

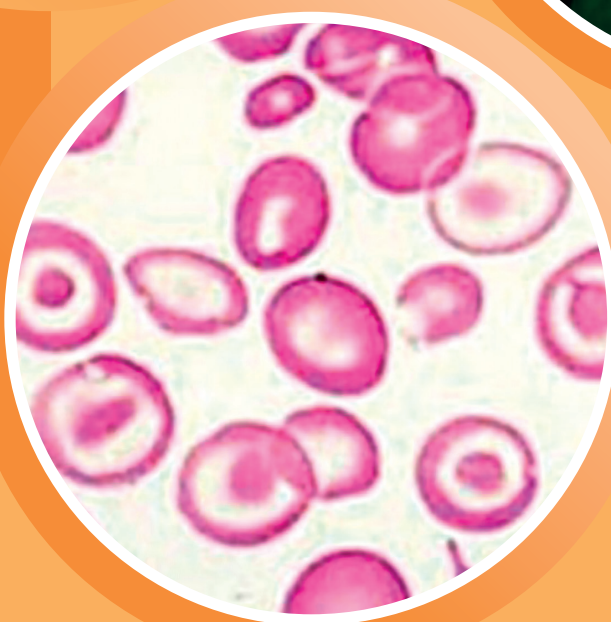


กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วารสาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 65 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2566 • Vol. 65 No. 3 July - September 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 ปวีทรานนท์ ดร.เดื่อนถนอม พรหมขัติแก้ว
บรรณาธิการบริหาร	ดร.ประไพ วงศ์สินคณมัน	
บรรณาธิการ	ดร.นวลจันทร์ วัจกษณ์จินดา	
รองบรรณาธิการ	ดร.อภิวัฏ ธวัชสิน ดร.ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์	นางสิริภากร แสงกิจพร
คณะบรรณาธิการ	ศ.เกียรติคุณ ดร.พิไลพันธ์ พุฒวัฒนะ ศ.ดร.นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล ดร.दनัย ทิวาเวช ศ.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร ศ.ดร.พรพิมล กองทิพย์ รศ.ดร.ศรีสุรางค์ ตันติมาวานิช ดร.สุณี ศิริวิชัยกุล ศ.ดร.พญ.ชนิตรา ธวัจจิตต์ รศ.ดร.ภญ.พิณทิพย์ พงษ์เพชร ภญ.สุวรรณา จารุณูช ดร.สลักจิต ชุตติพงษ์วิเวท ดร.อุษาวดี ถาวรระ นายสุธน วงษ์ชีรี นางสาววิษชุดา จิตตางกูร ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา รศ.ดร.นวลฉวี เวชประสิทธิ์ ดร.วันทนา ปวีณกิตติพร ดร.อรุณญากร จันทรแสง	มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยนเรศวร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ
ฝ่ายจัดการ	นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ นางสาวประสาน จุลวงษ์ นางสาวอภิมน จิรพงศธร 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@dmasc.mail.go.th	
คำขอบคุณ	นายศักดิ์วิชัย อ่อนทอง สถาบันวิจัยสมุนไพรร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เอื้อเฟื้อและอนุญาตให้ใช้ภาพใบและดอกพลูควัว เป็นภาพประกอบปก	
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 3 กรกฎาคม - กันยายน 2566

Vol. 65 No. 3 July - September 2023

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- ฤทธิ์ต้านอักเสบต่อเซลล์ผิวหนังและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดเมทานอลจากใบกล้วยงไทย 145
ประภัสสร ทิพย์รัตน์ ปรัชญา คงทวีเลิศ ณัฏฐชัย ดวงนิล สรินยา จุลศรีไคววัล
พัชรินทร์ จันทรานิมิตร และ สรिता ปิ่นมณี
- การพัฒนาตัวอย่างทดสอบความชำนาญสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของกัญชาในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง 169
ศิริพร ทองประกายแสง และ จำเริญ ดวงงามยิ่ง
- การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ Quercitrin ในสารสกัดน้ำพลูควาด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง 186
สุนันทา ศรีโสภณ สมจิตร เนียมสกุล สราวุธ จันทร์โคตรแก้ว ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง
กรวิชัย สมคิด และ ศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์
- การศึกษาปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอจากหยดเลือดบนกระดาษกรองในงานนิติเวช 200
ธนิตเชษฐ์ เขตคาม และ ทศนัย พิพัฒน์โชติธรรม

