogenes* DMST 15536 ยีสต์

(yeasts): *Candida albicans* DMST 5815 และรา (moulds): *Aspergillus niger* DMST 15538

การตรวจหาชนิดพันธุ์ของเชื้อ *Clostridium* spp. ประกอบด้วย *C. perfringens* ATCC 13124, *C. sporogenes* ATCC 11437, *C. sordellii* ATCC 9714 และ *C. bifermentans* LMG 3029

การตรวจหาสารพิษของเชื้อ *C. perfringens* ประกอบด้วย *C. perfringens* type A ATCC 13124, *C. perfringens* type B NCTC 4964, *C. perfringens* type C NCTC 10719, *C. perfringens* type D NCTC 8346, *C. perfringens* type E NCTC 8084 และ *C. perfringens* type A with enterotoxin DMST 51427

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี ตาม THP 2020⁽⁹⁾

อาหารเลี้ยงเชื้อ: trypticase soy agar (TSA), sabouraud dextrose agar (SDA), trypticase soy broth (TSB), baird-parker agar (BPA), rappaport-vassiliadis broth (RVS), brilliant green agar (BGA), xylose-lysine desoxycholate agar (XLD), bismuth sulfite agar (BSA), crystal violet-neutral red-bile-dextrose agar (VRBD), macconkey broth (MCB), macconkey agar (MCA), levine eosin-methylene blue agar (EMB), reinforced clostridia medium (RCM), cooked-meat medium (CMM), MR-VP broth, tryptone broth, Koser's citrate, nutrient agar (NA), peptone, egg yolk tellurite (Difco, France), enterobacteria enrichment medium (EEM), columbia agar (CBA), tetrathionate medium (TTM) (Merck, Germany), soy lecithin (Lecico, Germany), coagulase plasma rabbit with EDTA (BD BBLTM, France)

สารเคมี analytical grade: 30% hydrogen peroxide, hydrochloric acid, glacial acetic acid, sulfuric acid, potassium hydroxide, alpha naphthol, Kovac's indole reagent (Merck, Germany),

sodium hydroxide, potassium dihydrogen phosphate dehydrate, sodium chloride (Carlo Erba, Italy), gentamicin sulfate, chloramphenicol (Sigma Aldrich, USA), disodium hydrogen-phosphate heptahydrate, methyl red (PanReac, Spain), polysorbate 80 (Acros Organics, Belgium), liquid paraffin (LabChem, USA) gram stain set (CLINAG, Thailand)

สารละลายสำหรับเจือจางตัวอย่าง (diluent): buffered sodium chloride-peptone solution with 0.5% lecithin, 5% polysorbate 80 (BSP-LP)

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ (enrichment broth): trypticase soy broth with 0.5% lecithin, 5% polysorbate 80 (TSB-LP) และ reinforce clostridial medium with 0.5% lecithin, 5% polysorbate 80 (RCM-LP)

การทดสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

ตัวอย่างอาจมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) จากส่วนประกอบที่เป็นสมุนไพรหรือจากสารกันเสียที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ จึงจำเป็นต้องทดสอบความเหมาะสมของวิธีก่อนนำตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์กับเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน และมีการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน ประกอบด้วย การทดสอบคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (growth promotion test) โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานที่ได้รับจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ได้แก่ *Staphylococcus aureus* DMST 8013, *Bacillus subtilis* DMST 15896, *Candida albicans* DMST 5815 และ *Aspergillus niger* DMST 15538 ความเหมาะสมของการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีการนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (suitability of the counting method) สำหรับการทดสอบ TAMC ใช้เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน *S. aureus* DMST 8013, *Pseudomonas aeruginosa* DMST 15501, *B. subtilis*

DMST 15896, *C. albicans* DMST 5815 และ *A. niger* DMST 15538 สำหรับการทดสอบ TYMC ใช้เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน *C. albicans* DMST 5815, *A. niger* DMST 15538 และตัวควบคุมผลลบ (negative controls) การตรวจวิเคราะห์หาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน ประกอบด้วย การทดสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมและยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (growth-promoting and inhibitory properties of the media) และความเหมาะสมของวิธีทดสอบ (suitability of the test) ใช้เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน *S. aureus* DMST 8013, *P. aeruginosa* DMST 15501, *Escherichia coli* DMST 15537, *Salmonella* Abony DMST 21863, *Clostridium sporogenes* DMST 15536 และตัวควบคุมผลลบ (negative controls)

การเตรียมตัวอย่าง

สำหรับการทดสอบ total aerobic microbial count (TAMC), total combined yeasts and moulds count (TYMC) bile-tolerant gram-negative bacteria, *E. coli*, *S. aureus* และ *Clostridium* spp. ซึ่งตัวอย่าง 10.0 กรัม เติม BSP-LP ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ได้ระดับการเจือจางเริ่มต้น 1:10 ผสมให้เข้ากัน

การทดสอบหา TAMC

เจือจางสารละลายตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง 1:10 (10^{-1}) ลงครั้งละ 10 เท่า (10 fold dilution) ด้วย BSP-LP จนถึงระดับการเจือจาง 10^{-5} ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ ระดับการเจือจางละ 2 ซ้ำ เททับด้วยอาหาร TSA ที่อุณหภูมิไม่เกิน 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 15-20 มิลลิลิตรต่อจาน ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 32.5 ± 2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน โดยตรวจนับโคโลนีในระดับการเจือจางที่ให้โคโลนีชัดเจนระหว่าง 25-250 โคโลนีต่อจาน

การทดสอบหา TYMC

เตรียมสารละลายตัวอย่างเช่นเดียวกับการทดสอบ TAMC ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-4} แต่เพาะเลี้ยงในอาหาร SDA ซึ่งเติม chloramphenicol 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 22.5 ± 2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน ตรวจนับโคโลนีในระดับการเจือจางที่ให้โคโลนีไม่เกิน 50 โคโลนีต่อจาน

การทดสอบหา bile-tolerant gram-negative bacteria

ซึ่งตัวอย่าง 10.0 กรัม เติม TSB-LP ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ได้ระดับการเจือจาง 1:10 ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 22.5 ± 2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 5 ชั่วโมง จะได้เป็น pre-incubation sample จากนั้นแยกดำเนินการทดสอบเชิงคุณภาพสำหรับการตรวจพบ/ไม่พบ (test for absence) และการทดสอบเชิงปริมาณ (quantitative test) ดังนี้

เชิงคุณภาพ: ปิเปต pre-incubation sample ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (มีเนื้อตัวอย่าง 1 กรัม) ลงในอาหาร EEM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 32.5 ± 2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงบนอาหาร VRBD บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 32.5 ± 2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หากตรวจพบโคโลนีของ gram-negative bacteria ให้รายงานผลตรวจพบ หากตรวจไม่พบโคโลนีดังกล่าวให้รายงานผลตรวจไม่พบ

เชิงปริมาณ: ปิเปต pre-incubation sample ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EEM ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (มีเนื้อตัวอย่าง 0.1 กรัม) จากนั้นทำการเจือจางต่อให้ได้เนื้อตัวอย่าง 0.01 และ 0.001 กรัม นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 32.5 ± 2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงบนอาหาร VRBD บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 32.5 ± 2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจหาโคโลนีของ gram-negative bacteria รายงานผลโดยเทียบกับค่า probable number ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณ probable number ของการทดสอบหา bile-tolerant gram-negative bacteria⁽⁹⁾

ผลการทดสอบที่ปริมาณเนื้อสารตัวอย่าง			probable number ของ bile-tolerant gram-negative bacteria ต่อตัวอย่าง 1 กรัม
0.1 กรัม	0.01 กรัม	0.001 กรัม	
+	+	+	มากกว่า 10^3
+	+	-	มากกว่า 10^2 และน้อยกว่า 10^3
+	-	-	มากกว่า 10 และน้อยกว่า 10^2
-	-	-	น้อยกว่า 10

การทดสอบหา *E. coli*

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง 1:10 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (มีเนื้อตัวอย่าง 1 กรัม) ลงในอาหาร TSB-LP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 32.5 ± 2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร MCB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงบน MCA บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 32.5 ± 2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-72 ชั่วโมง หากพบลักษณะโคโลนีสีชมพูหรือแดง มีหรือไม่มีโซนรอบโคโลนี ให้ถ่ายเชื้อลงบนอาหาร EMB บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 32.5 ± 2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หากพบลักษณะโคโลนีสีเข้มมีจุดสีดำตรงกลางมีประกายเงาโลหะ (metallic sheen) ทำการทดสอบยืนยันโดยการย้อมแกรม หากเป็น *E. coli* จะพบ negative rods (cocco-bacilli) และทดสอบการใช้น้ำตาลบนอาหาร TSI จะพบส่วนของ slant และ butt สีเหลือง (acid) และสร้างแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ซึ่งจะสังเกตเห็นมีรอยแตก/แยก และ IMViC test⁽¹⁰⁾ โดย *E. coli* ให้ผลได้ 2 แบบ คือ Biotype I = + + - - และ Biotype II = - + - -

การทดสอบหา *S. aureus*

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง 1:10 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (มีเนื้อตัวอย่าง 1 กรัม) ลงใน TSB-LP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 32.5 ± 2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงบนอาหาร BPA บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 32.5 ± 2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-72 ชั่วโมง หากพบลักษณะโคโลนีสีดำเงาล้อมรอบได้โซนใสขนาด 2-5

มิลลิเมตร ทำการทดสอบยืนยันโดยการย้อมแกรม หากเป็น *S. aureus* จะย้อมติดสีแกรมบวก และมีลักษณะกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (gram-positive cocci in clusters) ทดสอบ coagulase test โดยใช้ coagulase plasma rabbit with EDTA ซึ่งให้ผลบวก เกิดการแข็งตัว (clot) ของ plasma ภายใน 24 ชั่วโมง

การทดสอบหา *Salmonella* spp.

ซั่งตัวอย่าง 10.0 กรัม ลงในอาหาร TSB-LP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 32.5 ± 2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ปิเปตเชื้อปริมาตร 0.1 และ 1 มิลลิลิตร แยกใส่ในหลอดซึ่งมีอาหาร RVS และ TTM บรรจุอยู่หลอดละ 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 32.5 ± 2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงบนอาหาร BGA, XLD และ BSA บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 32.5 ± 2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-48 ชั่วโมง หากพบลักษณะโคโลนีขนาดเล็ก โปร่งใส บน BGA หรือโคโลนีสีแดงลักษณะใส มีหรือไม่มีจุดดำตรงกลางบน XLD หรือโคโลนีสีน้ำตาล เทา หรือดำมันวาว บน BSA ทำการทดสอบยืนยันโดยการย้อมแกรม หากเป็น *Salmonella* spp. จะย้อมติดสีแกรมลบ และมีลักษณะเป็นรูปท่อน (gram-negative rods) ทดสอบการใช้น้ำตาลบนอาหาร TSI จะให้ส่วนของ slant สีแดง (alkaline) butt สีเหลือง (acid) และอาจพบ/ไม่พบสีดำของ hydrogen sulfide ตรงส่วนของ butt หากผลตรงตามลักษณะของ *Salmonella* spp. ให้ถ่ายเชื้อที่อายุ 18-24 ชั่วโมง ลงบนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 32.5 ± 2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ส่งเชื้อตรวจยืนยันผล ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มแบคทีเรียวิทยาทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

การทดสอบหา *Clostridium* spp.

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง 1:10 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (มีเนื้อตัวอย่าง 1 กรัม) ลงในอาหาร RCM-LP ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวดขวดแรกทดสอบ *Clostridium* spp. ที่อยู่ในรูปสปอร์ให้ความร้อนที่ 80°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นทันที เททับผิวหน้าด้วย sterile liquid paraffin ขวดที่สองทดสอบ *Clostridium* spp. ที่ไม่อยู่ในรูปสปอร์ เททับผิวหน้าด้วย sterile liquid paraffin โดยไม่ต้องให้ความร้อน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32.5±2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงบนอาหาร CBA ที่เติม gentamicin 20 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มเพาะในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 32.5±2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง หากพบโคโลนีเกิดขึ้น ให้ถ่ายเชื้อจากโคโลนีเดียวแยกลงบนอาหาร CBA จำนวน 2 จาน โดยให้ครอบคลุมทุกลักษณะโคโลนีที่พบนำไปแยกบ่มที่อุณหภูมิ 32.5±2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ในสภาวะปกติและสภาวะไร้อากาศ หากพบโคโลนีเชื้อในสภาวะไร้อากาศแต่ไม่พบในสภาวะปกติให้ทำการย้อมแกรม หากเป็น *Clostridium* spp. จะย้อมติดสีแกรมบวกและมีลักษณะเป็นรูปท่อน มีหรือไม่มีสปอร์ (gram-positive rods, with or without

spores) ทดสอบ catalase reaction กับสารละลาย 3% hydrogen peroxide ให้ผลลบ คือ ไม่เกิดฟองก๊าซ หากผลตรงตามลักษณะของ *Clostridium* spp. ทำการ sub culture เชื้อลงในหลอด CMM ที่ผ่านการต้มไอล่ากาแล้ว เททับผิวหน้าด้วย sterile liquid paraffin บ่มที่อุณหภูมิ 32.5±2.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำส่งห้องปฏิบัติการแบคทีเรียไร้อากาศ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข เพื่อตรวจหาชนิดพันธุ์ของเชื้อ *Clostridium* spp. รวมถึงสารพิษของเชื้อ *C. perfringens*

เกณฑ์การประเมินผล: ประเมินผลคุณภาพการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างตามเกณฑ์การยอมรับคุณภาพด้านจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ ตาม THP 2020 (Acceptance Criteria for Microbiological Quality : THP 2020) ดังนี้ Category 1A ยารับประทานที่เตรียมจากสารสกัดสมุนไพรซึ่งผ่านกระบวนการลดจุลินทรีย์แล้ว ในที่นี้ คือ ยาแผนโบราณชนิดน้ำ ได้แก่ ยาประดง ยาธาตุนอบเซย Category 2 ยารับประทานที่เตรียมจากสมุนไพรเดี่ยวหรือผสมซึ่งผ่านกระบวนการลดจุลินทรีย์ก่อนใช้ ในที่นี้ คือ ชาชง และ Category 4 ยารับประทานที่เตรียมจากสมุนไพรทั้งชิ้นหรือผง ในที่นี้ คือ ยาแคปซูล ยาผง และยาลูกกลอน ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เกณฑ์การยอมรับคุณภาพด้านจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ (Acceptance Criteria for Microbiological Quality) ตาม THP 2020⁽⁹⁾

ลำดับ	รายการทดสอบ	Category 1A	Category 2	Category 4
1	Total aerobic microbial count : CFU/g	ต้องไม่มากกว่า 5×10^3	ต้องไม่มากกว่า 5×10^7	ต้องไม่มากกว่า 5×10^5
2	Total combined yeasts and moulds count : CFU/g	ต้องไม่มากกว่า 5×10^2	ต้องไม่มากกว่า 5×10^5	ต้องไม่มากกว่า 5×10^4
3	Bile-tolerant gram-negative bacteria/g	-	-	ต้องไม่มากกว่า 10^3
4	<i>E. coli</i> /g	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ
5	<i>S. aureus</i> /g	-	-	-
6	<i>Salmonella</i> spp./10 g	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ
7	<i>Clostridium</i> spp./g	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ

การตรวจหาชนิดพันธุ์ (species) ของเชื้อ *Clostridium* spp. รวมถึงสารพิษของเชื้อ *C. perfringens* โดยห้องปฏิบัติการแบคทีเรียไร้อากาศ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

เครื่องมือและอุปกรณ์

ตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส (Memmert, Germany) ตู้ปราศจากเชื้อ (NuAire, USA) เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, Switzerland) เครื่องเพิ่มปริมาตรสารพันธุกรรม (Labnet, USA) ชุด agarose gel electrophoresis (i-MyRun, Japan) เครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ผลจากแผ่นเจล (Syngene, Switzerland)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ: Wilkins-Chalgren Anaerobe agar, Wilkins-Chalgren Anaerobe broth (Oxoid, England) AnaeroPack-Anaero-2.5 L (Mitsubishi gas chemical company, INC, Japan) starch, arabinose, dextrose, fructose, lactose, maltose, mannose, mannitol, salicin, sucrose, xylose, esculin, SIM, nitrate, litmus milk, gelatin, urea และ egg yolk agar (ฝ่ายเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและเครื่องมือปลอดเชื้อ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข)

สารเคมี: GoTaq Promega reaction buffer, magnesium chloride, dNTPs, primer, DNA template, agarose gel, TBE buffer, ethidium bromide, DNA marker ชนิด 100 bp + 1.5 kb DNA ladder (Sibenzyme, Russia), deionized water

การตรวจยืนยันชนิดพันธุ์ของ *Clostridium* spp.

เพาะเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากห้องปฏิบัติการยา ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี เพื่อจำแนกและยืนยันว่าเป็น *C. perfringens*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. sordellii* หรือ *Clostridium* sp. ตามการให้บริการตรวจวิเคราะห์ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข⁽¹¹⁾

การสกัดดีเอ็นเอจาก *C. perfringens*

นำเชื้อที่ทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีและยืนยันเป็น *C. perfringens* มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี lysis buffer โดยใช้โคโลนีของเชื้อที่เจริญบน Wilkins-Chalgren blood agar 2-3 โคโลนี มาละลายใน lysis buffer 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสทิ้งและละลายตะกอนด้วย lysis buffer 2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้เป็น DNA template ในการทดสอบ Multiplex PCR ต่อไป

การทดสอบยืนยันและจำแนกยีนสร้างสารพิษด้วยวิธี Multiplex PCR

การทำ Multiplex PCR เพื่อจำแนก *C. perfringens* type A, B, C, D, E และ enterotoxin-producing ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของยีน *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA* และ *cpe* ตามวิธีของ Heikinheimo A and Korkeala H⁽¹²⁾ และ Meer RR and Songer JG⁽¹³⁾ ซึ่งมีลำดับเบสของไพรเมอร์ ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยใช้ PCR reaction mix (GoTaq DNA polymerase, Promega, USA) ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X Green GoTaq Flexi Buffer, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTPs, 0.1 μM each primer, 2U Taq DNA polymerase, 30 ng DNA template และปรับปริมาตรด้วย sterile deionized water จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเครื่อง MultiGene Gradient Thermal Cycler (Labnet, USA) ตามโปรแกรมดังนี้ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ annealing ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ตรวจสอบ PCR product ที่ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยนำ PCR product 10 ไมโครลิตร หยดลงใน 2% agarose gel ใช้กระแสไฟฟ้า 100 V เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นย้อมแผ่นเจลด้วย Ethidium bromide (EtBr) ตรวจสอบผลผลิต PCR product ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายรูปด้วยเครื่อง Gel Doc เปรียบเทียบขนาดของแถบ PCR product ที่ได้กับ DNA marker ชนิด 100 bp+1.5 kb DNA ladder (Sibenzyme, Russia) การแปลผลเปรียบเทียบ PCR product จากดีเอ็นเอของ *C. perfringens* type A, B, C, D, E และ enterotoxin-producing *C. perfringens* type A ที่เป็นชุดควบคุมผลบวก (positive control) การยืนยันผลการตรวจพบขนาดของ PCR product โดยทุกชนิดพันธุ์ของ *C. perfringens* แสดงแถบ PCR product ของยีน *cpa* ขนาด 400 bp และการจำแนก *C. perfringens* type ต่างๆ ตรวจสอบได้จากขนาดและรูปแบบของ PCR

product ดังนี้ *C. perfringens* ATCC 13124 type A แสดงแถบ PCR product ของยีน *cpa* ขนาด 400 bp *C. perfringens* NTCT 4914 type B แสดงแถบ PCR product ของยีน *cpa*, *cpb* และ *etx* ขนาด 400 bp, 196 bp และ 655 bp ตามลำดับ *C. perfringens* NTCT 10719 type C แสดงแถบ PCR product ของยีน *cpa* และ *cpb* ขนาด 400 bp และ 196 bp ตามลำดับ *C. perfringens* NTCT 8346 type D แสดงแถบ PCR product ของยีน *cpa* และ *etx* ขนาด 400 bp และ 655 bp ตามลำดับ *C. perfringens* NTCT 8084 type E แสดงแถบ PCR product ของยีน *cpa* และ *iA* ขนาด 400 bp และ 446 bp ตามลำดับ และ *C. perfringens* DMST 51427 type A+enterotoxin แสดงแถบ PCR product ของยีน *cpa* และ *cpe* ขนาด 400 bp และ 233 bp ตามลำดับ สำหรับกลุ่มควบคุมผลลบ (no template control) ใช้ sterile deionized water แทน genomic DNA

ตารางที่ 3 ไพรมเมอร์สำหรับการจำแนกชนิดของ *C. perfringens* ด้วยเทคนิค Multiplex PCR

ไพรมเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาดผลผลิต (bp)	ยีน	อ้างอิง
CPA-F	TGC ATG AGC TTC AAT TAG GT	400	<i>cpa</i>	Heikinheimo and Korkeala (2005)
CPA-R	TTA GTT TTG CAA CCT GCT GT			
CPB-F	GCG AAT ATG CTG AAT CAT CTA	196	<i>cpb</i>	Meer and Songer (1997)
CPB-R	GCA GGA ACA TTA GTA TAT CTT C			
ETX-F	GCG GTG ATA TCC ATC TAT TC	655	<i>etx</i>	Meer and Songer (1997)
ETX-R	CCA CTT ACT TGT CCT ACT AAC			
IA-F	ACT ACT CTC AGA CAA GAC AG	446	<i>iA</i>	Meer and Songer (1997)
IA-R	CTT TCC TTC TAT TAC TAT ACG			
CPE-F	GGA GAT GGT TGG ATA TTA ACG	233	<i>cpe</i>	Meer and Songer (1997)
CPE-R	GGA CCA GCA GTT GTA GAT A			

ผล

การสำรวจสถานการณ์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างยาสมุนไพรและยาแผนโบราณ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 เก็บตัวอย่างโดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ทั้ง 15 แห่ง ทั่วประเทศ คัดเลือกผลิตภัณฑ์ที่เป็นโปรดักส์ แชมเปียน หรือผลิตภัณฑ์ที่มียอดจำหน่ายสูง หรือ

ผลิตภัณฑ์เด่นของพื้นที่ จำนวนแห่งละ 4 ผลิตภัณฑ์ รวมทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ไม่ผ่านเกณฑ์กำหนดตาม THP 2020 จำนวน 28 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 46.7 โดยพบตัวอย่างที่ไม่ผ่านเกณฑ์ตาม THP 2020 ด้วย 1 สาเหตุ จำนวน 12 ตัวอย่าง และหลายสาเหตุร่วมกันตั้งแต่ 2, 3 และ 4 สาเหตุ จำนวน 9, 6 และ 1

ตัวอย่าง ตามลำดับ ดังนี้ total aerobic microbial count, *Clostridium* spp., bile-tolerant gram-negative bacteria, total combined yeasts and moulds count และ *Salmonella* spp. จำนวน 19, 19, 12, 1 และ 1 รายการ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4, 5 และ ภาพที่ 1 โดยตัวอย่างที่ตรวจพบ *Clostridium* spp.

ผลยืนยันชนิดพันธุ์พบว่าเป็น *C. perfringens* type A สร้างสารพิษ Alpha toxin ทั้ง 19 ตัวอย่าง ผลการทดสอบ Multiplex PCR ดังแสดงในภาพที่ 2 มี 1 ตัวอย่าง ที่พบ *C. bifermentans* ปนเปื้อนร่วมด้วย และผลยืนยัน *Salmonella* spp. จำนวน 1 ตัวอย่าง พบ *Salmonella* serovar Aqua

ตารางที่ 4 ผลการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่ผ่านและไม่ผ่านเกณฑ์ตาม THP 2020 จำแนกตามรายการทดสอบ

ลำดับ	ชนิดยา	ชนิดตำรับ	จังหวัดผู้ผลิต	ประเภทผู้ผลิต	ผลการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์							
					เชิงปริมาณ : CFU/g		เชิงปริมาณและคุณภาพ			เชิงคุณภาพ		
					a	b	c		d	e	f	g
ตัวอย่างที่ผ่านเกณฑ์ THP 2020												
1	ขมิ้นชัน	แคปซูล	เชียงราย	โรงพยาบาลรัฐ	3×10 ²	< 10	A		A	A	A	A
2	ฟ้าทะลายโจร	แคปซูล	ลำพูน	โรงพยาบาลรัฐ	2.5×10	2.0×10	A		A	A	A	A
3	ยาธาตุบดขยี้	ยาน้ำ	เชียงใหม่	โรงพยาบาลรัฐ	< 10	< 10	A		A	A	A	A
4	ยาจันทน์ลีลา	แคปซูล	ชัยนาท	โรงพยาบาลรัฐ	8.0×10	< 10	A		A	A	A	A
5	ฟ้าทะลายโจร	แคปซูล	อุทัยธานี	โรงพยาบาลรัฐ	2.7×10 ³	< 10	10 ² < x < 10 ³		A	A	A	A
6	มะขามแขก	แคปซูล	อุทัยธานี	โรงพยาบาลรัฐ	5.5×10	< 10	A		A	A	A	A
7	มะขามแขก	แคปซูล	สระบุรี	โรงพยาบาลรัฐ	< 10	< 10	A		A	A	A	A
8	ขิง	แคปซูล	สระบุรี	โรงพยาบาลรัฐ	< 10	< 10	A		A	A	A	A
9	ฟ้าทะลายโจร	แคปซูล	นครปฐม	โรงพยาบาลรัฐ	< 10	< 10	A		A	A	A	A
10	ฟ้าทะลายโจร	แคปซูล	ปราจีนบุรี	โรงพยาบาลรัฐ	< 10	< 10	A		A	A	A	A
11	ธณีสันตะฆาต	แคปซูล	จันทบุรี	โรงพยาบาลรัฐ	< 10	< 10	A		A	A	A	A
12	ขมิ้นชัน	แคปซูล	นครพนม	โรงพยาบาลรัฐ	< 10	< 10	A		A	A	A	A
13	ยาผสมเพชรสังฆาต	แคปซูล	อุดรธานี	โรงพยาบาลรัฐ	1.5×10 ⁴	< 10	A		A	A	A	A
14	ฟ้าทะลายโจร	แคปซูล	สกลนคร	โรงพยาบาลรัฐ	< 10	< 10	A		A	A	A	A
15	ยาอมสมุนไพร	ลูกกลอน	นครราชสีมา	โรงพยาบาลรัฐ	9.1×10 ³	< 10	A		A	A	A	A
16	ฟ้าทะลายโจร	แคปซูล	บุรีรัมย์	โรงพยาบาลรัฐ	< 10	< 10	A		A	A	A	A
17	ยาอมอดบุหรี	ลูกกลอน	ตรัง	โรงพยาบาลรัฐ	6.0×10	< 10	A		A	A	A	A
18	ฟ้าทะลายโจร	แคปซูล	พัทลุง	โรงพยาบาลรัฐ	< 10	< 10	A		A	A	A	A
19	ขิง	แคปซูล	สตูล	โรงพยาบาลรัฐ	1.7×10 ²	< 10	10 < x < 10 ²		A	A	A	A
20	ฟ้าทะลายโจร	แคปซูล	สุราษฎร์ธานี	โรงพยาบาลรัฐ	< 10	< 10	A		A	A	A	A
21	ยาสหิศาธารา	แคปซูล	ชุมพร	โรงพยาบาลรัฐ	4.5×10	< 10	10 < x < 10 ²		A	A	A	A
22	ขมิ้นชัน	แคปซูล	ยะลา	โรงพยาบาลรัฐ	< 10	2.0×10	A		A	A	A	A
23	ยาผสมเพชรสังฆาต	แคปซูล	สงขลา	โรงพยาบาลรัฐ	< 10	< 10	A		A	A	A	A
24	สมุนไพรรวม	แคปซูล	สิงห์บุรี	เอกชน	5.4×10 ³	< 10	A		A	A	A	A
25	กาวเครือขาว	แคปซูล	ปทุมธานี	เอกชน	< 10	< 10	A		A	A	A	A

ตารางที่ 4 ผลการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่ผ่านและไม่ผ่านเกณฑ์ตาม THP 2020 จำแนกตามรายการทดสอบ (ต่อ)

ลำดับ	ชนิดยา	ชนิด ตำรับ	จังหวัด ผู้ผลิต	ประเภท ผู้ผลิต	ผลการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์							
					เชิงปริมาณ : CFU/g		เชิงปริมาณและคุณภาพ			เชิงคุณภาพ		
					a	b	c	d	e	f	g	
26	ยาผสมเพชรสังฆาต	แคปซูล	ปทุมธานี	เอกชน	4.2×10 ³	< 10	A	A	A	A	A	
27	ยาปราบชมพูทวีป	แคปซูล	นนทบุรี	เอกชน	3.7×10 ⁵	< 10	A	A	A	A	A	
28	ชิง	แคปซูล	นครปฐม	เอกชน	< 10	< 10	A	A	A	A	A	
29	ฟ้าทะลายโจร	แคปซูล	สมุทรปราการ	เอกชน	< 10	< 10	A	A	A	A	A	
30	ยาสหัสธารา	แคปซูล	ราชบุรี	เอกชน	< 10	< 10	A	A	A	A	A	
31	ยาหอม	ลูกกลอน	สงขลา	เอกชน	7.6×10 ⁴	< 10	A	A	A	A	A	
32	ยาห้าราก	แคปซูล	พัทลุง	เอกชน	7.0×10 ³	< 10	102 < x < 103	A	A	A	A	
ตัวอย่างที่ไม่ผ่านเกณฑ์ THP 2020												
1	ขมิ้นชัน	แคปซูล	พะเยา	โรงพยาบาลรัฐ	5.5×10 ⁶	2.0×10	> 10 ³	A	A	A	P	
2	ขมิ้นชัน	แคปซูล	พิษณุโลก	โรงพยาบาลรัฐ	3.5×10 ⁶	< 10	> 10 ³	A	A	A	A	
3	ขมิ้นชัน	แคปซูล	กาญจนบุรี	โรงพยาบาลรัฐ	3.7×10 ⁵	3.3×10 ³	> 10 ³	A	A	A	P	
4	ขมิ้นชัน	แคปซูล	หนองคาย	โรงพยาบาลรัฐ	1.2×10 ⁶	< 10	10 < x < 10 ²	A	A	A	P	
5	ขมิ้นชัน	แคปซูล	มุกดาหาร	โรงพยาบาลรัฐ	1.0×10 ⁷	< 10	> 10 ³	A	A	A	A	
6	ฟ้าทะลายโจร	แคปซูล	ขอนแก่น	โรงพยาบาลรัฐ	>2.5×10 ⁷	< 10	10 < x < 10 ²	A	A	A	A	
7	ยาขงรางจืด	ชาขง	ยโสธร	โรงพยาบาลรัฐ	2.0×10 ⁶	1.50×10 ²	> 10 ³	A	A	A	P	
8	ฟ้าทะลายโจร	แคปซูล	พัทลุง	โรงพยาบาลรัฐ	1.9×10 ⁷	2.8×10 ³	A	A	A	A	P	
9	ยาผงสตรี	ผง	เชียงใหม่	เอกชน	5.7×10 ⁵	1.7×10 ⁴	> 10 ³	A	A	A	P	
10	ยาหอม	ผง	ลำพูน	เอกชน	4.3×10 ⁴	1.6×10 ⁴	10 < x < 10 ²	A	A	A	P	
11	สมุนไพรรวม	แคปซูล	แพร่	เอกชน	1.8×10 ⁵	7.0×10 ³	10 < x < 10 ²	A	A	A	P	
12	กระชายขาว	แคปซูล	พิษณุโลก	เอกชน	7.4×10 ⁵	1.1×10 ³	> 10 ³	A	A	A	P	
13	ยาแก้ไอ	ผง	พิษณุโลก	เอกชน	3.7×10 ⁶	< 10	10 < x < 10 ²	A	A	A	A	
14	ยาหอม	ผง	อุทัยธานี	เอกชน	4.0×10 ⁵	< 10	A	A	A	A	P	
15	ขมิ้นชัน	แคปซูล	กรุงเทพฯ	เอกชน	9.8×10 ⁶	< 10	> 10 ³	A	A	A	P	
16	สมุนไพรรัดสีดวง ทวาร	แคปซูล	ชลบุรี	เอกชน	1.1×10 ⁷	< 10	A	A	A	A	P	
17	ยาบรรเทาริดสีดวง ทวาร	แคปซูล	จันทบุรี	เอกชน	4.1×10 ⁵	< 10	10 < x < 10 ²	A	A	A	P	
18	กาวเครือขาว	แคปซูล	เลย	เอกชน	3.5×10 ⁶	2.8×10 ²	> 10 ³	A	A	P	P	
19	ยาประดง	ยาน้ำ	กาฬสินธุ์	เอกชน	5.0×10 ⁴	1.6×10 ⁴	A	A	A	A	A	
20	ขมิ้นชัน	แคปซูล	กาฬสินธุ์	เอกชน	6.3×10 ⁴	2.4×10 ²	> 10 ³	A	A	A	A	
21	ฟ้าทะลายโจร	แคปซูล	สุรินทร์	เอกชน	3.7×10 ⁵	4.7×10 ²	10 < x < 10 ²	A	A	A	P	
22	ขมิ้นชัน	แคปซูล	เพชรบุรี	เอกชน	6.1×10 ⁵	5.0×10	10 ² < x < 10 ³	A	A	A	A	
23	ยาเขียวหอม	ผง	สุราษฎร์ธานี	เอกชน	1.8×10 ⁶	7.0×10	> 10 ³	A	A	A	P	
24	ยาแผนโบราณ	ลูกกลอน	สงขลา	เอกชน	7.8×10 ⁵	< 10	A	A	A	A	A	

ตารางที่ 4 ผลการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่ผ่านและไม่ผ่านเกณฑ์ตาม THP 2020 จำแนกตามรายการทดสอบ (ต่อ)

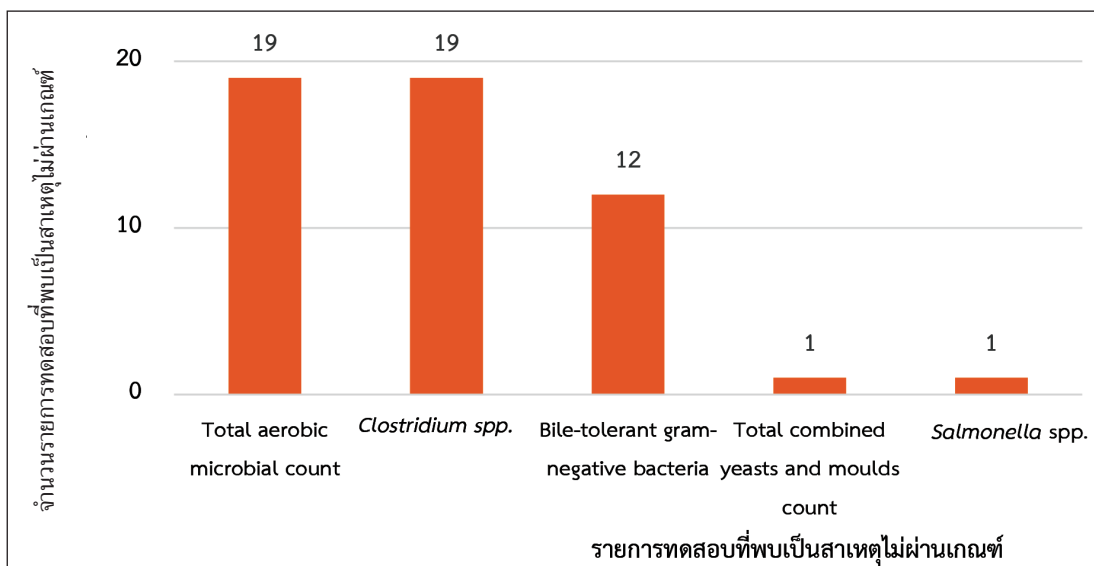
ลำดับ	ชนิดยา	ชนิดตำรับ	จังหวัดผู้ผลิต	ประเภทผู้ผลิต	ผลการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์							
					เชิงปริมาณ : CFU/g		เชิงปริมาณและคุณภาพ		เชิงคุณภาพ			
					a	b	c		d	e	f	g
25	ฟ้าทะลายโจร	แคปซูล	นครศรีธรรมราช	เอกชน	8.5×10^5	1.2×10^4	$> 10^3$		A	A	A	P
26	อบเชย	แคปซูล	นครศรีธรรมราช	เอกชน	$> 2.5 \times 10^7$	< 10	$10^2 \times < 10^3$		A	A	A	P
27	ยาบำรุงธาตุ	แคปซูล	พัทลุง	เอกชน	1.1×10^6	< 10	$10 \times < 10^2$		A	A	A	A
28	ยาสตรีผสมว่านชักมดลูก	แคปซูล	กระบี่	เอกชน	1.2×10^5	5.0×10	$10 \times < 10^2$		A	A	A	P

หมายเหตุ : การทดสอบเชิงปริมาณ (CFU/g) a: total aerobic microbial count และ b: total combined yeasts and moulds count การทดสอบเชิงปริมาณ (probable number) และคุณภาพ c: bile-tolerant gram-negative bacteria การทดสอบเชิงคุณภาพ d: *E. coli*, e: *S. aureus*, f: *Salmonella* spp. และ g: *Clostridium* spp โดย A = absence (ตรวจไม่พบ) P = presence (ตรวจพบ)

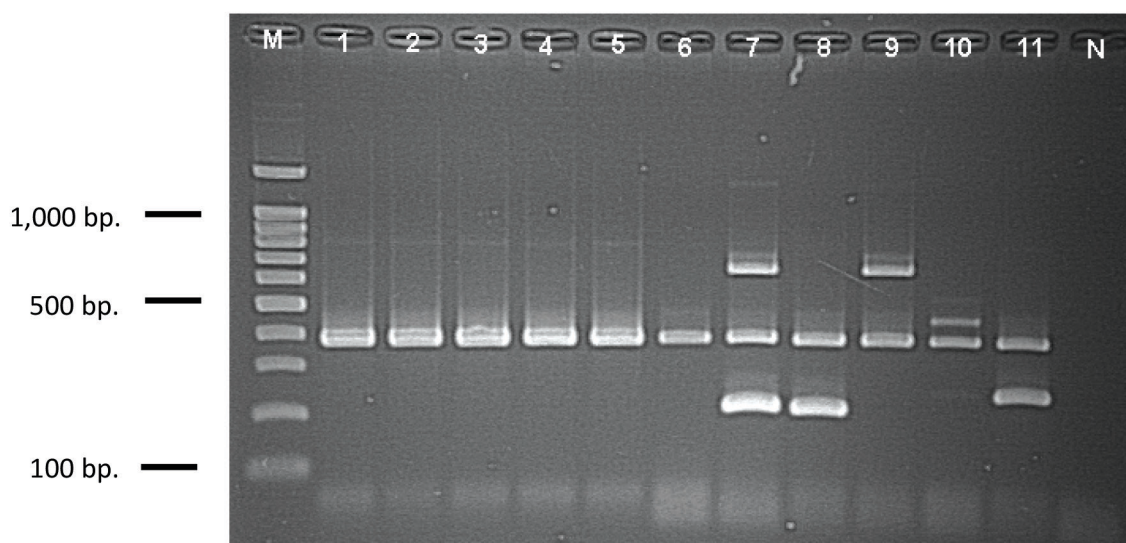
ตารางที่ 5 จำนวนตัวอย่างที่พบไม่ผ่านเกณฑ์ด้วย 1 สาเหตุและหลายสาเหตุร่วมกันตั้งแต่ 2, 3 และ 4 สาเหตุ

จำนวนสาเหตุที่พบไม่ผ่านเกณฑ์	จำนวนตัวอย่างที่พบไม่ผ่านเกณฑ์	จำนวนรายการทดสอบที่พบเป็นสาเหตุไม่ผ่านเกณฑ์						
		a	b	c	d	e	f	g
1	12	5	–	1	–	–	–	6
2	9	7	1	4	–	–	–	6
3	6	6	–	6	–	–	–	6
4	1	1	–	1	–	–	1	1
รวม	28	19	1	12	–	–	1	19

หมายเหตุ : สาเหตุ a: total aerobic microbial count, b: total combined yeasts and moulds count, c: bile-tolerant gram-negative bacteria, d: *E. coli*, e: *S. aureus*, f: *Salmonella* spp. และ g: *Clostridium* spp.