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

- การยกระดับความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการด้านเคมีของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ สู่มาตรฐานห้องปฏิบัติการในรูปแบบ Peer evaluation 209
ปาริชาติ กัญญาบุญ ทิพย์ภรณ์ วินิจสร อูษา อนุมเงิน ดนุลดา แก้วมัน มุทิตา คนทา
พิราม พานทอง ศิณห์ชากรณ์ ทวีทัศน์โรจน์ และ วิสิฐศักดิ์ วุฒิอดิเรก
- ความชุกและชนิดการกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมียในคู่สามี-ภรรยา ที่เสี่ยงต่อโรคเบตาธาลัสซีเมีย: ข้อมูลเขตสุขภาพที่ 10 พ.ศ. 2557 - 2564 224
ชาคริต ชาวฤทธิ์ สุภาพร ช่างคำ และ นวินดา วนิชกุลธาดา

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 65 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2566

Vol. 65 No. 3 July - September 2023

CONTENTS

Page

Original Articles

- Anti-inflammatory Activity on Skin Cells, Antibacterial and Antifungal Activities of Methanolic Thai Hemp Leaves Extracts** 145
Prapatsorn Tipparat, Prachya Kongtawelert, Natthachai Duangnil, Sarinya Julsrigivan, Patcharin Juntranimit, and Sarita Pinmanee
- Proficiency Testing Sample Development for Active Ingredients Determination of Cannabis in Cosmetic Products** 169
Siriporn Thongpakaisang and Jumrern Duangngamyong
- Method Validation of Quercitrin Content in *Houttuynia cordata* Aqueous Extract Using Ultra High Performance Liquid Chromatography** 186
Sununta Srisopon, Somchit Niumsakul, Sarawut Chankhotkaew, Sakwichai Ontong, Koravit Somkid, and Siriwan Chaisomboonpan
- A Study on the Quality and Quantity of DNA from Dried Blood Spots in Forensic Case Work** 200
Thanitchet Khetkham and Tossanai Pipatchotitham

Laboratory Finding

- Enhancing Chemical Laboratory Safety Standards of Regional Medical Sciences Center 3 Nakhon Sawan: A Peer Evaluation** 209
Parichat Kanyaboon, Thippayaporn Vinissorn, Usa Thanomngoen, Danulada Kgewman, Muthita Khontha, Phiram Panthong, Sinatsakon Thawithatsanarot, and Wisitsak Wuttiadirek
- Prevalence and Molecular Characterization of Beta-Thalassemia Gene Mutations in At-Risk Couples: A Retrospective Study in Health Region 10, 2014-2021** 224
Chakrit Chawarit, Supaporn Changkam and Nawinda Vanichakulthada

ฤทธิ์ต้านอักเสบต่อเซลล์ผิวหนังและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดเมทานอลจากใบกัญชงไทย

ประภัสสร ทิพย์รัตน์¹ ปรัชญา คงทวีเลิศ² ณัฐชัย ดวงนิล¹ สรินยา จุลศรีไกวล์¹ พชรินทร์ จันทรานิมิตร¹ และ สรिता ปันมณี³

¹ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เชียงใหม่ 50180

²คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

³สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) เชียงใหม่ 50200

บทคัดย่อ เนื่องด้วยรัฐบาลมีนโยบายส่งเสริมกัญชงเป็นพืชเศรษฐกิจโดยใช้ประโยชน์จากเส้นใย ดังนั้นการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์จากใบกัญชง ซึ่งเป็นส่วนเหลือทิ้งหลังจากการเก็บเกี่ยวเส้นใยของต้นกัญชงจึงเป็นการพัฒนาเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดใบกัญชง จำนวน 4 พันธุ์ปลูก ได้แก่ RPF1-4 โดยศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และฤทธิ์ต้านอักเสบ จากผลการศึกษาพบว่า cannabinoids fraction ของ RPF4 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า Trolox equivalent antioxidant capacity เฉลี่ยในช่วง 88.02-180.84 mg/g พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลพันธุ์ปลูก RPF3 และ RPF4 มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และ *Candida albicans* แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ โดยมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Clostridium sporogenes* ดีที่สุด มีค่า minimal inhibitory concentrations (MIC) ของสารสกัดที่ 976.5 ng/mL และพบว่าสารสกัดหยาบเมทานอล และ cannabinoids fraction ของสารสกัดจากใบกัญชงทุกพันธุ์ปลูกสามารถลดการสร้างไนตริกออกไซด์ ยับยั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ได้แก่ *iNOS*, *COX2* และ *IL1B* ลดการแสดงออกของยีน *MMP3* และ *COL2A1* โดยเฉพาะ RPF4 ที่มีสัดส่วนปริมาณสารกลุ่ม cannabinoids ค่อนข้างสูงและพบสาร tetrahydrocannabinavarin (THCV) มีฤทธิ์ต้านอักเสบได้ดีที่สุดใกล้เคียงกับเด็กชาเมทาโซน ซึ่งจากผลการศึกษามีประโยชน์ในการนำส่วนเหลือทิ้งจากการผลิตเส้นใยกัญชงกลับมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพร โดยต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมด้านการทดสอบความเป็นพิษ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในสัตว์ทดลอง

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านอักเสบ, ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย, ฤทธิ์ต้านเชื้อรา, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, สารสกัดใบกัญชงไทย

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

Received: 22 February 2023

Revised: 26 July 2023

Accepted: 10 August 2023

บทนำ

พืชกัญชา (*cannabis*) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. อยู่ในวงศ์ Cannabaceae ปัจจุบันหมายรวมถึงทั้งกัญชงหรือเฮมพ์และกัญชา มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชียกลาง และได้แพร่กระจายไปทั่วโลก⁽¹⁾ เป็นพืชล้มลุกมีอายุเพียง 1 ปี ลำต้นตั้งตรงสีเขียว สูงประมาณ 1–6 เมตร เปลือกของลำต้นสามารถลอกออกเพื่อใช้ประโยชน์จากเส้นใย มีดอก 2 ชนิด คือ ชนิดที่มีดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่ในต้นเดียวกัน (monoecious) และชนิดดอกเพศผู้และเพศเมียแยกกันอยู่แต่ละต้น (dioecious) ติดเมล็ดภายใน 2–3 สัปดาห์หลังออกดอก ภายในเมล็ดมีอาหารสะสมจำพวกแป้งและไขมันอัดแน่น โดยมีน้ำมันเป็นส่วนประกอบ 29–34% เป็นไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) สูง พืชกัญชาสร้างสารที่มีลักษณะเฉพาะ เรียกว่า cannabinoids สารสำคัญที่พบมาก ได้แก่ delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC หรือ THC) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทที่สำคัญ และ cannabidiol (CBD) เป็นสารสำคัญอีกชนิดหนึ่งแต่เป็น non-psychoactive สารในกลุ่ม cannabinoids terpenes และ volatile compounds อื่นๆ ถูกขับออกโดย glandular trichomes ในรูปสารเหนียว เรียกว่า เรซิน ซึ่งมีมากที่สุดในช่วงดอกตัวเมีย^(2,3) สามารถจำแนกกัญชาจากลักษณะการใช้ประโยชน์และลักษณะองค์ประกอบสารสำคัญ ได้แก่ การควบคุมปริมาณ THC ตามที่กำหนด เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกากำหนดให้มี THC ในเฮมพ์ไม่เกิน 0.3% น้ำหนักแห้ง⁽¹⁾ รัฐเวสเทิร์นออสเตรเลีย ประเทศออสเตรเลีย กำหนดไม่เกิน 1% น้ำหนักแห้ง⁽⁴⁾ เช่นเดียวกับประเทศไทยที่กำหนดระดับ THC ต้องไม่เกิน 1.0% น้ำหนักแห้ง ตามประกาศคณะกรรมการควบคุมยาเสพติดให้โทษว่าด้วยการกำหนดลักษณะกัญชา⁽⁵⁾ กัญชาถูกใช้เป็นพืชเสพติดและเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ ส่วนกัญชงเป็นพืชที่มีความเกี่ยวข้องกับขนบธรรมเนียมประเพณีและวิถีชีวิตของสังคมมนุษย์มาอย่างยาวนาน ปัจจุบันมากกว่า 30 ประเทศทั่วโลกปลูกกัญชงเป็นพืชเศรษฐกิจเช่นเดียวกับประเทศไทย มีการนำส่วนต่างๆ ของกัญชงมาใช้ประโยชน์อย่างมากมาย รวมถึงการนำสารสกัดมาใช้เป็นยา เช่น