ภาพที่ 1 รายการทดสอบที่พบเป็นสาเหตุที่ทำให้ตัวอย่างไม่ผ่านเกณฑ์ตาม THP 2020



ภาพที่ 2 ผลการทดสอบ Multiplex PCR เพื่อแยกชนิดเชื้อ *Clostridium perfringens*; M = 100 base pairs + 1.5 Kb DNA ladder, 1 = ตัวอย่างเชื้อที่คัดแยกจากยาสมุนไพรขมิ้นชัน, 2 = ตัวอย่างเชื้อที่คัดแยกจากยาขงรางจืด, 3 = ตัวอย่างเชื้อที่คัดแยกจากฟ้าทะลายโจร, 4 = ตัวอย่างเชื้อที่คัดแยกจากยาผงสตรี, 5 = ตัวอย่างเชื้อที่คัดแยกจากยาหอม, 6 = *C. perfringens* type A (ATCC 13124) PCR product ขนาด 400 base pairs, 7 = *C. perfringens* type B (NCTC 4964) PCR product ขนาด 400, 196, 655 base pairs, 8 = *C. perfringens* type C (NCTC 10719) PCR product ขนาด 400 and 196 base pairs, 9 = *C. perfringens* type D (NCTC 8346) PCR product ขนาด 400 and 655 base pairs, 10 = *C. perfringens* type E (NCTC 8084) PCR product ขนาด 400 and 446 base pairs, 11 = *C. perfringens* type A with enterotoxin (DMST 51427) PCR product ขนาด 400 and 233 base pairs, N = negative control

เมื่อจำแนกตามผลิตภัณฑ์โปรตีนที่โปรตีนสังเคราะห์เป็นผลิตภัณฑ์ที่มียอดจำหน่ายสูงและผลิตภัณฑ์เด่น จำนวน 26, 11 และ 23 ตัวอย่าง พบไม่ผ่านเกณฑ์ จำนวน 13, 3 และ 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50.0, 27.3 และ 52.2 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 จำแนกตามชนิดของสมุนไพรหรือสูตรตำรับการผลิต พบตัวอย่างชาขง (Category 2) ไม่ผ่านเกณฑ์ร้อยละ 100 ตัวอย่างชนิดน้ำ (Category 1A) ไม่ผ่านเกณฑ์ร้อยละ 50.0 และตัวอย่างชนิดแคปซูล ผง และลูกกลอน (Category 4)

ไม่ผ่านเกณฑ์ร้อยละ 45.6 ดังแสดงในตารางที่ 7 โดยเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากโรงพยาบาลของรัฐและผู้ประกอบการเอกชน จำนวน 31 และ 29 ตัวอย่าง พบไม่ผ่านเกณฑ์จำนวน 8 และ 20 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 25.8 และ 69.0 ตามลำดับ เมื่อจำแนกรายภูมิภาคเป็นผลิตภัณฑ์จากภาคเหนือ กลาง ตะวันออกเฉียงเหนือ และใต้ จำนวน 14, 17, 13 และ 16 ตัวอย่าง พบไม่ผ่านเกณฑ์จำนวน 8, 5, 8 และ 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 57.1, 29.4, 61.5 และ 43.7 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 8 และภาพที่ 3

ตารางที่ 6 จำนวนและร้อยละของตัวอย่างที่ผลการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ผ่านเกณฑ์และไม่ผ่านเกณฑ์จำแนกตามประเภทผลิตภัณฑ์และชนิดตัวอย่าง

ประเภท	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง				
		ได้รับ	ผ่านเกณฑ์	ร้อยละ	ไม่ผ่าน	ร้อยละ
ผลิตภัณฑ์	ฟ้าทะลายโจรแคปซูล	13	9	69.2	4	30.8
โปรตีน	ขมิ้นชันแคปซูล	11	3	27.3	8	72.7
แชมเปญ	กาวเครือขาวแคปซูล	2	1	50.0	1	50.0
	รวม	26	13	50.0	13	50.0
ผลิตภัณฑ์ที่มียอดจำหน่ายสูง	ชาชงรางจืด	1	0	0.0	1	100.0
	ยาบรรเทาโรคผิวหนังทวารแคปซูล	2	0	0.0	2	100.0
	ขิงแคปซูล	3	3	100.0	0	0.0
	ยาผสมเพชรสังฆาตแคปซูล	3	3	100.0	0	0.0
	มะขามแขกแคปซูล	2	2	100.0	0	0.0
	รวม	11	8	72.7	3	27.3
ผลิตภัณฑ์เด่นของพื้นที่	ยาน้ำ	2	1	50.0	1	50.0
	ยาแผนโบราณชนิดผง	5	0	0.0	5	100.0
	ยาแคปซูลอื่นๆ	12	7	58.3	5	41.7
	ลูกกลอน	4	3	75.0	1	25.0
	รวม	23	11	47.8	12	52.2
	รวมทั้งสิ้น	60	32	53.3	28	46.7

ตารางที่ 7 จำนวนและร้อยละของตัวอย่างที่ผลการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ผ่านเกณฑ์และไม่ผ่านเกณฑ์ จำแนกตามชนิดของสมุนไพรหรือสูตรตำรับการผลิต

ประเภท	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง				
		ได้รับ	ผ่านเกณฑ์	ร้อยละ	ไม่ผ่านเกณฑ์	ร้อยละ
Category 2	ชาชงรางจืด	1	0	0.0	1	100.0
Category 1A	ยาแผนโบราณชนิดน้ำ	2	1	50.0	1	50.0
Category 4	ยาแผนโบราณชนิดผง	5	0	0.0	5	100.0
	ยาบรรเทาโรคผิวหนังทวารแคปซูล	2	0	0.0	2	100.0
	ขมิ้นชันแคปซูล	11	3	27.3	8	72.7
	กาวเครือขาวแคปซูล	2	1	50.0	1	50.0
	ยาแคปซูลอื่นๆ	12	7	58.3	5	41.7
	ฟ้าทะลายโจรแคปซูล	13	9	69.2	4	30.8
	ลูกกลอน	4	3	75.0	1	25.0
	ขิงแคปซูล	3	3	100.0	0	0.0
	ยาผสมเพชรสังฆาตแคปซูล	3	3	100.0	0	0.0
	มะขามแขกแคปซูล	2	2	100.0	0	0.0
	รวม Category 4	57	31	54.4	26	45.6
	รวมทั้งสิ้น	60	32	53.3	28	46.7

ตารางที่ 8 จำนวนและร้อยละของตัวอย่างที่ผลการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ผ่านเกณฑ์และไม่ผ่านเกณฑ์จำแนกตามแหล่งผลิตรายภูมิภาค

แหล่งผลิตรายภูมิภาค	จำนวนตัวอย่าง				
	ได้รับ	ผ่านเกณฑ์	ร้อยละ	ไม่ผ่านเกณฑ์	ร้อยละ
ภาคเหนือ	14	6	42.9	8	57.1
- โรงพยาบาลของรัฐ	8	6	75.0	2	25.0
- เอกชน	6	0	0.0	6	100.0
ภาคกลาง	17	12	70.6	5	29.4
- โรงพยาบาลของรัฐ	6	5	83.3	1	16.7
- เอกชน	11	7	63.6	4	36.4
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	13	5	38.5	8	61.5
- โรงพยาบาลของรัฐ	9	5	55.6	4	44.4
- เอกชน	4	0	0.0	4	100.0
ภาคใต้	16	9	56.3	7	43.7
- โรงพยาบาลของรัฐ	8	7	87.5	1	12.5
- เอกชน	8	2	25.0	6	75.0
ทั่วประเทศ	60	32	53.3	28	46.7
- โรงพยาบาลของรัฐ	31	23	74.2	8	25.8
- เอกชน	29	9	31.0	20	69.0

ผลการสำรวจคุณภาพด้านการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในยาสมุนไพรและยาแผนโบราณจากทั่วประเทศ ทำให้ทราบสถานการณ์การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว โดยพบว่ายาที่ผลิตจากโรงพยาบาลของรัฐมีคุณภาพสูงกว่ายาที่ผลิตจากเอกชน แม้ว่าทั้ง 20 ตัวอย่าง ที่ไม่ผ่านเกณฑ์ของผู้ผลิตเอกชนจะมีทะเบียนยาแล้วก็ตาม ทั้งนี้พบว่าเป็นร้าน/ห้างขายยา 12 แห่ง บริษัท 7 แห่ง และวิสาหกิจชุมชน 1 แห่ง เมื่อจำแนกตามภูมิภาค พบว่าภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีตัวอย่างไม่ผ่านเกณฑ์สูงสุด คิดเป็นร้อยละ 61.5 และพบสาเหตุที่ทำให้ตัวอย่างไม่ผ่านเกณฑ์คุณภาพตาม THP 2020 รวม 52 รายการ ได้แก่ total aerobic microbial count, *Clostridium* spp., bile-tolerant gram-negative bacteria, total combined yeasts and moulds count และ *Salmonella* spp. จำนวน 19, 19, 12, 1

และ 1 รายการ ตามลำดับ โดยตัวอย่างที่พบสาเหตุ total aerobic microbial count ไม่ผ่านเกณฑ์ เป็นตัวอย่างตาม Category 4 จำนวน 18 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนอยู่ในช่วง 5.7×10^5 ถึง มากกว่า 2.5×10^7 CFU ต่อกรัม และตัวอย่างตาม Category 1A จำนวน 1 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อน 5.0×10^4 CFU ต่อกรัม ส่วนตัวอย่างที่ผ่านเกณฑ์ 41 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างตาม Category 1A จำนวน 1 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนน้อยกว่า 10 CFU ต่อกรัม ตัวอย่างตาม Category 2 จำนวน 1 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อน 2.0×10^6 CFU ต่อกรัม ตัวอย่างตาม Category 4 จำนวน 39 ตัวอย่าง โดย 16 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนน้อยกว่า 10 CFU ต่อกรัม และ 23 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนอยู่ในช่วง 2.5×10 ถึง 4.1×10^5 CFU ต่อกรัม



วิจารณ์

เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษากับประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง เกณฑ์มาตรฐานค่าความบริสุทธิ์หรือคุณลักษณะอื่นอันมีความสำคัญต่อคุณภาพ สำหรับตำรับผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ขึ้นทะเบียนแจ้งรายละเอียดหรือจดแจ้ง พ.ศ. 2564⁽⁵⁾ ประกาศในราชกิจจานุเบกษา วันที่ 1 ธันวาคม 2564 และบังคับใช้เมื่อพ้นกำหนด 90 วัน นับแต่วันประกาศในราชกิจจานุเบกษานั้น ผลิตภัณฑ์ตาม Category 1A และ 4 ของ THP 2020 เป็นยารับประทานเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์สมุนไพรประเภทรับประทาน ข. ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2564 เกณฑ์กำหนดการปนเปื้อนของ total aerobic microbial count ในผลิตภัณฑ์ 1 กรัม พบได้ไม่มากกว่า 5.0×10^4 CFU ทำให้มีตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนอยู่ในช่วง 6.3×10^4 ถึง 4.1×10^5 CFU ไม่ผ่านเกณฑ์เพิ่ม 9 ตัวอย่าง รวมไม่ผ่านเกณฑ์ 28 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 46.7 การปนเปื้อน total combined yeasts and moulds count กำหนดในผลิตภัณฑ์ 1 กรัม พบได้ไม่มากกว่า 5×10^2 CFU ทำให้มีตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนในช่วง 1.1×10^3 ถึง 1.7×10^4 CFU ไม่ผ่านเกณฑ์เพิ่ม 4 ตัวอย่าง รวมไม่ผ่านเกณฑ์ 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.3 การปนเปื้อน bile-tolerant gram-negative bacteria กำหนดพบการปนเปื้อนได้ไม่มากกว่า 10^2 ต่อกรัม ทำให้มีตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนช่วงมากกว่า 10^2 และน้อยกว่า 10^3 ไม่ผ่านเกณฑ์เพิ่ม 4 ตัวอย่าง รวมไม่ผ่านเกณฑ์ 15 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 25.0

การปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ตาม THP 2020 กำหนดต้องไม่พบในผลิตภัณฑ์ 10 กรัม แต่ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2564 กำหนดต้องไม่พบในผลิตภัณฑ์ 25 กรัม ซึ่งทำให้มีโอกาสในการตรวจพบ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์สูงกว่า ด้านการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* นั้น ตรวจไม่พบในผลิตภัณฑ์ทั้ง 60 ตัวอย่าง โดยในกรณีของ *S. aureus* นั้น ผลิตภัณฑ์ที่เป็นยารับประทานตาม THP 2020 และประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2564 ไม่ได้กำหนดเกณฑ์คุณภาพแต่อย่างใด ยืนยันได้ว่าการยกเลิกตรวจ *S. aureus* ซึ่งเดิมเคยกำหนดไว้ในประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 121

ตอนพิเศษ 43 ลงวันที่ 21 เมษายน พ.ศ. 2547 มีความเหมาะสม

การปนเปื้อน *Clostridium* spp. เกณฑ์กำหนดตาม THP 2020 และประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2564 ไม่ต่างกัน เมื่อนำเทคนิค Multiplex PCR มาใช้ตรวจยืนยันชนิดพันธุ์ร่วมกับการตรวจสอบยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษ พบว่า *C. perfringens* ทั้งหมดที่ตรวจพบในตัวอย่างเป็น *C. perfringens* type A ซึ่งตรวจพบยีน *cpa* ที่ควบคุมการสร้างสารพิษชนิด alpha toxin หรือ เอนไซม์ phospholipase C โดยจะแสดงคุณสมบัติของเอนไซม์ lecithinases ย่อยสลาย lecithin บนอาหาร egg yolk agar⁽¹⁴⁾ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์ และคณะ ได้นำเทคนิค Multiplex PCR ตรวจสอบยีนหลักที่ควบคุมการสร้างสารพิษจำนวน 4 ยีน ได้แก่ *cpa*, *cpb*, *etx* และ *iA* และยีนสร้างสารพิษ enterotoxin (*cpe*) ของเชื้อ *C. perfringens* ที่แยกได้จากสมุนไพรจำนวน 112 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บรวบรวมโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างปี พ.ศ. 2555–2562 พบว่าเป็น *C. perfringens* type A ทั้ง 112 ตัวอย่าง แต่จะพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง enterotoxin (*cpe*) ร่วมด้วย จำนวน 6 ชนิดพันธุ์ ซึ่งพบในตัวอย่างสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ ยากษัยเส้น (2 ตัวอย่าง) เพชรสังฆาต (1 ตัวอย่าง) ผักหวานป่า (2 ตัวอย่าง) และขมิ้นชัน (1 ตัวอย่าง)⁽¹⁵⁾

เมื่อพิจารณาตามประเภทของผลิตภัณฑ์ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่มียอดจำหน่ายสูง จำนวน 11 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ชาชงรางจืด ยาบรรเทาโรคผิวหนังแคปซูล ขิงแคปซูล ยาผสมเพชรสังฆาตแคปซูล และมะขามแขกแคปซูล จำนวน 1, 2, 3, 3 และ 2 ตัวอย่าง พบผ่านเกณฑ์สูงสุด จำนวน 8 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 72.7 ปัจจัยสำคัญที่ทำให้ผ่านเกณฑ์นั้น เนื่องจากผู้ผลิตส่วนใหญ่เลือกใช้วัตถุดิบที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา ส่วนผลิตภัณฑ์โปรดักส์แชนเปียนจากตัวอย่างที่ได้รับ ประกอบด้วย ฟ้าทะลายโจรแคปซูล ขมิ้นชันแคปซูล และกวาวเครือขาวแคปซูล จำนวน 13, 11 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ รวม 26 ตัวอย่าง พบผ่านเกณฑ์ 15 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 57.7 แสดงให้เห็นว่าแม้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการส่งเสริมจากหลายหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง แต่คุณภาพด้านการปนเปื้อน

เชื้อจุลินทรีย์ยังผ่านเกณฑ์ไม่มาก และผลิตภัณฑ์เด่นเป็นอัตลักษณ์ของพื้นที่ จำนวน 23 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ยาแผนโบราณชนิดน้ำ ยาแผนโบราณชนิดผง ยาแคปซูลอื่น ๆ และยาลูกกลอน จำนวน 2, 5, 12 และ 4 ตัวอย่าง พบผ่านเกณฑ์ต่ำที่สุด คือ จำนวน 11 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 47.8 เนื่องจากผู้ผลิตบางรายเป็นร้าน/ห้างขายยา ผลิตตามภูมิปัญญาดั้งเดิมและผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่มีส่วนผสมของสมุนไพรหลายชนิด ซึ่งการควบคุมคุณภาพจะทำได้ยากกว่าผลิตภัณฑ์ที่มาจากสมุนไพรเดี่ยว

ประเมินตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2564 ในภาพรวมทั้ง 60 ตัวอย่าง พบไม่ผ่านเกณฑ์ จำนวน 32 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 53.3 โดยพบตัวอย่างที่ไม่ผ่านเกณฑ์ด้วย 1 สาเหตุ จำนวน 16 ตัวอย่าง และหลายสาเหตุร่วมกันตั้งแต่ 2, 3 และ 4 สาเหตุ จำนวน 9, 6 และ 1 ตัวอย่าง รวม 73 รายการ ดังนี้ total aerobic microbial count, *Clostridium* spp., bile-tolerant gram-negative bacteria, total combined yeasts and moulds count และ *Salmonella* spp. จำนวน 29, 19, 16, 8 และ 1 รายการ ตามลำดับ เมื่อจำแนกตามแหล่งผลิตพบว่าผลิตจากโรงพยาบาลของรัฐ จำนวน 31 ตัวอย่าง และเอกชน จำนวน 29 ตัวอย่าง ไม่ผ่านเกณฑ์จำนวน 9 และ 23 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 29.0 และ 79.3 ตามลำดับ

ผลการศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ที่พบ อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค เช่น ได้รับเชื้อแบคทีเรียเข้าไปในปริมาณที่สูง ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food borne disease) bile-tolerant gram-negative bacteria เป็นแบคทีเรียที่ทนน้ำดีสามารถอยู่รอดได้ในกระเพาะอาหารของคน มีเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ที่สามารถป้องกันการทำลายจากยาปฏิชีวนะ และเอนไซม์ในร่างกาย และทำให้เกิดภาวะช็อกจากการติดเชื้อในผู้ป่วยได้⁽¹⁶⁾ เชื้อราสามารถสร้างสารพิษอันตราย เช่น Aflatoxin ก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้⁽¹⁷⁾ *Clostridium* spp. อาจก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษลำไส้อักเสบ (gas-troenteritis)⁽⁷⁾ เป็นต้น *C.perfringens* type A ที่ปนเปื้อนในสมุนไพรมีรายงานว่าเป็นชนิดพันธุ์ที่พบได้บ่อยในสิ่งแวดล้อมและสร้างสารพิษส่งผลต่อการก่อโรคที่รุนแรงในคน^(6,7) โดยเชื้อจุลินทรีย์อาจปนเปื้อนจาก

สิ่งแวดล้อมทั่วไป ได้แก่ น้ำ ดิน ฝุ่นละออง มูลสัตว์ที่ใช้ทำปุ๋ยคอก และร่างกายของมนุษย์ เป็นต้น ซึ่งทำให้มีโอกาสปนเปื้อนสู่กระบวนการผลิต ได้แก่ ขั้นตอนการปลูก การเก็บเกี่ยว การเก็บรักษาวัตถุดิบ ความสะอาดของสถานที่ สุขลักษณะของบุคลากร และวิธีการล้างทำความสะอาดวัตถุดิบสมุนไพรที่แตกต่างกันไปในสมุนไพรแต่ละชนิด ความเสี่ยงของการปนเปื้อนมีสูงถ้าสมุนไพรมาจากส่วนที่เป็นรากหรือลำต้นที่สัมผัสกับดิน ดังนั้นหากต้องการลดและป้องกันการปนเปื้อน ผู้ผลิตควรใส่ใจตั้งแต่ขั้นตอนการล้างทำความสะอาดวัตถุดิบ การผึ่งหรือตากวัตถุดิบต้องป้องกันฝุ่นละออง ซึ่งอาจใช้ชั้นหรือโรงเรือนที่มีพลาสติกคลุม นอกจากนี้อุปกรณ์ เครื่องมือ บริเวณที่ผลิตต้องสะอาด ฝ่ายผลิตต้องสวมอุปกรณ์ป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จากร่างกายสู่ผลิตภัณฑ์ เช่น เสื้อคลุม หมวกคลุมผม ผ้าปิดปาก และถุงมือ เป็นต้น การอบวัตถุดิบหรือผงยาที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นอกจากช่วยลดความชื้นของสมุนไพร ยังช่วยลดปริมาณ total aerobic microbial count, total combined yeasts and moulds count และ bile-tolerant gram-negative bacteria ให้มีปริมาณต่ำกว่าเกณฑ์กำหนดได้ *Clostridium* spp. หากไม่สามารถกำจัดให้หมดในขั้นตอนของการล้างด้วยน้ำสะอาด การอบวัตถุดิบสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์ยาที่อุณหภูมิและเวลาดังกล่าวจะไม่สามารถกำจัดได้ เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospores) ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้⁽¹⁸⁾ ปัจจุบันพบว่าวิธีการฉายรังสีแกมมาในปริมาณที่เหมาะสมเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ยาแผนโบราณ ยาจากสมุนไพร และวัตถุดิบสมุนไพรได้

จากผลการศึกษาและรายงานความปลอดภัยด้านการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในยาสมุนไพรและยาแผนโบราณในประเทศไทยที่ดำเนินการมาอย่างต่อเนื่อง เช่น การศึกษาความปลอดภัยของยาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติในกลุ่มตัวอย่างยาเขียวหอม ยาจันทร์ลีลา ยาแก้ไข้ห่าราก ยาหอมเทพจิตร ยาหอมนวโกฐ ยาหอมบำรุงหัวใจ ยาประสะมะแว้ง ยาธาตุบรรจบ ยาเหลืองปิดสมุทร ยาประสะไพล และยาสหัชธรรมา

ของ จิตรา ชัยวัฒน์ และคณะ⁽¹⁹⁾ ระหว่างปีงบประมาณ พ.ศ. 2555-2556 จำนวน 116 ตัวอย่าง พบผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผ่านเกณฑ์ตาม THP 2009 จำนวน 30 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 25.9 โดยพบสาเหตุที่ทำให้ไม่ผ่านเกณฑ์ รวม 46 รายการ ได้แก่ total aerobic microbial count, *Clostridium* spp. และ bile-tolerant gram-negative bacteria จำนวน 27, 13 และ 6 รายการ ตามลำดับ ซึ่งตัวยาละอองเป็นตัวยาล้างที่มีส่วนผสมของสมุนไพรจากส่วนที่เป็นรากลำต้นใต้ดิน ส่วนของพืชที่สัมผัสกับดินได้ง่าย และสมุนไพรที่มีขนาดเล็กทำความสะอาดยาก จากรายงานในปี พ.ศ. 2559 ชญานิศ ศรชัยธวัชวงศ์ และคณะ⁽²⁰⁾ ได้ศึกษาคุณภาพการปนเปื้อนเชื้อ total aerobic microbial counts และ total combined yeasts and moulds count ในตัวอย่างยาสมุนไพรที่มีจำหน่ายในท้องตลาดของประเทศไทย จำนวน 431 ตัวอย่าง พบ total aerobic microbial counts ไม่ผ่านเกณฑ์ร้อยละ 70 และ total combined yeasts and moulds count ไม่ผ่านเกณฑ์ร้อยละ 11 จากรายงานในปี พ.ศ. 2560 ปรัชญาพร อินทองแก้ว และคณะ⁽²¹⁾ ได้ตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในยากวาด ยาเป่าคอ และยานัตถ์ ที่สุ่มเก็บตัวอย่างจากร้านขายยาในจังหวัดกรุงเทพมหานคร และนนทบุรี จำนวน 20 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ผิดมาตรฐานตามตำรา British Pharmacopoeia 2016 จำนวน 15 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 75 ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาสถานการณ์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในครั้งนี้ ที่มีความมุ่งหวังเพื่อพัฒนาระดับทั้งผู้ประกอบการและคุณภาพผลิตภัณฑ์ ซึ่งข้อมูลจากห้องปฏิบัติการจะช่วยสนับสนุนและส่งเสริมให้ผู้ผลิตพัฒนาคุณภาพผลิตภัณฑ์ได้อย่างถูกต้องและตรงประเด็น หากหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง อาทิ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา สำนักงานสาธารณสุขจังหวัด สำนักงานยาและวัตถุเสพติด ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และผู้ประกอบการ ร่วมกันจัดทำ Road Map ของการพัฒนา โดยกลุ่มผู้ผลิตที่มีความพร้อมผลิตภัณฑ์มีคุณภาพและปลอดภัย สามารถเป็นต้นแบบ เป็นพี่เลี้ยง เป็นแหล่งศึกษาดูงานให้กับผู้ประกอบการกลุ่มอื่นๆ ลำดับรองลงมาเป็นโรงพยาบาลของรัฐหรือผู้ประกอบการเอกชนขนาดเล็กกว่าและ

ส่วนใหญ่ผลิตสมุนไพรเดี่ยว สามารถหาแหล่งจำหน่ายวัตถุดิบที่ปลอดภัยได้และง่ายต่อการควบคุมคุณภาพ ส่วนกลุ่มที่มีปัญหาสูงและแก้ไขยากที่สุด คือ ร้าน/ห้างขายยา ซึ่งผลิตผลิตภัณฑ์เด่นเป็นอัตลักษณ์ของพื้นที่ตามภูมิปัญญาดั้งเดิม ส่วนใหญ่ผลิตภัณฑ์มีส่วนผสมของสมุนไพรหลายชนิดยากต่อการควบคุมคุณภาพ ควรหาแหล่งหรือโรงงานแปรรูปวัตถุดิบที่มีคุณภาพของประเทศเพื่อกระจายวัตถุดิบที่ปลอดภัยต่อไป นอกจากนี้ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์และสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดทั่วประเทศ ซึ่งเป็นหน่วยงานที่ใกล้ชิดและมีหน้าที่กำกับดูแลผู้ผลิตยาสมุนไพรและยาแผนโบราณในพื้นที่ มีความเข้าใจในสถานการณ์และบริบทของพื้นที่ร่วมกัน จะสามารถกระตุ้นให้เกิดกระแสการพัฒนา ร่วมกับผู้ผลิตได้ดีขึ้น หากมีการวางแผนร่วมกันอย่างเป็นระบบ

อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรและยาแผนโบราณส่วนใหญ่ ได้รับความนิยมนิยมหรือถูกใช้ในผู้สูงอายุ^(22,23) ซึ่งผู้สูงอายุมีโรคประจำตัวอื่น ๆ เช่น โรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง⁽²²⁾ ยาที่ไม่ดีคุณภาพจะทำให้ผู้บริโภคกลุ่มดังกล่าวมีอาการป่วยรุนแรงขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่สูงเกินเกณฑ์กำหนดหรือจากสารพิษที่เชื้อจุลินทรีย์เหล่านั้นสร้างขึ้น แม้ปัจจุบันมีวิธีการเฝ้าระวังความปลอดภัยยาสมุนไพร ยาแผนโบราณของประเทศไทย คือ spontaneous reporting ที่บุคลากรทางการแพทย์หรือผู้ประกอบการจะส่งรายงานเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วยตามแบบฟอร์มที่กำหนดไปยังศูนย์เฝ้าระวังความปลอดภัยด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพ (Health Product Vigilance Center; HPVC) แต่ระบบดังกล่าวยังไม่เป็นที่รู้จักแพร่หลายและผู้บริโภคยังมีความเสี่ยงต่อการเกิดเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์⁽²⁴⁾ นอกจากนี้ยังไม่มีเผยแพร่ข้อมูลทางระบาดวิทยาและอาการทางคลินิกของผู้ป่วยจากการใช้ยาสมุนไพรและยาแผนโบราณของประเทศแต่อย่างใด ดังนั้นนอกจากส่งเสริมให้มีการพัฒนาคุณภาพผลิตภัณฑ์แล้ว ควรมีการพัฒนาระบบการเฝ้าระวังการใช้ยาที่มีประสิทธิภาพ โดยส่งเสริมให้มีการรายงานเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ได้ทั้งผู้บริโภค ผู้ป่วย ผู้ผลิต และ/หรือบุคลากรทางการแพทย์ทุกระดับ ร่วมกับการวิเคราะห์ข้อมูลทางระบาดวิทยา รวมถึงอาจพิจารณานำเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

ที่สามารถระบุชนิดพันธุ์และการสร้างสารพิษของเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์รวมด้วย

สรุป

จากผลการศึกษาได้บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ เนื่องจากได้ทราบสถานการณ์คุณภาพด้านการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรและยาแผนโบราณของประเทศ ทั้งผลิตภัณฑ์โปรดักส์แชมเปียน ผลิตภัณฑ์ที่มียอดจำหน่ายสูง และผลิตภัณฑ์เด่นเป็นอัตลักษณ์ของพื้นที่ โดยพบว่าผลิตภัณฑ์เด่นเป็นอัตลักษณ์ของพื้นที่พบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ไม่ผ่านเกณฑ์สูงสุด รองลงมา คือ ผลิตภัณฑ์ที่เป็นโปรดักส์แชมเปียน และผลิตภัณฑ์ที่มียอดจำหน่ายสูงพบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ไม่ผ่านเกณฑ์ต่ำสุด รองรับการประกาศกระทรวงสาธารณสุขซึ่งถือเป็นกฎหมายใหม่ที่เริ่มมีผลบังคับใช้ โดยข้อมูลทั้งแหล่งผลิตและผลการตรวจวิเคราะห์จะเป็นประโยชน์ต่อหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง อาทิ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา สำนักงานสาธารณสุขจังหวัด สำนักงานและวัตถุประสงค์ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และผู้ประกอบการ ในการวางแผนการพัฒนาแบบบูรณาการ นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลนำเข้าเพื่อให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้จัดวางระบบการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาและการศึกษาอาการทางคลินิกของผู้ป่วย ซึ่งหากมีการจัดวางระบบและดำเนินการในการพัฒนาและเฝ้าระวังคุณภาพผลิตภัณฑ์อย่างต่อเนื่องจริง คาดว่าผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรและยาแผนโบราณของไทยจะมีคุณภาพมาตรฐาน แพทย์มีความเชื่อมั่นในการใช้เพื่อการรักษาโรคและการสร้างเสริมสุขภาพเป็นไปตามยุทธศาสตร์ที่ 3 ของแผนแม่บทแห่งชาติว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ผู้บริโภคมีความปลอดภัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณดำเนินงาน ภายใต้โครงการบูรณาการเฝ้าระวัง เตือนภัยสุขภาพ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 ขอขอบคุณ ทนพญ. จินตนา ว่องวิไลรัตน์ ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์

การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ที่ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นทำให้โครงการวิจัยสำเร็จตามวัตถุประสงค์ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ทั้ง 15 แห่งทั่วประเทศ ในการประสานงานและเก็บตัวอย่างยาสมุนไพรและยาแผนโบราณ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ที่ให้ความร่วมมือ ข้อเสนอแนะและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. บัญชียาหลักแห่งชาติ. บัญชียาจากสมุนไพร ปรับปรุงล่าสุดถึง ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ. พ.ศ. 2556. [ออนไลน์]. 2556; [สืบค้น 23 พ.ย. 2565]; [108 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: http://ndi.fda.moph.go.th/uploads/main_drug_file/20171021185635.pdf.
2. กระทรวงสาธารณสุข, องค์การภาครัฐ-เอกชน. แผนแม่บทแห่งชาติว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2560-2564. นนทบุรี: กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข; 2559.
3. สำนักงานคณะกรรมการกฤษฎีกา. พระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510. [ออนไลน์]. 2510; [สืบค้น 23 พ.ย. 2565]; [50 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://www.fda.moph.go.th/sites/drug/LawDrug/drug2510-krisdika-v2020.pdf>.
4. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์การพิจารณาขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนโบราณเกี่ยวกับมาตรฐานการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และโลหะหนัก. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 122 ตอนพิเศษ 43 ง (วันที่ 16 มิถุนายน 2548). หน้า 28.
5. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง เกณฑ์มาตรฐานค่าความบริสุทธิ์ หรือคุณลักษณะอื่นอันมีความสำคัญต่อคุณภาพสำหรับตำรับผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ขึ้นทะเบียน แจ้งรายละเอียด หรือจดแจ้ง พ.ศ. 2564. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 138 ตอนพิเศษ 294 ง (วันที่ 1 ธันวาคม 2564). หน้า 6.
6. Aung MS, Matsuda A, Urushibara N, Kawaguchiya M, Ohashi N, Matsuda N, et al.

- Clonal diversity of *Clostridium perfringens* human clinical isolates with various toxin gene profiles based on multilocus sequence typing and alpha-toxin (PLC) typing. *Anaerobe* 2021; 72: 102473.
7. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Winn WC, Schreckenberger PC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott; 1997.
8. Bacteria: *Clostridium perfringens*. In: Juneja VK, Taneja NK, Thakur S. Reference module in food science. Amsterdam: Elsevier; 2023.
9. Appendix 10 Microbiological test, 10.2 Microbial limit tests, 10.5 Limits for Microbial Contamination., Ministry of Public Health. In: Department of Medical Sciences. Thai Herbal Pharmacopoeia 2020. Bangkok: The Agricultural Co-operative Federation of Thailand; 2020. p. 862-889, 891-894.
10. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร เล่มที่ 3. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ; 2558. หน้า 125-126.
11. ระเบียบกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ว่าด้วยอัตราค่าบำรุงการตรวจวิเคราะห์และให้บริการ พ.ศ. 2562. ลำดับที่ 33.2 การตรวจยืนยันเชื้อแบคทีเรียไร้อากาศ. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 136 ตอนพิเศษ 130 ง. (วันที่ 22 พฤษภาคม 2562).
12. Heikinheimo A, Korkeala H. Multiplex PCR assay for toxinotyping *Clostridium perfringens* isolates obtained from Finnish broiler chickens. *Lett Appl Microbiol* 2005; 40(6): 407-11.
13. Meer RR, Songer JG. Multiplex polymerases chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am J Vet Res* 1997; 58(7): 702-5.
14. Jepson M, Titball RW. Structure and function of clostridial phospholipase C. *Microbes Infect* 2000; 2(10): 1277-84.
15. ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์, ชุติมา จิตตประสาธศิลป์, ธนิตชัย คำแถลง, นัฐพงษ์ ชื่นบาน, สมชาย แสงกิจพร, ทายาท ศรียาภัย. การจำแนกชนิดของยีส่สร้างสารพิษของ *Clostridium perfringens* ที่แยกได้จากสมุนไพรด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์. ว มหวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี) 2564; 13(26): 60-72.
16. Cannabis Research UK. Bile-tolerant gram-negative bacteria. [online]. [cited 2023 Apr 5]. Available from: URL: https://cannabisresearchuk.com/testing/bile-tolerant_gram-negative_bacteria.html.
17. อาริรัตน์ ลอปัญญา, วิเชียร ธาณินทร์ธราธาร, อนัญญา เหลืองอรุณ. แนวทางการป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพร. กรุงเทพฯ: กองควบคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา; 2548.
18. Bacterial endospores. In: Brock TD, Madigan MT. Biology of microorganisms. 6th ed. New Jersey: Prentice Hall; 1991.
19. จิตรา ชัยวัฒน์, จิราณู แจ่มทวีกุล, สันติพงศ์ วงศ์เพ็ญทักษ์, ปรัชญาพร อินทองแก้ว. ความปลอดภัยของยาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ. ว กรมวิทย์ พ 2557; 56(3): 123-34.
20. Sornchaithawatwong C, Tadtong S, Tangkiat-kumjai M. The prevalence of acceptable quality herbal products in Thailand. *Journal of Herbal Medicine* 2020; 24: 100391. (6 pages).
21. ปรัชญาพร อินทองแก้ว, ประภาพรณ สุขพรรณ, อนัญญา สุพันธ์, จิราณู แจ่มทวีกุล. การตรวจสอบการปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ ในยาสมุนไพรแปรรูป และยานัตถุ์. ใน: บทความจากการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประจำปีงบประมาณ

- พ.ศ. 2561. วันที่ 28-30 มิถุนายน 2561, ศูนย์การประชุม อิมแพ็ค ฟอรั่ม เมืองทองธานี. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2561.
22. อุไรลักษณ์ เทพวัลย์. การศึกษาปัญหาและพฤติกรรม การใช้ยาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในผู้สูงอายุ โรคความดันโลหิตสูงในตำบลโป่ง อำเภอมะนัง จังหวัดเลย. ผลงานวิชาการ โรงพยาบาลเลย 2565; 1(1): 26-33.
23. de Sousa Lima CM, Fujishima MAT, de Paula Lima B, Mastroianni PC, de Sousa FFO, da Silva JO. Microbial contamination in herbal medicines: a serious health hazard to elderly consumers. BMC Complement Med Ther 2020; 20: 17. (9 pages).
24. เมธาวี ศรีรัตนโชติชัย, สุภาภรณ์ สุตหนองบัว, วิทยากุลสมบุรณ์, ชื่นจิตร กองแก้ว. การจัดการประสบการณ์ไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาสมุนไพรโดยมุมมองของผู้บริโภค. ว เกษตรกรรมไทย 2561; 10(2): 421-36.

Thailand's Situation of Microbial Contamination in Traditional and Herbal Medicines in 2021

Sirada Pongmuangmul¹, Chutima Jittaprasatsin², Piyada Wangroongsarb³, and Ladda Poolsawat⁴

¹Regional Medical Sciences Center 3 Nakhonsawan, Department of Medical Sciences, Muang Nakhonsawan, 60000, Thailand

²National Institute of Health, ³Medical Sciences Technical Office, ⁴Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT The Thai government and the Ministry of Public Health are currently promoting the use of herbal and traditional medicines, as the trend for natural products is growing rapidly. As a result, it is important for manufacturers and state agencies to ensure the quality of these products. In the fiscal year 2021, the Regional Medical Sciences Center 3 Nakhonsawan and the National Institute of Health surveyed the microbial contamination in herbal and traditional medicinal products from 58 entrepreneurs across 43 provinces. The products selected for testing included product champions, best-selling products and outstanding products, with a total of 60 samples, including 26, 11 and 23 samples from each category, respectively. The survey tested for microbial contamination using the Thai Herbal Pharmacopoeia 2020 (THP 2020) and found that 28 out of 60 samples (46.7%) failed to comply with the THP standard, with 13, 3, and 12 samples from each category, respectively. The results showed that 19, 19, 12, 1 and 1 samples were contaminated with total aerobic microbial count, *Clostridium* spp., bile-tolerant gram-negative bacteria, total combined yeasts and moulds count and *Salmonella* spp. Respectively. Among these samples, 31 samples were collected from government hospitals and 29 samples were obtained from private manufacturers, of which 8 (25.8%) and 20 (69%) samples, respectively, did not comply to the standard. The result revealed that the products from the Northeastern region showed poor quality since 61.5% of products did not meet the criteria. To address these issues, manufacturers should consider GMP process such as washing raw materials with clean water, protecting from dust during production, drying raw materials at optimum temperatures, or using gamma irradiation. This survey provides important information for relevant agencies to improve the quality of local entrepreneurs' products to meet the official standard and ensure consumer safety.

Keywords: Microbial contamination, Herbal medicine, Traditional medicine

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์พาราควอต ไดควอต คลอร์มีควอต และเมพิควอต ในเนื้อสัตว์ นม และไข่ โดยเทคนิค LC-MS/MS

รติยากร ศรีโคตร ภรพรรณ ส่งศรี และ ณิชนันท์ บุญนิ่ม

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ พาราควอต เป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 4 ที่ห้ามผลิต นำเข้า ส่งออก นำผ่าน หรือมีไว้ครอบครองตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่องบัญชีวัตถุอันตราย ฉบับที่ 6 (พ.ศ. 2563) นอกจากนั้นประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 419 (พ.ศ. 2563) เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง กำหนดขีดจำกัดการตรวจวัดของวิธี (method detection limit) อาหารประเภทเนื้อสัตว์ นม และไข่ ที่ระดับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพื่อเพิ่มขีดความสามารถของห้องปฏิบัติการ คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์พาราควอตในเนื้อสัตว์ นม และไข่ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS รวมทั้งสารในกลุ่มควอต 3 ชนิด ได้แก่ ไดควอต คลอร์มีควอต และเมพิควอต ในคราวเดียวกัน เพื่อให้ได้วิธีที่มีความจำเพาะสูงและตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ในระดับที่กฎหมายกำหนด โดยสกัดตัวอย่างด้วย acidic acetonitrile ตกตะกอนและทำให้บริสุทธิ์ผ่าน hydrophilic-lipophilic-balanced (HLB) SPE cartridge และตรวจวัดปริมาณแคปโธออนด้วย multiple reaction monitoring (MRM) วิธีนี้มีขีดจำกัดของการตรวจวัดเท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความแม่นยำ (%recovery) ความเที่ยง (%RSD) มีค่าเฉลี่ยในช่วง 64.8-108.6 และ 2.1-13.0 ตามลำดับ และมีช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ที่ 0.01-0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยไม่มีผลกระทบจากคุณสมบัติของเนื้อตัวอย่าง การนำวิธีที่พัฒนาไปตรวจวิเคราะห์อาหารประเภทเนื้อสัตว์ นม และไข่ จำนวน 29 ตัวอย่าง ผลตรวจไม่พบการตกค้างของสารทั้ง 4 ชนิด โดยสรุปวิธีดังกล่าวมีประสิทธิภาพเหมาะสมในการวิเคราะห์เนื้อสัตว์ นม และไข่ สอดคล้องตามข้อกำหนดทางกฎหมายเพื่อเฝ้าระวังการตกค้างในอาหาร

คำสำคัญ: กลุ่มควอต, เนื้อสัตว์, นม, ไข่, LC-MS/MS

Corresponding author E-mail: rattiyakorn.s@dmasc.mail.go.th

Received: 27 October 2022

Revised: 16 May 2023

Accepted: 18 May 2023

บทนำ

พาราควอต (paraquat; PQ) คือ สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชชนิดหนึ่งในกลุ่มสารกำจัดวัชพืช เป็นที่รู้จักในชื่อการค้าว่า กรัมม็อกโซน (grammoxone) ออกฤทธิ์โดยการดูดซึมทางใบอย่างไม่จำเพาะชนิดของวัชพืช มีผลทำลายเนื้อเยื่อพืชโดยรบกวนการสังเคราะห์แสงและเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดใบแห้งเหี่ยวอย่างรวดเร็ว เกษตรกรไทยนิยมใช้กำจัดวัชพืชในไร่อ้อย มันสำปะหลัง ยางพารา และพืชผล⁽¹⁾ คุณสมบัติทางพิษวิทยาขององค์การอนามัยโลก (WHO) ระบุว่า PQ เป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง มีค่าปริมาณที่บริโภคได้ต่อวัน (acceptable daily intake; ADI) เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมพาราควอต แคลไออนต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว⁽²⁾ ปัจจุบันมีหลายประเทศที่สั่งห้ามใช้ PQ เนื่องจากมีความเป็นพิษจากการใช้กำจัดวัชพืชของเกษตรกร ทำให้เข้าสู่ผิวหนังได้จากแผลเดิมบนผิวหนัง และแผลเผาไหม้ที่เกิดจากฤทธิ์ของ PQ⁽³⁾ การได้รับสัมผัส PQ ทางผิวหนังอาจทำให้ระคายเคือง ผิวหนังพุพอง ผิวหนังไหม้ แผลในปากและตาบอดได้ มีรายงานการเสียชีวิตเป็นจำนวนมากจากการกลืนกินและฉีด PQ เข้าใต้ผิวหนัง ทำให้ปอดถูกทำลายและเสียชีวิตภายใน 3 สัปดาห์⁽⁴⁾ งานวิจัยที่ผ่านมาบ่งชี้ว่า PQ สามารถถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือดและกระจายไปตามเนื้อเยื่อ เช่น ตับ ปอด ไต จากนั้นถูกขจัดออกทางไต ทำให้เกิดภาวะไตวายและส่งผลกระทบต่อระบบประสาท อีกทั้งพบปัญหาการปนเปื้อนของ PQ ในสิ่งแวดล้อมและการตกค้างในนมแม่สู่ทารก แต่ภาคการเกษตรของประเทศไทยนิยมใช้ PQ ยับยั้งการเจริญเติบโตของวัชพืช ซึ่งอาจมีการตกค้างในผลผลิตทางการเกษตรและห่วงโซ่อาหาร ปัจจุบันคณะกรรมการวัตถุอันตรายมีมติห้ามใช้ PQ ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่อง บัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย ฉบับที่ 6 พ.ศ. 2563 ซึ่งกำหนดให้ PQ เป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 4 ที่ห้ามผลิต นำเข้า ส่งออก นำผ่าน หรือมีไว้ครอบครองโดยมีผลบังคับใช้เมื่อวันที่ 1 มิถุนายน พ.ศ. 2563⁽⁵⁾ เป็นต้น ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 419 พ.ศ. 2563 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง กำหนดว่าห้องปฏิบัติการจะต้องใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่มีขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection; LOD) ของวิธีทดสอบอย่างน้อย

ต่ำถึงระดับที่กำหนด ซึ่งในเนื้อสัตว์ นม และไข่ มีค่ากำหนด (method detection limit; MDL) เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม⁽⁶⁾ ซึ่งมีค่าเท่ากับค่ากำหนดของคณะกรรมการโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (codex)⁽⁷⁾ ส่วนค่ากำหนดในสหภาพยุโรปของ PQ มีค่าเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม⁽⁸⁾ PQ มีสูตรเคมี $C_{12}H_{14}N_2^{+2}$ มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองหรือสีขาวนวล ไม่มีกลิ่น มักจำหน่ายในรูปของเหลวเพื่อไม่ให้สับสนกับเครื่องดื่มจึงมีการเติมสีและกลิ่นลงไปแล้วสารที่ทำให้หาเจียนหากมีผู้ดื่ม⁽⁹⁾

มีรายงานบทความวิจัยในต่างประเทศเกี่ยวกับวิธีตรวจวิเคราะห์ PQ, ไดควอต (diquat; DQ) คลอร์มีควอต (chlormequat; CQ) และเมพิควอต (mepiquat; MQ) ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ โดยเทคนิค UPLC-MS/MS ข้อดีของงานวิจัย คือ ให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงในตัวอย่างที่เป็นกรดและมีน้ำเป็นองค์ประกอบ ส่วนข้อเสียคือ วิธีไม่เหมาะสมกับตัวอย่างที่มีไขมันสูง⁽¹⁰⁾ ในปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีหน่วยงานหรือห้องปฏิบัติการใดให้บริการตรวจวิเคราะห์รายการทดสอบ PQ ในเนื้อสัตว์ นม และไข่ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ PQ ในตัวอย่าง เนื้อสัตว์ นม และไข่ ให้เป็นวิธีมาตรฐานตอบสนองต่อนโยบายกระทรวงสาธารณสุขตามที่กฎหมายกำหนด นอกจากนั้นยังสามารถตรวจวิเคราะห์สารในกลุ่มควอต (quats) อีก 3 ชนิด ในคราวเดียวกัน ได้แก่ DQ, CQ และ MQ ซึ่งสารดังกล่าวมีคุณสมบัติทางเคมีและความเป็นพิษคล้าย PQ⁽¹¹⁾ มีเพียง CQ เท่านั้นที่มีค่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดของวัตถุอันตรายทางการเกษตร (maximum residue limit; MRLs) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 387 (พ.ศ. 2560) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม⁽¹²⁾ DQ มีค่ากำหนดตาม codex โดยมีค่ากำหนดในเนื้อสัตว์ นม และไข่ เท่ากับ 0.01, 0.001 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ⁽⁷⁾ ส่วน MQ ไม่มีค่ากำหนดทั้งในประกาศกระทรวงสาธารณสุข และ codex จึงใช้ค่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเป็นค่าดีฟอลต์ลิมิต (default limit) ทั้งนี้ในปี พ.ศ. 2563 ห้องปฏิบัติการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้พัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์