ยารักษาอาการปวดเส้นประสาท อาการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ อาการนอนไม่หลับเรื้อรัง เป็นต้น^(6,7) จากการศึกษาทางคลินิก พบว่าทั้ง synthetic THC และสารสกัดพืชกัญชา (high THC, high cannabidiol หรือ THC และ CBD ในอัตราส่วน 1:1) สามารถลดความรุนแรงอาการโรคของผู้ป่วย multiple sclerosis และผู้ป่วย spinal cord injury นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มความสามารถของผู้ป่วยในการเดิน การเขียน การควบคุมกล้ามเนื้อของกระเพาะปัสสาวะให้ดีขึ้น และสามารถนำมาใช้ในการรักษาอาการผิดปกติของระบบประสาท เช่น อาการปวดเส้นประสาทหรือโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท เช่น Parkinson's disease ได้ดี^(8–11) การออกฤทธิ์ของสารกลุ่ม cannabinoids พบว่าออกฤทธิ์ผ่านตัวรับที่จำเพาะ เรียกว่า cannabinoid receptor ได้แก่ cannabinoid receptor 1 และ 2 (CB1 และ CB2) ซึ่งจะพบการแสดงออกโดยทั่วไปในเซลล์สมอง เซลล์ประสาทและเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน⁽¹²⁾ สารกลุ่ม cannabinoids มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการลดการอักเสบของเซลล์บางชนิดได้ พบว่าการกระตุ้นการทำงานผ่าน receptor ส่งผลกระทบต่อกระบวนการหลั่งสาร cytokine จากเซลล์ และเมื่อมีการอักเสบของเซลล์จะมีการแสดงออกของ CB2 receptor ที่มากขึ้นแบบแปรผันตรงกับกระบวนการอักเสบ⁽¹³⁾ มีรายงานว่าพบ cannabinoid receptors บนเซลล์ผิวหนัง และ anandamide ซึ่งเป็น endocannabinoids รวมทั้ง phytocannabinoids ได้แก่ THC, CBD, cannabinol (CBN) และ cannabigerol (CBG) สามารถยับยั้งการแบ่งตัวที่ผิดปกติของ epidermal keratinocyte ได้⁽¹⁴⁾ จากงานวิจัย การแสดงออกของ cannabinoid receptors มีความสัมพันธ์กับการอักเสบและการเกิดเป็นเซลล์มะเร็งเมื่อได้รับสิ่งกระตุ้น เช่น การสัมผัสกับแสงยูวีเป็นเวลานาน ทำให้เกิดการหลั่งของ TNF- α และ NF- κ B ซึ่งทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ และการเกิด tumor⁽¹⁵⁾ นอกจากนี้พบว่าทั้ง THC และ CBD มีฤทธิ์ neuroprotection โดยต้านผลของ 6-hydroxydopamine ที่ทำให้เกิด neurodegeneration ในผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน อาศัยคุณสมบัติ antioxidative และ anti-inflammatory

activity สามารถลดการสร้าง tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-1, nitric oxide และ biological active molecules ชนิดอื่นๆ ได้⁽¹⁶⁾ โดยเฉพาะสาร CBD ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีฤทธิ์เสพติด (non-psychotropic effect) พบว่ามีฤทธิ์ anti-inflammatory สูง สามารถลดการสร้าง TNF- α , nitric oxide, reactive oxygen intermediates (ROI), Con-A และ arthritis murine collagen-induced arthritis (CIA) ในสัตว์ทดลอง ซึ่งอาจจะพัฒนาเป็นยารักษา rheumatoid arthritis ตัวใหม่ได้⁽¹⁷⁾ จากการศึกษาการกระตุ้นสัญญาณผ่าน cannabinoid receptor ชนิด CB1 ในเซลล์ keratinocyte พบว่าสามารถควบคุมการหลั่งสาร cytokine จากเซลล์ที่อักเสบและลดความรุนแรงของการอักเสบได้⁽¹⁸⁾ เมื่อเกิดการอักเสบของ keratinocyte จะทำให้สร้างสาร cytokine ที่ทำให้เกิดการอักเสบขึ้น ได้แก่ TNF- α , IL-1 β และ interleukin 6 (IL-6) ซึ่งจะทำให้เกิดพยาธิสภาพของผิวหนังบริเวณดังกล่าว เช่น atopic dermatitis, allergic dermatitis และ psoriasis⁽¹⁹⁾ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย⁽²⁰⁾ สาร cannabidiolic acid (CBDA) และ CBD ที่แยกได้จากเฮมพ์หรือกัญชง⁽²¹⁾ จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าสารสกัดจากใบกัญชงสามารถลดการอักเสบของเซลล์ synovocyte เมื่อถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย interleukin 1-beta (IL-1 β) ได้⁽²²⁾ ผู้วิจัยมีความสนใจสารสกัดจากใบกัญชง เนื่องจากสามารถลดอาการอักเสบในผิวหนังชั้น dermis ซึ่งเกี่ยวเนื่องกับการอักเสบจากผิวหนังชั้น epidermis โดยผิวหนังชั้น dermis มีเซลล์ fibroblast เป็นองค์ประกอบและอยู่ร่วมกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ชนิดต่าง ๆ เมื่อเซลล์ fibroblast ได้รับ proinflammatory cytokine จะกระตุ้นให้เกิดการอักเสบของเซลล์ กลายเป็น fibrosis และเกิดการขยายการอักเสบเป็นวงกว้าง เกิดการสลาย connective tissue บริเวณใกล้เคียงและทำให้เกิดพยาธิสภาพของผิวหนังชั้นในขึ้นได้⁽²³⁾

ในประเทศไทย การเพาะปลูกกัญชงมีความเกี่ยวข้องกับวัฒนธรรมของชนเผ่าม้งมาอย่างยาวนาน

โดยใช้เส้นใยถักทอเป็นเสื้อผ้าสวมใส่ในชีวิตประจำวันและประกอบพิธีกรรมตามจารีตประเพณี และรัฐบาลเล็งเห็นความสำคัญ จึงส่งเสริมให้การปลูกกัญชงเป็นพืชเศรษฐกิจซึ่งเดิมใช้ประโยชน์จากเส้นใย ลำต้น แก่นลำต้น เท่านั้น ดังนั้นการศึกษาการใช้ประโยชน์จากเศษที่เหลือและส่วนอื่นๆ จากกัญชงเพื่อเพิ่มมูลค่าสูงสุด เป็นแนวทางหนึ่งในการดำเนินการพัฒนาเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มของกัญชง ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ ร่วมกับคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) จึงได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดใบกัญชงพันธุ์ปลูกต่างๆ (certified cultivars) ได้แก่ พันธุ์ปลูก RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูกสำหรับใช้ประโยชน์จากเส้นใย ส่วนใบที่เหลือทิ้งนำมาสกัดและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัด รวมทั้งแยกสารสกัดออกเป็น non-cannabinoids fraction และ cannabinoids fraction ของกัญชงแต่ละพันธุ์ปลูก จากนั้นทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านอักเสบ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านเชื้อรา ในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์จากใบกัญชง ซึ่งเป็นส่วนเหลือทิ้งจากการทำเส้นใยมาใช้ประโยชน์ในทางเภสัชกรรมและเพิ่มมูลค่าให้กับกัญชง

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างพืชกัญชง

กัญชงพันธุ์ปลูกที่อนุญาตให้ปลูกได้ตามกฎหมาย (certified cultivars) ตามกฎกระทรวงการขออนุญาตผลิต จำหน่าย หรือมีไว้ในครอบครองยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 เฉพาะกัญชง พ.ศ. 2559 ปลูกโดยสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จำนวน 4 พันธุ์ปลูก ได้แก่ พันธุ์ปลูก RPF1 ปลูกที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง อ.ขุนวาง จ.เชียงใหม่ พันธุ์ปลูก RPF2 ปลูกที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงห้วยน้ำริน อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย พันธุ์ปลูก RPF3 และ RPF4 ปลูกที่สถานีเกษตรหลวงปางดะ อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่ โดยเก็บตัวอย่างเฉพาะใบสดไม่เกินหนึ่งส่วนสามของลำต้น (upper third of the