PQ, DQ, CQ และ MQ ในผักและผลไม้ และได้ผ่านการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการระบบคุณภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 จึงได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อรองรับข้อกำหนดตามกฎหมาย โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มควอตในเนื้อสัตว์ นม และไข่ได้จากการสกัดในคราวเดียวกัน

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: methanol (MeOH), HPLC grade รุ่น I1107807034 (Supelco, Germany), acetonitrile (ACN) HPLC grade รุ่น K52651891034 (Supelco, China), ammonium formate, (NH₄HCO₂), AR grade รุ่น 102315819 (Sigma-Aldrich, India), formic acid (HCOOH), AR grade, รุ่น K34234564503 (Merck, Germany) สารละลาย acidified methanol เตรียมโดยการปิเปต formic acid 1.0 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มี MeOH และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย MeOH, mobile phase 20 มิลลิโมลาร์ ส่วน ammonium formate pH 3 เตรียมโดยการชั่ง ammonium formate 1.261 กรัม ละลายในน้ำกลั่น เติม formic acid 1.8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น, 0.5% v/v formic acid ใน ACN และ 0.5% v/v formic acid ในน้ำ

สารมาตรฐาน: สารมาตรฐานทั้งหมดเป็นชนิดเดียวในรูปเกลือ (single standard) paraquat dichloride ความบริสุทธิ์ 81.57% ค่าความไม่แน่นอน 1.63%, diquat dibromide ความบริสุทธิ์ 94.37% ค่าความไม่แน่นอน 1.60%, chlormequat chloride ความบริสุทธิ์ 98.19% ค่าความไม่แน่นอน 2.33% และ mepiquat chloride ความบริสุทธิ์ 99.20% ค่าความไม่แน่นอน 2.00% (Dr. Ehrenstorfer, Germany) ผ่านการรับรองมาตรฐานตามระบบคุณภาพ ISO 17034 ซึ่งเป็น reference material certificate เตรียมโดยการชั่งสารมาตรฐานชนิดละประมาณ 0.01 กรัม ลงใน volumetric flask ชนิดพลาสติก ขนาด 10 มิลลิลิตร นำมาละลายใน MeOH และคำนวณความเข้มข้นให้อยู่

ในรูป paraquat cation, diquat cation, chlormequat cation และ mepiquat cation ก่อนนำไปวิเคราะห์ เช่น paraquat dichloride มี molecular weight เท่ากับ 257.16 กรัมต่อโมล แต่น้ำหนักจริงที่นำมาคำนวณเท่ากับ 186.3 กรัมต่อโมล (molecular weight ของ paraquat cation ที่หักลบ dichloride แล้ว) โดย stock standard แต่ละชนิด มีความเข้มข้นประมาณ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง HPLC รุ่น 1260 series (Agilent, Singapore), เครื่อง MS/MS รุ่น 5500 QTRAP (AB SCIEX, Singapore), analytical column ขนาด 2.1 × 150 มิลลิเมตร, 3 ไมครอน (Atlantis[®] HILIC Silica รุ่น 1911068BF0362110141, Water[™], USA), เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 กรัม รุ่น LP 620 S (Sartorius, Germany), เครื่องชั่งความละเอียด 0.01 มิลลิกรัม รุ่น MC 210 S (Sartorius, Germany), เครื่องปั่นตกตะกอน รุ่น Multifuge X Pro Series (Thermo Scientific, Germany) ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที, เครื่องระเหยแบบ heating block รุ่น 18790 (Pierce, USA), แก๊สไนโตรเจน ความบริสุทธิ์ 99.95%, เครื่องหมุนปั่นสารละลาย Vortex Genie 2 รุ่น G560E (Scientific, USA), volumetric flask ชนิด polypropylene ขนาด 10, 25 และ 50 มิลลิลิตร, screw cap centrifuge tube ชนิด polypropylene ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร, micro-spin filters ชนิด nylon ขนาด 0.2 ไมครอน รุ่น 3883 (Vertical, Thailand), vial สีขาว ชนิด polypropylene ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, syringe ขนาด 6 มิลลิลิตร พร้อม SPE adapter และ volumetric flask ชนิดพลาสติก ขนาด 10, 25 และ 50 มิลลิลิตร

ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีโดยใช้เนื้อหมูเป็นตัวแทนของตัวอย่างเนื้อสัตว์ นมโคเป็นตัวแทนของตัวอย่างนม และไข่ไก่เป็นตัวแทนของตัวอย่างไข่ วิธีการเตรียมตัวอย่างโดยนำเนื้อหมูจากฟาร์มที่ได้รับรองมาตรฐานการผลิตจากกรมปศุสัตว์

จำนวน 8 ตัวอย่าง ละ 500 กรัม เป็นส่วนผสมเนื้อแดง นำมาหั่นและบดปั่นรวมกัน ซึ่งตัวอย่างใส่ในขวดตัวอย่าง ขวดละ 5 กรัม นมโคชนิด ยู เอช ที ยี่ห้อต่างๆ จำนวน 8 ตัวอย่าง ละ ประมาณ 500 มิลลิลิตร นำมาผสมรวมกัน ซึ่งตัวอย่างใส่ในขวดตัวอย่าง ขวดละ 5 กรัม และไข่ไก่จากฟาร์มที่ได้รับรองมาตรฐานการผลิตจากกรมปศุสัตว์ จำนวน 8 ตัวอย่าง ละ 6 ฟอง ตอกไข่รวมกันทั้งไข่ขาวและไข่แดง ซึ่งตัวอย่างใส่ในขวดตัวอย่าง ขวดละ 5 กรัม สำหรับทดสอบความใช้ได้ของวิธี

วิธีวิเคราะห์

การสกัด

วิธีที่นำมาทดสอบเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Korean Journal of Environmental Agriculture, 2020⁽¹⁰⁾ เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง นำตัวอย่าง 5 กรัม ไปสกัดโดยเติม 0.5% formic acid ในน้ำ 2 มิลลิลิตร และ 0.5% formic acid ใน ACN 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer นาน 1 นาที ปั่นแบบตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทำให้บริสุทธิ์ด้วย SPE cartridge HLB 200 มิลลิกรัม (Oasis, water) โดยใช้ syringe ชนิดพลาสติก ขนาด 6 มิลลิลิตร พร้อม SPE adapter ล้าง SPE ด้วย 5 มิลลิลิตร 0.5% formic acid ในน้ำ และ 5 มิลลิลิตร 0.5% formic acid ใน ACN จากนั้นนำตัวอย่าง (ส่วนใส) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมนลงใน SPE cartridge HLB 200 มิลลิกรัม กรองผ่าน SPE cartridge โดยใช้ plunger เก็บสารละลายที่ถูกชะลงใน screw cap centrifuge tube ชนิด polypropylene ขนาด 15 มิลลิลิตร และชะด้วย 2 มิลลิลิตร ของ 0.5% formic acid ใน ACN เก็บสารละลายที่ถูกชะลงใน screw cap centrifuge tube ชนิด polypropylene ขนาด 15 มิลลิลิตร และนำไประเหยด้วยแก๊สไนโตรเจนให้เกือบแห้ง ปรับปริมาตรด้วย 0.5% formic acid ใน ACN ให้ได้ 1 มิลลิลิตร โดยใช้ autopipette กรองผ่าน micro-spin filters ชนิด nylon ขนาด 0.2 ไมครอน ปั่นแบบตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำสารละลายที่กรองได้ใส่ใน vial พลาสติกสีขาว ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ

การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณโดยเทคนิค LC-MS/MS ที่สภาวะ column oven 35 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีด 10 ไมโครลิตร mobile phase A:B (20 มิลลิโมลาร์ ammonium formate: ACN)⁽¹³⁾ ตรวจวัดปริมาณไอออนโดยใช้ multiple reaction monitoring (MRM) รายงานในรูปแคตไอออน (cation) ในหน่วย มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณของสารที่ตรวจพบคำนวณจาก standard curve

$$\begin{aligned} \text{โดยใช้สมการเส้นตรง} \quad Y &= aX + b \\ \text{ปริมาณของสารที่ตรวจพบ (mg/kg)} &= \frac{(Y-b)}{a} \end{aligned}$$

โดย X = concentration, C (mg/kg)
 Y = peak area ของสารมาตรฐาน
 a = slope ของ calibration curve
 b = intercept ของ calibration curve

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

เตรียมสารมาตรฐานผสมของ PQ, DQ, CQ และ MQ 7 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 5, 10, 20, 40, 80, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย 1% volume/volume formic acid ใน MeOH: H₂O (1:1) จากนั้นฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS สร้าง calibration curve ระหว่าง concentration กับ peak area คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (determination coefficient; R²) กำหนดเกณฑ์การยอมรับเป็น: R² มากกว่าหรือเท่ากับ 0.99⁽¹⁴⁾

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (specificity)

เป็นการแสดงการแตกตัวเป็นไอออนและค่าพลังงานอิเล็กตรอนของสารมาตรฐาน เพื่อให้เกิดความจำเพาะเจาะจงของสารแต่ละชนิด โดยฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ บันทึกค่า retention time (RT) วิเคราะห์ matrix blank

โดยพิจารณา chromatogram ของ matrix blank ผลต้องไม่พบสัญญาณที่มีค่า RT หรือค่ามวลต่อประจุ (mass transition: m/z) ที่ตรงกับสารมาตรฐาน

ผลกระทบจากคุณสมบัติของเนื้อตัวอย่าง (matrix effect: ME)

การประเมินค่า ME คำนวณโดยใช้ค่า %recovery ของสารมาตรฐานจากการเปรียบเทียบความชันของการวิเคราะห์แบบ calibration curve on solvent ที่ระดับความเข้มข้น 10–200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ calibration curve on matrix ใน matrix เนื้อหมู นมโค และไข่ไก่ ที่ระดับความเข้มข้น 10–200 นาโนกรัมต่อกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ เกณฑ์การประเมิน %ME, (-20 ถึง 20%) หมายถึง soft, (-50 ถึง -20% และ 20 ถึง 50%) หมายถึง medium และ (> 50% และ < -50%) หมายถึง strong⁽¹⁵⁾ คำนวณจากสูตร

$$MF (\text{matrix factor}) = b (\text{matrix}) / b (\text{solvent})$$

โดย b คือ peak area ของสารมาตรฐาน

$$ME (\%) = (MF - 1) \times 100$$

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection; LOD)

ทดสอบโดยการฉีดสารมาตรฐานผสม PQ, DQ, CQ และ MQ ลงใน matrix blank ที่ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อกรัม ซึ่งเป็นค่ากำหนดตามกฎหมาย (MDL) เป็นระดับที่สามารถตรวจวัดได้ตาม sensitivity ที่เหมาะสมของเครื่องมือ ทำการสกัดและตรวจวิเคราะห์ จำนวน 10 ซ้ำ หา signal-to-noise (S/N) ของสารแต่ละชนิด คำนวณปริมาณสารมาตรฐานที่ทำให้พีคมีความสูง 3 เท่า (S/N) และคำนวณความเข้มข้นต่อน้ำหนักตัวอย่าง

การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation; LOQ)

ทดสอบโดยการฉีดสารมาตรฐานผสม PQ, DQ, CQ และ MQ ที่ความเข้มข้นประมาณ 2 เท่าของค่า LOD

ลงในตัวอย่าง blank sample ทำการสกัดและวิเคราะห์ จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน %recovery เกณฑ์การยอมรับอยู่ในช่วง 60–120% และ %RSD เกณฑ์การยอมรับ $\leq 20\%$ ⁽¹⁴⁾

การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง (accuracy and precision)

ทดสอบโดยการฉีดสารมาตรฐานผสม PQ, DQ, CQ และ MQ ใน spiked sample ที่ระดับ LOQ, 8 × LOQ และ 20 × LOQ ได้แก่ ที่ความเข้มข้น 10, 80 และ 200 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน %recovery เกณฑ์การยอมรับอยู่ในช่วง 60–120 % และ %RSD เกณฑ์การยอมรับ $\leq 20\%$ ⁽¹⁴⁾

ช่วงการวิเคราะห์และความเป็นเส้นตรง (linearity and working range)

วิเคราะห์ matrix blank เติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อย่างน้อย 5 ระดับ ภายในช่วงกราฟมาตรฐานที่พิสูจน์แล้วว่าเป็นเส้นตรงวิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ตามวิธี สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นที่เติม (x axis) กับค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ตรวจพบ (y axis) คำนวณค่า R^2 กำหนดเกณฑ์การยอมรับเป็น R^2 มากกว่าหรือเท่ากับ 0.95⁽¹⁴⁾

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ (uncertainty)

ความไม่แน่นอนของการวัดต้องคำนึงถึงแหล่งความไม่แน่นอนทุกแหล่ง ที่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ เมื่อนำมารวมกันให้คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า $k = 2$ เป็นวิธีที่มีความถูกต้องเป็นที่ยอมรับและเหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน คำนวณปริมาณสารที่วัด โดยใช้ค่าความเข้มข้น (C_0) ที่อ่านได้จาก calibration curve ที่สร้างจากความสัมพันธ์ระหว่าง concentration กับ peak area

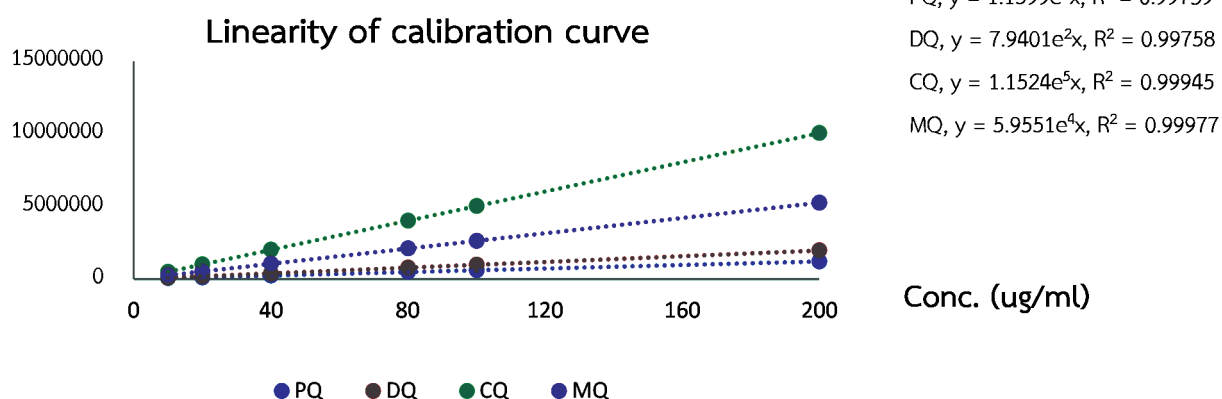
ผล

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยเตรียมสารมาตรฐานผสมของ PQ, DQ, CQ และ MQ 7 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 5, 10, 20, 40, 80, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย 1% volume/volume formic acid ใน MeOH:น้ำ (1:1) นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS สร้าง calibration curve ระหว่าง concentration กับ peak area คำนวณค่า R^2 มีค่าตั้งแต่ 0.997–0.999 ดังแสดงในภาพที่ 1

ความจำเพาะเจาะจงเป็นการแสดงการแตกตัวเป็นไอออนและค่าพลังงานอิเล็กตรอนของสารมาตรฐาน

แต่ละชนิด ทดสอบโดยฉีดสารมาตรฐานผสมที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย 1% volume/volume formic acid ใน MeOH:น้ำ (1:1) จำนวน 3 ซ้ำ บันทึกค่า retention time (RT) วิเคราะห์ matrix blank โดยพิจารณา chromatogram ของ matrix blank ผลต้องไม่พบสัญญาณที่มีค่า RT และค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่ตรงกับสารมาตรฐาน โดย PQ, DQ, CQ และ MQ มี RT ที่ 3.0, 2.1, 2.6 และ 2.7 ตามลำดับ PQ จะให้ 1 product ion ที่เกิดจาก 2 precursor ion ส่วน DQ, CQ และ MQ จะให้ 1 product ion ที่เกิดจาก 1 precursor ion ซึ่งค่า m/z เป็นค่าคงที่เสมอ⁽¹³⁾ ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2

Peak area



ภาพที่ 1 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารกลุ่มควอต

ตารางที่ 1 Multiple reaction monitoring (MRM) condition ของการวิเคราะห์ PQ, DQ, CQ และ MQ

Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP (eV)	EP (eV)	CE (eV)	CXP (eV)
PQ	186.3	171.1 (primary)	80.00	1.69	28.00	11.80
	171.1	77.0 (secondary)	156.30	8.00	46.65	8.24
DQ	183.3	168.0 (primary)	81.20	13.10	30.82	10.32
	183.3	157.1 (secondary)	81.20	13.10	22.00	9.79
CQ	122.0	58.0 (primary)	148.46	7.07	36.65	7.06

ตารางที่ 1 Multiple reaction monitoring (MRM) condition ของการวิเคราะห์ PQ, DQ, CQ และ MQ (ต่อ)

Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP (eV)	EP (eV)	CE (eV)	CXP (eV)
MQ	122.0	63.0 (secondary)	148.46	7.07	27.11	10.40
	114.2	98.0 (primary)	254.96	7.84	34.09	13.57
	114.2	58.0 (secondary)	254.96	7.84	32.53	9.17

หมายเหตุ: DP คือ declustering potential, EP คือ entrance potential energy, CE คือ collision energy และ CXP คือ collision cell exit potential

ตารางที่ 2 ค่า retention time (RT) และค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของสารมาตรฐาน PQ, DQ, CQ และ MQ

Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	RT (min)	Ion Ratio
PQ	186.3	171.1	3.0	
	171.1	77.0		
DQ	183.3	168.0	2.6	0.90
	183.3	157.1		
CQ	122.0	58.0	2.1	0.96
	122.0	63.0		
MQ	114.2	98.0	2.7	0.97
	114.2	58.0		

การพิสูจน์ ME โดยการประเมินค่า ME จากค่า %recovery ของสารมาตรฐานจากการวิเคราะห์แบบ calibration curve on solvent (calibration curve ของ standard ที่เตรียมใน 1% formic acid: น้ำ (1:1) ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10–200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ calibration curve on matrix (calibration curve ที่เกิดจากการสกัด matrix เนื้อหมู นมโค และไข่ไก่) ที่ความระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10–200 นาโนกรัมต่อกรัม เกณฑ์การประเมิน %ME, (–20 ถึง 20%) หมายถึง soft, (–50 ถึง –20% และ 20 ถึง 50%) หมายถึง medium และ (> 50% และ < –50%) หมายถึง strong ผลพบว่า %ME อยู่ในเกณฑ์ soft ทุก matrix

การยืนยันค่า LOD โดยเติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank ที่ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อกรัม ซึ่งเป็นระดับที่สามารถตรวจวัดได้ตาม sensitivity ที่เหมาะสมของเครื่องมือ ซึ่งเป็นค่ากำหนดตามกฎหมาย (MDL) ทำการสกัดและหาค่า S/N ของสารแต่ละชนิด คำนวณปริมาณสารมาตรฐานที่ทำให้พีคมีความสูง 3 เท่า S/N โดย PQ มีค่า S/N อยู่ในช่วงตั้งแต่ 11–19 DQ มีค่าอยู่ในช่วงตั้งแต่ 11–20 CQ มีค่าอยู่ในช่วงตั้งแต่ 460–903 และ MQ มีค่าอยู่ในช่วงตั้งแต่ 274–625 ทั้งนี้ค่า S/N สูงหรือต่ำขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสารแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่า signal-to-noise (S/N) ที่ระดับ LOD (5 นาโนกรัมต่อกรัม) ของตัวอย่างเนื้อหมู นมโค และไข่ไก่

Compounds	ค่า S/N*		
	เนื้อหมู (ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด)	นมโค (ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด)	ไข่ไก่ (ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด)
PQ	13-21	12-19	11-19
DQ	13-20	11-13	12-17
CQ	570-708	533-903	460-743
MQ	274-448	463-625	414-625

หมายเหตุ: *เกณฑ์ยอมรับ S/N > 3

ความแม่นยำและความเที่ยงทดสอบโดยการฉีดสารมาตรฐานผสม PQ, DQ, CQ และ MQ ใน (spiked sample) ที่ระดับ LOQ, 8 × LOQ และ 20 × LOQ ได้แก่ ความเข้มข้น 10, 80 และ 200 นาโนกรัมต่อกรัม

ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับกราฟของสารมาตรฐานแล้วคำนวณ %recovery %RSD เกณฑ์ยอมรับโดย mean recovery อยู่ในช่วง 64.8-108.6% เกณฑ์ยอมรับ %RSD อยู่ในช่วง 2.1-13.0% ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับ LOQ (10 นาโนกรัมต่อกรัม) 8 × LOQ (80 นาโนกรัมต่อกรัม) และ 20 × LOQ (200 นาโนกรัมต่อกรัม)

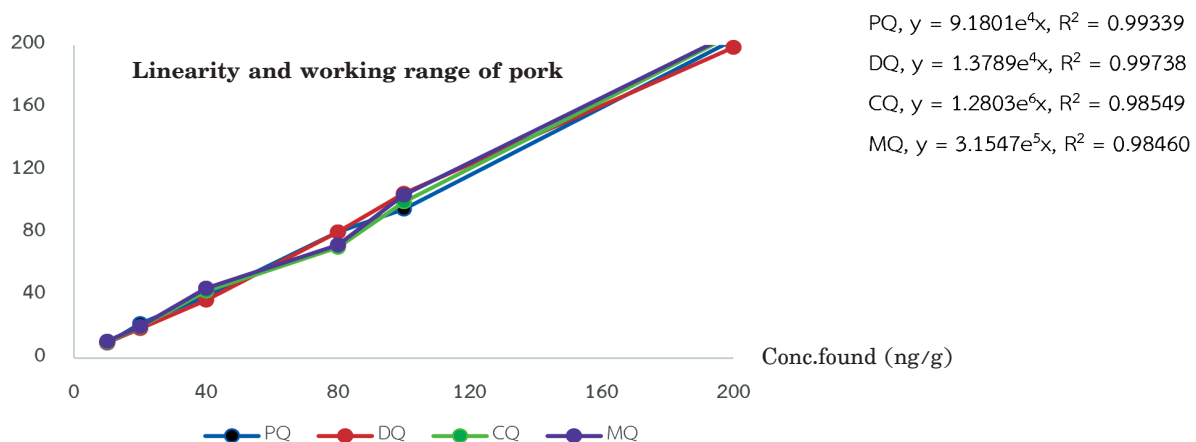
Compounds	Spiked level (ng/g)	เนื้อหมู		นมโค		ไข่ไก่	
		%recovery*	%RSD*	%recovery*	%RSD*	%recovery*	%RSD*
PQ	10	80.0	12.2	101.7	7.9	100.6	9.6
	80	99.6	13.0	101.1	7.48	100.8	13.0
	200	93.9	12.8	105.2	7.19	94.9	12.3
DQ	10	64.8	3.9	91.9	12.9	103.6	12.1
	80	106.3	6.9	107.4	4.9	98.6	7.5
	200	104.7	8.8	97.2	10.8	92.6	11.0
CQ	10	98.0	5.3	100.5	11.6	103.0	10.9
	80	99.9	8.6	100.2	4.9	108.6	3.3
	200	104.5	2.6	94.5	7.8	98.4	3.5
MQ	10	85.8	4.7	102.1	12.4	103.2	11.6
	80	106.3	2.1	94.7	9.1	105.2	2.0
	200	101.8	3.6	95.9	10.7	100.6	4.6

หมายเหตุ: *เกณฑ์การยอมรับ %recovery = 60-120%, %RSD ≤ 20%⁽¹⁴⁾

ช่วงการวิเคราะห์และความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ โดยเติมสารละลายมาตรฐานลงใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40, 80, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อกรัม ภายในช่วงกราฟมาตรฐานที่พิสูจน์แล้วว่าเป็นเส้นตรง ทำการสกัดและวิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความ

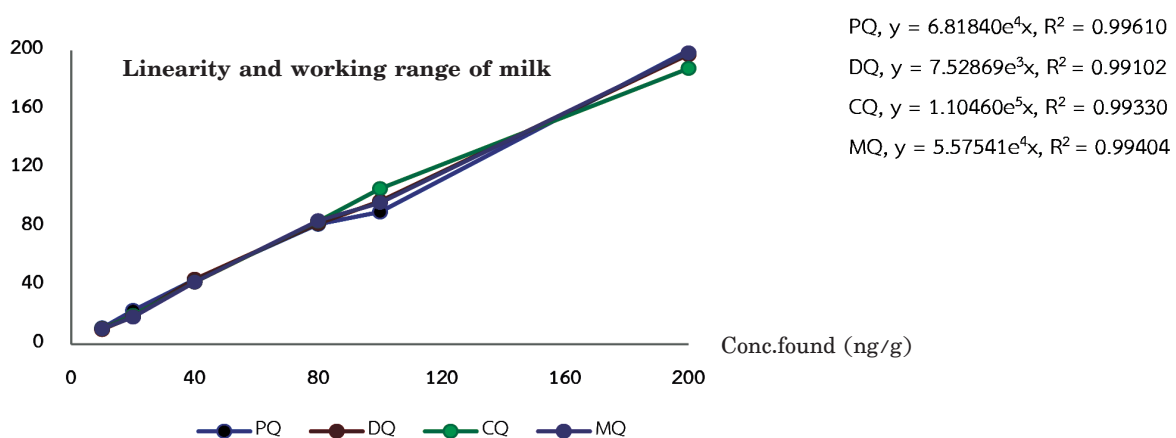
เข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่างกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ตรวจพบ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) โดยมีค่าอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.985–0.997 ความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์อยู่ในช่วง 10–200 นาโนกรัมต่อกรัม ดังแสดงในภาพที่ 2, 3 และ 4

Conc spiked (ng/g)



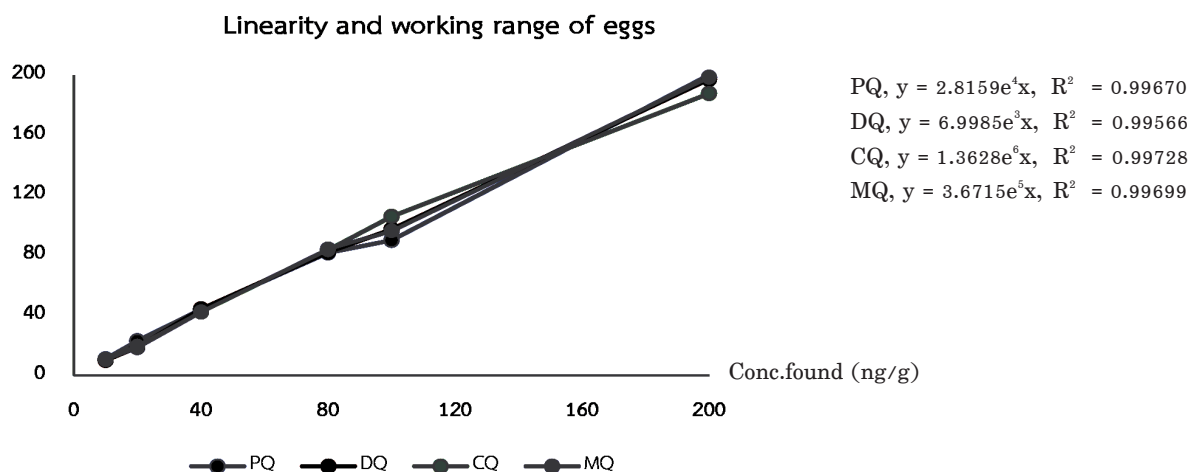
ภาพที่ 2 ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์เนื้อหมู

Conc spiked (ng/g)



ภาพที่ 3 ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์นมโค

Conc spiked (ng/g)

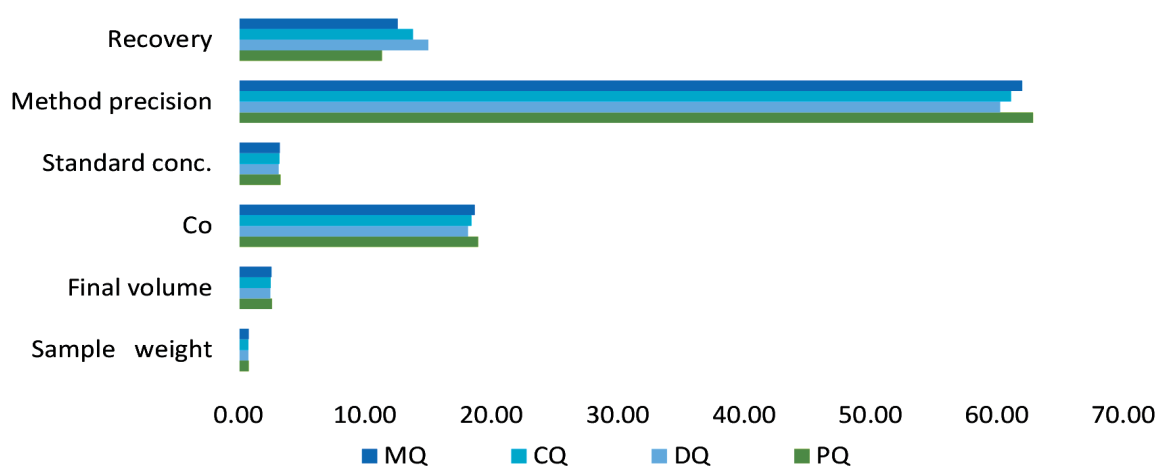


ภาพที่ 4 ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ไข่ไก่

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ แสดงให้เห็นถึงสายโซ่การสอบกลับได้ของการวัด ได้พิจารณาแหล่งความไม่แน่นอนที่จะมีผลกระทบต่อการตรวจวิเคราะห์⁽¹⁶⁾ ได้แก่ ความไม่แน่นอนจากค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่อ่านได้จาก calibration curve สารมาตรฐาน ความเที่ยงของวิธีเมื่อทำซ้ำ รวมไปถึงประสิทธิภาพของวิธีที่ทำให้เกิด bias เมื่อนำค่าความ

ไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์เนื้อหมูที่เดิมสารมาตรฐานกลุ่มควอตที่ระดับ 0.1 นาโนกรัมต่อกรัม ทำการวิเคราะห์ 10 ซ้ำ โดยมีค่าความไม่แน่นอนที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และสัดส่วนของแหล่งความไม่แน่นอนที่สำคัญที่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์ส่วนใหญ่มาจาก method precision รองลงมา คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่อ่านได้จาก calibration curve สารมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 5

Relative standard uncertainty of quats in pork (%)



ภาพที่ 5 relative standard uncertainty contributions ของสารกลุ่มควอตในเนื้อหมู

หลังจากพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์และนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารประเภทเนื้อสัตว์ นม และไข่ ในโครงการประเมินความเสี่ยงการได้รับสัมผัสสารเคมีและสารปนเปื้อนที่คนไทยได้รับจากการบริโภค ปี พ.ศ. 2565 (total diet study) โดยเก็บตัวอย่างอาหารประเภทเนื้อสัตว์ นม และไข่ จากตลาดค้าส่งหรือศูนย์กระจายสินค้าในแต่ละภาค ๆ ละ 2 จังหวัด รวม 8 จังหวัด

จำนวน 29 ตัวอย่าง รายละเอียดและวิธีการจัดการตัวอย่าง โครงการประเมินความเสี่ยงการได้รับสัมผัสสารเคมีและสารปนเปื้อนที่คนไทยได้รับจากการบริโภค ระบุไว้ในรายงานประจำปี 2565 ของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽¹⁷⁾ ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่พบการตกค้างของสารกลุ่มควอตินในทุกตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการตรวจวิเคราะห์การตกค้างของสารกลุ่มควอตินในตัวอย่าง total diet study ในปี พ.ศ. 2565 จำนวน 29 ตัวอย่าง

ชนิดตัวอย่าง	ปริมาณที่ตรวจพบ (mg/kg)			
	PQ	DQ	CQ	MQ
1. เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ (23 ตัวอย่าง) เนื้อไก่, ลูกชิ้นไก่, ไส้กรอกไก่, ตับไก่, เนื้อหมู, ลูกชิ้นหมู, หมูปิ้ง, ไส้กรอกหมู, หมูยอ, ตับหมู, ลูกชิ้นเนื้อ, เนื้อวัว/เนื้อควาย, ปลานิล/ปลาตะเพียน, ปลาช่อน, ปลาดุก, ปลาน้ำจืดตากแห้ง, กุ้งน้ำจืด, ปลาทะเล, กุ้งทะเล, ปลาหมึก, ลูกชิ้นปลา, ปลากระป๋อง, หอยแครง/หอยแมลงภู่	ND	ND	ND	ND
2. นม (4 ตัวอย่าง) นมโค, นมถั่วเหลือง, นมเปรี้ยว, นมปรุงแต่งพร้อมดื่ม	ND	ND	ND	ND
3. ไข่ (2 ตัวอย่าง) ไข่ไก่, ไข่เป็ด	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND = not detected

วิจารณ์

ตามระบบคุณภาพมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017⁽¹⁸⁾ กำหนดว่า วิธีการทดสอบต้องผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีครั้งนี้ใช้เนื้อหมูเป็นตัวแทนของตัวอย่างเนื้อสัตว์ ใช้นมโคเป็นตัวแทนของตัวอย่างนม และไข่ไก่เป็นตัวแทนของตัวอย่างไข่ เนื่องจากมีอัตราการบริโภคของคนไทยในปริมาณที่สูง⁽¹⁹⁾ ถึงแม้ว่าเนื้อไก่จะมีอัตราการบริโภคที่สูงไม่ต่างจากเนื้อหมู แต่เนื้อไก่มีปริมาณไขมันสูงกว่าเนื้อหมู⁽²⁰⁾ ซึ่งคุณสมบัติทางเคมีของสารกลุ่มควอตินจะไม่ละลายในไขมันเนื่องจากแคโทไอออน จึงเลือกใช้เนื้อหมูซึ่งมีไขมันระดับกลาง

ประกอบกับปริมาณไขมันในเนื้อหมูจะไม่รบกวนการวิเคราะห์เท่ากับเนื้อไก่ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย hydrophilic-lipophilic-balanced (HLB) SPE cartridge และเนื้อหมูสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายกว่า ตาม CXG 40-1993 (codex guideline)⁽²¹⁾ ในการกำหนดชนิดของอาหารเพื่อเป็นตัวแทนกลุ่มอาหาร (representative matrix) ตามความเหมาะสม โดยทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็น representative commodity (species) 1 ชนิดเป็นอย่างน้อย ใน 1 commodity categories (class) ซึ่งเนื้อหมูและเนื้อไก่จัดอยู่ใน class เดียวกัน จึงเลือกใช้เนื้อหมูเป็นตัวแทนของตัวอย่างเนื้อสัตว์ เมื่อทดสอบ

ประสิทธิภาพการสกัดในตัวอย่างเนื้อไก่พบว่า %recovery ผ่านเกณฑ์ยอมรับ จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธี PQ ให้ product ion ที่เกิดจาก 2 precursor ion ส่วน DQ, CQ และ MQ product ion จะเกิดจาก 1 precursor ion เท่านั้น ซึ่งสัดส่วนของมวลต่อประจุของ precursor ion และมวลต่อประจุของ product ion เป็นค่าคงที่เสมอ การวิเคราะห์ calibration curve ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่เกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน มีค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.997–0.999 และความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40, 80, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อกรัม ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่างผ่านกระบวนการสกัดและคำนวณเป็นความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ตรวจพบ มีค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.985–0.997 ซึ่งคุณลักษณะและคุณสมบัติอยู่ในเกณฑ์ยอมรับตาม pesticide analytical guideline ของสหภาพยุโรป SANTE/11312/2021⁽¹⁴⁾ สามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในห้องปฏิบัติการได้ และ calibration curve ที่ใช้เป็น calibration curve on solvent ซึ่งไม่มีผลกระทบจากคุณสมบัติของเนื้อตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับความชันกับ calibration curve on matrix ของเนื้อหมู นมโค และไข่ไก่พบว่า %ME อยู่ในเกณฑ์ soft ในความยากของวิธี จึงดัดแปลงขั้นตอนการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ โดยการปรับใช้ HLB SPE cartridge จากขนาดความจุ 500 มิลลิกรัม เป็นขนาดความจุ 200 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรสารที่ใช้ในการสกัดจาก 20 มิลลิลิตร เป็น 10 มิลลิลิตร และปริมาตรสารละลายที่ใช้ชะจาก 12.5 มิลลิลิตร เป็น 10 มิลลิลิตร เพื่อให้เหมาะสมกับความจุของ HLB SPE cartridge ขนาด 200 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นวัสดุวิทยาศาสตร์ที่มีในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด โดยปรับความเร็วรอบในการ centrifuge จาก 2,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เป็นความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกสารสกัดกับเนื้อตัวอย่างได้ชัดเจน มีความใสมากขึ้น และง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์ ใช้ syringe plunger พร้อม SPE adapter ต่อกับ HLB SPE cartridge ในการทำให้บริสุทธิ์ แทน

การใช้ชุดกรองแบบ manifold pressure และปรับสภาวะของเครื่อง LC-MS/MS ตามที่ได้กล่าวในส่วนของวัสดุและวิธีการ แต่ความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS คือ 1 กรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากัน และประสิทธิภาพการสกัด %recovery อยู่ในช่วง 60–120% ในทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบประสิทธิภาพวิธี ขั้นตอนการสกัดหลังจากปั่นแบบตกตะกอน พบว่าตัวอย่างนมโคและไข่ไก่ให้สารสกัด ลักษณะใสกว่าตัวอย่างเนื้อหมู เนื่องจากนมโคและไข่ไก่มีลักษณะเป็นของเหลว ขั้นตอนการสกัดเมื่อมีน้ำเป็นองค์ประกอบในตัวอย่าง จะทำให้การสกัด analyte ออกมาได้ดีกว่าตัวอย่างที่ไม่มีน้ำ⁽¹³⁾ ก่อนการสกัดเติม 0.5% formic ในน้ำ ลงไปในตัวอย่างก่อนการสกัดทำให้ประสิทธิภาพการสกัดดีกว่าสารมาตรฐานที่ใช้เป็นเกลือของสารในกลุ่มควอต เช่น พาราควอตไดคลอไรด์ ซึ่งเป็นวัตถุอันตรายทางการเกษตร แต่ชนิดสารที่ออกฤทธิ์ คือ พาราควอต แคโทไอออน⁽²²⁾ ดังนั้นในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน ต้องคำนวณความเข้มข้นให้อยู่ในรูปพาราควอตแคโทไอออนก่อนนำไปวิเคราะห์และเตรียมในภาชนะบรรจุชนิดพลาสติกทั้งหมด⁽¹³⁾ เนื่องจากสารในกลุ่มควอตจะทำปฏิกิริยากับกับผิวของภาชนะบรรจุที่เป็นแก้ว ในการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ แสดงตัวอย่างการประมาณค่าความไม่แน่นอนเฉพาะการวิเคราะห์เนื้อหมูที่เติมสารมาตรฐานกลุ่มควอตที่ระดับ 0.1 นาโนกรัมต่อกรัม ทำการวิเคราะห์ 10 ซ้ำ เท่านั้น ส่วนตัวอย่างนมโคและไข่ไก่ สัดส่วนของแหล่งความไม่แน่นอนสามารถประมาณค่าและคำนวณได้เช่นเดียวกับการตรวจวิเคราะห์เนื้อหมูที่ระดับความเข้มข้น 95%

วิธีการสกัดตัวอย่างที่พัฒนานี้สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ PQ, CQ และ MQ ในเนื้อสัตว์ นม และไข่โดยเทคนิค LC-MS/MS ที่สอดคล้องตามข้อกำหนดในพระราชบัญญัติอาหาร เพื่อเฝ้าระวังการตกค้างของสารดังกล่าวในอาหารในประเทศได้ ยกเว้นการตรวจวิเคราะห์ DQ ที่ค่ากำหนดของ codex ในนม มีค่าเท่ากับ 0.001 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แม้ว่าวิธีที่พัฒนาจะไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในระดับที่กำหนด แต่ถ้าตรวจพบการตกค้างของ DQ ในนม ที่ระดับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามวิธี ถือว่าตรวจพบการตกค้างเกินกว่ากฎหมายกำหนด

ประเทศไทยยังไม่มีหน่วยงานหรือห้องปฏิบัติการเปิดให้บริการตรวจวิเคราะห์รายการทดสอบ PQ, DQ, CQ และ MQ ในเนื้อสัตว์ นม และไข่ ห้องปฏิบัติการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร เป็นห้องปฏิบัติการแรก ที่พัฒนาวิธีทดสอบดังกล่าว สามารถตอบสนองต่อนโยบายของกระทรวงสาธารณสุขได้ เพื่อเฝ้าระวังการตกค้างของ PQ DQ CQ และ MQ ที่ตกค้างในอาหาร หรือที่ห่วงโซ่อาหารได้ การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มควอตในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ นม และไข่ มีข้อจำกัด คือ ไม่มีห้องปฏิบัติการให้บริการรายการตรวจวิเคราะห์นี้และไม่มีแผนทดสอบความชำนาญทั้งในระดับชาติและนานาชาติ หากมีห้องปฏิบัติการอื่นที่ตรวจวิเคราะห์อาจมีการจัดการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory comparison) เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพภายนอกได้

Journal of Environmental Agriculture, 2020⁽¹⁰⁾
สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ PQ, DQ, CQ และ MQ ในเนื้อสัตว์ นม และไข่ โดยเทคนิค LC-MS/MS เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง สามารถใช้ calibration curve on solvent ได้โดยไม่มีผลกระทบจากคุณสมบัติของเนื้อตัวอย่าง ให้ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบเท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความแม่นยำแสดงเป็น %recovery อยู่ในช่วง 64.8–108.6% และความเที่ยงแสดงเป็น %RSD ค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 2.1–13.0 มีช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ที่ 0.01–0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่เหมาะสมกับการใช้งานและให้ผลผ่านเกณฑ์ยอมรับ ทำให้ผลการทดสอบถูกต้อง เชื่อถือได้ และได้แนววิธีที่พัฒนามาสำรวจปริมาณการตกค้างของ PQ, DQ, CQ และ MQ ในอาหารที่คนไทยบริโภคประเภทเนื้อสัตว์ นม และไข่ ในโครงการ total diet study ปี พ.ศ. 2565 จำนวน 29 ตัวอย่าง ผลไม่พบการตกค้างของสารทั้ง 4 ชนิด ในทุกตัวอย่าง ดังนั้นอาหารประเภทเนื้อสัตว์ นม และไข่ที่คนไทยบริโภคนั้นมีความปลอดภัย

ขอขอบคุณ นางวิชาดา จงมีवासนา นักวิทยาศาสตร์
การแพทย์เชี่ยวชาญ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ
สำหรับการให้คำปรึกษาในงานวิจัย จนสำเร็จและสามารถ
เปิดให้บริการตรวจวิเคราะห์ได้

1. สุทธิดา คงเจ็ญ. “พาราควอต” เพฆฆฆฆฆฆฆฆฆฆฆฆฆฆฆฆฆฆฆฆฆฆฆฆฆฆ
กรุงเทพมหานคร: ศูนย์พัฒนาและวิเคราะห์สมบัติของวัสดุ.
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ; 2564.
2. Database Platform for S-Curve Industrial,
Bureau of Science and Technology Information.
PARAQUAT (057). [online]. 2020; [cited 2022
Oct 7]; [166 screens]. Available from: URL:

- <http://lib1.dss.go.th/5datasci/index.php/th/standard-rules/2020-09-29-09-53-26/158-paraquat-057>.
3. คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ศูนย์พิษวิทยารามาธิบดี. ภาวะเป็นพิษจาก paraquat. [ออนไลน์]. [สืบค้น 23 ก.ย. 2565]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.ramamahidol.ac.th/poisoncenter/th/pois-cov/PQ>.
 4. Gawarammana IB, Buckley NA. Medical management of paraquat ingestion. *Br J Clin Pharmacol* 2011; 72(5): 745-57.
 5. ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่อง บัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย ฉบับที่ 6 (พ.ศ. 2563). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 117 ง (วันที่ 19 พฤษภาคม 2563).
 6. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 419 (พ.ศ. 2563) เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 3). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 257 ง (วันที่ 2 พฤศจิกายน 2563).
 7. Codex Alimentarius International Food Standard. Codex pesticides residues in food online database. [online]. 2021; [cited 2022 Sep 23]; [1 screen]. Available from: URL: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/en/>.
 8. European Commission (EURL-SRM). Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in food involving extraction with acidified methanol and LC-MS/MS measurement. Food of Animal Origin (QuPpe-AO-Method). [online]. 2021; [cited 2022 Oct 1]; [87 screens]. Available from: URL: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EurlSrm_meth_QuPpe_PO_V11_1.pdf.
 9. Gao L, Yuan H, Xu E, Liu J. Toxicology of paraquat and pharmacology of the protective effect of 5-hydroxy-1-methylhydantoin on lung injury caused by paraquat based on metabolomics. *Sci Rep* 2020; 10: 1790. (16 pages).
 10. Cho IK, Rahman M, Seol JU, Noh HH, Jo HW, Moon JK. Development of a simultaneous, analytical method for diquat, paraquat and chlormequat in animal products using UPLC-MS/MS. *Korean J Environ Agric* 2020; 39(4): 368-74.
 11. Zhang C, Cui F, Zeng GM, Jiang M, Yang ZZ, Yu ZG, et al. Quaternary ammonium compounds (QACs): A review on occurrence, fate and toxicity in the environment. *Sci Total Environ* 2015; 518-519: 352-62.
 12. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 387 (พ.ศ. 2560) เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 134 ตอนพิเศษ 228 ง (วันที่ 18 กันยายน 2560).
 13. European Commission (EURL-SRM). Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in food involving extraction with acidified methanol and LC-MS/MS measurement I. Food of Plant Origin (QuPpe-PO-Method). [online]. 2019; [cited 2022 Oct 1]; [86 screens]. Available from: URL: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EurlSrm_meth_QuPpe_PO_V11.pdf.
 14. EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. *SANTE* 2021; 11312: 1-55.
 15. Ferrer C, Lozano A, Agüera A, Girón AJ, Fernández-Alba AR. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *J Chromatogr A* 2011; 1218(42): 7634-9.
 16. Williams A, Ellison SL, Rosslein M. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2nd ed. United Kingdom: EURACHEM/CITAC; 2000.
 17. สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร. รายงานประจำปี 2565 สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2565.
 18. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration

- laboratories. 3rd ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.
19. สำนักงานมาตรฐานสินค้าและระบบคุณภาพ สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. ข้อมูลการบริโภคอาหารของประเทศไทย. [ออนไลน์]. 2549; [สืบค้น 23 ก.ย. 2565]; เข้าถึงได้ที่: URL: https://dol.thaihealth.or.th/resourcecenter/sites/default/files/documents/1_451.pdf?download.
20. สำนักโภชนาการ กรมอนามัย. ตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารไทย. นนทบุรี: กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข; 2561.
21. Guidelines on good laboratory practice in pesticide residue analysis CXG 40-1993. Rome, Italy: Codex Committee on Pesticide Residues (CCPR); 2010.
22. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 9002-2559. สารพิษตกค้าง: ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด. กรุงเทพฯ: สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์; 2559.

Analytical Method Development of Paraquat, Diquat, Chlormequat and Mepiquat in Meat, Milk and Eggs by LC-MS/MS

Rattiyakorn Srikote Phornphan Songsri and Nichanan Boonnim

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

ABSTRACT Paraquat is a type 4 hazardous substance that has been banned for manufacturing, import, export, transit, or possession according to the Notification of the Ministry of Industry No. 6 (B.E. 2563) Re: List of Hazardous Substances. Additionally, the Notification of the Ministry of Public Health No. 419 (B.E. 2563) Re: Food Containing Pesticide Residues indicates the criteria for regulating paraquat level in meat, milk and eggs that the analytical method used for detection must have a minimum detection limit of 0.005 mg/kg. Based on these notifications, an efficient laboratory was developed using LC-MS/MS to simultaneously determine paraquat and three quats; diquat, chlormequat and mepiquat in meat, milk and eggs. Samples were extracted using acidic acetonitrile, centrifuged, purified through hydrophilic-lipophilic-balanced (HLB) SPE cartridge and quantify using multiple reaction monitoring (MRM). The method had a limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 0.005 mg/kg and 0.01 mg/kg, respectively, with a linearity range of 0.01–0.20 mg/kg and accuracy (%recovery) at 64.8–108.6 and precision (%RSD) at 2.1–13.0. This method was used to analyze 29 food samples and it was found no quat residues. Therefore, this developed method is effective for determining quat residues in meat, milk, and eggs and suitable for monitoring quat residues in food regulations.

Keywords: Quats, Meat, Milk, Eggs, LC-MS/MS

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาแผนปัจจุบันที่ปลอมปน ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยเทคนิค Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

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

บทคัดย่อ ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่อ้างสรรพคุณในการช่วยลดน้ำหนัก เพิ่มสมรรถภาพทางเพศ บำรุงผิวพรรณ หรือช่วยแก้ไข
ปัญหาสุขภาพอาจมีการปลอมปนของวัตถุออกฤทธิ์หรือยาแผนปัจจุบัน เพื่อให้เกิดผลที่ต้องการอย่างรวดเร็วโดยไม่คำนึงถึง
ความปลอดภัยของผู้บริโภค ซึ่งการใช้สารเหล่านี้อย่างผิดวัตถุประสงค์อาจก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพอย่างร้ายแรงจนเสียชีวิตได้
การศึกษานี้จึงได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพ เพื่อตรวจสอบการปลอมปนของยาแผนปัจจุบัน 16 ชนิด ที่นิยมนำ
มาใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารประเภทผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม โดยใช้ตัวทำละลาย MeOH:H₂O (70:30) ในการ
สกัดและปรับค่า pH ของสารละลายให้เป็นกรด จากนั้นนำสารสกัดเจือจาง 10 เท่า ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS
ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดการตรวจวัดสำหรับการยืนยันผลเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับตัวอย่างทุกประเภท จาก
การทดสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่าค่า %diagnostic sensitivity, %diagnostic specificity, %positive predictive
value และ %negative predictive value มีค่าเท่ากับ 100% ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้จึงมีความไว ความจำเพาะ ความแม่นยำสูง
ไม่ทำให้เกิดผลบวกложหรือผลลบлож และสามารถวิเคราะห์ทั้ง 16 ชนิด ได้ในครั้งเดียว ซึ่งเป็นการลดปริมาณการใช้
สารเคมีและระยะเวลาในการวิเคราะห์ เกิดประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์เสริมอาหารให้เป็นไปตามกฎหมายและ
คุ้มครองความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค

คำสำคัญ: การพัฒนาวิธีวิเคราะห์, ยาแผนปัจจุบัน, ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร, LC-MS/MS

Corresponding author E-mail: kanyarat.ch@dmsc.mail.go.th

Received: 17 January 2023

Revised: 31 May 2023

Accepted: 2 June 2023

บทนำ

ปัจจุบันผู้บริโภคนิยมใช้ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆ เช่น ลดน้ำหนัก เสริมสร้างการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อ เพิ่มสมรรถภาพทางเพศ บำรุงผิวพรรณ หรือแก้ไขปัญหาลักษณะอื่นๆ ซึ่งผลิตภัณฑ์บางชนิดอาจมีการปลอมปนด้วยยาแผนปัจจุบัน เพื่อให้เกิดผลลัพธ์ที่ต้องการในระยะเวลาอันรวดเร็ว แต่อาจส่งผลข้างเคียงต่อสุขภาพของผู้บริโภคอย่างรุนแรง⁽¹⁾ พบได้จากข่าวการเสียชีวิตหรืออาการประสาทหลอนของผู้ที่บริโภคผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับลดน้ำหนัก สาเหตุหลักที่ทำให้เกิดอันตราย คือ การปลอมปนยาลดน้ำหนักในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว โดยทั่วไปยาลดน้ำหนักจะส่งจ่ายโดยแพทย์ เพื่อใช้เป็นส่วนหนึ่งของการรักษาโรคอ้วน ยาลดน้ำหนักแบ่งเป็น 2 ประเภท ตามการออกฤทธิ์ของยา⁽²⁾ ได้แก่ กลุ่มออกฤทธิ์ต่อสมองมีผลต่อศูนย์ควบคุมการรับประทานอาหารหรือความรู้สึกอยากอาหาร โดยกระตุ้นศูนย์ควบคุมความอิ่มและทำให้เกิดอาการเบื่ออาหาร เช่น sibutramine, phentermine, fluoxetine, desoxy-D2PM ยาชนิดออกฤทธิ์กดประสาทและลดการทำงานของศูนย์ควบคุมความหิว เช่น fenfluramine และกลุ่มที่ออกฤทธิ์กับอวัยวะอื่นๆ เช่น ephedrine, pseudoephedrine ที่ช่วยกระตุ้นกระบวนการเผาผลาญในร่างกายและเพิ่มอัตราการเผาผลาญไขมัน phenolphthalein มีฤทธิ์เป็นยาระบาย กระตุ้นการบีบตัวของลำไส้ ทำให้เกิดการขับถ่ายมากขึ้นหรือบ่อยขึ้น เมื่อร่างกายสูญเสียน้ำและเกลือแร่จึงทำให้รู้สึกมึนงงอย่างรวดเร็ว และอาจมีการใช้ diazepam เพื่อลดผลข้างเคียงจากยาลดน้ำหนักที่กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางร่วมด้วยการได้รับยาเหล่านี้ในปริมาณที่มากเกินไปอาจส่งผลเสียต่อสุขภาพ เช่น เกิดอาการวิตกกังวล หวาดระแวง นอนไม่หลับ ขาดความสมดุลของสภาวะเกลือแร่ในร่างกาย หรือการทำงานของบางอวัยวะผิดปกติ และหากใช้ยาเหล่านี้ติดต่อกันเป็นเวลานานหรือใช้ในปริมาณที่เกินขนาด อาจส่งผลต่อระบบประสาท หัวใจ และหลอดเลือดจนถึงขั้นเสียชีวิต

นอกจากนี้พบผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่อ้างสรรพคุณช่วยรักษาปัญหาสุขภาพ แต่มีการปลอมปนยาประเภทสเตียรอยด์ เช่น prednisolone⁽³⁾ และ dexamethasone⁽⁴⁾

ที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ กดภูมิคุ้มกัน ใช้รักษาอาการแพ้ รักษาความผิดปกติเกี่ยวกับระบบกล้ามเนื้อ กระดูกและข้อ ทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร และต่อมไร้ท่อ หากใช้เป็นเวลานานหรือใช้บ่อยเกินไปอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียง เช่น เพิ่มความเสี่ยงการติดเชื้อแบคทีเรียจากฤทธิ์การกดภูมิคุ้มกัน เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด เพิ่มการสะสมไขมัน เพิ่มความเสี่ยงต่อภาวะกระดูกพรุน และอาจทำให้ร่างกายหยุดสร้างสเตียรอยด์ตามธรรมชาติ ดังนั้นเมื่อหยุดใช้ยานี้ทันทีจะทำให้ร่างกายขาดสเตียรอยด์อย่างฉับพลัน อาจเกิดภาวะช็อก หมดสี และเสียชีวิต ผลิตภัณฑ์ช่วยเสริมสมรรถภาพทางเพศเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่อันตราย มีการใช้ sildenafil (viagra), tadalafil หรือ vardenafil⁽⁵⁾ ซึ่งเป็นยารักษาโรคหย่อนสมรรถภาพทางเพศ ออกฤทธิ์ช่วยผ่อนคลายกล้ามเนื้อของหลอดเลือด ช่วยเพิ่มการไหลเวียนโลหิตไปยังอวัยวะเพศชาย และช่วยให้อวัยวะเพศแข็งตัว หากได้รับในปริมาณมากเกินไปอาจทำให้สูญเสียการมองเห็นอย่างฉับพลันหรือทำให้หัวใจวายจนเสียชีวิต ดังนั้นการผสมยาเหล่านี้ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ไม่มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นยาและไม่ได้รับการควบคุมปริมาณการบริโภคดังเช่นยา อาจทำให้ผู้บริโภคได้รับความเสี่ยงจากผลข้างเคียงอย่างร้ายแรง เกิดอันตรายต่อสุขภาพ และเสียชีวิตได้

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 293 พ.ศ. 2548 เรื่อง ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร⁽⁶⁾ ให้นิยาม ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารว่า เป็นผลิตภัณฑ์ที่รับประทานนอกเหนือจากการรับประทานอาหารตามปกติ ซึ่งมีสารอาหารหรือสารอื่นเป็นองค์ประกอบอยู่ในรูปแบบเม็ด แคปซูล ผง เกล็ด ของเหลว หรือลักษณะอื่น ซึ่งมีใช้รูปแบบอาหารตามปกติ สำหรับผู้บริโภคที่คาดหวังประโยชน์ทางด้านส่งเสริมสุขภาพ ดังนั้นการนำวัตถุดิบออกฤทธิ์⁽⁷⁾ เช่น sibutramine และ desoxy-D2PM ที่ถูกจัดเป็นวัตถุดิบออกฤทธิ์ประเภท 1 alprazolam, ephedrine, phentermine และ pseudoephedrine ที่เป็นวัตถุดิบออกฤทธิ์ประเภท 2 และ diazepam ที่เป็นวัตถุดิบออกฤทธิ์ประเภท 4 มาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารถือเป็นการกระทำที่ผิดกฎหมาย นอกจากนี้การปลอมปนยาควบคุมพิเศษ⁽⁸⁾ เช่น sildenafil, tadalafil, fluoxetine, prednisolone, dexamethasone ยาอันตราย⁽⁹⁾ เช่น

fluoxetine ยาแผนปัจจุบันที่ใช้ตามแพทย์หรือเภสัชกรสั่งเท่านั้น เช่น มี bisacodyl ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ซึ่งเป็นการใช้อย่างผิดวัตถุประสงค์ อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคและเป็นการกระทำที่ผิดกฎหมาย

เทคนิคการตรวจวิเคราะห์วัตถุออกฤทธิ์และยาแผนปัจจุบันมีหลายเทคนิค⁽¹⁰⁾ ตั้งแต่วิธีการพื้นฐานที่ใช้ตรวจคัดกรองเบื้องต้น ได้แก่ โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (thin-layer chromatograph; TLC)⁽¹¹⁻¹³⁾ ที่อาศัยเทคนิคการแยกสารแบบของแข็งและของเหลว โดยใช้ alumina หรือ silica gel เป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) เคลือบบนแผ่นกระจกหรือแผ่น aluminum แล้วใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์เชิงคุณภาพแบบง่ายและรวดเร็ว แต่ใช้แยกสารปริมาณมาก ๆ ได้ไม่ดี มีค่าขีดจำกัดการตรวจวัดสูง และอาจต้องทำการตรวจยืนยันผลอีกครั้ง นอกจากนี้ยังมีเทคนิค gas chromatography (GC) และ liquid chromatography (LC)^(14,15) ที่มีความจำเพาะ ความไว และความแม่นยำสูง สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน โดย LC นิยมใช้กับ detector ชนิด UV/VIS หรือ MS/MS ซึ่งทำให้การวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ยาแผนปัจจุบัน 16 ชนิด ได้แก่ alprazolam, bisacodyl, desoxy-D2PM, dexamethasone, diazepam, ephedrine, fenfluramine, fluoxetine, phenolphthalein, phentermine, prednisolone, pseudoephedrine, sibutramine, sildenafil, tadalafil และ vardenafil โดย LC-MS/MS ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด และแคปซูล ดำเนินการทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยศึกษาความจำเพาะเจาะจง ขีดจำกัดการตรวจวัดสำหรับการยืนยันผล ความไวของวิธีวิเคราะห์ positive predictive value (PPV) และ negative predictive value (NPV) ซึ่งวิธีที่พัฒนานี้สามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง เพื่อควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมาย และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เพื่อป้องกันและเฝ้าระวังสถานการณ์ความปลอดภัยในการบริโภคผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน: alprazolam, diazepam, ephedrine hydrochloride, phentermine hydrochloride, pseudoephedrine hydrochloride (DMS reference standard, ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 99.0), bisacodyl, dexamethasone, fluoxetine hydrochloride, phenolphthalein, prednisolone, tadalafil, vardenafil hydrochloride (Dr. Ehrenstorfer GmbH, ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 97.0), desoxy-D2PM, sildenafil citrate (Sigma-Aldrich, ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 99.0), fenfluramine hydrochloride, sibutramine hydrochloride monohydrate (LGC GmbH, ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 98.00)

สารเคมี: acetonitrile (ACN), methanol (MeOH) เป็น HPLC grade และ formic acid เป็น AR grade

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 กรัม (Sartorius AG, รุ่น LP 620S, Germany) และ 0.01 มิลลิกรัม (Mettler-Toledo AG, รุ่น XPE, Switzerland), refrigerated centrifuge, เครื่องปั่น (Nessei, Japan), vortex mixer, shaker, micro pipette ขนาด 2-20, 10-100, 20-200, 100-1,000 และ 1,000-10,000 ไมโครลิตร, screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร, micro-spin filter tube 0.2 ไมโครเมตร ชนิด PVDF, ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 และ 1,000 มิลลิลิตร, กระบอกตวง ขนาด 100 และ 500 มิลลิลิตร, pH paper ช่วง 0-14 และ 2.5-4.5, เครื่อง LC-MS/MS ประกอบด้วย binary pump, auto-sampler, micro vacuum degasser, thermostatted column compartment: Agilent 1100-API 4000, detector ชนิด triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies, Germany) และคอลัมน์ Zorbax SB C-18 (4.6 mm × 150 mm, 5 µm)

วิธีวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด และ แคปซูล ทำการบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดปั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenize) โดยแต่ละชนิดตัวอย่างจะนำจากทุกส่วนมารวมกันและทำการชั่งตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ ส่วนตัวอย่างที่เหลือจากการชั่งจะเก็บในสถานะที่เหมาะสม (reserved portion) ในการสุ่มตัวอย่างใช้หลัก hypermetric distribution ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%⁽¹⁶⁾ เช่น ตัวอย่างชนิดเม็ด หากมีตัวอย่าง 100 เม็ด ให้นำตัวอย่างทั้งหมดบดปั่นและดำเนินการตามที่กล่าวข้างต้น ตัวอย่างชนิดแคปซูล เลือกใช้เฉพาะส่วนที่อยู่ในแคปซูลเท่านั้น ตัวอย่างชนิดผง นำตัวอย่างทั้งหมดรวมกันและดำเนินการเช่นเดียวกับชนิดเม็ด กรณีตัวอย่างเป็นของเหลว นำทุกส่วนของหน่วยบรรจุรวมกันและผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นดำเนินการเช่นเดียวกับตัวอย่างชนิดอื่น ๆ สำหรับตัวอย่าง matrix blank ได้จากตัวอย่างที่ส่งวิเคราะห์ของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ผ่านการสกัดและวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนา จากนั้นฉีดสารสกัดเข้าเครื่อง LC-MS/MS และตรวจสอบว่าไม่มี mass หรือสัญญาณรบกวนที่สารมาตรฐานทั้ง 16 ชนิด เพื่อป้องกันความผิดพลาดของผลวิเคราะห์

การสกัดตัวอย่าง

สกัดผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม โดยชั่งตัวอย่าง 1.000 ± 0.05 กรัม ใส่ screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลายผสม MeOH:H₂O อัตราส่วน 70:30 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับค่า pH ซึ่งขั้นตอนนี้มีการศึกษาค่า pH ช่วงต่างๆ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของการสกัดสารเป้าหมายโดยมีการปรับค่า pH ในช่วงต่างๆ ได้แก่ 1.5–2.5, 2.5–3.5 และ 3.5–4.5 ด้วย formic acid ผสมให้เข้ากันและเขย่าด้วย shaker นาน 15 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใส 1 มิลลิลิตร (กรณีผลิตภัณฑ์

เสริมอาหารชนิดเครื่องดื่ม เนื่องจากตัวอย่างจะรวมเป็นเนื้อเดียวกันกับตัวทำละลายจึงสามารถดูดสารละลายได้ทั้งหมด) ใส่ลงใน micro-spin filter ชนิด PVDF ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำสารละลายที่ได้มาเจือจาง 10 เท่า ด้วย MeOH:H₂O อัตราส่วน 70:30 ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน stock standard solution ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานแต่ละชนิดประมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย methanol คำนวณความเข้มข้นของสารมาตรฐานเป้าหมาย เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 100, 10 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการเจือจางด้วย methanol สำหรับสารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณด้วย LC-MS/MS เป็นแบบ single point standard ที่ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

การวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

เครื่อง Agilent 1110 series API 4000 MS/MS ที่สภาวะดังนี้ mobile phase เป็น 0.1% formic acid และ acetonitrile ใช้โปรแกรม gradient ในการแยกสาร เวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมด 22 นาที โดยมีสภาวะของ mass spectrometer ประกอบด้วย ion spray voltage: 5500 volts, temperature (TEM): 400 องศาเซลเซียส, collision gas (CAD): nitrogen; medium, curtain gas (CUR): 30 psig, ion spray nebulizer gas (GAS-1): 40 psig, tis heater gas (GAS-2): 50 psig อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 35 องศาเซลเซียส และ injection volume เท่ากับ 5 ไมโครลิตร โดยสารถูกทำให้เป็นไอออนบวกด้วย electro spray ionization (ESI) ไอออนที่ได้ถูกวิเคราะห์ด้วย multiple reaction monitoring (MRM) และศึกษา mass ที่ m/z ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 MS/MS fragmentation conditions

No.	Compound name	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Retention Time (RT) (min)
1	alprazolam	309.100	281.300 (primary) 205.300 (secondary)	8.29
2	bisacodyl	362.000	184.000 (primary) 167.000 (secondary)	7.35
3	desoxy-D2PM	238.000	97.000 (primary) 117.000 (secondary)	6.34
4	dexamethasone	393.000	147.000 (primary) 355.000 (secondary)	7.16
5	diazepam	285.300	193.200 (primary) 154.200 (secondary)	7.89
6	ephedrine	166.200	117.100 (primary) 115.100 (secondary)	6.07
7	fenfluramine	232.200	159.100 (primary) 109.100 (secondary)	6.38
8	fluoxetine	310.100	44.000 (primary) 148.100 (secondary)	6.35
9	phenolphthalein	319.000	225.000 (primary) 141.100 (secondary)	6.72
10	phentermine	150.100	91.100 (primary) 105.100 (secondary)	6.15
11	prednisolone	361.000	307.000 (primary) 343.000 (secondary)	6.90
12	pseudoephedrine	166.200	117.100 (primary) 115.100 (secondary)	6.19
13	sibutramine	280.000	125.000 (primary) 139.000 (secondary)	6.92
14	sildenafil	475.100	58.000 (primary) 100.000 (secondary)	6.34
15	tadalafil	390.100	268.100 (primary) 135.100 (secondary)	6.88
16	varденаfil	489.400	151.000 (primary) 312.200 (secondary)	6.20

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (specificity)

ตรวจสอบ specificity โดยพิจารณาจาก ion ratio และ retention time ของสารละลายตัวอย่างต้องแตกต่างจาก ion ratio และ retention time เฉลี่ยของสารมาตรฐานที่ได้จากการฉีดสารมาตรฐาน จำนวน 3 ซ้ำ ก่อนทำการฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ (system suitability) ไม่เกินเกณฑ์การยอมรับ⁽¹⁷⁾ และวิเคราะห์ matrix blank พิจารณา chromatogram ของตัวอย่าง โดยต้องไม่พบสัญญาณที่มีค่า retention time (RT) และค่า m/z ที่ตรงกับสารมาตรฐานทั้ง 16 ชนิด

ขีดจำกัดการตรวจวิเคราะห์สำหรับการยืนยันผลบวก (cut-off) และความใช้ได้ของวิธีการสกัดตัวอย่างชนิดต่าง ๆ

วัตถุประสงค์ของการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาแผนปัจจุบันที่ปลอมปนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารนี้ จึงเป็นการตรวจวิเคราะห์เพื่อพิสูจน์และยืนยันการปลอมปนการใช้ยาผิดวัตถุประสงค์ โดยกำหนดค่า cut-off ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ในการรักษาทางการแพทย์⁽¹⁸⁾ หากผู้ประกอบการหรือบริษัทผู้ผลิตมีเจตนาผสมยาในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารบางชนิด เพื่อให้เกิดผลลัพธ์ที่ต้องการในระยะเวลาอันรวดเร็วจะผสมยาในปริมาณที่มากเกินไป

การยืนยันระดับความเข้มข้นสำหรับการยืนยันผลบวก แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม ที่ปราศจากสารกลุ่มเป้าหมาย (matrix blank) และกลุ่มที่ 2 เติมสารกลุ่มเป้าหมาย 16 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม ที่ปราศจากสารกลุ่มเป้าหมาย ซึ่งทั้ง 2 กลุ่ม ทำซ้ำชนิดตัวอย่างละ 100 ซ้ำ โดยทำการสกัด วิเคราะห์และประเมินผล

ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (diagnostic specificity)

วิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม ที่ปราศจากสารกลุ่มเป้าหมาย

ตัวอย่างชนิดละ 100 ซ้ำ ประเมินผลโดยคำนวณตามสมการ⁽¹⁹⁾

diagnostic specificity

$$= \frac{\text{number of true negative sample}}{\text{total number of samples without condition}}$$

ความไวของวิธีวิเคราะห์ (diagnostic sensitivity)

วิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม ที่เติมสารกลุ่มเป้าหมาย 16 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ชนิดตัวอย่างละ 100 ซ้ำ ประเมินผลโดยคำนวณตามสมการ⁽¹⁹⁾

diagnostic specificity

$$= \frac{\text{number of true positive sample}}{\text{total number of samples without condition}}$$

positive predictive value (PPV)

วิเคราะห์เพื่อทดสอบสัดส่วนของโอกาสจากการวิเคราะห์ สำหรับการตรวจพบสารกลุ่มเป้าหมายที่ให้ผลถูกต้อง โดยวิเคราะห์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม ที่มีสารกลุ่มเป้าหมายที่มีระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ชนิดตัวอย่างละ 100 ซ้ำ ประเมินผลโดยคำนวณตามสมการ⁽¹⁹⁾

positive predictive value

$$= \frac{\text{number of true positives}}{\text{total number of positives}}$$

negative predictive value (NPV)

วิเคราะห์เพื่อทดสอบสัดส่วนของโอกาสจากการวิเคราะห์ สำหรับการตรวจไม่พบสารกลุ่มเป้าหมายที่ให้ผลถูกต้อง โดยวิเคราะห์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม ที่ไม่มีสารกลุ่มเป้าหมาย ชนิดตัวอย่างละ 100 ซ้ำ ประเมินผลโดยคำนวณตามสมการ⁽¹⁹⁾

negative predictive value

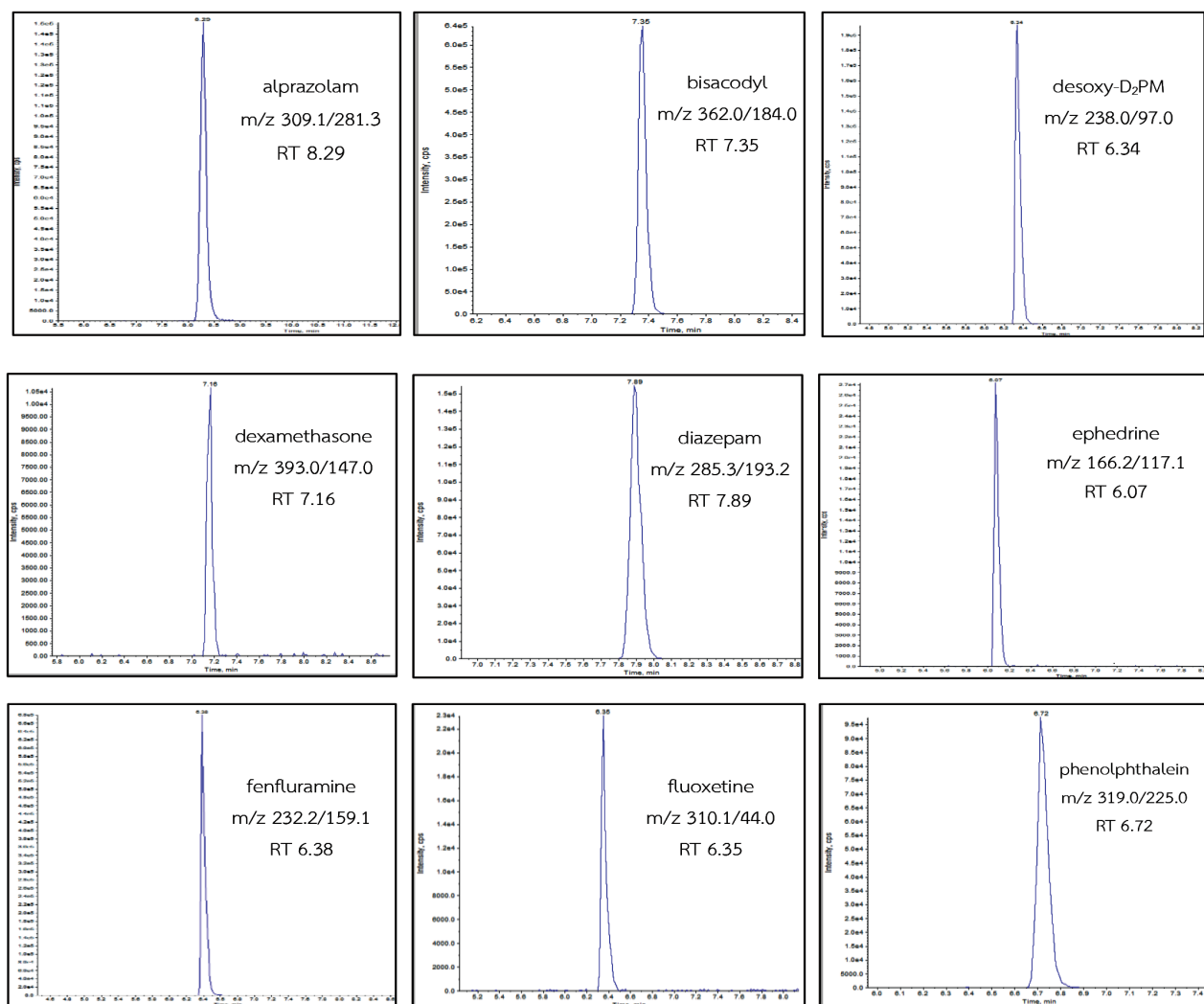
$$= \frac{\text{number of true negative}}{\text{total number of negative}}$$

ผล

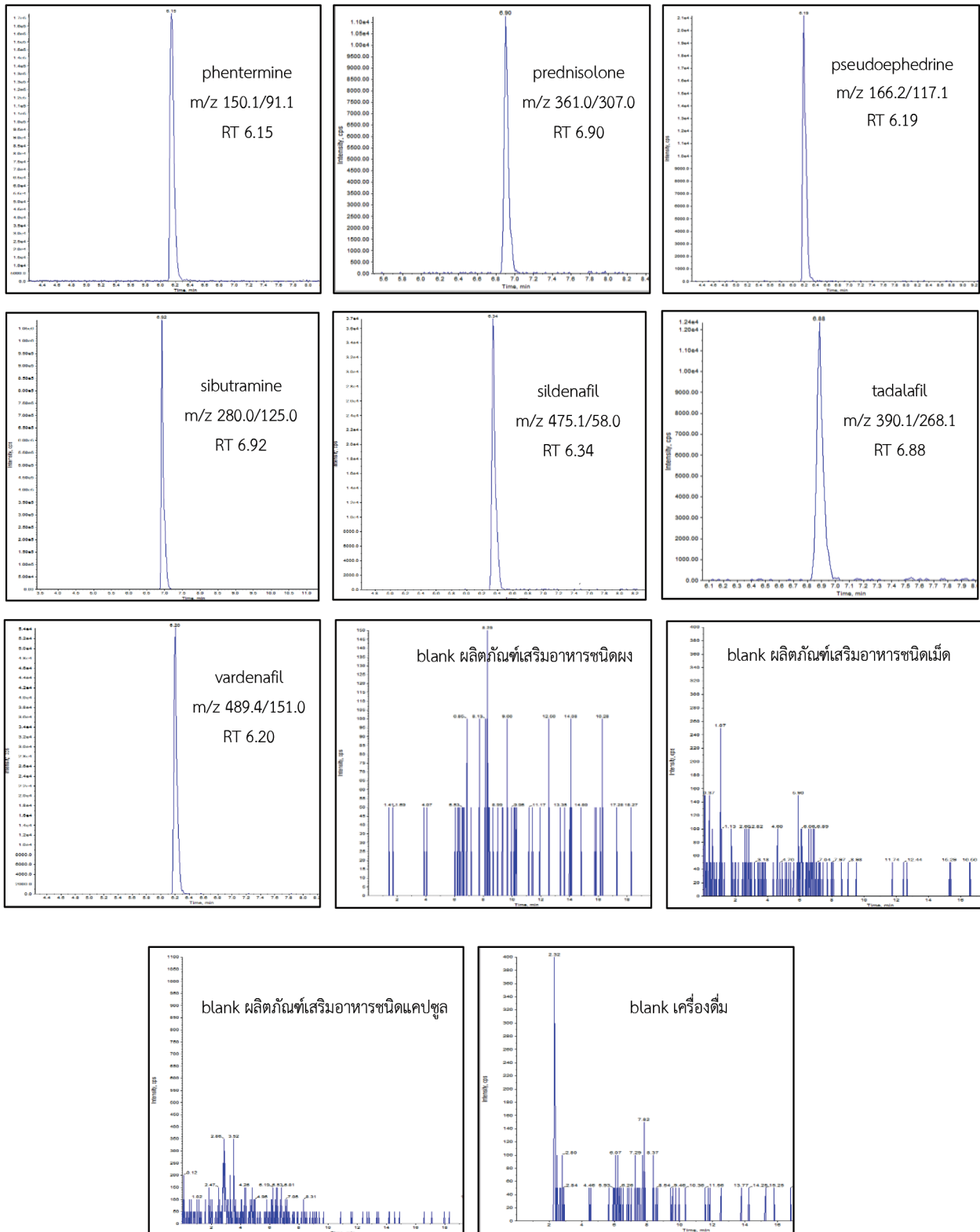
ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์

จากการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มเป้าหมาย 16 ชนิด โดยวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ตามสภาวะที่กำหนด วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งผ่านการสกัดตามวิธีที่พัฒนาจากการทดสอบเติมสารกลุ่มเป้าหมายลงใน matrix blank พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

สามารถตรวจพบสารกลุ่มเป้าหมายทั้ง 16 ชนิด ตรวจสอบ specificity พบว่า ion ratio และ retention time (RT) ของสารละลายตัวอย่างแตกต่างจาก ion ratio และ RT เฉลี่ยของสารมาตรฐาน จากการตรวจสอบด้วยระบบ system suitability ไม่เกินร้อยละ 20 และ 2 ตามลำดับ และวิเคราะห์ matrix blank พิจารณาโครมาโทแกรมของตัวอย่างไม่พบสัญญาณที่มีค่า RT และค่า m/z ที่ตรงกับสารมาตรฐาน วิธีนี้จึงมีความจำเพาะเจาะจง ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานยาแผนปัจจุบัน 16 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS และ matrix blank ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม



ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานยาแผนปัจจุบัน 16 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS และ matrix blank ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม(ต่อ)

ขีดจำกัดการตรวจวิเคราะห์สำหรับการยืนยันผลบวก (cut-off) และความใช้ได้ของวิธีการสกัดในตัวอย่าง การยืนยัน cut-off โดยสกัดตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารกลุ่มเป้าหมาย (matrix blank) และตัวอย่างที่มีการเติมสารกลุ่มเป้าหมาย ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม ชนิดตัวอย่างละ 100 ซ้ำ พบว่าทุกตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารกลุ่มเป้าหมาย ไม่ทำให้เกิดผลบวก ส่วนตัวอย่างที่เติมสารกลุ่มเป้าหมายให้ผลบวกทั้ง 16 ชนิด ในทุกตัวอย่าง ดังนั้นที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม

ต่อกิโลกรัม สามารถใช้เป็นจุด cut-off ได้ ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3 และใช้ค่าดังกล่าวเป็นค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม เนื่องจากผลการทดสอบพบว่า ตัวอย่างทุกประเภทตรวจพบสารมาตรฐานยาแผนปัจจุบันทั้ง 16 ชนิด ตามหลักเกณฑ์มาตรฐานการตรวจพบที่กำหนด⁽¹⁹⁾ และตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารกลุ่มเป้าหมาย พบว่าตรวจไม่พบสารกลุ่มเป้าหมายในทุกชนิดตัวอย่างเช่นกัน

ตารางที่ 2 การทดสอบขีดจำกัดการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม สำหรับการยืนยันผลที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ชนิดสาร	ชนิดผง		ชนิดเม็ด		ชนิดแคปซูล		ชนิดเครื่องดื่ม	
	Conc. (mg/kg)	%rec	Conc. (mg/kg)	%rec	Conc. (mg/kg)	%rec	Conc. (mg/kg)	%rec
alprazolam	4.15	83.00	4.23	84.60	4.30	86.00	4.14	82.80
bisacodyl	4.77	95.40	3.98	79.60	3.77	75.40	3.96	79.20
desoxy-D2PM	4.34	86.80	4.25	85.00	4.81	96.20	3.91	78.20
dexamethasone	4.09	81.80	3.83	76.60	3.86	77.20	4.86	97.20
diazepam	4.21	84.20	4.76	95.20	3.75	75.00	4.11	82.20
ephedrine	4.23	84.60	4.19	83.80	3.80	76.00	4.36	87.20
fenfluramine	4.12	82.40	4.40	88.00	4.13	82.60	4.17	83.40
fluoxetine	4.71	94.20	4.16	83.20	4.31	86.20	4.33	86.60
phenolphthalein	3.85	77.00	3.79	75.80	3.79	75.80	4.00	80.00
phentermine	4.19	83.80	4.07	81.40	3.78	75.60	3.89	77.80
prednisolone	4.36	87.20	3.95	79.00	3.75	75.00	3.92	78.40
pseudoephedrine	4.43	88.60	4.16	83.2	4.28	85.60	4.02	80.40
sibutramine	4.27	85.40	4.08	81.60	3.98	79.60	3.98	79.60
sildenafil	4.29	85.80	4.29	85.80	5.16	103.20	5.06	101.20
tadalafil	3.84	76.80	4.66	93.20	3.80	76.00	3.93	78.60
vardenlafil	3.90	78.00	4.17	83.40	5.02	100.40	4.60	92.00

ตารางที่ 3 การยืนยันขีดจำกัดการตรวจวิเคราะห์สำหรับตัดสินผลบวก (cut-off) ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และผลการทดสอบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารประเภทต่าง ๆ

	samples above cut-off (n)	sample below cut-off (n)	total sample
positive test	100	0	100
negative test	0	100	100
ประเภทตัวอย่าง			
ชนิดผง	100	0	100
ชนิดเม็ด	100	0	100
ชนิดแคปซูล	100	0	100
เครื่องดื่ม	100	0	100

การทดสอบค่า %diagnostic sensitivity, %diagnostic specificity, %PPV และ %NPV

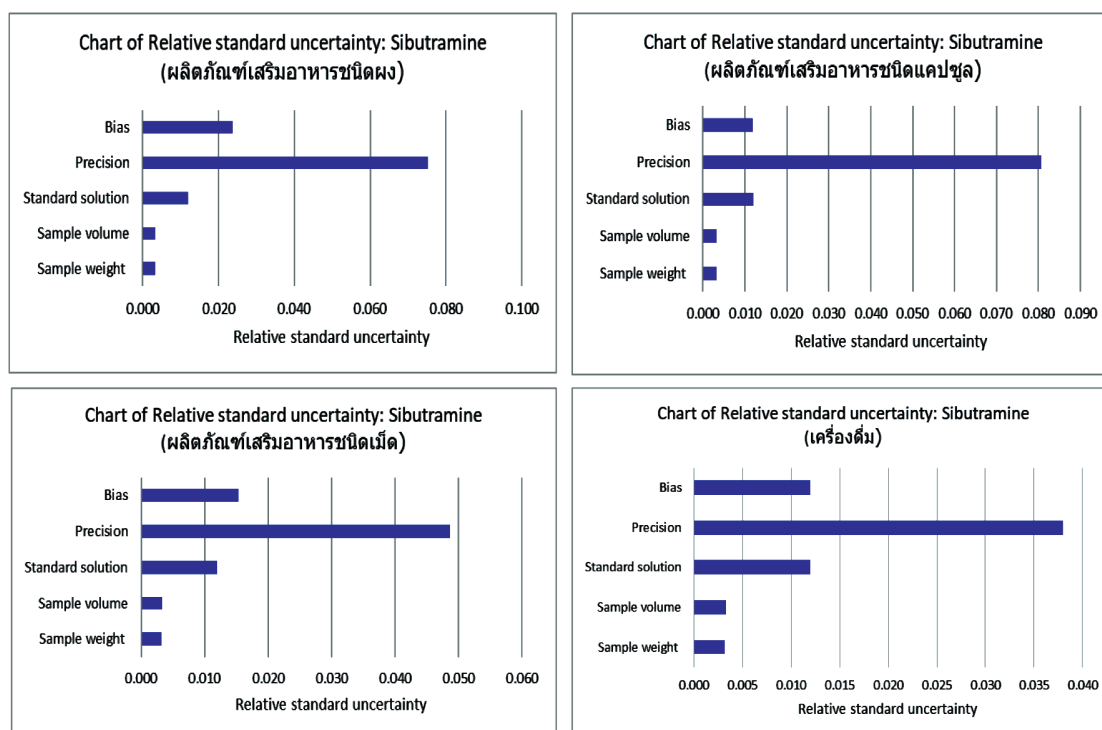
วิธีที่พัฒนาขึ้นมีค่า %diagnostic sensitivity, %diagnostic specificity, %PPV และ %NPV เท่ากับ 100% แสดงให้เห็นว่าความน่าจะเป็นของผลการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารกลุ่มเป้าหมายให้ผลเป็นลบจริง 100% และความน่าจะเป็นของผลการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีการเติมสารกลุ่มเป้าหมาย 16 ชนิด ให้ผลเป็นบวกจริง 100% ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นจึงมีความไวต่อการวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะและข้อมูลมีความน่าเชื่อถือ

จากขั้นตอนการสกัดโดยใช้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารทั้ง 4 ประเภท น้ำหนัก 1.000 ± 0.05 กรัม ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งขั้นตอนนี้มีการทดลองและศึกษาปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพผลการวิเคราะห์โดยมีการปรับค่า pH ในช่วง 1.5–2.5, 2.5–3.5 และ 3.5–4.5 เพื่อให้การสกัดมีประสิทธิภาพสูงสุดและได้สารกลุ่มเป้าหมายครบทุกชนิดพบว่าในช่วง pH 2.5–3.5 เป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุด สามารถสกัดสารกลุ่มเป้าหมายได้ครบทุกสารและให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีที่สุด ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

สามารถตรวจพบสารอยู่ในช่วงความเข้มข้น 3.84–4.77 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม คิดเป็นร้อยละการคืนกลับ พบว่าอยู่ในช่วง 76.8–95.4 ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับ⁽¹⁷⁾ ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการสกัดในช่วง pH 2.5–3.5 ด้วยตัวทำละลาย methanol:H₂O อัตราส่วน 70:30

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (measurement uncertainty)