main stem) หรือไม่เกิน 30 เซนติเมตร ของต้นกัญชง ในช่วงออกดอก จากนั้นนำตัวอย่างมาอบแห้งในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 48 ชั่วโมง ให้มีความชื้นไม่เกิน 10% บดให้ละเอียดและร่อนผ่าน sieve ขนาด 32 mesh ได้ผงขนาดน้อยกว่า 500 µm เก็บในขวดแก้วสีชาที่อุณหภูมิ 2–8 °C

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน

delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) 1 mg/mL purity 98.676±0.028%, cannabidiol (CBD) 1 mg/mL purity 99.950±0.050% และ cannabiol (CBN) 1 mg/mL purity 99.652±0.005% (Lipomed, สวิตเซอร์แลนด์), 2,2,2, triphenyl-acetophenone และ dexamethasone (Aldrich, สหรัฐอเมริกา) antibiotic discs สำเร็จรูป; chloramphenicol 30 µg/disc และ tetracycline 30 µg/disc (BD-BBL, สหรัฐอเมริกา), gentamicin 10 µg/disc (Oxoid, สหราชอาณาจักร), amphotericin B solution 250 µg/mL และ clotrimazole (Sigma, สหรัฐอเมริกา)

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

methanol, hexane, dichloromethane (Merck, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (Fluka, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), potassium persulfate (Sigma-Aldrich, ญี่ปุ่น), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Aldrich, สหรัฐอเมริกา), 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (Fluka, สวิตเซอร์แลนด์), iron (III) chloride heptahydrate (FeCl₃·6H₂O) (Sigma-Aldrich, สาธารณรัฐประชาชนจีน), glacial acetic acid, sodium acetate-3-hydrate (C₂H₃NaO₂·3H₂O) (Merck, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) และ trolox (C₁₄H₁₈O₄) (Aldrich, สวิตเซอร์แลนด์)

สารเคมีสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบ

phosphate buffer solution (PBS), dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal calf serum (FCS), methylthiazol tetrazolium (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), lipopolysaccharide (LPS) (Gibco, สหรัฐอเมริกา), Griess's reagent (Merck, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), lysis buffer (RA1, RA2 และ RA3), MDB buffer, DNase, diethylpyrocarbonate (DEPC) nuclease free water, oligo(dT) 18 primer, ribonuclease inhibitor, deoxynucleotides triphosphates (dNTPs), revertAid H minus M-MuLV reverse transcriptase, iodonitrotetrazolium chloride (GE Medical Systems, ประเทศไทย), SensiFAST™ cDNA synthesis kit และ SensiFAST™ SYBR® Lo-ROX (Bioline, สิงคโปร์)

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา

dimethyl sulfoxide (DMSO) (Gibco, สหรัฐอเมริกา), meuller hinton agar (MHA), meuller hinton broth (MHB), potato dextrose agar (PDA), potato dextrose broth (PDB), sabouraud dextrose agar (SDA), sabouraud dextrose broth (SDB) และ reinforced clostridial medium (RCM) (Difco, สหรัฐอเมริกา) และ mcfarland standard set (Himedia, อินเดีย)

เชื้อมาตรฐานสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา

แบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 5 สายพันธุ์ ประกอบด้วย แบคทีเรียที่ใช้อากาศ ได้แก่ *Bacillus subtilis* DMST 15896, *Enterococcus faecalis* DMST 2860, *Staphylococcus aureus* DMST 8013, *Staphylococcus epidermidis* DMST 5868 และแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ ได้แก่ *Clostridium sporogenes* DMST 15282 แบคทีเรียแกรมลบ จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Enterobacter aerogenes* DMST 8841,

Escherichia coli DMST 15537, *Pseudomonas aeruginosa* DMST 15501, *Salmonella typhimurium* DMST 562 และ *Salmonella abony* DMST 21863 ยีสต์และรา ได้แก่ *Candida albicans* DMST 5815 และ *Aspergillus niger* DMST 15538 ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

เซลล์เพาะเลี้ยงสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบ

dermal fibroblast cell line (Detroit-551) และ macrophage cell line (Raw 264.7) (ATCC, สหรัฐอเมริกา)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ที่มีส่วนตรวจวัดสาร 2 ชนิด คือ mass spectrometry (MS) และ flame ionization (FID) (รุ่น 7890A series GC equipped with 7693 autosampler and 5975C single Quadrupole MS, Agilent, สหรัฐอเมริกา), เครื่อง flash chromatograph (รุ่น Pure C-810, Buchi, สวิตเซอร์แลนด์), เครื่อง spectrophotometer (รุ่น 8453 UV-Vis, Agilent, สหรัฐอเมริกา), silica gel column (รุ่น Flashpure, Buchi, สวิตเซอร์แลนด์), เครื่อง real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) (รุ่น 7500 Fast, Applied Biosystem (ABI), สหรัฐอเมริกา), ชุดอุปกรณ์สำหรับสกัดสารแบบต่อเนื่อง (Soxhlet's apparatus) (NK laboratory, ไทย), เครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) (รุ่น R-100, Buchi, สวิตเซอร์แลนด์), เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge) (รุ่น Sorvell ST8, Thermo scientific Inc., สหรัฐอเมริกา), ตู้บ่มเชื้อ (incubator) (รุ่น CCL-240B-8, Esco, สิงคโปร์), เครื่อง Thermal cycler (รุ่น S1000, Bio-rad, สหรัฐอเมริกา) และเครื่องชั่งความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม (รุ่น Secura 224-1, Sartorius, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

การเตรียมสารสกัด

ซึ่งผงตัวอย่างใบกัญชงแห้งแต่ละพันธุ์ปลูก (RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4) 300 กรัม สกัดตัวอย่างด้วยเมทานอลโดยวิธี solvent extraction แบบต่อเนื่อง ใช้ Soxhlet's apparatus ได้สาร crude extract นำสารสกัดมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และชั่งหาปริมาณสารสกัดหยาบ (crude extract) คำนวณเป็นร้อยละน้ำหนักต่อน้ำหนัก (%w/w) จากนั้นใช้เครื่อง flash chromatograph แยก fraction สารสกัดหยาบของกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูก ออกเป็น cannabinoids fraction และ non-cannabinoids fraction ด้วย silica gel column ขนาด 40 g โดยชะด้วยสารละลายผสมระหว่าง hexane กับ diethyl ether อัตราส่วน 9:1 อัตราการไหล 20 mL/min และเก็บสารที่มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 209 และ 280 nm ออกเป็น cannabinoids fraction ส่วน fraction ที่เหลือรวบรวมเป็น non-cannabinoids fraction จากนั้นนำแต่ละ fraction ไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ⁽²⁴⁾

เตรียมสารละลายสารมาตรฐาน THC, CBD และ CBN ในเมทานอล ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1974, 0.1999 และ 0.1993 mg/mL (stock standard solution) จากนั้นแยกเตรียมสารละลายมาตรฐาน THC, CBD และ CBN ให้มีความเข้มข้นอย่างน้อย 3 ระดับ ในช่วง 0.01–0.2 mg/mL เพื่อสร้างกราฟสารมาตรฐาน แยกปิเปตสารละลายมาตรฐาน THC, CBD และ CBN แต่ละความเข้มข้นลงใน vial แก้วสีชา ขนาด 2 mL จากนั้นเติมสารละลาย internal standard 2,2,2, triphenylacetophenone ความเข้มข้น 0.2 mg/mL ในเมทานอล ด้วยอัตราส่วน 1:1

เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยชั่งใบกัญชงแห้ง บดละเอียด 1 กรัม (ชั่ง 25 มิลลิกรัม สำหรับสารสกัด) สกัดด้วยเมทานอล ปริมาตร 25 mL เขย่านาน 1 ชั่วโมง กรองและนำสารละลายมาเจือจางด้วยสารละลาย internal standard 2,2,2, triphenylacetophenone ความเข้มข้น 0.2 mg/mL ด้วยอัตราส่วน 1:1