การประเมินค่าความไม่แน่นอน โดยใช้เกณฑ์การคำนวณจากค่า standard deviation ซึ่งค่าความไม่แน่นอนที่เหมาะสมควรน้อยกว่า 2 เท่าของ predicted Horwitz's RSD⁽²⁰⁾ โดยค่าความไม่แน่นอนที่ควรจะเป็นจากการคำนวณของ sibutramine ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม ที่ระดับ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 8.00%, 8.26%, 5.26% และ 4.18% ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($k = 2$) ทั้งนี้การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีนี้ได้นำค่าความไม่แน่นอนจากทุกแหล่งมาพิจารณา ประกอบด้วย sample weight, sample volume, concentration of sample, precision และ bias ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 Chart of relative standard uncertainty ของการวิเคราะห์สาร sibutramine ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารประเภทต่างๆ จากแหล่งความไม่แน่นอน

วิจารณ์

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารประเภทต่างๆ ที่เป็นตัวแทนในการศึกษาทั้งชนิดผง เม็ด แคปซูล และ เครื่องดื่ม พบว่าผลิตภัณฑ์เสริมอาหารแต่ละประเภท มีลักษณะและส่วนประกอบหลักที่แตกต่างกัน ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ชนิดผงและแคปซูล พบว่ามีส่วนประกอบของ น้ำตาลหรือสารให้ความหวานที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ มี ส่วนผสมของวิตามิน แร่ธาตุ และสมุนไพรชนิดต่างๆ ซึ่งส่งผลกระทบต่อระบบการตรวจวิเคราะห์ ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดเม็ด พบว่าเม็ดยามีน้ำตาลหรือฟิล์มเป็น ตัวเคลือบ มีส่วนประกอบของสมุนไพรหลายชนิด ด้วย าละลายช้า ความสม่ำเสมอของตัวยาน้อย ซึ่งยากต่อการ สกัดสารกลุ่มเป้าหมายออกจากตัวอย่าง ส่วนผลิตภัณฑ์ ชนิดเครื่องดื่มที่มีลักษณะเป็นน้ำใสและตะกอนแขวนลอย มีส่วนประกอบของสมุนไพรและน้ำเป็นหลัก พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปของของเหลวจะมีการสลายตัวของ สารกลุ่มเป้าหมายได้ง่ายเมื่ออยู่ในรูปของสารสกัด จึง ได้ทำการศึกษาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีในทุกชนิด ตัวอย่างเพื่อให้มั่นใจในความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

จนได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด และเมื่อนำวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ ไปใช้จะทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้อง ไม่เกิดผล วิเคราะห์ลวง

โดยสกัดด้วย $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ อัตราส่วน 70:30 สารกลุ่มเป้าหมายถูกสกัดออกมาอยู่ในชั้นของสารละลาย ยกเว้นตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดเครื่องดื่มที่ ตัวอย่างจะรวมเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลาย เนื่องจาก คุณสมบัติความมีขี้ของน้ำ และ methanol ปรับสภาพ สารสกัดให้อยู่ในรูปของกรด⁽⁵⁾ ที่มีค่า pH อยู่ในช่วง 2.5–3.5 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมกับสารกลุ่มเป้าหมาย ทั้งหมดที่ต้องการวิเคราะห์ เนื่องจากคุณสมบัติของสาร ที่เป็น hydrophilic เลือกใช้ methanol แทนการใช้ acetonitrile และ dichloromethane ที่มีงานวิจัย ยืนยันว่า methanol สามารถสกัดสารกลุ่มเป้าหมาย ออกจากตัวอย่างทั้ง 4 ประเภทได้ดี⁽²⁰⁾ หลีกเลี่ยงการใช้ สารเคมีที่มีคลอรีนและกลุ่มไซยาไนด์เป็นองค์ประกอบที่ เป็นอันตราย การหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิติดลบ (–4 องศาเซลเซียส) เป็นการกำจัดไขมันในตัวอย่างและทำการ กรองสารละลายด้วย micro-spin filter ขนาด 0.2

ไมโครเมตร ชนิด PVDF เพื่อลดการรบกวนจาก matrix ของตัวอย่าง เนื่องจากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารมีส่วนประกอบที่หลากหลายทั้งน้ำตาล ครีมเทียม ไขมัน และสปีคประกอบของสมุนไพร

เทคนิค LC-MS/MS สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน ช่วงความเข้มข้นกว้างตั้งแต่ระดับ ppb ถึง ppm และสามารถเลือก m/z ได้ทั้ง positive และ negative mode ตรงตามคุณสมบัติของสารเป้าหมายที่ต้องการวิเคราะห์ รวมทั้งสามารถปรับตั้งค่าพารามิเตอร์ต่างๆ จากหลักการทำงานของเครื่อง เพื่อให้สารมีความจำเพาะมากยิ่งขึ้น สร้างความเชื่อมั่นในการยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์^(14,15) จึงเลือกใช้เทคนิค LC-MS/MS ในการตรวจวิเคราะห์ยาแผนปัจจุบันหรือสารกลุ่มเป้าหมายที่ปลอมปนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ซึ่งการวิเคราะห์กลุ่มสารเป้าหมายนี้สามารถทำได้หลายเทคนิค เช่น TLC แต่เป็นการตรวจวัดเบื้องต้นเท่านั้น และ GC-MS มีความยากต่อการเตรียมตัวอย่าง ซึ่งมีส่วนประกอบที่หลากหลาย โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และใช้ปริมาณของสารสกัดตัวอย่างมากกว่าเทคนิค LC-MS/MS⁽²¹⁾ จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ LC-MS/MS ที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะสูง (specificity) ใช้หลักการ mass spectrometry ตรวจวัด ion ของสารที่แยกกันด้วยค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio, m/z) ที่แตกต่างกันจึงมีความจำเพาะสูง และเลือกใช้เทคนิค electrospray ionization (ESI) เพื่อให้เกิด ionization ดียิ่งขึ้น โดยการเติมสาร 0.1% formic acid ซึ่งเป็นสาร additives ทำให้การแยกของสารที่ต้องการออกจาก matrix ได้ดียิ่งขึ้น ป้องกันการเกิด co-elute และ detector ชนิด MRM ตรวจวัดโดยเลือกค่าที่เหมาะสมสำหรับประจุแม่ (precursor ion) และประจุลูก (product ion) ที่ได้จากการแตกตัวของประจุแม่ ซึ่งเป็นค่าที่เฉพาะเจาะจงของประจุแม่กับประจุลูกคู่กัน โดย quadrupole ที่ 1 จะถูกตั้งค่าความต่างศักย์และความถี่ที่เหมาะสม เพื่อให้อิออนแตกตัวทำให้เกิด fragmentation ส่งประจุแม่ผ่านไปยัง quadrupole ที่ 2 หรือที่เรียกว่า collision cell แตกตัวให้ประจุลูกที่เสถียรและเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของประจุแม่เพื่อส่งไป quadrupole ที่ 3 ซึ่งถูกตั้งค่า

ความต่างศักย์และความถี่ สำหรับประจุลูกแต่ละตัว (product ions) ที่มีค่า response สูงและไม่มีสารอื่นรบกวนการตรวจวิเคราะห์ เช่น alprazolam เลือก m/z 309.100 เป็น precursor ion และเลือก product ion ที่ m/z 281.300 กับ 205.300 ดังแสดงในตารางที่ 1

ยาแผนปัจจุบันถูกกำหนดให้เป็นสารห้ามใช้ในอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ปริมาณของสารได้ต่ำกว่าปริมาณที่ใช้สำหรับการรักษา ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในการวิเคราะห์จึงกำหนดการควบคุมคุณภาพ (internal quality control) เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้องและมีความมั่นใจในผลการวิเคราะห์ ตัวอย่างทุก batch ทำการทดสอบ method blank, matrix blank, duplicate analysis และ spike sample ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 70–110 และเลือก identification point ซึ่งเป็นระบบการคิดเพื่อยืนยันชนิดยาในการแปลผลข้อมูล โดยการใช้จำนวน parent ion เริ่มต้น กับ daughter ion กำหนดค่าความแตกต่างสูงสุดที่ยอมรับได้ (maximum permitted tolerance) ของ relative ion intensities และเปรียบเทียบค่า RT ของสารละลายมาตรฐาน โดยกำหนดความแตกต่างสูงสุดที่ยอมรับได้ของ relative RT ตามกำหนดตามเกณฑ์มาตรฐาน Codex Alimentarius International Food Standards, Revision 2012, 2014⁽¹⁷⁾ ส่วนการยืนยันชนิดจำกัดการตรวจวัดสำหรับการตัดสินผลบวก (cut-off) ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยเลือกใช้ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม เป็นตัวแทนมีการเติมและไม่เติมสารกลุ่มเป้าหมาย ชนิดตัวอย่างละ 100 ขั้ว ถึงแม้ว่ามาตรฐานดังกล่าวระบุให้มีการทดสอบ positive test และ negative test อย่างละ 30 ขั้ว ต่อชนิดตัวอย่างสำหรับ cut-off แต่งานวิจัยนี้ได้ตระหนักถึงส่วนผสมของตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารทั้งชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม ซึ่งมีส่วนประกอบหลากหลายผสมอยู่ เช่น คอลลาเจน แอล-อาร์จินีน ซิงค์อะมิโน-แอซิดคีเลต โครเมียมพิโคลิเนต โคโคซาน อะเซโรลาเชอร์รี่ วิตามิน ไฟเบอร์ น้ำตาล กรดอะมิโน โปรตีนจากถั่วเหลือง สมุนไพร ดังกุย ผงไซเลียมฮักส์ ผงต้นข้าวสาลี สารให้ความหวาน สารสกัดจากส้ม สารสกัดจากส้มแขก สาร

สกัดจากโกจิเบอร์รี่ สารสกัดจากถั่งเช่า สารสกัดจากชั่งมดลูก สารสกัดจากเจียวกู่หลาน สารสกัดจากเมล็ดกาแฟ สารสกัดจากพริกไทยดำ สารสกัดจากกระบองเพชร สารสกัดจากถั่วขาว สารสกัดจากเมล็ดตองุ่น สารสกัดจากวาวเครือขาว สารสกัดจากทับทิม สารสกัดดอกกุหลาบ สารสกัดจากหอยนางรม และสารสกัดจากยีสต์ เป็นต้น จึงทำให้ผู้วิจัยได้รวบรวมตัวอย่างแต่ละชนิดที่มีส่วนประกอบผสมอยู่ในผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันให้ได้มากที่สุด เพื่อศึกษาปัจจัยรบกวนที่อาจจะส่งผลต่อการตรวจวิเคราะห์หยาแผนปัจจุบัน เมื่อคำนวณผล พบว่ามีค่า %diagnostic sensitivity, %diagnostic specificity, %PPV และ %NPV อยู่ที่ 100% แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะสูง ไม่มีโอกาสเกิดผลบวกлож และลบлож สร้างความมั่นใจและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ว่าสามารถตรวจวิเคราะห์หยาแผนปัจจุบันได้ครอบคลุมตัวอย่างที่มีส่วนประกอบหลากหลายได้

การตรวจวิเคราะห์การปลอมปนยาแผนปัจจุบันในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เริ่มเปิดบริการตรวจวิเคราะห์ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2550 โดยใช้เทคนิค HPLC สำหรับการตรวจวัดยาทั้ง 16 ชนิด ใช้วิธีการสกัดและตรวจวิเคราะห์ชนิดสาร 3 วิธี เพื่อให้ครอบคลุมชนิดยาทั้งหมด จึงใช้ระยะเวลานาน การตรวจวิเคราะห์ของแต่ละวิธีต้องใช้อุปกรณ์และสารเคมีที่แตกต่างกันทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย หากพบชนิดยาดังกล่าวต้องทำการยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS และ GC-MS อีกครั้ง ส่งผลให้การรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ล่าช้า ไม่ทันต่อความต้องการของผู้ใช้บริการ โดยเฉพาะในกรณีคดีความ กรณีพิเศษ และเร่งด่วน ดังนั้นจึงทำการศึกษาและพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์การปลอมปนยาแผนปัจจุบัน 16 ชนิด ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารทั้ง 4 ประเภท ด้วยเทคนิค LC-MS/MS เพื่อตอบสนองต่อการกิจและปริมาณตัวอย่างที่ส่งตรวจวิเคราะห์จำนวนมาก จากการพัฒนาวิธี พบว่าสามารถลดต้นทุนค่าใช้จ่าย ใช้ปริมาณสารเคมีน้อย สามารถตรวจวิเคราะห์ชนิดยาทั้ง 16 ชนิดได้ในวิธีเดียวกัน โดยใช้ระยะเวลาในการสกัดตัวอย่างน้อยกว่าวิธีเดิม 8 เท่า ถึงแม้กฎหมายบังคับห้ามใช้ยาในผลิตภัณฑ์โดยเด็ดขาดจึงไม่จำเป็นต้องรายงานผลปริมาณการปลอมปนยาที่ตรวจพบเชิงปริมาณ แต่วิธีที่พัฒนาสามารถวิเคราะห์สารเชิงปริมาณได้

เมื่อพิจารณาค่าความไม่แน่นอนเพื่อนำไปใช้กรณีผลการวิเคราะห์อยู่ในช่วงการตัดสินใจ (พบ/ไม่พบ) โดยใช้เกณฑ์การคำนวณจากค่า standard deviation ซึ่งค่าความไม่แน่นอนที่เหมาะสมควรมีน้อยกว่า 2 เท่าของ predicted Horwitz's $RSD_r^{(22)}$ โดยค่าความไม่แน่นอนที่ควรจะเป็นจากการคำนวณของ sibutramine ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่มที่ระดับ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 8.00%, 8.26%, 5.26% และ 4.18% ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($k = 2$) ซึ่งพบว่ามีค่าความเหมาะสมผลของความไม่แน่นอน ดังแสดงในภาพที่ 2 การเปรียบเทียบสัดส่วนค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งความไม่แน่นอนที่ส่งผลต่อปริมาณสาร sibutramine พบว่าความเที่ยงมีค่ามากที่สุดในทุกตัวอย่าง ดังนั้นจึงพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับในทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ตามมาตรฐาน Codex⁽¹⁷⁾ ซึ่งต้องอยู่ในช่วงร้อยละ 70-110 โดยเติมสารกลุ่มเป้าหมายที่ระดับความเข้มข้นระดับ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank และทำการสกัดตามขั้นตอนการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง เพื่อเป็นการตรวจสอบผลกระทบจากลักษณะตัวอย่าง (matrix effect) ที่อาจเกิดขึ้นในขั้นตอนการสกัด นอกจากนี้การเลือกใช้สารมาตรฐานและเครื่องมือที่มีค่าความไม่แน่นอนน้อย มีผลทำให้ค่าความไม่แน่นอนของวิธีลดลงได้เช่นกัน ทั้งนี้การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีนี้ได้นำค่าความไม่แน่นอนจากทุกแหล่งมาพิจารณา ประกอบด้วย sample weight, sample volume, concentration of sample, precision และ bias การรายงานผลตัวอย่างที่พบปริมาณสารปลอมปนใกล้ค่า cut-off ต้องพิจารณาค่าความไม่แน่นอนมาใช้เป็นแนวทางในการรายงานผลการทดสอบด้วยทุกครั้ง เพื่อให้เป็นไปตามกฎการตัดสินใจผลทดสอบ ทั้งนี้วัตถุประสงค์ของการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารของผู้บริโภคส่วนใหญ่เป็นการตอบสนองต่อความต้องการ โดยเน้นการให้ผลลัพธ์ที่รวดเร็วจนนำมาสู่การฉวยโอกาสของผู้ประกอบการในการเติมสารต้องห้ามลงในผลิตภัณฑ์เพื่อกระตุ้นยอดขาย ผลการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างจริง พบว่าปริมาณปลอมปนกลุ่มยามีค่าปริมาณที่น้อยที่สุดที่ 5 เท่า และมากที่สุดที่ 96,000 เท่า ของ cut-off

จากรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากห้องปฏิบัติการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2564-2565 พบว่าในปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 ตัวอย่างจำนวน 599 ตัวอย่าง พบการปลอมปน 81 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 13.5 และปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 ตัวอย่างจำนวน 579 ตัวอย่าง พบการปลอมปน 79 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 13.6 โดยชนิดยาที่ตรวจพบมากที่สุด คือ sildenafil เป็นยากระตุ้นสมรรถภาพทางเพศ sibutramine เป็นยาควบคุมน้ำหนัก และพบยากลุ่มอื่น ได้แก่ bisacodyl, desoxy-D₂PM, dexamethasone, fluoxetine, prednisolone และ tadalafil นอกจากนี้พบผลิตภัณฑ์ที่มีการปลอมปนชนิดยา 2 ชนิด ในตัวอย่างเดียวกัน ลักษณะเสริมฤทธิ์กัน เช่น พบ bisacodyl ร่วมกับ sibutramine หรือ dexamethasone ร่วมกับ prednisolone หรือ fluoxetine ร่วมกับ sibutramine หรือ sildenafil ร่วมกับ tadalafil และพบ 3 ชนิดยารวมกัน ได้แก่ fluoxetine, sibutramine และ sildenafil นอกจากนี้วิธีวิเคราะห์ยาแผนปัจจุบันที่ปลอมปนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโดยเทคนิค LC-MS/MS ได้รับการขึ้นทะเบียนเป็นห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ และเปิดให้บริการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยเริ่มใช้ตราสัญลักษณ์การรับรองมาตรฐานดังกล่าวในวันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2565

สรุป

การตรวจวัดยาแผนปัจจุบันที่มีการปลอมปนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารด้วยเทคนิค LC-MS/MS ที่ได้พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารเป้าหมายได้ 16 ชนิด ได้แก่ alprazolam, bisacodyl, desoxy-D₂PM, dexamethasone, diazepam, ephedrine, fenfluramine, fluoxetine, phenolphthalein, phentermine, prednisolone, pseudoephedrine, sibutramine, sildenafil, tadalafil และ vardenafil โดยมีความจำเพาะต่อชนิดของสารเป้าหมายที่ทำการวิเคราะห์ มีขีดจำกัดการตรวจวัดที่ต่ำ ไม่เกิดผลบวกปลอม และผลลบปลอม แสดงถึงความถูกต้องแม่นยำ ความน่าเชื่อถือ

ของผลวิเคราะห์ ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์สั้น ผลการตรวจวิเคราะห์เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน สามารถนำวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดผง เม็ด แคปซูล และเครื่องดื่ม ที่มีส่วนประกอบ ลักษณะผลิตภัณฑ์ และสถานะของตัวอย่างที่แตกต่างกันได้ ดังนั้นวิธีดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ เพื่อดำเนินคดีความควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมายคุ้มครองผู้บริโภค และรองรับกฎหมายของประเทศต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ หัวหน้าห้องปฏิบัติการยาสัตว์และวัตถุออกฤทธิ์ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่สนับสนุนการศึกษาวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ช่วยดำเนินการพัฒนาวิธีวิเคราะห์และสนับสนุนในทุกขั้นตอนจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. กองอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่เป็นอันตรายและผิดกฎหมาย. [ออนไลน์]. 2561; [สืบค้น 20 ก.ค. 2564]; [34 หน้า]. เข้าถึงได้: URL: <https://www.fda.moph.go.th/sites/food/FileNews/DangerousSupplements.pdf>.
2. กองควบคุมวัตถุเสพติด สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. โรคอ้วนและปัญหาการใช้ยาลดความอ้วน. [ออนไลน์]; [สืบค้น 20 ก.ค. 2564]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้: URL: <https://mnfda.fda.moph.go.th/narcotic/?p=6079>.
3. กองยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ข้อมูลยาสำหรับบุคลากรทางการแพทย์ ยาเพรดนิโซโลน (Prednisolone) 2.5 มิลลิกรัม ชนิดเม็ด 5 มิลลิกรัม ชนิดเม็ด และชนิดแคปซูล. [ออนไลน์]; [สืบค้น 20 ก.ค. 2564]; [31 หน้า]. เข้าถึงได้: URL: http://ndi.fda.moph.go.th/uploads/drug_doc/SPC-Prednisolone-Tablet-19-5-59_edit_13-4-61.pdf.

4. กองยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. เดกซาเมทาโซน 0.25, 0.5, 4 มิลลิกรัม ชนิดเม็ด. [ออนไลน์]; [สืบค้น 20 ก.ค. 2564]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://ndi.fda.moph.go.th/uploads/drug_doc/PIL_Dexamethasone_Tab_025.pdf.
5. Singh S, Prasad B, Savaliya AA, Shah RP, Gohil VM, Kaur A. Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and their analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs. *TrAC Trends Anal Chem* 2009; 28(1): 13–28.
6. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 293 (พ.ศ. 2548) เรื่อง ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 122 ตอนพิเศษ 150 ง (วันที่ 28 ธันวาคม 2548).
7. สำนักงานและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อวัตถุออกฤทธิ์ พ.ศ. 2561. [ออนไลน์]. 2561; [สืบค้น 21 ก.ค. 2564]. เข้าถึงได้ที่ : <https://website.bdn.go.th/th/knowledge/detail/qQScZUtk>.
8. กองยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ยาควบคุมพิเศษ. [ออนไลน์]. [สืบค้น 21 ก.ค. 2564]. เข้าถึงได้ที่: <https://www.fda.moph.go.th/sites/drug/SitePages/Law03-03.aspx>.
9. กองยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ยาอันตราย. [ออนไลน์]. [สืบค้น 21 ก.ค. 2564]. เข้าถึงได้ที่: <https://www.fda.moph.go.th/sites/drug/SitePages/Law03-04.aspx>.
10. สำนักงานและวัตถุเสพติด. วิถีมาตรฐานสำหรับการตรวจพิสูจน์สารเสพติดในปัสสาวะ เล่มที่ 1. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2558.
11. Phattanawasin P, Sotanaphun U, Sukwat-tanasini T, Akkarawarantorn J, Kitchaiya S. Quantitative determination of sibutramine in adulterated herbal slimming formulations by TLC–image analysis method. *Forensic Sci Int* 2012; 219: 96–100.
12. Lv D, Cao Y, Lou Z, Li S, Chen X, Chai Y, et al. Rapid on-site detection of ephedrine and its analogues used as adulterants in slimming dietary supplements by TLC–SERS. *Anal Bioanal Chem* 2015; 407(5): 1313–25.
13. Minh DTC, Thi LA, Huyen NTT, Vu LV, Anh NTK, Ha PTT. Detection of sildenafil adulterated in herbal products using thin layer chromatography combined with surface enhanced Raman spectroscopy: “Double coffee–ring effect” based enhancement. *J Pharm Biomed Anal* 2019; 174: 340–7.
14. Woo H, Kim JW, Han KM, Lee JH, Hwang IS, Kim J, et al. Simultaneous analysis of 17 diuretics in dietary supplements by HPLC and LC–MS/MS. *Food Addit Contam Part A* 2013; 30(2): 209–17.
15. Shi Y, Sun C, Gao B, Sun A. Development of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of eight adulterants in slimming functional foods. *J Chromatogr A* 2011; 1218: 7655–62.
16. World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization (FAO). Recommended methods of sampling for the determination of pesticide residues for compliance with MRLs; CAC/GL 33–1999. Rome, Italy: Codex Alimentarius International Food safety Standards; 1999.
17. World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization (FAO). Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals; CAC/GL 71 2009. Adopted 2009, Revision 2012, 2014. Rome, Italy: Codex Alimentarius International Food safety Standards; 2017.

18. Drug Dosage. [online]; [cited 2021 Jul 20]; [4 screens]. Available from: URL: <https://www.drugs.com/dosage>.
19. Annex D-notes on qualitative analysis. In: Magnusson B, Ömemark U, editors. Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. United Kingdom: Eurachem; 2014. p. 56-58.
20. Rocha T, Amaral JS, Oliveira MBPP. Adulteration of dietary supplements by the Illegal addition of synthetic drugs: a review. Compr Rev Food Sci Food Saf 2016; 15: 43-62.
21. LC-MS/MS in drugs of abuse testing for target screening and quantitative confirmation. [online]; [cited 2021 Jul 20]; [4 screens]. Available: URL: <https://chromsystems.com/en/lc-ms-ms-in-drugs-of-abuse-testing-for-target-screening-and-quantitative-confirmation>.
22. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.

The Method Development of Modern Drugs Adulterated in Dietary Supplement Products by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

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

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

ABSTRACT The dietary supplement products that claim to aid in weight loss, enhance sexual performance, improve skin health, or cure health problems might be intentionally adulterated with psychotropic substances or modern drugs. Misusing these substances can lead to serious health issues or even death. This study aimed to develop the qualitative analysis method for detecting the adulteration of 16 modern drugs, which are commonly used in dietary supplement products, including powder, tablet, capsule and beverages. The extraction method involved dissolving the sample in a MeOH:H₂O (70:30) solution and adjusting its pH to acid and then the extraction solution was analyzed by LC-MS/MS after a 10-fold dilution. This developed method provided a limit of detection for confirming (cut-off) at 5 mg/kg for all categories of the sample. The validation indicated that this method showed 100% of %diagnostic sensitivity, %diagnostic specificity, %positive predictive value, and %negative predictive value. Moreover, it was simultaneously used to analyze 16 modern drugs in a single run that reducing the use of chemical substances and time consuming. Overall, this developed method is highly beneficial for ensuring that dietary supplement products comply with the laws and for consumer protection.

Keywords: Method development, Modern drugs, Dietary supplement products, LC-MS/MS

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ รีบาวติโอไซด์ เอ และสติวโอไซด์ในน้ำหวาน ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

สุธาทิพย์ วิทย์ชัยวุฒินวงศ์ และ ศิริธร พุ่มซ้อน

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ รีบาวติโอไซด์ เอ และสติวโอไซด์ เป็นสารในกลุ่มสตีวียอลไกลโคไซด์ที่สกัดได้จากหญ้าหวาน โดยทำหน้าที่เป็นสารให้ความหวานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 418 พ.ศ. 2563 การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนารูปแบบการวิเคราะห์รีบาวติโอไซด์ เอ และสติวโอไซด์โดยทดสอบความใช้ได้ของวิธีและประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในน้ำหวานด้วยเครื่อง HPLC เครื่องตรวจวัดชนิดอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร คอลัมน์ Capcell pak C18 MG II วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของ acetonitrile และ 10 mM โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต pH 2.6 อัตราส่วน 32:68 ผลการทดลองพบว่า ขีดจำกัดของการตรวจพบเท่ากับ 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 4.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ช่วงของการวัดและความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 2.0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 1 ความแม่นยำของวิธีประเมินจากร้อยละของการคืนกลับที่ความเข้มข้น 4.0, 28 และ 140 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของรีบาวติโอไซด์ เอ อยู่ในช่วงร้อยละ 96.5-106.9 และสติวโอไซด์อยู่ในช่วงร้อยละ 96.0-109.8 ความเที่ยงของรีบาวติโอไซด์ เอ และสติวโอไซด์มีค่าที่ยอมรับได้ ($HORRAT < 2$) intermediate precision คำนวนจากผลการวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุมคุณภาพของรีบาวติโอไซด์ เอ และสติวโอไซด์ เท่ากับ 0.36 และ 0.45 ตามลำดับ สรุปได้ว่าวิธีนี้เหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์รีบาวติโอไซด์ เอ และสติวโอไซด์ในน้ำหวานในห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ: รีบาวติโอไซด์ เอ, สตีวโอไซด์, น้ำหวาน, วิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Corresponding author E-mail: suthatip.v@dmsc.mail.go.th

Received: 26 January 2023

Revised: 2 June 2023

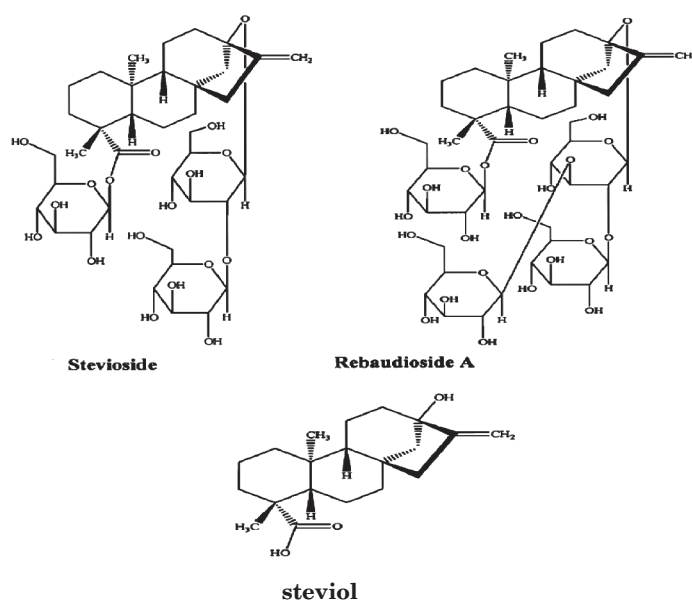
Accepted: 7 June 2023

บทนำ

หญ้าหวานเป็นพืชพื้นเมืองของประเทศบราซิล และทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศปารากวัย ในทวีปอเมริกาใต้ หลายประเทศมีการบริโภคหญ้าหวาน มาเป็นเวลานาน สำหรับประเทศไทยมีการนำเข้าหญ้าหวาน มาปลูกในปี พ.ศ. 2518⁽¹⁾ สารสกัดจากใบหญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana* Bertoni วงศ์ Asteraceae) เรียกว่า สตีวียอลไกลโคไซด์ เป็นสารประกอบไกลโคไซด์ ของสารกลุ่มไดเทอพีน ปี พ.ศ. 2528 มีรายงาน การศึกษาว่า สตีวียอลไกลโคไซด์ทำให้เกิดการ กลายพันธุ์ในหนูทดลอง องค์การอาหารและยาของ สหรัฐอเมริกา (US FDA) ประกาศว่าสารชนิดนี้ ไม่ปลอดภัย ห้ามใช้เป็นสารปรุงแต่งในอาหาร ส่ง ผลกระทบไปทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย ต่อมา JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) และ EFSA (European Food Safety Authority) ของกลุ่มประเทศยุโรป มี

การทบทวนเอกสารวิชาการและประเมินความปลอดภัย ของสารดังกล่าวและเห็นร่วมกันว่า สตีวียอลไกลโคไซด์ ไม่ทำให้เกิดมะเร็ง (carcinogenic) การกลายพันธุ์ (genotoxic) หรือมีผลต่อระบบสืบพันธุ์ (reproductive/ developmental toxicity) จึงมีการอนุญาตให้ใช้ใน อาหาร โดยกำหนดค่า ADI (acceptable daily intake) ของสตีวียอลไกลโคไซด์ (แสดงในรูปสตีวียอล) (ADI for steviol glycosides, expressed as steviol equivalents) 0-4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว (กิโลกรัม) ต่อวัน⁽²⁾

รีบาดีโอไซด์ เอ และสตีวียโอไซด์ เป็นสารประกอบ ไกลโคไซด์ของสารกลุ่มไดเทอพีน เรียกว่า สตีวียอล ไกลโคไซด์ ได้จากการสกัดใบของต้นหญ้าหวานที่เป็น สารประกอบส่วนใหญ่และมีสารประกอบสตีวียอลไกล- โคไซด์อื่นๆ อีกเล็กน้อย โครงสร้างสารประกอบไกลโคไซด์หลัก (รีบาดีโอไซด์ เอ และสตีวียโอไซด์) และสตีวียอล (steviol)⁽³⁾ ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของสตีวียโอไซด์ รีบาดีโอไซด์ เอ และสตีวียอล⁽³⁾

สารสกัดสตีวียอลไกลโคไซด์ใช้เป็นวัตถุเจือปน อาหารประเภทสารให้ความหวาน ลักษณะเป็นผงสีขาว ถึงสีเหลืองอ่อน ละลายได้ดีในน้ำ ให้ความหวานประมาณ 200-300 เท่าของน้ำตาล มีความคงตัวต่ออุณหภูมิและ การถูกไฮโดรไลซ์ จึงเหมาะกับการใช้ในอาหาร^(4,5) ตาม

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 418 พ.ศ. 2563 เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์ เงื่อนไข วิธีการใช้ และอัตราส่วน ของวัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 2)⁽⁶⁾ อนุญาตให้ใช้ สตีวียอลไกลโคไซด์ในเครื่องดื่มแต่งกลิ่นรส ปริมาณสูงสุด ที่อนุญาต 115 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีเงื่อนไขคำนวณ

เป็นสตีวียอไซด์ ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหาร และยา เรื่อง คำชี้แจงประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 418 พ.ศ. 2563⁽⁷⁾

การรองรับการให้บริการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงได้ศึกษาและทดสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์รีบาวดีไฮโดรเจน เอ และสตีวียอไซด์ในน้ำหวาน เพื่อให้เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการ และสามารถรองรับความต้องการของผู้รับบริการจากการตรวจวิเคราะห์ที่ผ่านมาพบสตีวียอไซด์ไกลโคไซด์อื่นๆ ในปริมาณที่น้อยกว่า 1 เมื่อคำนวณเป็นสตีวียอไซด์ ดังนั้นห้องปฏิบัติการจึงตรวจวิเคราะห์เพียงสาร 2 ชนิดนี้ โดยการเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำ แล้วกำจัดสิ่งรบกวนตามหลักการ solid phase extraction (SPE) ของ Yoshimi Kitada, Michiko Sasaki and Yutaka Yamazoe⁽⁸⁾ จากนั้นตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง HPLC เครื่องตรวจวัดชนิด UV⁽⁹⁾ และทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว⁽¹⁰⁾

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ: solid phase extraction, SPE (Bond Elute C18, 500 mg 3 ml) (Agilent Technologies, USA), ขวดปริมาตรขนาด 5, 10, 20, 50, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร, กระบอกตวงขนาด 200 มิลลิลิตร, ขวดขนาด 2 มิลลิลิตร, ตัวกรองชนิด regenerate cellulose (RC) 0.45 ไมครอน ขนาด 13 มิลลิเมตร

เครื่องมือและอุปกรณ์: HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) (Waters, รุ่น Alliance 2695, USA) พร้อมด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดยูวี (UV detector, รุ่น 2487) เครื่องชั่งความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม (Mettler Toledo, รุ่น PG403-S, Switzerland) เครื่องชั่งความละเอียด 0.01 มิลลิกรัม (Mettler Toledo, รุ่น XS 205, Switzerland) vacuum pump (GAST, รุ่น DOA-P504-BN, USA) และ vacuum manifold

สภาวะของเครื่อง HPLC: คอลัมน์ Capcell pak C18 MG II (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m, Shiseido

Co. Ltd, Japan) Lot No. A4AD11485 พร้อมด้วยการัดคอลัมน์ชนิดเดียวกัน ความยาวคลื่นของเครื่องตรวจวัดชนิดยูวีที่ 210 นาโนเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ acetonitrile และ 10 mM โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต pH 2.6 อัตราส่วน 32:68 อัตราการไหล 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที ตู้อบคอลัมน์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และปริมาตรที่ฉีด 5 ไมโครลิตร

สารมาตรฐาน: รีบาวดีไฮโดรเจน เอ (purity 99.3%) Lot No. TWK 6296 และสตีวียอไซด์ (purity 100.0%) Lot No. ECH3470 (WAKO, Japan)

การเตรียมสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน 1: รีบาวดีไฮโดรเจน เอ ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งสารมาตรฐาน รีบาวดีไฮโดรเจน เอ 0.0101 กรัม ใส่ขวดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย 30% acetonitrile

สารมาตรฐาน 2: สตีวียอไซด์ ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งสารมาตรฐาน สตีวียอไซด์ 0.0100 กรัม ใส่ขวดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย 30% acetonitrile

สารมาตรฐาน 3: รีบาวดีไฮโดรเจน เอ และสตีวียอไซด์ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยปิเปตสารมาตรฐาน 1 และ 2 อย่างละ 2 มิลลิลิตร ใส่ขวดปริมาตรขนาด 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 30% acetonitrile

สารมาตรฐาน 4: รีบาวดีไฮโดรเจน เอ และสตีวียอไซด์ ความเข้มข้น 2, 5, 10, 20, 40, 60 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยปิเปตสารมาตรฐาน 3 ปริมาตร 100, 250, 500, 1,000, 2,000, 3,000 และ 4,000 ไมโครลิตร แยกใส่ขวดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 30% acetonitrile

สารเคมีและวิธีเตรียม: acetonitrile (HPLC) (Supelco, China), methanol (HPLC) (Supelco, Germany), acetone (HPLC) (Honeywell, USA), 80% acetonitrile, 30% acetonitrile, 20% acetonitrile, โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (HPLC) (Sigma-Aldrich, Switzerland), กรดฟอสฟอริก (AR) (J.T.Baker, USA), น้ำ (น้ำมีความต้านทาน $\geq$ 10-18 m Ω .cm) และ 10 mM โพแทสเซียมไฮโดรเจน

ฟอสเฟต (ซังโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.2 กรัม ใส่ขวดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ แล้วปรับ pH เป็น 2.6 ด้วยกรดฟอสฟอริก)

ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบวิธี: น้ำหวานเข้มข้น (เฮลซ์บลูบอย รุ่นการผลิต 01-12-2020) นำมาเจือจางตามฉลากระบุ น้ำหวาน 1 ส่วน ต่อ น้ำ 5 ส่วน โดยเตรียม 3 ลิตร

วิธีวิเคราะห์: ซังตัวอย่าง 35 กรัม ใส่ขวดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำผสมให้เข้ากัน ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ใส่ใน SPE (การเตรียม SPE: ซะด้วยตัวทำละลายตามลำดับ ดังนี้ acetone 5 มิลลิลิตร methanol 5 มิลลิลิตร น้ำ 5 มิลลิลิตร และ 20% acetonitrile 10 มิลลิลิตร) จากนั้นล้าง SPE ด้วยน้ำ 3 มิลลิลิตร ตามด้วย 20% acetonitrile 10 มิลลิลิตร ซะสารที่ต้องการด้วย 80% acetonitrile 2 มิลลิลิตร ลงในขวดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ แล้วกรองผ่านตัวกรองชนิด RC ตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง HPLC

การคำนวณ

รีบาดีโอไซด์ เอ หรือสตีวียอไซด์ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) = $\frac{C \times V}{W}$

C = ความเข้มข้นที่อ่านจากกราฟมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

V = ปริมาตรที่ปรับ (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

Performance characteristic ที่ใช้ทดสอบวิธี⁽¹⁰⁾

ช่วงของการวัดและความเป็นเส้นตรง (working range and linearity): ตรวจวัดสารมาตรฐาน 3 และ 4 แบบสุ่ม ความเข้มข้นละ 3 ซัง สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เกณฑ์ R^2 มากกว่า 0.995

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD): เติมสารมาตรฐานในตัวอย่างที่ใช้ทดสอบวิธีให้ได้

ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตรวจวิเคราะห์ 10 ซัง เกณฑ์ตรวจพบสัญญาณทุกตัวอย่างที่ทำซ้ำ (ประมาณค่า LOD โดยวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซัง คำนวณค่า standard deviation (SD) แล้วคำนวณค่า LOD จากสูตร $LOD = 3SD$)

ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ): เติมสารมาตรฐานในตัวอย่างที่ใช้ทดสอบวิธีให้ได้ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตรวจวิเคราะห์ 10 ซัง เกณฑ์ร้อยละการกลับคืน (%recovery) อยู่ในช่วง 80–110% และ HORRAT น้อยกว่า 2 (ประมาณค่า LOQ โดยวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซัง คำนวณค่า SD แล้วคำนวณค่า LOQ จากสูตร $LOQ = 10SD$)

matrix effect: เตรียมสารมาตรฐานเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน 3 และ 4 โดยใช้สารละลายที่สกัดจากตัวอย่างที่ใช้ทดสอบวิธีปรับปริมาตรแทนน้ำ ตรวจวัดความเข้มข้นละ 1 ซัง เกณฑ์ confidence interval (CI) ของ slope กลุ่ม 1 และ CI ของ y-intercept กลุ่ม 0

ความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision): เติมสารมาตรฐานในตัวอย่างที่ใช้ทดสอบวิธีให้ได้ความเข้มข้น 28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 140 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 7 ซัง เกณฑ์ร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 90–107% และ HORRAT น้อยกว่า 2

ความเฉพาะเจาะจง (selectivity): ฉีดสารมาตรฐานแอสพาแตม ซัคคาริน อะซีซัลเฟม-เค และซูคราโลส ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบว่า RT ไม่ตรงกัน

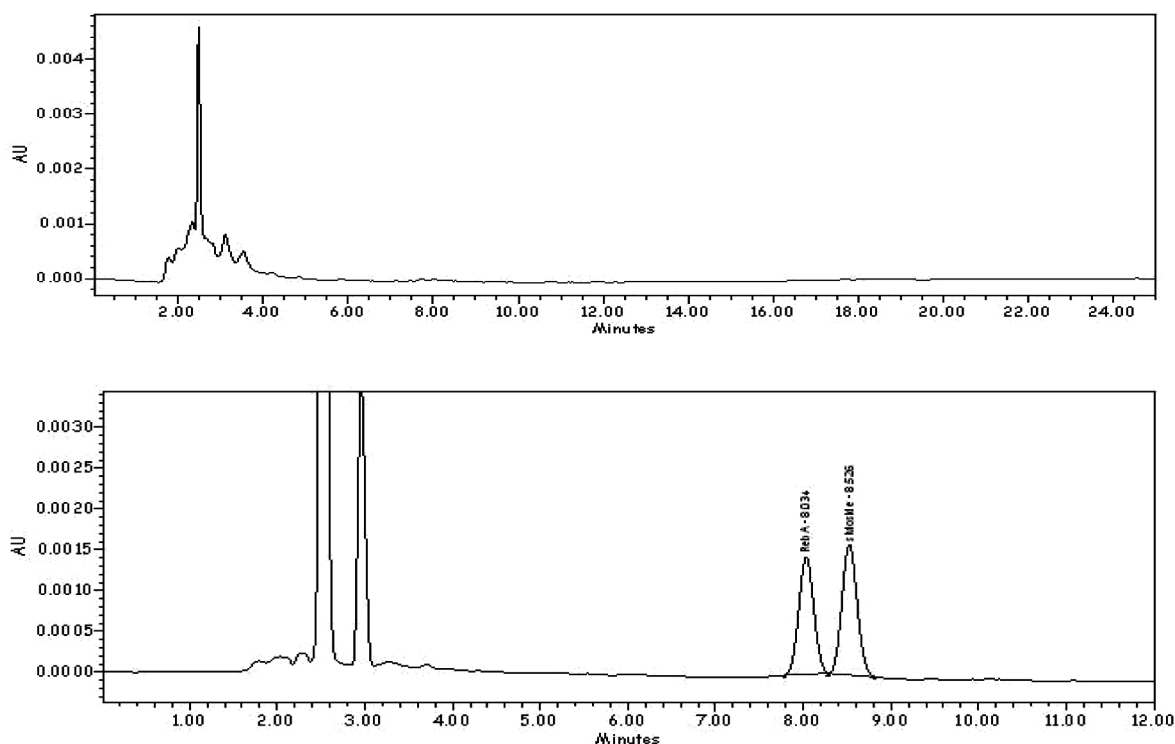
การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (estimation of measurement uncertainty)⁽¹¹⁾

ประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 โดยคำนึงถึงแหล่งความไม่แน่นอนทุกแหล่ง เมื่อรวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผล

ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบวิธีไม่พบสัญญาณของ ริบาวดีไฮโดรเจน เอ และสตีวียอไซด์ เมื่อฉีดสารมาตรฐาน ผสม พบการแยกของพีคของริบาวดีไฮโดรเจน เอ และ

สตีวียอไซด์ (peak resolution = 1.62) ดังแสดงในภาพที่ 2 ส่วนการทดสอบการรบกวนของสารให้ความหวานชนิดอื่น ได้แก่ แอสพาแตม ซัคคาริน อะซีซัลเฟม-เค และซูคราโลส ที่อาจมีการเติมในผลิตภัณฑ์ร่วมกับสารริบาวดีไฮโดรเจน เอ และสตีวียอไซด์ ดังแสดงในภาพที่ 3

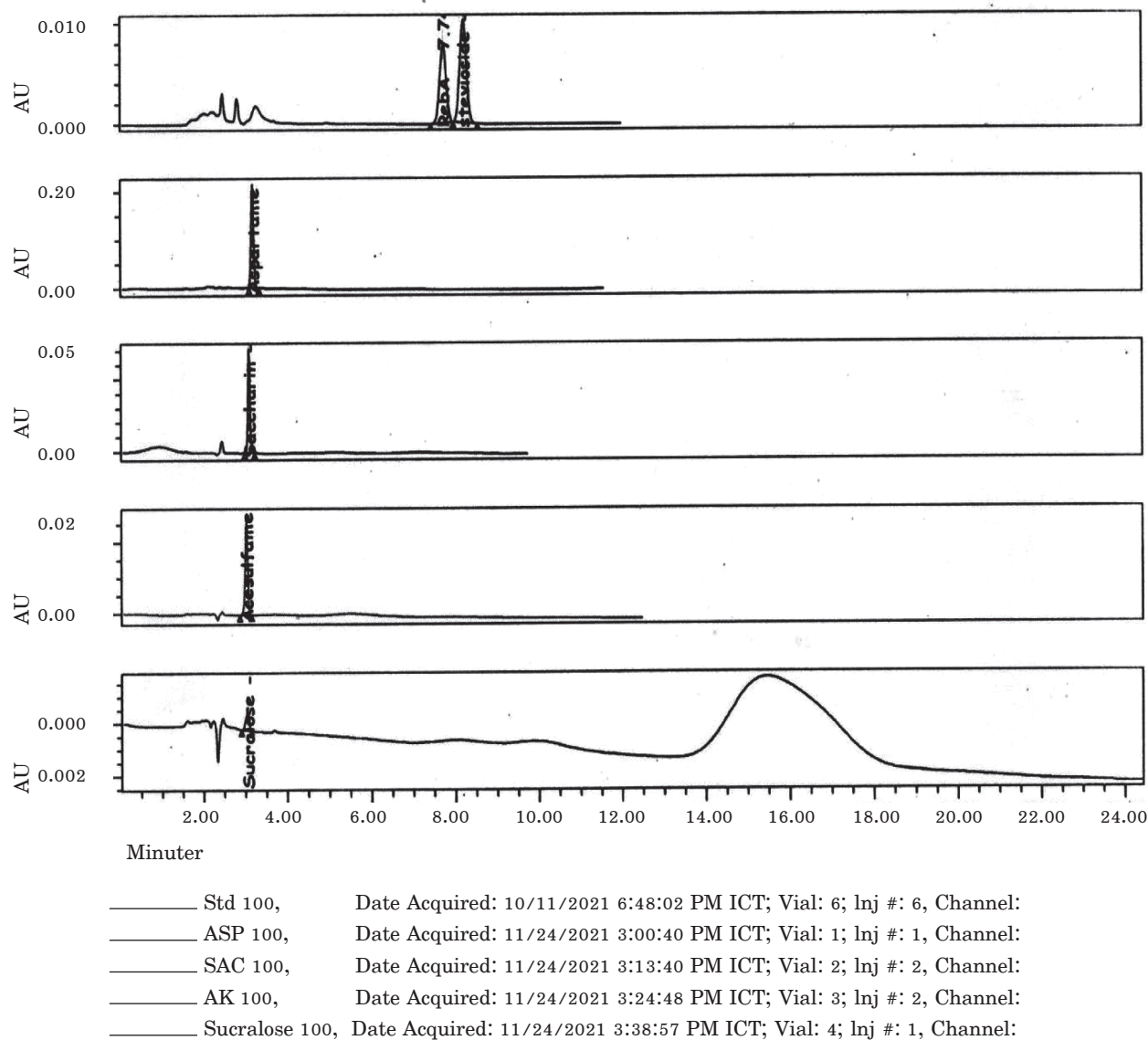


ภาพที่ 2 Chromatogram ของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบวิธี (ภาพบน) และ chromatogram ของสารมาตรฐานริบาวดีไฮโดรเจน เอ และสตีวียอไซด์ ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพล่าง)

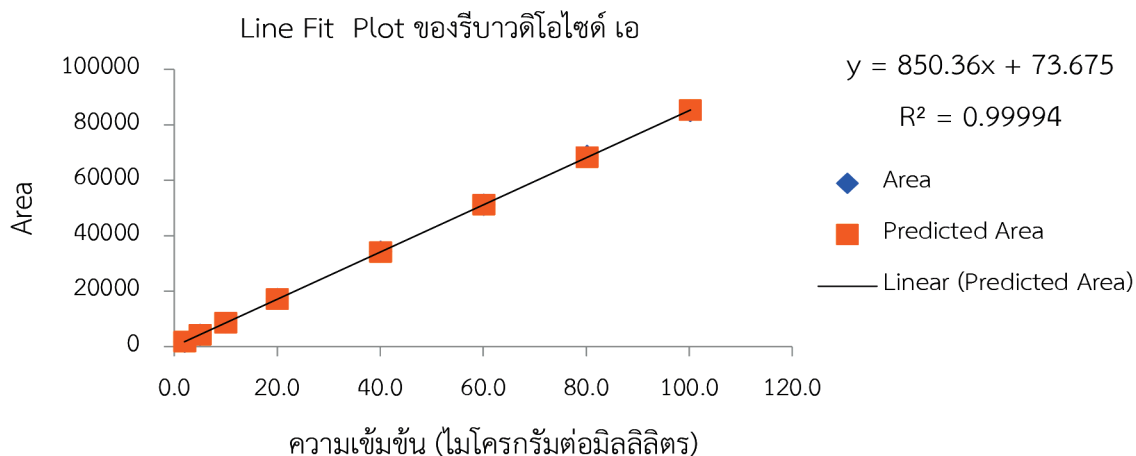
จากการตรวจวัดสารมาตรฐาน 8 ระดับ ที่ความเข้มข้น 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบช่วงของการวัดและความเป็นเส้นตรงของ ริบาวดีไฮโดรเจน เอ และสตีวียอไซด์ ดังแสดงในภาพที่ 4 และ 5 Residual plot ของริบาวดีไฮโดรเจน เอ และสตีวียอไซด์ ดังแสดงในภาพที่ 6 และ 7

ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบวิธีที่เติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (LOD) ตรวจพบทุกการวิเคราะห์ 10 ซ้ำ ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธี ความแม่นยำของการวิเคราะห์ ที่ความเข้มข้น 4.0 (LOQ) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้น 28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และความเข้มข้น 140 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่าเฉลี่ยและ SD ของร้อยละการกลับคืนของริบาวดีไฮโดรเจน เอ เท่ากับ $101.5 \pm 3.10\%$,

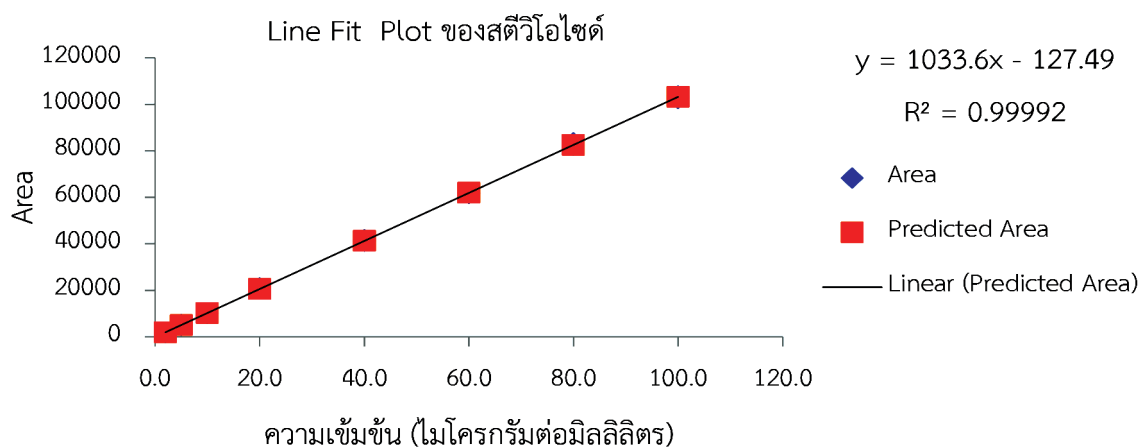
$99.8 \pm 0.72\%$ และ $98.5 \pm 1.41\%$ ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยและ SD ของร้อยละการกลับคืนของสตีวียอไซด์ที่ความเข้มข้น 4.0 (LOQ) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้น 28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และความเข้มข้น 140 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ $107.1 \pm 2.72\%$, $99.0 \pm 1.55\%$ และ 99.6 ± 1.71 ตามลำดับ ความเที่ยงของการวิเคราะห์ คำนวณค่า HORRAT ของริบาวดีไฮโดรเจน เอ ที่ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 140 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 0.36, 0.12 และ 0.28 ตามลำดับ ค่า HORRAT ของสตีวียอไซด์ที่ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 140 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เท่ากับ 0.30, 0.24 และ 0.34 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1



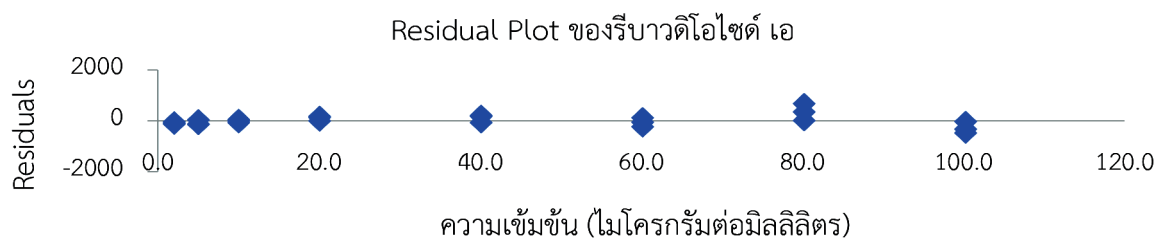
ภาพที่ 3 Chromatogram ของสารมาตรฐานรีบาวิตไอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ (Std 100) แอสพาแตม (ASP 100) ซัคคาริน (SAC 100) อะซีซัลเฟม-เค (AK 100) และซูคราโลส (Sucralose 100)



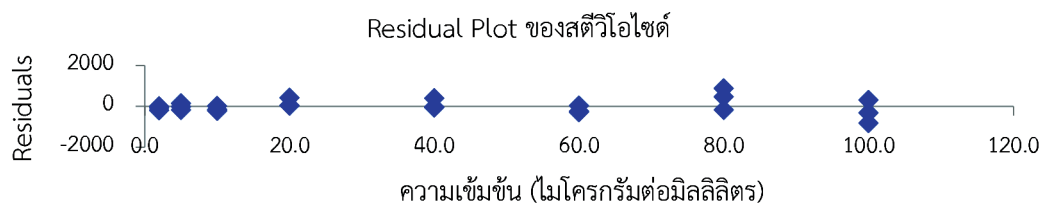
ภาพที่ 4 ช่วงและความเป็นเส้นตรงของรีบาวิตไอไซด์ เอ



ภาพที่ 5 ช่วงและความเป็นเส้นตรงของสตีวียโอไซด์



ภาพที่ 6 Residual plot ของรีบาวติโอไซด์ เอ



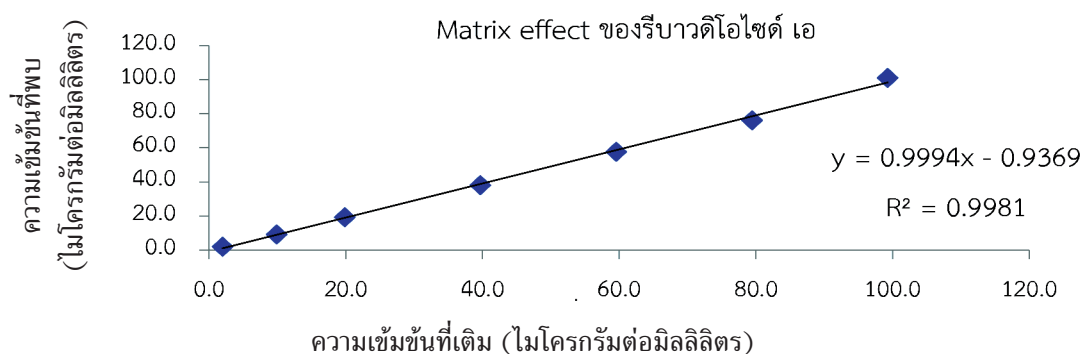
ภาพที่ 7 Residual plot ของสตีวียโอไซด์

ตารางที่ 1 %recovery, %RSD และ HORRAT ของรีบาวติโอไซด์ เอ และสตีวียโอไซด์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ

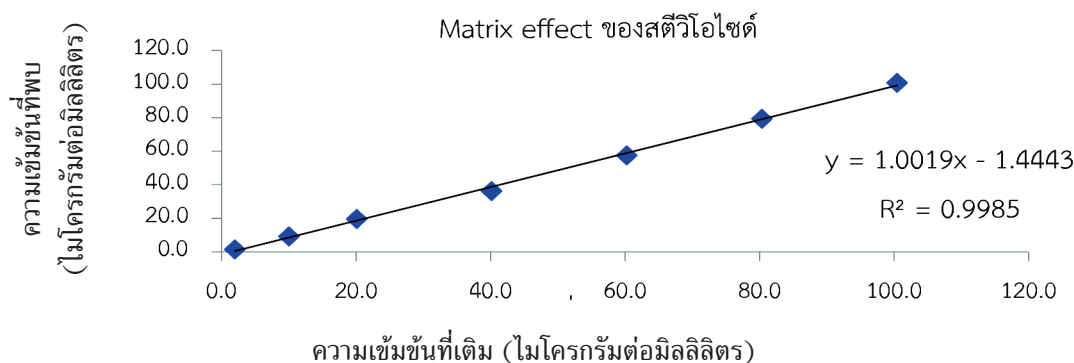
	ความเข้มข้นที่เติม (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	%recovery ค่าเฉลี่ย±SD	%RSD	HORRAT
รีบาวติโอไซด์ เอ	4.0 (LOQ)	101.5±3.10	3.04	0.36
	28	99.8±0.72	0.72	0.12
	140	98.5±1.41	1.43	0.28
สตีวียโอไซด์	4.0 (LOQ)	107.1±2.72	2.54	0.30
	28	99.0±1.55	1.57	0.24
	140	99.6±1.71	1.71	0.34

ผลการทดสอบ matrix effect ของรีบา-
ดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ ดังแสดงในภาพที่ 8 และ 9
ตามลำดับ เมื่อทดสอบช่วงความเข้มข้นของ slope และ
intercept พบว่าค่า CI ของ slope ของรีบา-ดิโอไซด์ เอ

เท่ากับ 0.95 และ 1.05 CI ของ y-intercept ของ
รีบา-ดิโอไซด์ เอ เท่ากับ -3.74 และ 1.87 ค่า CI ของ
slope ของสตีวิโอไซด์ เท่ากับ 0.96 และ 1.05 CI ของ
y-intercept ของสตีวิโอไซด์ เท่ากับ -3.97 และ 1.09



ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานรีบา-ดิโอไซด์ เอ ที่เติมและความเข้มข้นที่พบ



ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานสตีวิโอไซด์ที่เติมและความเข้มข้นที่พบ

เมื่อนำข้อมูลตัวอย่างควบคุมคุณภาพ (quality control sample; QC sample) ซึ่งเป็นตัวอย่างน้ำหวานที่มีการเติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยเตรียมไว้ประมาณ 1.2 ลิตร และนำมาตรวจวิเคราะห์ 2 ซ้ำ ทุกรอบการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เข้ามา

ในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์แต่ละรอบ ดังแสดงในตารางที่ 2 ข้อมูลดังกล่าวใช้คำนวณค่า intermediate precision (s_I) โดยใช้สถิติ One way ANOVA⁽¹²⁾ คำนวณ s_I ด้วยสมการดังนี้

$$\text{Intermediate precision, } s_I = \sqrt{s_r^2 + s_{\text{between}}^2}$$

.....สมการที่ 1

$$\text{Within-group variance, } s_r = \sqrt{MS_w}$$

.....สมการที่ 2

$$\text{Between group variance, } s_{\text{between}} = \sqrt{(MS_b - MS_w)/n}$$

.....สมการที่ 3

โดย MS_w = within-group mean square

MS_b = between group mean square

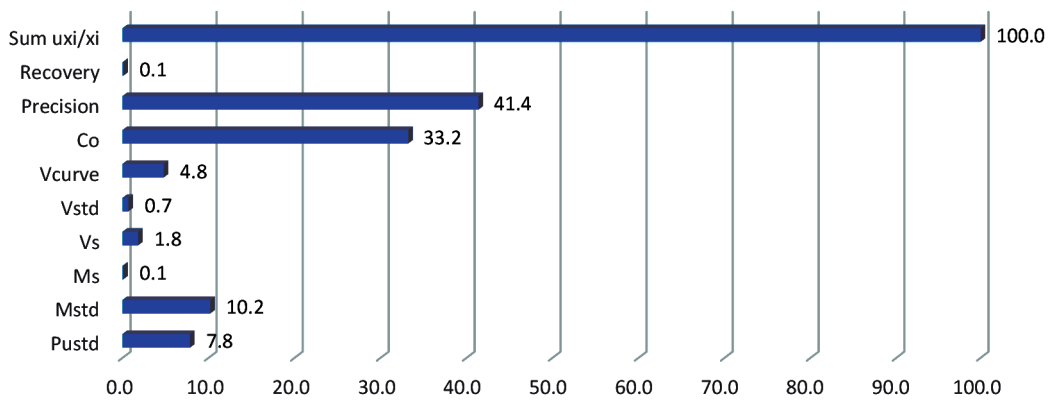
พบว่า s_I ของรีบา-ดิโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ เท่ากับ 0.36 และ 0.45 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 Intermediate precision ผลวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุมคุณภาพของรีบาวติโอไซด์ เอ และสติวโอไซด์

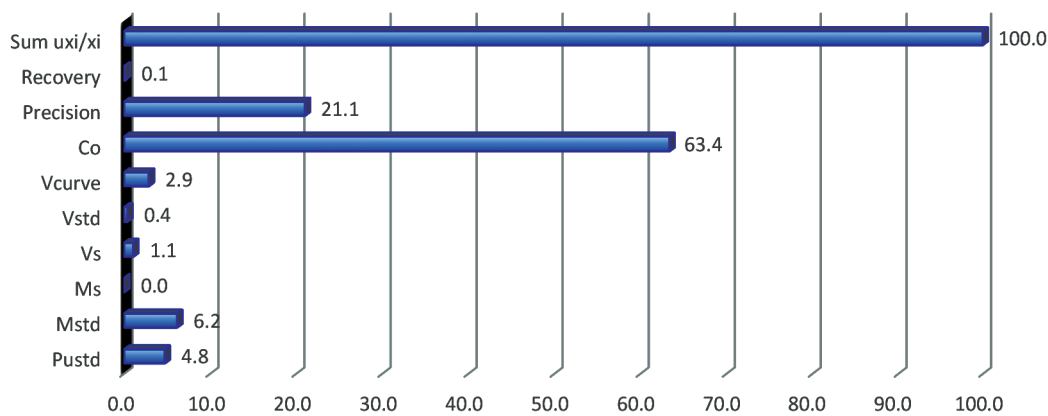
วันที่วิเคราะห์	รีบาวติโอไซด์ เอ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)		สติวโอไซด์ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2
9/2/2564	18.854	18.998	19.261	19.207
18/2/2564	18.415	18.409	19.352	19.543
16/3/2564	17.272	17.206	19.519	19.412
23/3/2564	18.508	18.520	18.147	18.096
29/3/2564	18.799	18.758	17.792	18.280
7/5/2564	18.219	18.496	17.979	18.849
27/5/2564	18.111	17.987	18.136	19.051
3/6/2564	18.084	17.880	19.066	18.734
14/6/2564	17.753	17.572	18.185	18.904
12/7/2564	17.964	17.980	18.694	18.712
18/8/2564	19.120	19.380	19.258	19.387
31/8/2564	18.730	18.560	16.794	16.946
27/9/2564	17.910	16.389	16.183	16.106
12/10/2564	18.061	18.431	16.652	17.034
7/12/2564	18.215	18.444	18.407	19.545
ค่าเฉลี่ย	18.234		18.374	
Intermediate precision (s_I)	0.36		0.45	
%RSDr (Horwitz equation)	6.815		6.810	
HORRAT = s_I /%RSDr	0.05		0.07	
HORRAT < 2	ผ่าน		ผ่าน	
จำนวนข้อมูล	30		30	

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด ประเมินจากค่ารวมของผลกระทบทั้งหมดที่มีต่อผลการวิเคราะห์ ได้แก่ ความไม่แน่นอนจากความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน การสอบเทียบเครื่องชั่ง เครื่องแก้วที่ใช้เตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่าง ความเข้มข้นที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน การวิเคราะห์ซ้ำจากค่าร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ของการทดสอบความถูกต้องของวิธี นำมาคำนวณค่าความไม่แน่นอนรวม (combined uncer-

tainty; uc) และค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty; U) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า coverage factor (k) เท่ากับ 2 ได้ค่า U ของรีบาวติโอไซด์ เอ เท่ากับ 3.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ U ของสติวโอไซด์ เท่ากับ 2.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ร้อยละของแหล่งความไม่แน่นอนของการวัดของรีบาวติโอไซด์ เอ และสติวโอไซด์ ดังแสดงในภาพที่ 10 และ 11



ภาพที่ 10 ร้อยละของแหล่งความไม่แน่นอนของการวัดของรีบาวิตโอไซด์ เอ



ภาพที่ 11 ร้อยละของแหล่งความไม่แน่นอนของการวัดของสตีวิโอไซด์

วิจารณ์

เนื่องจากห้องปฏิบัติการของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารต้องมีการตรวจวิเคราะห์ assay ของวัตถุเจือปนอาหารกลุ่มสตีวียอลไกลโคไซด์ ซึ่งสภาวะ HPLC ที่กำหนดในวิธีตรวจวิเคราะห์คุณลักษณะของสารนี้ตาม FAO JECFA Monograph 10, 2010⁽⁹⁾ จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่าเมื่อใช้ HPLC คอลัมน์ชนิด C18 หลายยี่ห้อได้แก่ Shimpack CLC ODS(M), Nucleodur C18 Gravity, Alphabond C18, Lichrosorb RP18, Atlantis dC18 ทดลองใช้ตรวจวิเคราะห์สารมาตรฐานรีบาวิตโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ พบว่า peak ของรีบาวิตโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์แยกจากกันไม่ดี ค่า resolution น้อยกว่า 1 และตามวิธีของ Fayaz S⁽¹³⁾ ที่ใช้คอลัมน์ Agilent ZORBAX C18 แต่การแยกไม่ดีเช่นกัน จึงใช้คอลัมน์

Capcell pak C18 MG II ที่มีราคาสูงกว่าตามวิธีที่ระบุใน specification ของ steviol glycosides; JECFA 2010 ซึ่งพบว่าการแยกดีกว่า โดยที่คอลัมน์ชนิด MG II มี packing เป็น silicones polymer บนผิวของ silica ทำให้มีความเสถียรมากกว่าชนิดของ silica ทั่วไป การตรวจสอบการรบกวนจากสารให้ความหวานชนิดอื่นที่อาจมีการเติมในน้ำหวาน เพื่อดูการรบกวนการตรวจวิเคราะห์ พบว่า peak ของอะซีลเฟม-เค, ซัคคาริน, แอสพาแตม และซูคราโลสไม่รบกวน peak ของรีบาวิตโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ ดังแสดงในภาพที่ 3 พบว่าวิธีที่ใช้ไม่มี matrix effect โดยค่า CI ของ slope กลุ่ม 1 และ y-intercept ของกราฟมาตรฐานผ่าน 0 ผลการทดสอบความเที่ยงที่ความเข้มข้น LOQ จุดกลาง จุดสูง และผล intermediate precision ของรีบาวิตโอไซด์ เอ และสตีวิโอไซด์ ผ่าน โดยมีค่า HORRAT น้อยกว่า 2 ค่าความไม่แน่นอนของการวัด

เมื่อคำนวณค่า U ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% k เท่ากับ 2 ได้ค่า U ของรีบาดีโอไซด์ เอ และสตีวียโอไซด์ เท่ากับ 3.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 2.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยค่าความไม่แน่นอนขยายคำนวณจาก %RSDr (Horwitz's) $\times 2^{(11)}$ ไม่ควรเกิน 11.6 และ 13.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 418 พ.ศ. 2563 กำหนดให้รายงานค่าสตีวียอลไกลโคไซด์ โดยคำนวณเป็นสตีวียอล ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง คำชี้แจงประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 418 พ.ศ. 2563 ระบุชนิดสตีวียอลไกลโคไซด์ดังนี้ สตีวียโอไซด์, รีบาดีโอไซด์ เอ, รีบาดีโอไซด์ บี, รีบาดีโอไซด์ ซี, รีบาดีโอไซด์ ดี, รีบาดีโอไซด์ เอฟ, รีบาดีโอไซด์ เอ็ม, ตัลโคไซด์ เอ, รูบูโซไซด์, สตีวียอลไบโอไซด์ และสตีวียอลไกลโคไซด์ ชนิดอื่นๆ จากการตรวจวิเคราะห์ที่ผ่านมาพบสตีวียอลไกลโคไซด์อื่นๆ น้อยกว่า 1 เมื่อคำนวณเป็นสตีวียอล นอกจากนี้สารมาตรฐานของสตีวียอลไกลโคไซด์ เหล่านี้ราคาสูง จึงทดสอบความถูกต้องของการตรวจวิเคราะห์เพียงสาร 2 ชนิดนี้ ในอนาคตอาจมีการใช้สารสกัดสตีวียอลไกลโคไซด์ ซึ่งมีสารหลักเป็นรีบาดีโอไซด์ เอ็ม, รีบาดีโอไซด์ ดี หรือสตีวียอลไกลโคไซด์อื่น ดังนั้นห้องปฏิบัติการอาจต้องเตรียมการ เพื่อรองรับความต้องการตรวจวิเคราะห์สารสตีวียอลไกลโคไซด์ชนิดอื่นๆ ต่อไป

สรุป

ผลการทดสอบวิธีวิเคราะห์รีบาดีโอไซด์ เอ และสตีวียโอไซด์ในน้ำหวานตามพารามิเตอร์ต่าง ๆ ข้างต้น พบว่าวิธีนี้มีขีดจำกัดของการตรวจพบ เท่ากับ 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ 4.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ช่วงของการวัดและความเป็นเส้นตรง อยู่ในช่วง 4.0-140 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความแม่นยำและความเที่ยงเหมาะสมที่จะใช้ตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณจันทร์เพ็ญ โตวิยานนท์ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ให้คำแนะนำการเขียนบทความและการคำนวณทางสถิติ

เอกสารอ้างอิง

1. เมดไทย (Medthai). ญ่้าหวาน สรรพคุณและประโยชน์ของญ่้าหวาน 14 ข้อ. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 4 เม.ย. 2565]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://medthai.com/ญ่้าหวาน/>.
2. EFSA J 2010; Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). Scientific opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. EFSA Journal 2010; 8(4): 1537. (84 pages).
3. Carakostas MC, Curry LL, Boileau AC, Brusick DJ. Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. Food Chem Toxicol 2008; 46(Suppl 7) : S1-10.
4. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Steviol glycosides-69th JECFA-Chemical and Technical Assessment (CTA). [online]. 2008; [cited 2022 Apr 4]; [7 screens]. Available from: URL: <https://www.fao.org/3/at966e/at966e.pdf>.
5. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Steviol glycosides-82nd JECFA-Chemical and Technical Assessment (CTA). [online]. 2016; [cited 2022 Apr 4]; [10 screens]. Available from: URL: <https://www.fao.org/3/br566e/br566e.pdf>.
6. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 418 (พ.ศ. 2563) เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์ เงื่อนไข วิธีการใช้ และอัตราส่วนของวัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 2). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 237 ง (วันที่ 9 ตุลาคม 2563).

7. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง คำชี้แจงประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 418) พ.ศ. 2563 ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์ เงื่อนไข วิธีการใช้ และอัตราส่วนของวัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 2). [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 4 เม.ย. 2565]; [210 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_fda/418_FoodAdditives.pdf.
8. Kitada Y, Sasaki M, Yamazoe Y, Nakazawa H. Simultaneous determination of stevioside, rebaudioside A and C and dulcoside A in food by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1989; 474: 447-51.
9. 73rd meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Steviol glycosides. Rome: FAO/JECFA Monograph; 2010.
10. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
11. สุวรรณ จารุณูช, และคณะ. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550.
12. Eurachem Guide. The Fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. [online]. 2014; [cited 2022 Jan 1]; [70 screens]. Available from: URL: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf.
13. Fayaz S, Sharma R, Rajput YS, Mann B, Lata K. Estimation of steviol glycosides in food matrices by high performance liquid chromatography. *J Food Sci Technol*. 2018; 55(8): 3325-34.

Method Validation of Rebaudioside A and Stevioside Determination in Syrup by High Performance Liquid Chromatography

Suthatip Vitchaivutivong and Sirithorn Putsorn

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

ABSTRACT Rebaudioside A and stevioside are steviol glycosides extracted from *Stevia rebaudiana* Bertoni. According to the Notification of Ministry of Public Health No. 418 (B.E. 2020), both are allowed to use as sweetener. The objective of this study was to develop the suitable method to analyze rebaudioside A and stevioside in syrup using HPLC. The condition consisted of Capcell pak C18 MG II column as solid phase, ultraviolet detector at wavelength 210 nm and the mixture of acetonitrile and 10 mM potassium hydrogen phosphate pH 2.6 (32:68) as mobile phase. The results showed that limit of detection (LOD) at 2.0 mg/kg, limit of quantitation (LOQ) at 4.0 mg/kg, linearity and range were detected from 2.0 to 100 µg/ml ($R^2 = 1$). The %recovery of the concentration at 4.0, 28 and 140 mg/kg, of rebaudioside A and stevioside 96.5–106.9% and 96.0–109.8% respectively. Precision of rebaudioside A and stevioside were acceptable (HORRAT < 2). Intermediate precision calculated from analytical results of quality control samples of rebaudioside A and stevioside were equal to 0.36 and 0.45, respectively. In conclusion, this method is suitable for analyze rebaudioside A and stevioside in syrup in the laboratory.

Keywords: Rebaudioside A, Stevioside, Syrup, HPLC

การเตรียมจุลินทรีย์มาตรฐานแห้งแบบแช่เยือกแข็งและ การควบคุมคุณภาพ

กมลวรรณ กันแต่ อัจฉรา อยู่คง และ กนกชน สุภาพรหม

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยามีการนำจุลินทรีย์มาตรฐานมาใช้ควบคุมคุณภาพ เพื่อให้ผลการทดสอบที่ได้มีความถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือ ก่อนนำจุลินทรีย์มาตรฐานมาใช้งานต้องผ่านการทดสอบความบริสุทธิ์และคุณสมบัติทางชีวเคมี ซึ่งขั้นตอนการปฏิบัติงานต้องใช้ระยะเวลา 2-7 วัน ขึ้นอยู่กับเชื้อแต่ละชนิด ดังนั้นเพื่อลดขั้นตอนและระยะเวลาดังกล่าว ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาการเตรียมจุลินทรีย์มาตรฐานแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพผลการทดสอบที่สามารถนำมาละลายใช้งานได้ทันที โดยใช้ 10% skim milk ผสมกับจุลินทรีย์มาตรฐานบรรจุในขวดแก้ว นำเข้ากระบวนการการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และเก็บรักษาในที่มืดที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส โดยทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันที่ 3 สัปดาห์ต่อมา จากนั้นทดสอบความคงตัวทุกสัปดาห์ พบว่าเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* มีความคงตัวนาน 12 และ 16 สัปดาห์ ตามลำดับ โดยใช้เกณฑ์ไม่เกิน 0.5 log₁₀ ที่คงความบริสุทธิ์และคุณสมบัติทางชีวเคมีได้อย่างครบถ้วน เชื้อที่เตรียมได้นี้สามารถพัฒนาเป็นจุลินทรีย์มาตรฐาน เพื่อให้ห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชนที่มีความต้องการใช้เชื้อมาตรฐานสำเร็จรูปในการควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการต่อไป อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เรื่อง สถานะของการขนส่งและสารที่ทำให้เชื้อมีความคงตัว เพื่อพัฒนาคุณภาพของจุลินทรีย์มาตรฐานแห้งแบบแช่เยือกแข็งให้มีมาตรฐานตามข้อกำหนด ISO Guide 35:2017 (Reference materials-guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability)

คำสำคัญ: การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจุลินทรีย์มาตรฐาน, การควบคุมคุณภาพ, ความเป็นเนื้อเดียวกัน, ความคงตัว

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

Received: 18 January 2023

Revised: 6 June 2023

Accepted: 15 June 2023



บทนำ

การควบคุมคุณภาพ (quality control; QC) เป็นกระบวนการที่ใช้ในการตรวจสอบและเฝ้าระวังขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างของห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ผลการทดสอบที่ได้มีความแม่นยำ (accuracy) ความเที่ยง (precision) และน่าเชื่อถือ (reliability) ดังนั้นการควบคุมคุณภาพจึงสำคัญสำหรับการทดสอบของห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา แบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ การควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control; IQC)⁽¹⁾ และการควบคุมคุณภาพภายนอก (external quality control)⁽²⁾

การควบคุมคุณภาพภายในเป็นกระบวนการในการตรวจสอบการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างของห้องปฏิบัติการเพื่อควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์ เฝ้าระวังการทดสอบการถ่ายโอนข้อมูล การสุ่มตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่าง การรายงานผลการวิเคราะห์ และปรับปรุงการปฏิบัติงานในแต่ละขั้นตอน ให้ได้มาซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือ ซึ่งแผนควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการประกอบด้วย การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (validation of analytical method หรือ method validation) การทวนสอบวิธี (method verification) และการควบคุมคุณภาพสม่ำเสมอ (routine quality control) การควบคุมคุณภาพการทดสอบทำโดยการตรวจวิเคราะห์ซ้ำ (duplicate analysis) ซึ่งเป็นการประเมินความเที่ยงของการวิเคราะห์ ตรวจตัวอย่างเดียวกันสองซ้ำ (2 subsample) อย่างน้อยร้อยละ 5 ของจำนวนตัวอย่างที่ตรวจในแต่ละครั้งของการวิเคราะห์ (test run) ซึ่งเป็นการตรวจสอบความสามารถของนักวิเคราะห์ในการตรวจหาเชื้อเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณในตัวอย่าง ว่าให้ผลใกล้เคียงหรือเหมือนกัน ส่วนการเติมเชื้อจุลินทรีย์ (spike sample) ที่ทราบปริมาณเป็นการตรวจสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ตัวอย่าง การตรวจสอบความถูกต้องระหว่างดำเนินการทดสอบโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานเป็น positive control และ negative control เป็นการควบคุมกระบวนการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งรวมถึงการเตรียมตัวอย่าง ผู้ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบ และการรายงานผลว่าถูกต้องหรือไม่ เพื่อนำไปใช้ในการประกันคุณภาพผลการทดสอบ⁽¹⁾

การควบคุมคุณภาพภายนอกเป็นการควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์จากหน่วยงานภายนอก เพื่อให้เกิดความมั่นใจในผลการวิเคราะห์ โดยการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการหรือการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นข้อกำหนดของหน่วยงานที่ให้การรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025⁽²⁾ การควบคุมคุณภาพทั้งภายในและภายนอกมีการนำเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานมาใช้ควบคู่กับการปฏิบัติงานหรือการทดสอบเสมอ

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหารใช้เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานที่เก็บรักษาไว้ในรูปแบบของ reference stock cryobeads หรือ 15% glycerol broth ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า⁽³⁾ ส่วน stock culture หรือ working culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะชนิดแข็งเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้งานต้องมีการนำเชื้อถ่ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งและอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อกลุ่มแบคทีเรีย เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ส่วนยีสต์และราใช้เวลาบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อ 5-7 วัน⁽⁴⁾ ผู้วิจัยจึงได้ทำการพัฒนาการเตรียมจุลินทรีย์มาตรฐานแห้งแบบแช่เยือกแข็งใช้ในการควบคุมคุณภาพผลการทดสอบเพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะสามารถลดระยะเวลาและขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน โดยละลายด้วย buffer peptone water (BPW) แล้วใช้งานได้ทันทีและสามารถทราบค่าปริมาณเชื้อตั้งต้นต่อมิลลิลิตรของสารละลายที่ละลายได้ เพื่อง่ายต่อการเจือจางในระดับที่ต้องการใช้งานต่อไป การศึกษาในครั้งนี้เลือกใช้เชื้อ *Escherichia coli* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ และ *Staphylococcus aureus* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งเป็นเชื้อที่ใช้ควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการ

วัสดุและวิธีการ

จุลินทรีย์มาตรฐาน

จุลินทรีย์มาตรฐานใช้ควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ เป็นจุลินทรีย์จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นำมาเก็บ

เป็น reference stock ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหาร โดยเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็งแบบพิเศษ (deep freezer) (Haier รุ่น DW-86L 728D, China) อุณหภูมิต่ำกว่า -70 องศาเซลเซียส จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *E.coli* DMST 24373 Lot. Es63085 และ *S. aureus* DMST 8013 Lot. St63041

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilizer; Martin Christ, รุ่น EPSILON 2-10D LSCplus, Germany), เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave; Getinge getting group, รุ่น GE L600 series, Sweden), เครื่องนับโคโลนี (colony counter; model 3328, USA), ตู้บเพาะเชื้อ $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ (incubator; SANYO, รุ่น MIR 252, Japan), ตู้บเพาะเชื้อ $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ (SANYO, รุ่น MIR 553, Japan), กล้องจุลทรรศน์แบบส่องตา (microscope; Leica, Germany), อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ $47\pm 2^{\circ}\text{C}$ (water bath; MEMMERT, Germany), เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 0.1 และ 0.01 กรัม (electronic balance; Sartorius, รุ่น BP2100, Germany), เครื่องผสม (vortex mixer; LABNET, รุ่น VX100, USA), ขวดแก้วฝาเกลียว (glass bottle with screw cap; Schott, Germany), หลอดทดลอง (test tube, Kimble, Mexico), จานเพาะเชื้อ (petri dishes) ขนาด 15×90 มิลลิเมตร หรือ 15×100 มิลลิเมตร, (Micro QA, China), ปิเปต 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร (pipette; Witeg, Germany), loop และ needle เขี่ยเชื้อ, glass slide, hot plate with magnetic stirrer (Stuart, USA), automatic pipette step volume (BrandTech, Germany), Tip (Axygen, China), ถาด stainless สำหรับบรรจุขวดแก้ว (vial), จุกยางและฝาอะลูมิเนียมพร้อมที่ปิดฝาอะลูมิเนียม

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Brain heart infusion broth (BHI; Oxoid, England), Tryptic Soy Agar (TSA) (Scharlau, Spain) และ Buffered Peptone

Water (BPW; Scharlau, Spain) วัตถุประสงค์สำหรับการทำแห้ง ได้แก่ 10% skim milk (Oxoid, England) การตรวจวิเคราะห์ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ จำนวนจุลินทรีย์ : Plate Count Agar (PCA) (Scharlau, Spain) *E. coli*: Levine eosin methylene blue (L-EMB) agar (Scharlau, Spain), tryptone broth, methyl red-Voges Proskauer broth (MR-VP), Simmons citrate agar และ lauryl sulphate tryptose broth (LST) (Oxoid, England) ส่วน *S. aureus*: Baird-Parker (BP) Agar (Scharlau, Spain), Brain heart infusion broth (BHI) (Oxoid, England), coagulase rabbit plasma with EDTA (BBL, USA)

น้ำยาและสารเคมี

Gram stain reagents (BIOTECH, Biotech reagent co., Ltd., Thailand), Kovacs' reagent (Scharlau, Spain) สารละลายสำหรับเจือจาง (diluent) 0.1% peptone water (Oxoid, England), 10% skim milk ในขวดแก้ว ปริมาตร 400 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (อุณหภูมิและเวลาที่ใช้อ้างอิงตามบริษัทผู้ผลิตกำหนด) ตรวจสอบการปนเปื้อนหลังการฆ่าเชื้อ ผลจำนวนจุลินทรีย์น้อยกว่า 1 cfu ต่อ มิลลิลิตร

การเตรียมจุลินทรีย์มาตรฐานโดยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและการแบ่งบรรจุ

เตรียมจุลินทรีย์มาตรฐาน ทดสอบความบริสุทธิ์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อโดยนำจุลินทรีย์มาตรฐานภายในห้องปฏิบัติการที่อยู่ในรูปของ reference stock ชีด (streak) บน TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีบริสุทธิ์ (purity) คือ เชื้อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวและมีลักษณะเดียวกันทั้งจานเพาะเชื้อ จากนั้นเชี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยวลงในหลอด BHI ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ควบคุมไปการ streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็งของเชื้อแต่ละชนิดและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเฉพาะ

ซึ่งต้องให้ลักษณะโคโลนีเฉพาะ (typical colony) และผลการตรวจยืนยันตรงตามวิธีการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์แต่ละชนิด

การเตรียมเชื้อ *E. coli* โดย streak ลงบน L-EMB agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีแบนและมีสีดำตรงกลาง มีหรือไม่มี metallic sheen นำไปทดสอบทางชีวเคมีดังนี้
 ดูลักษณะ รูปร่าง และการดัดสีแกรม *E. coli* เป็นแบคทีเรียท่อนสั้น ดัดสีแกรมลบ, tryptone broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ± 2 ชั่วโมง, MR-VP broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ± 2 ชั่วโมง และบ่มต่ออีก 48 ± 2 ชั่วโมง, Simons citrate agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง และ LST บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ± 2 ชั่วโมง

การเตรียมเชื้อ *S. aureus* โดย streak ลงบน PB agar บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 45-48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีกลม นูน ผิวเรียบ สีเทาถึงดำ ขนาด 2-3 มิลลิเมตร รอบโคโลนีมีโซนขุ่นล้อมรอบด้วยโซนใส นำไปทดสอบทางชีวเคมีดังนี้ ดูลักษณะ รูปร่าง และการดัดสีแกรม *S. aureus* เป็นแบคทีเรียรูปกลม ไม่สร้างสปอร์ ดัดสีแกรมบวก เชียโคโลนีลักษณะเฉพาะลงใน BHI บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เติม coagulase rabbit plasma with EDTA ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส สังเกตการเกิดลิ่ม (clot) เป็นระยะๆ ภายใน 6 ชั่วโมง

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI มานับจำนวน โดย *E. coli* มีปริมาณเชื้อตั้งต้น 2.9×10^9 cfu/ml และ *S. aureus* มีปริมาณเชื้อตั้งต้น 2.2×10^9 cfu/ml เติม *E. coli* DMST 24373 (ชุดที่ 1) และ *S. aureus* DMST 8013 (ชุดที่ 2) ปริมาตร 5 มิลลิตร ลงใน 10% skim milk ปริมาตร 395 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้แท่งกวน (magnetic stirrer) ตลอดเวลาขณะแบ่งบรรจุ แบ่งบรรจุใน vial ปริมาตรขวดละ 2 มิลลิตร ชุดละ 150 ขวด ปิดฝาขวดด้วยจุกยางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยปิดแบบหลวมๆ เพียงครึ่งหนึ่งของความยาวทั้งหมดของจุกยาง นำไปทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งในเครื่องระเหิดให้แห้งด้วยความเย็น

(lyophilizer) โดยใช้โปรแกรมและสภาวะเดียวกัน ตั้งโปรแกรมกำหนดให้อุณหภูมิแช่แข็งเท่ากับ -30 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นขึ้นอุณหภูมิของกระบวนการทำให้แห้ง (primary drying process) ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วปรับอุณหภูมิเป็น 0 องศาเซลเซียส ความดันเท่ากับ 1.65 mbar นาน 18 ชั่วโมง และขึ้นอุณหภูมิของกระบวนการทำให้แห้ง (secondary drying process) ปรับอุณหภูมิเป็น 4 องศาเซลเซียส ความดันเท่ากับ 1.65 mbar นาน 4 ชั่วโมง เมื่อกระบวนการทำให้แห้งเสร็จสมบูรณ์ทำการปิดฝาขวดด้วยจุกยางให้สนิท นำออกมาปิดทับด้วยฝาลูมิเนียม ปิดหมายเลขบนขวดจุลินทรีย์มาตรฐานที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เรียงลำดับตามการเตรียม เก็บใส่กล่องที่มีฝาปิดสนิท ทนการกระแทก เก็บรักษาในที่มืดอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส และนำออกมาทดสอบความคงตัวเป็นระยะๆ ทุกสัปดาห์

การสุ่มตัวอย่าง

สุ่มขวดเชื้อที่เตรียมได้แบบสุ่มอิสระ (random sampling) โดยใช้โปรแกรมจากเว็บไซต์ <https://www.randomizer.org>⁽⁵⁾

การทดสอบและวิธีวิเคราะห์

ละลายตัวอย่างด้วย BPW ปริมาตร 10 มิลลิตร ทำการเจือจางตัวอย่างตามลำดับๆ ละ 10 เท่า จนถึงลำดับที่ต้องการ ปิเปิดตัวอย่างที่แต่ละระดับการเจือจาง 1 มิลลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ 2 จาน (duplicate) เท PCA 12-15 มิลลิตร ผสมให้ตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเนื้อเดียวกันทั่วทั้งจาน ตั้งทิ้งไว้ให้วันแข็งแล้วคว่ำจาน บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี คำนวณจำนวนจุลินทรีย์ต่อปริมาตรตาม APHA 2015^(6,7) สำหรับ *S. aureus* เลือกโคโลนีนำมาย้อมสีแกรมและ streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ BP agar บ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง โคโลนีลักษณะเฉพาะ คือ มีสีเทาดำและโซนทึบ นำไปทดสอบ coagulase test ตาม FDA BAM Online. 2016 (Chapter 12)⁽⁸⁾ ส่วน *E. coli* เลือกโคโลนีนำมาย้อมสีแกรมและ streak ลงบนอาหาร

เลี้ยงเชื้อจำเพาะ L-EMB agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โคลีนีลักษณะเฉพาะ คือ แบน และมีสีตรงกลาง มี metallic sheen นำไปทดสอบทางชีวเคมี (tryptone broth, MR-VP, Simmons citrate agar; IMViC test และ LST) ตาม FDA BAM Online. 2020 (Chapter 4)⁽⁹⁾

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity test)

กลุ่มขวดเชื้อที่จัดเตรียมไว้จำนวน 11 ขวด⁽¹⁰⁾ ตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ ขวดละ 2 ซ้ำ (repeatability) ด้วยวิธี APHA 2015^(6,7) โดยห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017⁽²⁾ จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หมายเลขทะเบียน 4043/50 ทดสอบความแปรปรวนภายในของเชื้อแต่ละขวด โดยใช้ Cochran's test จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณทางสถิติตาม ISO 13528:2022⁽¹¹⁾ และ ISO Guide 35:2017⁽¹⁰⁾ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย one way ANOVA single factor for homogeneity test ได้ค่า mean square between (M_{between}) และ mean square within (M_{within}) คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างขวดตัวอย่าง the between-unit standard deviation (S_{bb}) โดยใช้สูตร:

$$S_{bb} = \frac{M_{\text{between}} - (M_{\text{within}})}{n_0}$$

* n_0 = จำนวนของการทำซ้ำ ($n_0 = 2$)

โดยใช้เกณฑ์ยอมรับ คือ S_{bb} ควรมีค่าน้อยกว่า $0.3S_{IR}$ (ค่า S_{IR} เท่ากับ 0.118 ได้มาจากการหาค่า interlaboratory reproducibility standard deviation (S_R) ของ technique uncertainty⁽¹²⁾ ด้วยวิธี APHA 2015^(6,7) ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร) และมีการนำ F test เพื่อเปรียบเทียบค่า F_{cal} น้อยกว่า F_{crit} มาพิจารณาร่วม

การทดสอบความคงตัว (stability test)

โดยกลุ่มขวดเชื้อซึ่งเก็บรักษาในที่มืดอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นำมาวิเคราะห์หลังจากการทดสอบความ

เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว 2 สัปดาห์ โดยใช้วิธีการทดสอบเดียวกันกับการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ทำการทดสอบความคงตัวทุกสัปดาห์ ละ 3 ขวดๆ ละ 2 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบความคงตัวในแต่ละสัปดาห์ เปรียบเทียบกับผลการทดสอบความปั่นเนื้อเดียวกันในหน่วย $\log_{10}$ โดยเกณฑ์การยอมรับ คือ ค่าสัมบูรณ์ของผลต่างของค่าเฉลี่ยผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว ($|\text{mean}_{\text{homo}} - \text{mean}_{\text{sta}}|$) มีค่าน้อยกว่า $0.5 \log_{10}$ ⁽¹³⁾ และยุติการทดสอบเมื่อผลการทดสอบความคงตัวมีค่าผลต่างมากกว่า $1.0 \log_{10}$

ผล

เชื้อจุลินทรีย์ผสม 10% skim milk ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีลักษณะทางกายภาพเป็นก้อนสีขาวนวลแห้ง อัดแน่น ไม่มีรูพรุน เมื่อนำมาบดพบเป็นเนื้อละเอียดลักษณะคล้ายนมผง ตรวจสอบการละลาย พบว่าในระยะเวลา 0-3 เดือน มีความสามารถในการละลาย BPW ได้ดีภายใน 1 นาที หลังจากละลายมีลักษณะเป็นของเหลวขุ่นสีขาวเป็นเนื้อเดียวกัน แต่หลังจาก 3 เดือน การละลายต้องอาศัยการใช้เครื่องผสม (vortex mixer) ร่วมด้วยและมีลักษณะของตะกอนหรือผลึกสีขาวเล็กน้อยในของเหลวขุ่นสีขาว

ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของเชื้อ *E. coli* ปริมาณเชื้อตั้งต้นมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $6.639 \log_{10}$ cfu/ml ส่วน *S. aureus* ปริมาณเชื้อตั้งต้นมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $7.062 \log_{10}$ cfu/ml (โดยมีค่าจากการเดิมเชื้อก่อนผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งของเชื้อ *E. coli* เท่ากับ $6.860 \log_{10}$ cfu/ml และ *S. aureus* เท่ากับ $6.740 \log_{10}$ cfu/ml) การประเมินผลความเป็นเนื้อเดียวกันทางสถิติ พบว่าค่า F_{cal} มีค่าน้อยกว่า F_{crit} ค่า S_s น้อยกว่า $0.3\sigma_{\text{pt}}$ ตาม ISO 13528:2022⁽¹¹⁾ แสดงว่าตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกันทั้งสองเชื้อ แต่กรณีใช้เกณฑ์ตาม ISO Guide 35:2017⁽¹⁰⁾ เชื้อ *E. coli* ค่า S_{bb} มีค่าน้อยกว่า $0.3S_{IR}$ แสดงว่าตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน ส่วนเชื้อ *S. aureus* ค่า S_{bb} มีค่ามากกว่า $0.3S_{IR}$ แสดงว่าตัวอย่างไม่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 1

ผลการทดสอบความคงตัว พบว่าความคงตัวของเชื้อ *E. coli* มีปริมาณของเชื้อลดลงไม่เกิน $0.5 \log_{10}$ ในระยะตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2-12 ดังแสดงในภาพที่ 1 ส่วนความคงตัวของเชื้อ *S. aureus* มีปริมาณของเชื้อลดลงไม่เกิน $0.5 \log_{10}$ ในระยะตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2-16 ดังแสดงในภาพที่ 2

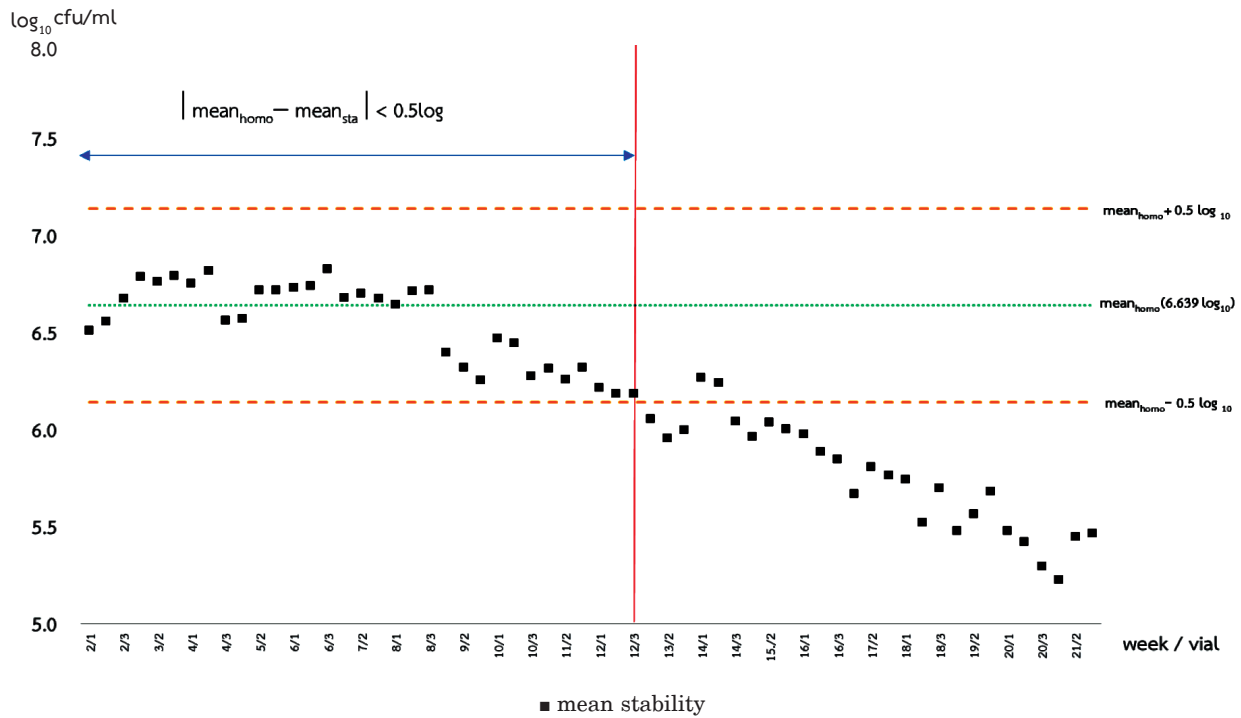
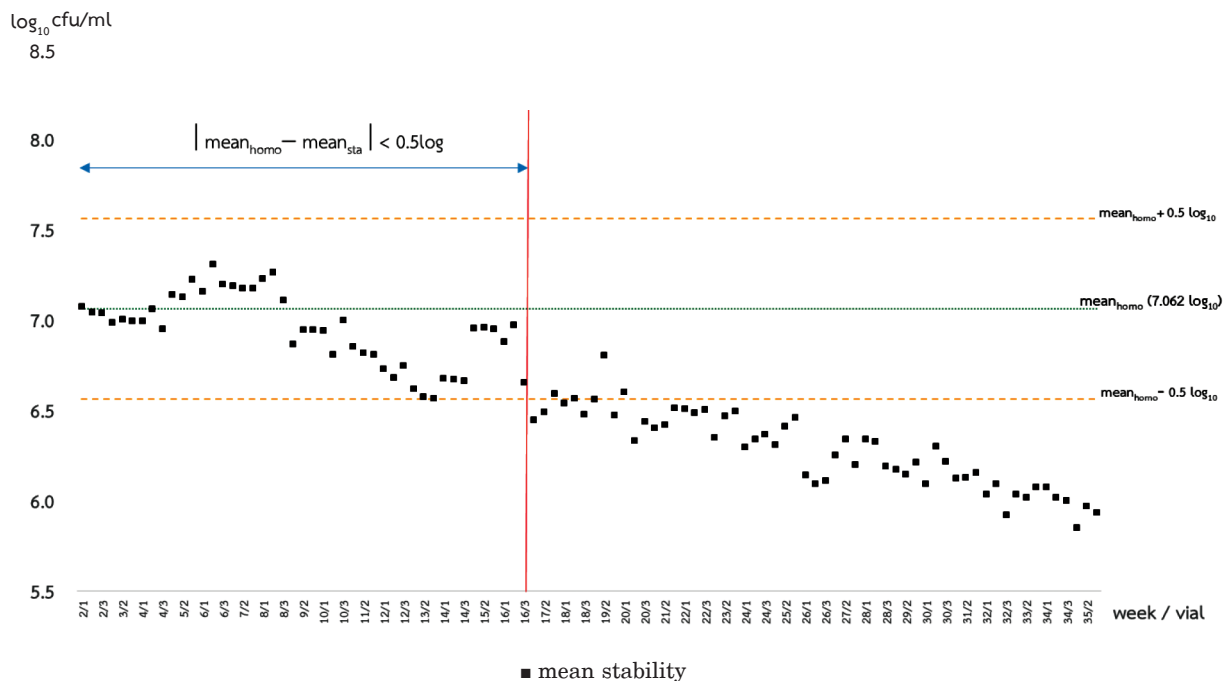
ตารางที่ 1 การตรวจวิเคราะห์ความเป็นเนื้อเดียวกันของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus*

ชนิดที่	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	Duplicate 1 ($\log_{10}$ cfu/g)	Duplicate 2 ($\log_{10}$ cfu/g)	Duplicate 1 ($\log_{10}$ cfu/g)	Duplicate 2 ($\log_{10}$ cfu/g)
1	6.799	6.756	7.079	6.991
2	6.792	6.602	7.000	7.041
3	6.690	6.544	7.000	6.934
4	6.531	6.602	7.000	7.114
5	6.643	6.580	7.000	7.041
6	6.623	6.643	7.041	7.114
7	6.663	6.690	7.079	7.000
8	6.672	6.491	7.041	7.176
9	6.477	6.732	7.114	7.176
10	6.643	6.477	6.973	7.079
11	6.699	6.716	7.146	7.230
mean _{homogeneity}	6.639		7.062	
Cochran _{critical}	0.570		0.570	
Cochran _{calculation}	0.333		0.226	
F _{critical}	2.854		2.854	
F _{calculation}	1.031		2.201	
S _{bb} หรือ S _s	0.012		0.047	
S _{IR}	0.118		0.118	
σ_{pt}	0.250		0.250	
F < F	Passed		Passed	
S _s < $0.3\sigma_{pt}^{(a)}$	Passed		Passed	
S _{bb} < $0.3S_{IR}^{(b)}$	Passed		Not passed	

หมายเหตุ : เกณฑ์การตัดสินใจ (a) ตาม ISO 13528:2022⁽¹¹⁾, (b) ตาม ISO Guide 35:2017⁽¹⁰⁾

The between-unit standard deviation (S_{bb} หรือ S_s)

Intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR})

ผลการทดสอบความคงตัวของ *E. coli* ($\log_{10}$ cfu/ml)ภาพที่ 1 การทดสอบความคงตัวของเชื้อ *E. coli* ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2-21ผลการทดสอบความคงตัวของ *S. aureus* ($\log_{10}$ cfu/ml)ภาพที่ 2 การทดสอบความคงตัวของเชื้อ *S. aureus* ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2-35

วิจารณ์

เชื้อที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งหลังเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0-3 เดือน โดยตรวจสอบการละลายด้วย BPW มีความสามารถในการละลายภายใน 1 นาที หลังจากละลายมีลักษณะเป็นของเหลวขุ่นสีขาวเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งผลการศึกษาความคงตัวในช่วง 0-3 เดือน พบ $|\text{mean}_{\text{homo}} - \text{mean}_{\text{sta}}|$ มีค่าไม่น้อยกว่า $0.5 \log_{10}$ แต่หลังจาก 3 เดือน การละลายต้องอาศัยการใช้เครื่อง vortex mixer ร่วมด้วยและมีลักษณะของตะกอนหรือผลึกสีขาวเล็กน้อยในของเหลวขุ่นสีขาว ลักษณะทางกายภาพเห็นของเหลวที่ละลายได้มีความไม่เป็นเนื้อเดียวกัน พบปริมาณเชื้อลดลงจากปริมาณเชื้อตั้งต้นเกินกว่า $0.5 \log_{10}$ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่มีผลกระทบต่อความคงตัวของเชื้อมาตรฐานที่เตรียมได้

จากผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของเชื้อมาตรฐานที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งของเชื้อ *E. coli* พบมีความเป็นเนื้อเดียวกันในทุกเกณฑ์การพิจารณา คือ ค่า S_s เท่ากับ 0.012 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า $0.3\sigma_{\text{pt}}$ (มีค่าเท่ากับ 0.075) ตาม ISO 13528:2022⁽¹¹⁾ และค่า S_{bb} มีค่าน้อยกว่า $0.3S_{\text{IR}}$ (มีค่าเท่ากับ 0.035) เมื่อพิจารณาโดยใช้เกณฑ์ตาม ISO Guide 35:2017⁽¹⁰⁾ สำหรับเชื้อ *S. aureus* เมื่อพิจารณาโดยใช้เกณฑ์ตาม ISO 13528:2022⁽¹¹⁾ พบว่าผ่านเกณฑ์ เนื่องจากค่า S_s เท่ากับ 0.047 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า $0.3\sigma_{\text{pt}}$ (มีค่าเท่ากับ 0.075) แต่กรณีใช้เกณฑ์ตาม ISO Guide 35:2017⁽¹⁰⁾ พบผลการประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันไม่ผ่านเกณฑ์กำหนด โดยค่า S_{bb} มีค่ามากกว่า $0.3S_{\text{IR}}$ อาจเพราะค่า intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR}) ที่นำมาใช้เป็นตัวเลขที่ได้จากการหาค่า S_{IR} ของ technique uncertainty ด้วยวิธี APHA 2015^(6,7) ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร อาจทำให้ค่าที่ได้ค่อนข้างน้อยกว่าความเป็นจริง ซึ่งตาม ISO Guide 35:2017⁽¹¹⁾ ต้องเป็นค่า interlaboratory reproducibility standard deviation (S_{R}) ของวิธีวิเคราะห์นั้น ๆ ซึ่งวิธี APHA 2015^(6,7) ไม่มีการระบุการหาค่า S_{R} เนื่องจากไม่มีข้อมูล interlaboratory study ของวิธี

จึงจำเป็นต้องใช้ค่า S_{IR} ของห้องปฏิบัติการแทนในการประเมินผล แต่การทวนสอบวิธี (method verification) ตาม ISO 16140-3:2021⁽¹⁴⁾ หากมีข้อมูลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (method validation) กำหนด $2S_{\text{IR}}$ ของการทวนสอบของวิธีต้องไม่เกิน S_{R} ซึ่งในกรณีนี้ S_{bb} มีค่า 0.470 มีค่าน้อยกว่า $0.3S_{\text{R}}$ หรือ $(0.3)2S_{\text{IR}}$ ซึ่งเท่ากับ 0.070 ซึ่งอาจแสดงว่าตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน

การทดสอบความคงตัวของเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อพิจารณาโดยใช้เกณฑ์ค่าสัมบูรณ์ของผลต่างของค่าเฉลี่ยผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว ($|\text{mean}_{\text{homo}} - \text{mean}_{\text{sta}}|$) มีค่าน้อยกว่า $0.5 \log_{10}$ พบว่าเชื้อ *E. coli* ในสัปดาห์ที่ 12 มีค่าเฉลี่ยของผลต่างเท่ากับ $0.442 \log_{10}$ ส่วน *S. aureus* ในสัปดาห์ที่ 16 มีค่าเฉลี่ยของผลต่างเท่ากับ $0.225 \log_{10}$ ดังนั้น *S. aureus* มีความคงตัวนานกว่า *E. coli* ประมาณ 4 สัปดาห์ จากข้อมูลพิจารณาได้ว่าเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีโครงสร้างของผนังเซลล์ที่แตกต่างจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ องค์ประกอบหลักของผนังเซลล์เป็น peptidoglycan ถึงร้อยละ 90 ในด้านความหนาของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกหนากว่า โดยทั่วไปลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียแกรมบวกจะมีความทนทานสูงกว่าแบคทีเรียแกรมลบ^(15,16) ดังนั้นการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานในรูปแบบของการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีปัจจัยหลักของการพิจารณา คือ ความทนทานของเชื้อแต่ละชนิด

หากขยายขอบข่ายการให้บริการไปศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์หรือหน่วยงานภาครัฐหรือเอกชนอื่น ๆ ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของความคงตัวในสภาวะการขนส่งและความคงตัวที่นานกว่านี้ เช่น การเติม stabilizer อื่น ๆ และการใช้ตัวทำละลายชนิดอื่น เช่น 0.85% NSS, SDW (sterile distilled water) เป็นต้น เพื่อให้สะดวกต่อการนำไปใช้งานของแต่ละห้องปฏิบัติการ

สรุป

การเตรียมจุลินทรีย์มาตรฐานแห้งแบบแช่เยือกแข็งของเชื้อทั้งสองชนิด พบว่ามีความเป็นเนื้อเดียวกัน

และมีความคงตัวอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ค่าสัมบูรณ์ของผลต่างของค่าเฉลี่ยผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว ($|\text{mean}_{\text{omo}} - \text{mean}_{\text{sta}}|$) มีค่าน้อยกว่า 0.5 $\log_{10}$ ในระยะตั้งแต่ 12 สัปดาห์ สำหรับเชื้อ *E. coli* และ 16 สัปดาห์ สำหรับเชื้อ *S. aureus* โดยยังคงความบริสุทธิ์และคุณสมบัติทางชีวเคมี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ช่วยงานวิจัยนี้ให้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Laboratory quality management systems. In: Salfinger Y, Tortorello ML, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 5th ed. Washington, DC: American Public Health Association; 2015. p. 3-11.
2. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: International Organization for Standardization; 2017.
3. Cabri. Preservation of bacteria by freezing and low temperature store below -70°C on glass beads. [online]. 1998; [cited 2020 Nov 9]; [2 screens]. Available from: URL: <http://www.cabri.org/guidelines/micro-organisms/M300Ap505.html>.
4. ISO 11133:2014/Amd 1:2018, Amd 2:2020. Microbiology of food, animal feed and water-preparation, production, storage and performance testing of culture media - Amendment 1, 2. Geneva: International Organization for Standardization; 2020.
5. Research Randomizer. [online]. [cited 2020 Nov 9]; [2 screens]. Available from: URL: <https://www.randomizer.org>.
6. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: Salfinger Y, Tortorello ML, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 5th ed. Washington DC: American Public Health Association 2015. p. 75-87.
7. Mesophilic aerobic plate count. In: Salfinger Y, Tortorello ML, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 5th ed. Washington DC: American Public Health Association; 2015. p. 95-101.
8. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual (BAM) Chapter 12: *Staphylococcus aureus*. [online]. 2016; [cited 2021 Jan 14]; [6 screens]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-staphylococcus-aureus>.
9. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual (BAM) Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. [online]. 2020; [cited 2021 Apr 1]; [17 screens]. Available from: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>.
10. ISO GUIDE 35:2017. Reference materials - guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability. Geneva: International Organization for Standardization; 2017.
11. ISO 13528:2022. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva: International Organization for Standardization; 2022.
12. ISO 19036:2019. Microbiology of the food chain - estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. Geneva: International Organization for Standardization; 2019.
13. ISO 22117:2019. Microbiology of the food chain - specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva: International Organization for Standardization; 2019.

14. ISO 16140-3:2021. Microbiology of the food chain-method validation-Part 3: protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. Geneva: International Organization for Standardization; 2021.
15. นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, ปรีชา สุวรรณพินิจ. จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2544.
16. Differences between Gram positive and Gram negative bacteria. [online]. 2019; [cited 2019 Aug 14]; [26 screens]. Available from: URL: <https://microbiologyinfo.com/differences-between-gram-positive-and-gram-negative-bacteria/>.

Lyophilization of Reference Microorganisms Preparations and Its Quality Control

Kamonwan Kantaeng, Atchara Ukhong and Kanokchon Supaprom

Bureau of Quality and safety of food, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Microbiology laboratories use reference microorganisms to ensure the accuracy, precision and reliability of their analytical results. Prior to routine work, reference microorganisms must be tested for purity and biochemical properties. This step can take 2–7 days, depending on the strains of bacteria being used. In order to reduce processing time, we developed lyophilized reference microorganisms preparations, which can be used immediately after rehydration. Skimmed milk (10% w/v) was mixed with each reference microorganism and then aliquoted into glass vials. The vials were lyophilized and stored in a dark place at 2–8°C. The lyophilized microorganisms were tested for homogeneity at three weeks later. For stability study in terms of purity and biochemical characteristics, the results showed that *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* remained stable for 12 weeks and 16 weeks, respectively using $0.5 \log_{10}$ as a criteria. These lyophilized products can be used as reference microorganisms for quality control in microbiology laboratories of both government and private sections. However, further studies are needed to determine the optimal transportation conditions and stabilizers for lyophilized reference microorganisms in order to meet the reference materials–guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability according to ISO Guide 35:2017

Keywords: Lyophilized reference microorganisms, Quality control, Homogeneity, Stability

การระบุขอบข่ายชนิดผลิตภัณฑ์ยา เครื่องสำอาง และ เครื่องมือแพทย์ ในใบรับรองความสามารถ ห้องปฏิบัติการของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

สุวรรณ ชื่นใจ¹ อวิรุทธิ์ เจริญนิตย์¹ เสาวนีย์ อารมย์สุข¹ สุรศักดิ์ หมั่นพล² และ ภัทรวีร์ สร้อยสังวาลย์¹

¹สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

²ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นครราชสีมา 30000

บทคัดย่อ การระบุขอบข่ายการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล มีความสำคัญในการออกใบรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2556 สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการมีแนวทางการกำหนดรูปแบบและรายละเอียดการเขียนขอบข่ายการรับรองให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน แต่พบปัญหาเนื่องจากชนิดตัวอย่างผลิตภัณฑ์ยา เครื่องสำอาง และเครื่องมือแพทย์ มีความหลากหลายมากขึ้นและมีการแก้ไขกฎหมายที่เกี่ยวข้อง ทำให้แนวทางการกำหนดรูปแบบและรายละเอียดการเขียนขอบข่ายการรับรองไม่ชัดเจน ไม่เป็นปัจจุบัน ส่งผลให้พบปัญหาการแก้ไขขอบข่ายการรับรองทั้งก่อนและหลังบอญครั้ง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์วิเคราะห์ปัญหาและรวบรวมข้อมูล เพื่อทบทวนและปรับปรุงแนวทางการระบุขอบข่ายการรับรองชนิดผลิตภัณฑ์ยา เครื่องสำอาง และเครื่องมือแพทย์ของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ โดยรวบรวมข้อมูลที่พบจากการยื่นขอการรับรองในขอบข่ายด้านยา เครื่องสำอาง และเครื่องมือแพทย์ จำนวน 28 แห่ง ซึ่งมีข้อมูลเปรียบเทียบห้องปฏิบัติการก่อนและหลังได้รับการรับรองตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2563-2565 จากทั้งหมด 127 แห่ง (ร้อยละ 22.05) การระบุที่เบี่ยงเบนจากแนวทางปฏิบัติและตามข้อกำหนดในชนิดตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เครื่องมือแพทย์ และยา คิดเป็นร้อยละ 55, 38 และ 7 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าผู้ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรับรองมีความเข้าใจแนวทางวิธีเขียนการอ้างอิงขอบข่ายการรับรองที่ไม่เป็นไปในแนวทางเดียวกัน ประกอบกับชนิดผลิตภัณฑ์สุขภาพมีความหลากหลายมากขึ้นตามสถานการณ์ปัจจุบัน ดังนั้นผลการศึกษานี้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงแนวทางปฏิบัติการเขียนขอบข่ายการรับรองห้องปฏิบัติการทดสอบ เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานและผู้เกี่ยวข้องห้องปฏิบัติการระบุขอบข่ายชนิดผลิตภัณฑ์ยา เครื่องสำอาง และเครื่องมือแพทย์ในการออกใบรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการได้อย่างถูกต้องและลดปัญหาที่พบจากการแก้ไขใบรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ: ขอบข่ายการรับรอง, มาตรฐาน ISO/IEC 17025, ผลิตภัณฑ์ยา, เครื่องสำอาง, เครื่องมือแพทย์

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

Received: 5 February 2023

Revised: 5 May 2023

Accepted: 16 May 2023

บทนำ

การยื่นคำขอส่งเอกสารของหน่วยรับรองระบบงาน การรับรองความสามารถหน่วยงานที่ขอการรับรอง (conformity assessment body, CAB) ทั้งภาครัฐ และเอกชน เพื่อขอการรับรองใหม่ ต่ออายุ และขยาย ขอบข่าย การรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตาม มาตรฐาน ISO/IEC 17025 มีจำนวนเพิ่มขึ้นทุกปี ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2562-2565 (จำนวนห้องปฏิบัติการที่ได้ รับการรับรองด้านคุ้มครองผู้บริโภค 276, 281, 297 และ 305 แห่ง) รวมถึงขอบข่ายการรับรองมีความหลากหลาย เพิ่มขึ้น ตามการเปลี่ยนแปลงของกฎหมายและข้อกำหนด ที่เกี่ยวข้องตามวัตถุประสงค์การให้บริการ แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ 1) ให้บริการทดสอบแก่ผู้ใช้บริการภายนอก เพื่อนำผลการทดสอบไปใช้ในการขึ้นทะเบียนกับ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) และเพื่อ การส่งออก 2) ให้บริการแก่ผู้ใช้บริการภายใน เพื่อควบคุม คุณภาพและใช้รายงานผลการทดสอบในผลิตภัณฑ์ของ ผู้ประกอบการผลิต เพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนตำรับ หรือใช้ในการส่งออกผลิตภัณฑ์ไปยังประเทศคู่ค้า การศึกษานี้เป็นการปรับปรุงแนวทางการเขียนขอบข่าย การรับรองด้านสาธารณสุขของผลิตภัณฑ์ยา เครื่องสำอาง และเครื่องมือแพทย์ ให้ห้องปฏิบัติการที่จะขอการรับรอง ใช้เป็นแนวทางในการระบุรายละเอียดข้อมูลจำเพาะที่ ขอการรับรอง (กว.2) ซึ่งประกอบด้วยส่วนสำคัญ คือ ชื่อผลิตภัณฑ์/ชนิดตัวอย่าง (product/type of sample) รายการทดสอบ (test) และวิธีทดสอบ (method) ข้อมูล ดังกล่าวจะเชื่อมโยงกับการออกใบรับรองความสามารถ ห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017⁽¹⁾ กำหนดว่า หน่วยรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการ ต้องรับรองขอบข่ายของห้องปฏิบัติการให้มีความถูกต้อง สอดคล้องกับวิธีทดสอบที่ได้รับการรับรอง

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข มีบทบาท หน้าที่และการดำเนินงานที่เชื่อมโยงกัน โดยสำนักงาน คณะกรรมการอาหารและยามีภารกิจ ในการกำกับดูแล ตามกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันและคุ้มครองสุขภาพ ของประชาชนจากการบริโภคผลิตภัณฑ์สุขภาพ โดย ผลิตภัณฑ์สุขภาพต้องมีคุณภาพและปลอดภัย ผ่านการ

ทดสอบในห้องปฏิบัติการที่มีความสามารถตามมาตรฐาน สากลและน่าเชื่อถือ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีภารกิจที่สำคัญ ในการเป็นหน่วยวิเคราะห์ทดสอบ วิจัย พัฒนา และรับรองคุณภาพมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ด้าน การแพทย์และสาธารณสุขตามมาตรฐานสากล สำนัก มาตรฐานห้องปฏิบัติการ (สมป.) ซึ่งได้รับการยอมรับใน ฐานะหน่วยรับรองมาตรฐานสากลและเป็นสมาชิกสามัญ ที่ลงนามความร่วมมือระหว่างประเทศ (Mutual recognition arrangement) กับ Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC) และ Inter- national laboratory accreditation cooperation (ILAC) มีกระบวนการรับรองที่สอดคล้องกับมาตรฐาน สากล ISO/IEC 17011 (conformity assessment- requirements for accreditation bodies accrediting conformity assessment bodies) และ APAC MRA-001 (procedures for establishing and maintaining mutual recognition amongst APAC accreditation bodies) ให้การรับรองความสามารถ ห้องปฏิบัติการทดสอบที่ดำเนินการสอดคล้องกับ มาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 (general requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO 15189 (medical laboratories-requirements for quality and competence), ISO 15190 (medical laboratories- requirements for safety, ISO 22870 (point-of-care testing POCT) –requirements for quality and competence) และให้การรับรองหน่วยผลิตวัสดุอ้างอิง ตามมาตรฐาน ISO 17034 (general requirement for the competence of reference material producers) รวมทั้งกฎหมายและระเบียบราชการของประเทศไทย

ในฐานะผู้ศึกษาทำหน้าที่ผู้ประสานงานของหน่วยงาน พบว่าปัญหาการระบุขอบข่ายชนิดผลิตภัณฑ์ของ ห้องปฏิบัติการที่ยื่นขอการรับรองไม่ชัดเจนและ ไม่ครอบคลุมส่งผลให้มีการแก้ไขขอบข่ายการรับรอง ก่อนออกใบรับรองหลายครั้ง สาเหตุเกิดจากห้องปฏิบัติการ ที่ยื่นขอการรับรองและบุคลากรที่เกี่ยวข้องมีความรู้ ความเข้าใจไม่ถูกต้อง ไม่ครบถ้วน ในการระบุขอบข่าย

ที่ขอการรับรองตามแนวทาง/หลักเกณฑ์การเขียนที่
ห้องปฏิบัติการระบุรายละเอียด ชื่อผลิตภัณฑ์/ชนิด
ตัวอย่าง รายการทดสอบ และวิธีทดสอบ ให้เป็นไปใน
แนวทางเดียวกันในทุกห้องปฏิบัติการที่ขอการรับรอง
ก่อนเข้าสู่กระบวนการให้การรับรอง จากการศึกษาข้อมูล
พบว่าการระบุข้อบกพร่องการรับรอง โดยการอ้างอิงหลักเกณฑ์
ตามกฎหมาย หรือประกาศของหน่วยงานกำกับดูแล
ตามกฎหมาย หรือกำหนดมาตรฐานไว้เป็นการเฉพาะ
เช่น พระราชบัญญัติ ประกาศกระทรวงสาธารณสุขตามที่
กฎหมายกำหนดด้านยา เครื่องสำอาง และเครื่องมือแพทย์
พบประเด็นที่เป็นปัญหามากที่สุด คือ ชนิดผลิตภัณฑ์

การดำเนินการพิจารณาการเขียน/รูปแบบข้อบกพร่อง
ที่ขอการรับรองด้านยา เครื่องสำอาง และเครื่องมือแพทย์
ใน กว.2⁽²⁾ ผู้ประสานงานและห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องมี
แนวทาง/หลักการเขียนเพื่อให้เกิดความเข้าใจที่ตรงกัน
เข้าใจง่าย อำนวยความสะดวกในการกรอกข้อมูลได้
อย่างถูกต้อง ลดระยะเวลาขั้นตอนการยื่นขอรับรอง
ห้องปฏิบัติการและข้อบกพร่องมีความถูกต้อง เป็นที่ยอมรับ
ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025⁽³⁾ และตามกฎหมาย
หรือประกาศข้อกำหนดเฉพาะที่เกี่ยวข้อง

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ข้อมูลสำหรับใช้
ในการปรับปรุงแนวทางการอ้างอิงการระบุรายละเอียด
ข้อบกพร่องที่ยื่นขอการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการ
ทดสอบด้านยา เครื่องสำอาง และเครื่องมือแพทย์ รวมถึง
ข้อบกพร่องการรับรองห้องปฏิบัติการด้านสุขภาพอื่นๆ
(G 07 15 016) เช่น ผลิตภัณฑ์อาหาร เป็นต้น การให้
การรับรอง โดยห้องปฏิบัติการที่ยื่นขอการรับรองความ
สามารถห้องปฏิบัติการทดสอบดังกล่าว สามารถระบุ
ข้อบกพร่องการรับรองที่ยื่นขอการรับรองใน กว.2 ให้มีรูปแบบ
และรายละเอียดที่ถูกต้อง ครบถ้วน ชัดเจน สอดคล้อง
กับการอ้างอิงตามกฎหมายหรืออ้างอิงถึงมาตรฐานวิธี
ทดสอบ ครอบคลุมทั้งวิธีทดสอบที่เป็นมาตรฐาน
(standard method) และวิธีไม่เป็นมาตรฐาน
(non-standard method) ให้เป็นไปในแนวทางเดียวกัน
ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ถูกต้อง ออกใบรับรอง
ทันตามระยะเวลาที่กำหนดและสามารถนำไปใช้งานได้
ตามวัตถุประสงค์

วัสดุและวิธีการ

การรวบรวมข้อมูล

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงวิเคราะห์แบบย้อนหลัง
(retrospective analysis study) โดยใช้ข้อมูลห้อง
ปฏิบัติการที่ยื่นขอการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการ
ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ในข้อบกพร่องผลิตภัณฑ์ยา
เครื่องสำอาง และเครื่องมือแพทย์ ทั้งก่อนและหลัง
ได้รับการรับรอง ซึ่งได้แหล่งข้อมูลจากห้องปฏิบัติการ
ที่ยื่นขอการรับรองดังกล่าวระหว่าง ปี พ.ศ. 2563–2565
จำนวน 28 แห่ง แบ่งเป็น ชื่อผลิตภัณฑ์ยา เครื่องสำอาง
และเครื่องมือแพทย์ จำนวน 164, 53 และ 57 รายการ
ตามลำดับ ศึกษาปริมาณของผลิตภัณฑ์ ที่ตามหน่วยงาน
กำกับดูแลตามกฎหมายหรือมาตรฐานกำหนดไว้
เป็นการเฉพาะตามข้อบกพร่องที่ทำการศึกษาด้านยา
13 ฉบับ เครื่องมือแพทย์ 40 ฉบับ และเครื่องสำอาง 12
ฉบับ จาก อย. ซึ่งเป็นหน่วยงานหลักของประเทศไทย
ที่กำกับดูแล ควบคุมคุณภาพ และความปลอดภัยของ
ผลิตภัณฑ์สุขภาพที่จำหน่ายในท้องตลาด

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ปัญหาที่พบจากการระบุข้อบกพร่องผลิตภัณฑ์ยา
เครื่องสำอาง และเครื่องมือแพทย์ จำนวน 28 แห่ง เป็น
ข้อมูลที่สมบูรณ์คือ มีข้อมูลตั้งแต่ครั้งแรกที่ห้องปฏิบัติการ
ยื่นขอการรับรองจนกระทั่งผ่านการพิจารณาให้การรับรอง
จากทั้งหมด 127 แห่ง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2563–2565 ที่ปรากฏ
บนเว็บไซต์ ศึกษารูปแบบหรือแนวทางการระบุข้อ
บกพร่องของหน่วยรับรองอื่นๆ ทั้งภายในประเทศและ
ต่างประเทศ เพื่อวิเคราะห์หลักเกณฑ์ในการเขียน
ชื่อผลิตภัณฑ์/ตัวอย่าง นำไปสู่การปรับแก้ไขแนวทางการ
ปฏิบัติในการอ้างอิงวิธีทดสอบตามข้อบกพร่องการรับรอง
ห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสาธารณสุข (G 07 15 016)
เพื่อให้ห้องปฏิบัติการ ทีมผู้ประสานงาน ผู้ตรวจประเมิน
และผู้ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรับรองความสามารถ
ห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 นำไป
ใช้เป็นแนวทางปฏิบัติสำหรับช่วยในการตัดสินใจการระบุ
รายละเอียดข้อบกพร่องการรับรองได้อย่างถูกต้องและเป็นไป
ในทิศทางเดียวกัน

แนวทางการพิจารณาการอ้างอิงชื่อผลิตภัณฑ์ยา เครื่องสำอาง และเครื่องมือแพทย์ ประกอบด้วย กรณีที่ 1 มีกฎหมาย หรือประกาศของหน่วยงานกำกับดูแลตามกฎหมาย หรือกำหนดมาตรฐานไว้เป็นการเฉพาะ กรณีที่ 2 ไม่มีกฎหมายหรือประกาศของหน่วยงานกำกับดูแลตามกฎหมายเฉพาะ แต่มีการระบุไว้ในเอกสารอ้างอิงหรือเอกสารตีพิมพ์ด้านวิชาการขององค์กรที่ได้รับการยอมรับในระดับสากล โดยการอ้างอิงชื่อผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 กรณี ต้องไม่ระบุตามชื่อทางการค้า หากมีความหมายกว้างต้องระบุหมายเหตุ/ขึ้นบ่ง ให้ชัดเจน

ผล

จากการศึกษาและข้อมูลการวิเคราะห์ปัญหาที่พบ การระบุชื่อชนิดผลิตภัณฑ์/ตัวอย่างของห้องปฏิบัติการทดสอบ เพื่อต่ออายุการรับรอง ขยายขอบข่าย และขอการรับรองใหม่ จำนวน 28 แห่ง รวมทั้งสิ้น 274 รายการ ประกอบด้วย ผลิตภัณฑ์ยา จำนวน 164 รายการ ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง จำนวน 53 รายการ และเครื่องมือแพทย์จำนวน 57 รายการ และจำนวนผลิตภัณฑ์

ที่ระบุไม่สอดคล้องกับวิธีอ้างอิง ผลิตภัณฑ์ยา จำนวน 36 รายการ เครื่องสำอาง จำนวน 53 รายการ และเครื่องมือแพทย์ จำนวน 7 รายการ รวมทั้งสิ้น 96 รายการ พบว่าผลิตภัณฑ์กลุ่มเครื่องสำอางระบุไม่สอดคล้องกับวิธีอ้างอิงของสูงสุดร้อยละ 100 รองลงมา ได้แก่ ผลิตภัณฑ์กลุ่มยา ร้อยละ 22 และผลิตภัณฑ์กลุ่มเครื่องมือแพทย์ ร้อยละ 12 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างผลิตภัณฑ์/ชนิดตัวอย่าง ที่ระบุไม่สอดคล้องกับวิธีอ้างอิงที่กำหนด ได้แก่ กลุ่มผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางพบความไม่สอดคล้องสูงสุดร้อยละ 55 รองลงมา ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ยาร้อยละ 38 และผลิตภัณฑ์เครื่องมือแพทย์ร้อยละ 7 ตามลำดับ ซึ่งเป็นกรณีที่มีกฎหมายกำหนด แต่พบว่าห้องปฏิบัติการระบุชื่อผลิตภัณฑ์ทางการค้า ชื่อผลิตภัณฑ์ที่มีความหมายกว้างและไม่ตรงตามกฎหมายกำหนด นอกจากนี้พบว่าหลังจากมีการให้ข้อมูล/ข้อเสนอแนะห้องปฏิบัติการทั้ง 28 แห่ง มีการแก้ไขให้สอดคล้องกับแนวทางการอ้างอิงวิธีทดสอบตามขอบข่ายการรับรองห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสาธารณสุข ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ข้อมูลที่ไม่สอดคล้องกับแนวทางปฏิบัติในการอ้างอิงวิธีทดสอบตามขอบข่ายการรับรองห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสาธารณสุข (G 0715016)

แนวทางการพิจารณา	ประเภทผลิตภัณฑ์		
	ผลิตภัณฑ์ยา (รายการ)	ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (รายการ)	ผลิตภัณฑ์เครื่องมือแพทย์ (รายการ)
กรณีที่ 1 มีกฎหมายกำหนด	36	20	3
กรณีที่ 2 ไม่มีกฎหมาย ให้ระบุตามเอกสารอ้างอิง	–	33	4

ที่มา: กว.2 ของห้องปฏิบัติการปี พ.ศ. 2563-2565

ตารางที่ 2 การเขียนชื่อผลิตภัณฑ์/ชนิดตัวอย่างของห้องปฏิบัติการที่ยื่นขอการรับรอง ทั้งก่อนและหลังการชี้แจง
วิธีการอ้างอิงการเขียนในรูปแบบฟอร์มข้อมูลจำเพาะที่ขอการรับรอง

ผลิตภัณฑ์/ชนิดตัวอย่าง (ก่อนการแก้ไข)	ผลิตภัณฑ์/ชนิดตัวอย่าง (หลังการแก้ไข)	หน่วยกำกับดูแลตามกฎหมาย/ เอกสารอ้างอิง (วัตถุประสงค์)
1. ชื่อทางการค้า	Isosorbide mononitrate tablets	ตามทะเบียนตำรายา ⁽⁴⁾
2. ชื่อทางการค้า	Simvastatin Tablet	ตามทะเบียนตำรายา ⁽⁴⁾
3. ชื่อทางการค้า	Sterile Water For Injection	ตามทะเบียนตำรายา ⁽⁴⁾
4. ชื่อทางการค้า	Amoxicillin and Clavulanic acid Tablet	ตามทะเบียนตำรายา ⁽⁴⁾
5. ชื่อทางการค้า	Lyophilized Injection* Acyclovir Sodium Omeprazole sodium Pantoprazole sodium Amphotericin B Omeprazole sodium	ตามทะเบียนตำรายา ⁽⁴⁾
6. ยาผงแห้งเพื่อละลายน้ำชนิด รับประทาน (oral powder)	ยาผง (Oral powder) Azithromycin Cefdinir	ตามทะเบียนตำรายา ⁽⁴⁾
7. ขมิ้นชัน (Khamin Chan)	สมุนไพร ขมิ้นชัน (ผง, ผงบรรจุแคปซูล) Curcuma Longa, Linn. (powder, powder in capsule)	Department of Medical Sciences. Thai herbal pharmacopoeia 2019 volume I. Nonthaburi: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; 2019. ⁽⁵⁾ Pharmacopoeia
8. ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (ครีม โลชั่น เจล ของเหลว ของแข็งแข็งกึ่งเหลว สบู่ แป้ง)	ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง* ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว ผลิตภัณฑ์ปกปิด ริ้วรอย ผลิตภัณฑ์ตกแต่ง (สำหรับ ใช้ทาบริเวณรอบดวงตา ใบหน้า และร่างกาย) ผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผม และหนังศีรษะ	ตามการจดแจ้งเครื่องสำอาง ⁽⁶⁾
9. ผลิตภัณฑ์เพื่อสุขอนามัย สำหรับมือ (แบบไม่ใช้น้ำ ล้างออก) ประเภทเจลและ สารละลายที่มีแอลกอฮอล์ เป็นส่วนประกอบ (hand sanitizer gel and solution)	ผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วน ประกอบเพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ (alcohol-based hand sanitizer) - เจล (gel) - สารละลาย (solution)	ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนด ลักษณะของเครื่องสำอางที่มีส่วนผสม ของแอลกอฮอล์เพื่อสุขอนามัย สำหรับมือ ที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือขาย พ.ศ. 2563 ⁽⁷⁾

ตารางที่ 2 การเขียนชื่อผลิตภัณฑ์/ชนิดตัวอย่างของห้องปฏิบัติการที่ยื่นขอการรับรอง ทั้งก่อนและหลังการชี้แจงวิธีการอ้างอิงการเขียนในแบบฟอร์มข้อมูลจำเพาะที่ขอการรับรอง (ต่อ)

ผลิตภัณฑ์/ชนิดตัวอย่าง (ก่อนการแก้ไข)	ผลิตภัณฑ์/ชนิดตัวอย่าง (หลังการแก้ไข)	หน่วยกำกับดูแลตามกฎหมาย/ เอกสารอ้างอิง (วัตถุประสงค์)
10. แผ่นชุบด้วยแอลกอฮอล์ (alcohol pad)	ผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อฆ่าเชื้อสำหรับมนุษย์ สัตว์ และเครื่องมือแพทย์ (alcohol-based humans animals and medical cleaning) - แผ่นเยื่อกระดาษ (pad)	ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อฆ่าเชื้อสำหรับมนุษย์ สัตว์ และเครื่องมือแพทย์ พ.ศ. 2562 ⁽⁸⁾
11. ถุงมือยาง	ถุงมือยางสำหรับการตรวจโรค ชนิดใช้ครั้งเดียว - ยางธรรมชาติ - ยางสังเคราะห์	ตาม มอก. 1056 เล่ม 1-2556 ⁽⁹⁾ ถุงมือยางทางการแพทย์ชนิดใช้ครั้งเดียว
12. ผ้าเย็บ ผ้าเปียก ทิชชูเปียก	- ผ้าเย็บ - ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด (ผ้าเปียก/ทิชชูเปียก) - ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด จุดซ่อนเร้น(ผ้าเปียก/ทิชชูเปียก) - ผลิตภัณฑ์ลดเหงื่อหรือระงับกลิ่นกาย (ผ้าเปียก/ทิชชูเปียก)	- ตาม มอก. 1511-2559 ผ้าเย็บและกระดาษเย็บ ⁽¹⁰⁾ - ตามหลักเกณฑ์การจดทะเบียนเครื่องสำอาง สำนักควบคุมเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ที่มา: แบบ กว.2 ข้อมูลจำเพาะส่วนที่ขอการรับรองของห้องปฏิบัติการ

วิจารณ์

จากการวิเคราะห์ปัญหาที่พบการระบุชื่อผลิตภัณฑ์/ชนิดตัวอย่างด้านยา เครื่องสำอาง และเครื่องมือแพทย์ของห้องปฏิบัติการทดสอบ ที่ยื่นแบบข้อมูลจำเพาะส่วนที่ขอการรับรอง เพื่อขอการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 และตามนโยบาย ข้อกำหนด และเงื่อนไขการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการทดสอบรายการที่ได้รับการรับรองตามวัตถุประสงค์พบปัญหาการสื่อสารและการสืบค้นข้อมูลของผู้ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการด้านสาธารณสุขของห้องปฏิบัติการ ผู้รับบริการ ผู้ประสานงาน ผู้ตรวจประเมิน และคณะกรรมการรับรองความสามารถ

ห้องปฏิบัติการว่ามีแนวทางในการระบุชื่อผลิตภัณฑ์/ตัวอย่างที่ห้องปฏิบัติการทดสอบอย่างไร เนื่องจากขอบข่ายการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบด้านคุ้มครองผู้บริโภคมีหลากหลายประเภทที่ให้การรับรอง ซึ่งมีความเชื่อมโยงกับหน่วยกำกับดูแลตามกฎหมายหลายหน่วยงาน หากห้องปฏิบัติการทดสอบสามารถระบุชื่อผลิตภัณฑ์ได้ถูกต้องสอดคล้องกับวิธีทดสอบที่อ้างอิงตั้งแต่นำขอการรับรองครั้งแรก การจัดทำใบรับรองมีความถูกต้องชัดเจน ส่งผลให้การรายงานผลการทดสอบที่มีเครื่องหมายการรับรองนำไปใช้ได้อย่างถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือตรงตามวัตถุประสงค์ของผู้รับบริการ

การเปรียบเทียบหน่วยงานที่ให้การรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบภายในประเทศ คือ สำนักงานคณะกรรมการมาตรฐานแห่งชาติ (สก.) ทั้งหมด 3 แห่ง (ไม่รวมกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) ดังนี้ 1) สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (สมอ.)⁽¹¹⁾ 2) กองบริหารและรับรองห้องปฏิบัติการ (บร.) กรมวิทยาศาสตร์บริการ (วศ.)⁽¹²⁾ รับรองระบบงานแก่หน่วยรับรองและหน่วยตรวจขอบข่ายความปลอดภัยของสินค้าเกษตรและอาหาร เกษตรอินทรีย์ และการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี 3) กองรับรองมาตรฐานสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.)⁽¹³⁾ ซึ่งทั้ง 3 หน่วยรับรองไม่มีห้องปฏิบัติการทดสอบยื่นขอการรับรองในด้านยา เครื่องสำอาง และเครื่องมือแพทย์ แต่จากแนวทางการระบุรายละเอียดในใบรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการ ที่ออกให้กับผู้รับบริการของหน่วยรับรองภายในประเทศ การระบุขอบข่ายการรับรองจะเป็นในแนวทางเดียวกัน ต่างกันที่ประเภทของผลิตภัณฑ์ การกำหนดช่วงขอบข่ายการขอการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการในรายการทดสอบ นอกจากนั้นพบว่า การระบุขอบข่ายที่ได้รับการรับรองของหน่วยรับรองต่างประเทศ ไม่แตกต่างจากรูปแบบการเขียนของ สมป. ซึ่งขอบข่ายที่ระบุในใบรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ตารางขอบข่ายการรับรอง (table of accredited items) ประกอบด้วยผลิตภัณฑ์/ชนิดตัวอย่าง รายการทดสอบ และวิธีทดสอบที่ใช้อ้างอิง ซึ่งแตกต่างกันตามแต่ละประเทศ แต่ให้ความหมายเหมือนกัน ส่วนของชื่อผลิตภัณฑ์/ชนิดตัวอย่าง ระบุตามส่วนประกอบ ลักษณะเฉพาะของตัวอย่างที่ห้องปฏิบัติการใช้ในการทดสอบ และเทคนิคเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบ เป็นต้น

การพิจารณาแนวทางการอ้างอิงผลิตภัณฑ์/ชนิดตัวอย่าง (product/type of sample) เพื่อกำหนดข้อมูลรายการทดสอบที่ขอการรับรอง ตามแบบขอข้อมูลส่วนจำเพาะที่ขอการรับรอง ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ไม่สามารถระบุผลิตภัณฑ์/ชนิดตัวอย่างที่แน่นอนและอาจปรับเปลี่ยนได้ตามสถานการณ์ จากปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ 1) กฎหมาย หรือประกาศ

ของหน่วยงานกำกับดูแลตามกฎหมาย หรือกำหนดมาตรฐานไว้เป็นการเฉพาะ มีการปรับแก้ไขไปตามสถานการณ์ต่าง ๆ ในปัจจุบันที่เกี่ยวข้อง เช่น ผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบ เพื่อสุขอนามัยสำหรับมือ เพื่อสุขลักษณะที่ดีในการป้องกันโรคโควิด 19 ได้มีประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดลักษณะของเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์เพื่อสุขอนามัยสำหรับมือที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือขาย พ.ศ. 2563 โดยมีผลบังคับใช้วันที่ 10 มีนาคม พ.ศ. 2563 กำหนดให้ผลิตภัณฑ์นี้เป็นเครื่องสำอางและต้องมีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ไม่ต่ำกว่า 70% โดยปริมาตร ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ซึ่ง อย. ประกาศไว้เป็นการเฉพาะ 2) ปัจจุบันความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีทำให้เกิดนวัตกรรมใหม่ๆ ในการผลิตทำให้ผลิตภัณฑ์ด้านคุ้มครองผู้บริโภคมีความหลากหลายในด้านรูปแบบ การใช้สาร และเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่เคยมีมาก่อน ส่งผลให้รายการทดสอบและวิธีทดสอบที่ใช้อ้างอิงในการตรวจวิเคราะห์ ต้องปรับเปลี่ยนไปตามผลิตภัณฑ์ที่มีการเปลี่ยนแปลง

ผู้ให้บริการสามารถศึกษาแบบการระบุชื่อผลิตภัณฑ์หรือตัวอย่างของหน่วยรับรองต่างประเทศ (<https://www.apac-accreditation.org/membership/>)⁽¹⁴⁾ อาทิ กลุ่ม medical devices (including implantable) tissue (support SAL validation) and sterile medical devices ที่ใช้การทดสอบ bacterial endotoxin (LAL) test ใช้วิธีอ้างอิงจาก ANSI/AAMI ST72, USP <85>, USP <161> โดยหน่วยงาน American Association for Laboratory Accreditation (A2LA), USA⁽¹⁵⁾ กลุ่ม Latex Total ใช้การทดสอบ solids content, dry rubber contents, density และ viscosity ใช้วิธีอ้างอิงจาก ISO 124:2014, Ed.7, ISO 126:2005, Ed.5, ISO 705:1994, Ed. 2, ISO 1652:2011, Ed.⁽⁴⁾ โดยหน่วยงาน Standards Malaysia, Malaysia.⁽¹⁶⁾ กลุ่ม cosmetics and pharmaceuticals ใช้การทดสอบ microbiological (antimicrobial effectiveness of preservatives และ microbial analysis-total plate count) ใช้วิธีอ้างอิงจาก USP <51>, <2027> USP <61>, <2021>

โดยหน่วยงาน National association of testing authorities, Australia (NATA)⁽¹⁷⁾ เป็นต้น

การติดตาม ศึกษา และสืบค้นข้อมูลของหน่วยงานกำกับดูแลตามกฎหมายหรือกำหนดมาตรฐานไว้เป็นการเฉพาะ เช่น พระราชบัญญัติอาหารพระราชบัญญัติยา⁽¹⁸⁾ พระราชบัญญัติเครื่องสำอาง⁽¹⁹⁾ พระราชบัญญัติเครื่องมือแพทย์⁽²⁰⁾ พระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าทางการเกษตร มาตรฐานกรมอนามัย มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำบริโภค เอกสารอ้างอิง หรือเอกสารตีพิมพ์ด้านวิชาการขององค์กรที่ได้รับการยอมรับในระดับสากล เป็นต้น เพื่อให้ทันสถานการณ์ในโลกปัจจุบันอย่างสม่ำเสมอ ปัจจุบันหน่วยรับรองระบบงาน (accreditation body, AB) ทั้ง 4 แห่ง ได้แก่ สำนักมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงอุดมศึกษาวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้บูรณาการในรูปแบบเครือข่าย (single platform) เพื่อสนับสนุนการยกระดับมาตรฐานคุณภาพสินค้าและบริการตอบสนองยุทธศาสตร์ชาติในอุตสาหกรรมเป้าหมาย เพื่อประโยชน์สูงสุดของห้องปฏิบัติการและผู้ให้บริการ การศึกษาแนวทางการอ้างอิงวิธีทดสอบในขอบข่ายด้านยา เครื่องสำอาง และเครื่องมือแพทย์สามารถปรับแนวทางการเขียนสำหรับห้องปฏิบัติการที่ยื่นขอการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 ในขอบข่ายด้านอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น ด้านอาหาร ด้านสัตวแพทย์ และรวบรวมข้อมูลขอบข่ายการรับรองเพื่อนำไปพัฒนาเป็นฐานข้อมูลต่อไป

ประโยชน์ที่ได้รับจากการศึกษาแนวทางการอ้างอิงขอบข่ายด้านยา เครื่องสำอาง และเครื่องมือแพทย์ ผู้รับบริการนำแนวทางดังกล่าวไปใช้กรอกข้อมูลส่วนจำเพาะที่ขอการรับรองได้ถูกต้อง ทราบแนวทางการเขียนรายละเอียดขอบข่ายการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการออกใบรับรองความสามารถให้ห้องปฏิบัติการ นอกจากสอดคล้องกับมาตรฐานสากล ยังมีหลักการ

อ้างอิงตามหน่วยกำกับดูแลตามกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับผู้ประสานงาน ซึ่งทำหน้าที่เบื้องต้นในการตรวจสอบเอกสารจากผู้รับบริการ ที่ยื่นขอรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 นำไปใช้เป็นแนวทางในการตรวจสอบรายละเอียดผลิตภัณฑ์/ชนิดตัวอย่างให้ถูกต้องสอดคล้องกับรายการทดสอบ วิธีทดสอบ ลระยะเวลาในการยื่นเอกสารกับหน่วยรับรอง และรายงานผลการทดสอบที่ใช้เครื่องหมายรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 มีความถูกต้อง

สรุป

การศึกษาแนวทางวิธีการอ้างอิงชื่อผลิตภัณฑ์/ตัวอย่างในขอบข่ายด้านยา เครื่องสำอาง และเครื่องมือแพทย์ ซึ่งใช้เป็นแนวทางการแก้ไข ปรับปรุง และเพิ่มเติมแนวทางปฏิบัติวิธีการอ้างอิงวิธีทดสอบตามขอบข่ายการรับรองห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสาธารณสุข ใช้เป็นเครื่องมือแนวทางปฏิบัติ เพื่อให้ห้องปฏิบัติการที่ยื่นขอการรับรองความสามารถด้านการทดสอบตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 ผู้ประสานงาน (case office) ผู้ตรวจประเมิน (assessor) และผู้ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรับรองให้สามารถอ้างอิงวิธีการเขียนผลิตภัณฑ์/ชนิดตัวอย่างได้อย่างถูกต้องครอบคลุมวิธีทดสอบที่ห้องปฏิบัติการใช้ทดสอบ โดยเฉพาะผู้ประสานงานห้องปฏิบัติการที่ตรวจสอบเอกสารของห้องปฏิบัติการที่ยื่นขอการรับรองฯ ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญลำดับแรกให้สามารถสื่อสารชี้แจงแนวทางวิธีการเขียน กว.2 ได้อย่างถูกต้อง ส่งผลให้กระบวนการรับรองในขั้นตอนการยื่นเอกสารการตรวจประเมิน การแก้ไขข้อบกพร่อง การพิจารณาให้การรับรองของคณะกรรมการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการด้านสาธารณสุข การออกใบรับรองมีความถูกต้องชัดเจน ลระยะเวลาในการออกใบรับรองหลังผ่านคณะกรรมการรับรองฯ ใบรายงานผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการที่ใช้เครื่องหมายรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 และนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ตามวัตถุประสงค์ของผู้รับบริการ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่กลุ่มรับรองห้องปฏิบัติการ
ด้านการแพทย์และสาธารณสุข สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่สนับสนุนการศึกษานี้
และขอขอบคุณ ดร.สิทธิพร ปานเม่น ที่ให้คำแนะนำและ
แก้ไขการเขียนบทความให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. ISO/IEC 17011:2017. Conformity assessment – requirements for accreditation bodies accrediting conformity assessment bodies. Geneva: International Organization for Standardization; 2017.
2. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ. ข้อมูลส่วนจำเพาะส่วนที่ขอการรับรอง [ออนไลน์]. 2565; [สืบค้น 15 เม.ย. 2565]; [7 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://blqs.dmsc.moph.go.th/page-view/171>.
3. ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: International Organization for Standardization; 2017.
4. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ตรวจสอบการอนุญาต [ออนไลน์]. 2565; [สืบค้น 4 พ.ย.2565]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://www.fda.moph.go.th/sites/drug/SitePages>.
5. Department of Medical Sciences. Thai herbal pharmacopoeia 2019 volume I. Nonthaburi: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; 2019.
6. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. การอนุญาตเกี่ยวกับเครื่องสำอาง [ออนไลน์]. 2565; [สืบค้น 8 พ.ค. 2565]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://www.fda.moph.go.th/sites/Cosmetic/SitePages/Permission.aspx>.
7. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดลักษณะของเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์เพื่อสุชนามัยสำหรับมือ ที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือขาย พ.ศ. 2563. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 54 ง (วันที่ 9 มีนาคม 2563).
8. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเพื่อฆ่าเชื้อสำหรับมนุษย์ สัตว์ และเครื่องมือแพทย์ พ.ศ. 2562. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 136 ตอนพิเศษ 230 ง (วันที่ 13 กันยายน 2562).
9. ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมถุงมือสำหรับการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ชนิดใช้ครั้งเดียว เล่ม 1 : เกณฑ์กำหนดสำหรับถุงมือที่ทำจากน้ำยางหรือสารละลายยาง มอก.1056 เล่ม 1-2556. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 131 ตอนพิเศษ 60 ง (วันที่ 8 เมษายน 2557).
10. ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมผ้าเย็บและกระดาดเย็บ มอก. 1511-2559. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 133 ตอนพิเศษ 270 ง (วันที่ 23 พฤศจิกายน 2559).
11. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (สมอ.) กระทรวงอุตสาหกรรม. การรับรองระบบงาน [ออนไลน์]. 2565; [สืบค้น 2 เม.ย. 2566]; [41 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: https://www.tisi.go.th/website/about/tisi_acc.
12. สำนักบริหารและรับรองห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม. รายงานห้องปฏิบัติการแยกตามสาขา [ออนไลน์]. 2565; [สืบค้น 13 มิ.ย. 2565]; [10 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: https://labthai.dss.go.th/dss/report/actLab/report_actLab.php.
13. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. รายชื่อหน่วยตรวจและหน่วยรับรอง [ออนไลน์]. 2565; [สืบค้น 13 มิ.ย. 2565]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: https://cabservices.acfs.go.th/Act5/Certs_CB.
14. Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC). Membership [online]. 2022; [cited 2022 Jun 13]; [1 screen]. Available from: URL: <https://www.apac-accreditation.org/membership/>.
15. American Association for Laboratory Accreditation (A2LA). A2LA inspires confidence in quality. [online]. 2022; [cited 2022 Jun 13]; [1 screen]. Available from: URL: <https://a2la.org/#>.

16. Department of Standards Malaysia. Accredited organisation [online]. 2022; [cited 2022 Jun 13]; [1 screen]. Available from: URL: <https://www.jsm.gov.my/accredited-organisation-directories>.
17. National Association of Testing Authorities, Australia (NATA). ISO/IEC 17025 testing & calibration [online]. 2022; [cited 2022 Jun 13]; [3 screens]. Available from: URL: <https://nata.com.au/accreditation/laboratory-accreditation-iso-iec-17025/>.
18. พระราชบัญญัติยา (พ.ศ. 2510). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 84 ตอนที่ 101 (วันที่ 20 ตุลาคม 2510).
19. พระราชบัญญัติเครื่องสำอาง (พ.ศ. 2558). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 132 ตอนที่ 86 ก (วันที่ 8 กันยายน 2558).
20. พระราชบัญญัติเครื่องมือแพทย์ ฉบับที่ 2 (พ.ศ. 2562). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 136 ตอนที่ 56 ก (วันที่ 30 เมษายน 2562).

Specifying of Pharmaceutical Products, Cosmetics and Medical Devices in the Accredited Laboratory Certificate of the Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences

Suwan Chuenjai,¹ Awiruth Khejonit,¹ Saovanee Aromsook,¹ Surasak Muenphon,²
and Patravee Soisangwan¹

¹ Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

² Regional Medical Sciences Center 9 Nakhon Ratchasima, Department of Medical Sciences,
Nakhonratchasima 30000, Thailand

ABSTRACT The specifying of laboratory accreditation scope of international standards is of considerable importance to the issuing of laboratory accreditation certificate according to the requirements of the international standard ISO/IEC 17025. Since 2013, the Bureau of Laboratory Quality Standards (BLQS) has determined a guideline to define format and specify scopes of laboratory accreditation. Currently, types of pharmaceutical products, cosmetics and medical devices are shown more varieties and relevant regulatory announcements are revised and issued. These changes affect to the guideline for specify accreditation scope not only the processes of pre- and post-accreditation but also the duration of the overall processes. The purpose of this study was to analyze problems from collected data to suggest the current context to revise the guideline for specifying of pharmaceutical products, cosmetics and medical devices to be mentioned in the accreditation certificate of BLQS. The study was compiled from the accreditation applications in the fields of pharmaceutical products, cosmetics, and medical devices of 28 from 127 (22.05%) laboratories with comparative data before and after accreditation from the year 2020 to 2022. The results showed that the accreditation scopes specified were deviated from the guidelines and the requirements of BLQS in the fields of cosmetics, medical devices, and pharmaceutical products which were 55%, 38% and 7% respectively. This study indicated that those relevant parties in the laboratory accreditation process did not have the consistent understanding of how to specify the accreditation scope. In addition, there were more varieties of health products according to the current situation. Therefore, this result will be useful for operators and related parties to accurately and clearly identify the accreditation scope to be applied for the intended purpose and reduce problems from correction.

Keywords: Scope of accreditation, ISO/IEC 17025, Pharmaceutical products, Cosmetics, Medical devices

Retrospective Study: Lessons Learned and Key Success Factors in the Promotion of the Production of Thai Traditional Medicines in Public Hospitals

Nophadon Luangpirom

College of Allied Health Science, Suan Sunandha Rajabhat University, Bangkok 10300, Thailand

ABSTRACT After the proclamation of the Alma-Ata Declaration, the Ministry of Public Health responded to WHO's recommendation by including traditional medicine policy to promote the use of medicinal plants in primary health care (PHC) in the Fourth National Economic and Social Development Plan (1977-1981). This research focused on the retrospective study of the lessons learned from the promotion of the production of Thai traditional medicines (TTM) in public hospitals in Thailand (2008-2013) and aimed to identify key success factors in TTM production development. According to the quantitative study among inexperienced public hospitals, the key success factors ranked from highest to lowest were budget, management, infrastructure, personnel development and networking. In contrast, the qualitative study among experienced public hospitals, the key success factors ranked from high to low were networking, personnel development, management, budget, and infrastructure, respectively. The discrepancy could be explained that, among the experienced hospitals, networking was the key driver and the most important sources of learning. The networking allowed the exchanges of both tacit and explicit knowledge that led to comprehensive understanding and know-how to effectively execute the TTM production project. Thus, the capacity of the project leader to influence team members and management personnel was simultaneously developed. In conclusion, the effectiveness of the budget spending and suitable infrastructure should be created by the project leader to successfully support the TTM production.

Keywords: Thai traditional medicines, Production, Key success factors, Public hospitals

Corresponding author: nophadon.lu@ssru.ac.th

Received: 11 October 2022

Revised: 5 June 2023

Accepted: 8 June 2023

Introduction

According to the revival of Thai traditional medicine (TTM) in 1978, various aspects and practices of TTM have been promoted for health promotion of the Thai people with the hope to fully integrate TTM into the National Health Service System, for example: medicinal plants and traditional medicines.⁽¹⁻³⁾ TTM was neglected for over 60 years until its revival began in the late 1970s as the World Health Organization (WHO) had urged its member states to include medicinal plants in their primary health care (PHC) schemes. In October 2002, the Department for the Development of Thai Traditional and Alternative Medicine was established as a new department under the Ministry of Public Health⁽²⁾, comprising the Institute of Thai Traditional Medicine, the Division of Alternative Medicine and the Office of the Secretary; currently, it is the Department of Thai Traditional and Alternative Medicine (DTAM).⁽²⁾ Therefore, the government has been committed to promoting TTM as another means of health care for Thai people.⁽⁴⁻⁶⁾ Thai public hospitals have responded and started to produce their own TTM products. However, in the beginning, the factory infrastructure and quality management system were poorly developed.⁽⁷⁾ To resolve such a situation, the “Programme on the Promotion of the Production of Thai Traditional Medicines in Thai Public Hospitals” was initiated by DTAM during the period 2008–2013. The development of herbal regulations was at the international level. So DTAM planned to improve and upgrade the factory infrastructure and quality management system of the public hospitals according to the recognized standards, for example, ASEAN

GMP, WHO GMP and GMP PIC/s. In the beginning phase, DTAM adopted the WHO GMP standards in 2013. The pilot project covered 47 public hospitals in five regions of the country: the North, the Northeast, the East, the South and the Central Parts. The project was an extension of the Project on TTM production promotion in Thai public hospitals for the period 2008–2013. Of all the 47 public hospitals, only 27 could adopt the WHO GMP standards, another 10 requested additional support from DTAM, and the rest were still at the beginning stage. So DTAM confirmed to conduct the research study to find out the key success factors in TTM production development in 37 public hospitals and to use the lessons learned from the TTM production promotion in Thai public hospitals between 2008 and 2013. The key success factors should be the guidelines for all other public hospitals which were in the process of adopting the WHO GMP standards. However, after the implementation according to the plan, there was a dramatic increase in the number of public hospitals that had met the WHO GMP standards. The consequence was the more acceptances in the Thai traditional medicines produced by the public hospitals. Besides, more and more Thai traditional medicines or formulas have been accepted and included in the National List of Essential Medicines.

Methodology

This cross-sectional study used both qualitative and quantitative methods. The qualitative part was designed for attaining a preliminary conceptual framework and proposing a development model; and qualitative data were collected using in-depth interviews

with 10 hospital directors, who were involved in the development of TTM production in public hospitals, including planning, organization development, learning processes, networking processes and resources allocation-in order to pursue as many variables as possible that were linked to the TTM production and development. All the 10 hospital directors (executives) could manage the TTM production very well and the system had successfully met WHO GMP standards.

The quantitative part included a regression analysis designed to confirm the consistency and explain the ability of the proposed model. The unit of analysis included the personnel who were involved in TTM production in the 27 public hospitals. The research period was between November 2013 and February 2014.

After literature review and reliability testing of 30 questionnaires,⁽⁸⁻¹¹⁾ the researcher conceptualized and proposed the model. Then the model was validated by experts before being distributed for further implementation. The proposed model included independent variables (physical structure, operational personnel, networking, budget and management) and a dependent variable (capability of TTM production according to international standards). The dependent variable was operationalized according to the WHO GMP standards and the questionnaire was written in the Thai language to avoid misinterpretation of the meaning of the capability of TTM production within the scope of international production. The questionnaire was validated by experts and with reliability testing; and its Cronbach's alpha was 0.890,

which was deemed as good. The Cronbach's alpha is a measure of internal consistency, that is, how closely related a set of items are as a group; and it can be written as a function of the number of test items and the average inter-correlation among the items.⁽¹²⁾

$$\alpha = \frac{k}{k-1} \left(1 - \frac{\sum V_i}{V_t} \right)$$

The Cronbach's alpha formula is where n is the number of items, V_t is the variance of the total scores and V_i is the variance of the item scores. The questionnaires were answered by 70 personnel who were involved in TTM production in the 27 public hospitals ($n = 70$).

Results

According to literature review and qualitative research, there were five groups of independent variables, which were investigated and conceptualized as follows: physical infrastructure, operational personnel, networking, budget, and management (Figure 1). Physical infrastructure had two elements: a) production infrastructure and utilities and b) readiness of production and quality control equipment. Operational personnel variables comprised basic knowledge, education level, experiences, skills, special talent, and personal characteristics. Networking was among suppliers, academic professors and operational personnel. Budget sources included the hospitals' revenue and regular budget from the central government agency.

Last but not least were management variables, including organizational management, management support, process management, knowledge management, and external linkages. At the experienced public hospitals, there were

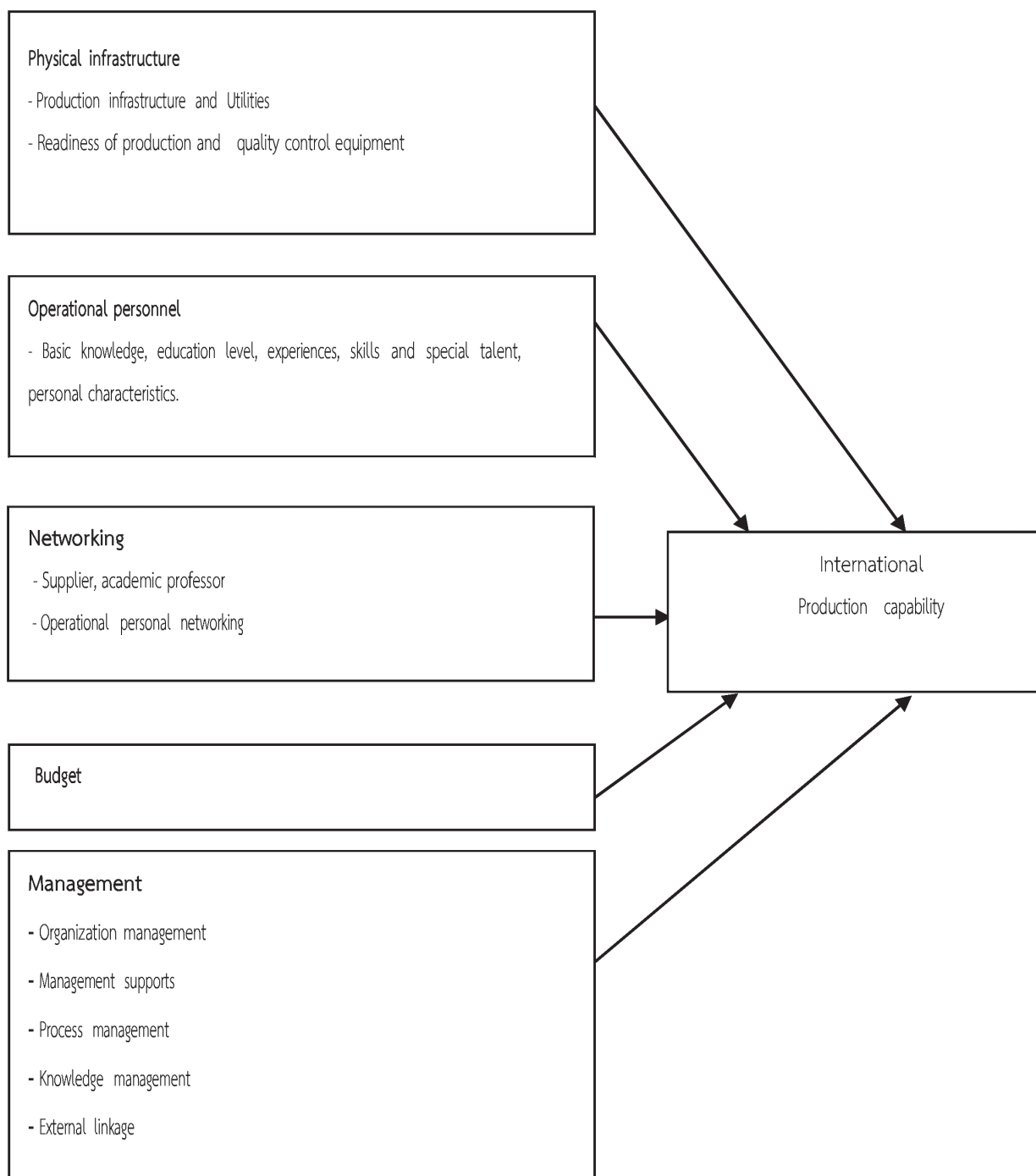


Figure 1 International production capability model of Thai public hospitals

personnel who had worked according to the WHO GMP standards, while in the inexperienced hospitals there were personnel who had worked, but the work did not meet the WHO GMP standards.

Regarding the qualitative aspect of this research, among the experienced public

hospitals, the key success factors ranked from the highest to the lowest were networking, personnel development, management, budget, and infrastructure, respectively. However, the result of the regression analysis of the International Production capability model of Thai public hospitals (Table 1) was quite opposite.

Among the inexperienced public hospitals, the key success factors ranked from the highest to the lowest were budget, management, infrastructure, personnel development, and networking.

The regression equation was as follows:

$$Y = 0.643 + 0.198X_1 + 0.111X_2 + 0.109X_3 + 0.407X_4 + 0.206X_5, \text{ where } X_1 = \text{physical infrastructure, } X_2 = \text{operational personnel, } X_3 = \text{networking, } X_4 = \text{budget, } X_5 = \text{management, and } Y = \text{internal production capability model of Thai public hospitals.}$$

Regression coefficient = slope of the graph and constant = Y-intercept according to linear regression calculation analysis.

According to the model, the five combined independent variables could be calculated as 53.60% of the variation of the dependent variable ($R^2 = 0.536$), $F = 12.940$, and $p\text{-value} = 0.05$.

Table 1 Regression analysis of production capability model of Thai public hospitals

Independent variables	Regression coefficient	Significant ($p\text{-value} \leq 0.05$)
Physical infrastructure	0.198	0.000
Operational personnel	0.111	0.000
Networking	0.109	0.000
Budget	0.407	0.000
Management	0.206	0.000
Constant	0.643	
Multiple R	0.732	

Discussion

Among the inexperienced public hospitals, they were still struggling to meet the WHO GMP standards, and they believed that the budget was the absolute solution for everything such as the acquisition of good infrastructure. The more costly infrastructure would lead to the better production capability of the factory. In fact, there was no such guarantee for this hypothesis. The production capability is more concerned with both explicit and tacit knowledge (in other words: know-how).⁽¹²⁾ They were too naive and thus underestimated the following aspects: personal development, learning process, budgeting process, management process especially in decision-making process, process management, knowledge management

and external linkage for know-how exchange. The missing link of the budget to these variables was the major failure of the inexperienced group, especially the networking which facilitates many aspects, for example, tacit knowledge exchange, decision-making process, learning from project mismanagement and peer-to-peer review, better process management, external linkage, and organization management to cope with the rapid change in production technology.

According to the qualitative analysis, the networking is believed to be one of the key drivers and important sources of learning. The networking is a kind of social capital which facilitates both explicit and tacit knowledge transfer, but more for tacit knowledge. The

social capital or the networking among public hospitals is crucial to create mutual trust and then the sharing of success stories.⁽¹³⁾ And such knowledge will be quickly transferred for resolving the repetitive failure of TTM production among the groups.

Conclusion

Thus, the right starting point is half finished. The networking allows the exchanges of both tacit knowledge and explicit knowledge leading to comprehensive understanding and know-how to execute the TTM production project effectively. The project leader who understands this phenomenon will be able to cope, get involved and work with the top management and make process management, knowledge management, and external linkage move effectively. Not only the production process improvement but also the decision-making process will be undertaken faster; avoiding trial and errors will lead to the many problems, especially the over-budget or poor budget spending and implementation. Thus, the capacity of the project leader to influence team members and management staff should be simultaneously developed. Finally, the effectiveness of the budget spending and suitable infrastructure should be created by the project leader to successfully support the effective and efficient TTM production.

References

1. World Health Organization. The third ten years of the World Health Organization: 1968-1978. Socrates Listios. Geneva: WHO; 2008.
2. Chokeyivat V. Policies and directions for the development of Thai traditional medicine and alternative medicine in Thailand. Bangkok: War Veterans Administration Printing; 2003. p. 41-74.
3. Primary health care and development. In: Declaration of Alma-Ata. International conference on primary health care, Alma-Ata, USSR, 6-12 September 1978. Geneva: World Health Organization; 1978. p. 44-52.
4. Department of Medical Services order no. 112/2536. Establishment of the Institute of Thai Traditional Medicine and Pharmacy, 26 March 1993. Bangkok: Institute of Thai Traditional Medicine and Pharmacy; 1993.
5. Bureau cratic reform act B.E. 2545. Section 43, Organization of the Ministry of Public Health, issued on 3 October 2002. Bangkok: Ministry of Public Health; 2002.
6. Ministerial regulation on the organization of the Department of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health B.E. 2545, issued on 9 October 2002. Bangkok: Ministry of Public Health; 2002.
7. Ministerial regulation on the organization of the Department of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health B.E. 2561, issued on 7 March 2018. Bangkok: Ministry of Public Health; 2018.
8. Kamoltham T, Sornrung W. Study on the development of international herbal hub of Thailand with good governance. International Journal of Management and Applied Science (IJMAS) 2016; 2(11); 15-20.
9. Kenya GMP Roadmap. A stepwise approach for the pharmaceutical industry to attain WHO GMP Standards. Vienna, Austria: United Nations Industrial Development Organization (UNIDO); 2014.
10. Sirikwin P, Pongpirul K, Sirikwin K, Anant-suksomsri S. Situation of public and private herbal pharmaceutical factories in Thailand. J Thai Trad Alt Med 2020; 18(1): 99-110.

-
11. Kwesiga V, Ekeocha Z, Byrn S, Clase K. Compliance to GMP guidelines for herbal manufacturers in East Africa: a position paper. BIRS Africa Technical Reports. [online]. 2021; [14 screens]. Available from: URL: <http://dx.doi.org/10.5703/1288284317428>.
 12. Tavakol M, Dennick R. Making sense of Cronbach's alpha. *Int J Med Educ* 2011; 2: 53-5.
 13. Luangpirom N. Innovation management. Bangkok: Duangkamol Publishing; 2015. p. 33-45.
-

การศึกษาย้อนหลัง: ถอดบทเรียนและปัจจัยหลักแห่งความสำเร็จในการส่งเสริมการผลิตยาแผนไทยในโรงพยาบาลของรัฐ

นพดล เหลืองภิรมย์

วิทยาลัยสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา กรุงเทพฯ 10300

บทคัดย่อ หลังจากคำประกาศอ้อมมาตา กระทรวงสาธารณสุขได้ปฏิบัติตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลก การแพทย์ไทยถูกบรรจุเข้าในนโยบายหลักสุขภาพ ตั้งแต่แผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 4 (พ.ศ. 2520–2524) การวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบย้อนหลังที่เน้นการถอดบทเรียนการผลิตยาแผนไทยในโรงพยาบาลของรัฐ เพื่อหาปัจจัยความสำเร็จของการผลิตยาแผนไทยในโรงพยาบาลของรัฐในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2551–2556 ผลการวิจัยเชิงปริมาณในกลุ่มโรงพยาบาลที่ไม่มีประสบการณ์มาก่อน พบว่าปัจจัยหลักความสำเร็จเรียงลำดับจากมากที่สุดไปน้อยที่สุด คือ งบประมาณ การบริหาร โครงสร้างพื้นฐาน การพัฒนาบุคลากร และการสร้างเครือข่าย ผลการวิจัยเชิงคุณภาพในโรงพยาบาลที่มีประสบการณ์ พบว่าปัจจัยหลักความสำเร็จเรียงลำดับจากมากที่สุดไปน้อยที่สุด คือ การสร้างเครือข่าย การพัฒนาบุคลากร การบริหาร งบประมาณ และโครงสร้างพื้นฐาน ตามลำดับ อธิบายข้อแตกต่างได้ดังนี้ การมีเครือข่ายเป็นกุญแจสำคัญในการเรียนรู้เพื่อทำให้เกิดการเริ่มต้นที่ถูกต้อง เกิดการแลกเปลี่ยนความรู้ข้อเรียนรู้และความรู้เด่นชัดในประสบการณ์การทำงาน ส่งผลให้เกิดความรู้ความเข้าใจ ในการดำเนินงานที่มีประสิทธิผลในการปฏิบัติงานบริหารโครงการผลิตยาแผนไทย จึงเป็นการเพิ่มขีดความสามารถของหัวหน้าโครงการในการโน้มน้าวทีมงานและผู้บริหารในการผลิตยาแผนไทยให้ประสบความสำเร็จ เกิดการใช้งบประมาณอย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสมกับโครงสร้างพื้นฐาน เพื่อสนับสนุนการผลิตยาแผนไทยให้สำเร็จได้ในที่สุด

คำสำคัญ : ยาแผนไทย, การผลิต, ปัจจัยที่ทำให้ประสบความสำเร็จ, โรงพยาบาลของรัฐ

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	Nuanjan Wichukchinda	
Assistant Editor	Apiwat Tawatsin	Siripakorn Sangkitporn
	Piyada Wangroongsarb	
Editorial Board	Pilaipan Puthavathana	Mahidol University
	Prasert Auewarakul	Mahidol University
	Danai Tiwawech	Naresuan University
	Suwanna Charunut	Huachiew Chalermprakiet University
	Padet Siriyasatien	Chulalongkorn University
	Pornpimol Kongtip	Mahidol University
	Srisurang Tantimavanich	Mahidol University
	Sunee Sirivichayakul	Chulalongkorn University
	Chanitra Thuwajit	Mahidol University
	Pintip Pongpech	Independent Scholar
	Salakchit Chutipongvivate	Independent Scholar
	Usavadee Thavara	Independent Scholar
	Suthon Vongsheree	Independent Scholar
	Wichuda Chittangkura	Independent Scholar
	Supanee Duangteraprecha	Independent Scholar
	Nuanchawee Wetprasit	Independent Scholar
	Wantana Paveenkittiporn	Independent Scholar
	Uryakorn Chansang	Independent Scholar
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	Medical Sciences Technical Office Department of Medical Sciences	
	88/7 Soi Tiwanond 14, Tiwanond Rd., Nonthaburi 11000, Thailand.	
	Tel. 0-2951-0000 ext. 99662 Fax: 0-2951-1297	
	E-mail : bull.dmsc@dmsc.mail.go.th	
Printed by	Thanaaroonkarnpim Co., Ltd.	
	457/6-7 Phra Sumen Road, Bangkok 10200	
	Tel. 0-2282-6033-4	



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

เปิดใจ ใฝ่รู้ คู่คุณธรรม นำหลักวิชาการ มาตรฐานสากล



<https://bit.ly/BullDmsc>