วิเคราะห์สารสำคัญโดยฉีดสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานอย่างละ 1 μL เข้าสู่เครื่อง GC-FID โดยใช้ DB-1 capillary column, 30 m, 0.25 mm ID, film thickness 0.25 μm โดยมีสภาวะของเครื่องมือดังนี้ อุณหภูมิส่วนฉีดสาร: 260 °C, อุณหภูมิส่วนตรวจวัดสาร: 280 °C, อุณหภูมิส่วนตู้บคอลัมน์: ตั้งที่ 230 °C นาน 7 นาที และเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 260 °C ด้วยอัตรา 10 °C/min และตั้งที่ 260 °C นาน 2 นาที จากนั้นคำนวณหาปริมาณสารเป็น %w/w as is ของ THC, CBD และ CBN โดยใช้ peak ratio (อัตราส่วนระหว่าง peak area ของสารสำคัญกับ internal standard) ของสารสำคัญในตัวอย่าง เทียบกับ peak ratio ในสารมาตรฐาน

การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมี (chemical fingerprint)^(24,25)

เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยสกัดใบกัญชงแห้งบดละเอียด 500 mg ด้วยเฮกเซนปริมาตร 10 mL เขย่านาน 1 ชั่วโมง นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ฉีดสารละลายตัวอย่าง 1 μL เข้าสู่เครื่อง GC-MS โดยใช้คอลัมน์ DB-5MS (5% phenylmethylpolysiloxane, 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 μm film thickness) โดยมีสภาวะเครื่องมือดังนี้ carrier gas: helium (99.999%), flow rate: 1.2 mL/min, split ratio: 1:100, อุณหภูมิส่วนฉีดสาร: 230 °C, อุณหภูมิส่วนตู้บคอลัมน์: เริ่มที่ 60 °C และเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 240 °C ด้วยอัตรา 3 °C/min และตั้งที่ 240 °C นาน 5 นาที, อุณหภูมิ MS source: 300 °C, อุณหภูมิ single quad: 150 °C, อุณหภูมิ transfer line: 280 °C, mass range: 50–500 m/z ratio at rate of 0.5 seconds per scan, ส่วนตรวจวัด: mass-selective detector with electron impact ionization ประมวลผลด้วย enhanced chemstation software จากนั้นเปรียบเทียบ retention time และ mass spectra ของแต่ละองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่าง เปรียบเทียบกับ MS databases ของ NIST library version 2.0, 2011

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใช้วิธีทดสอบที่แตกต่างกัน 3 วิธี เพื่อใช้ยืนยันฤทธิ์ ประกอบด้วย วิธี ABTS free radical scavenging assay⁽²⁶⁾ DPPH free radical scavenging assay⁽²⁷⁾ และ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay⁽²⁸⁾ โดยวิธีการเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบ กระบวนการทดสอบ และการอ่านผล อ้างอิงจากงานวิจัยที่มีการระบุไว้ก่อนหน้านี้ ผลของฤทธิ์ antioxidant ที่ทดสอบ ทั้ง 3 วิธี เปรียบเทียบกับ standard curve ในช่วงความเข้มข้น 2–12 μg Trolox และแสดงเป็นค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ในหน่วย mg/g ของสารสกัด

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา^(29–31)

Agar diffusion method: Kirby-Bauer method

การเตรียมตัวอย่าง: ละลาย crude extract, cannabinoids fraction และ non-cannabinoids fraction ของกัญชงแต่ละพันธุ์ปลูก ด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/mL

การเตรียมเชื้อและ inoculum: สำหรับ aerobic bacteria ให้ถ่ายเชื้อจาก MHA slant 4 °C ลง MHA fresh agar plate บ่มที่ 32.5 $\pm$ 2.5 °C นาน 24 ชั่วโมง ก่อนทดสอบ ถ่ายเชื้อ 1 loop ลงใน MHB บ่มที่ 32.5 $\pm$ 2.5 °C นาน 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นด้วย 0.5 McFarland standard จะได้เชื้อประมาณ 1.5 $\times$ 10⁸ cfu/mL สำหรับ anaerobic bacteria ให้ถ่ายเชื้อจาก RCM 4 °C ลง MHA fresh agar plate บ่มที่ 32.5 $\pm$ 2.5 °C นาน 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ (anaerobic condition) ก่อนทดสอบ จากนั้นถ่ายเชื้อ 1 loop ลงใน RCM บ่มที่ 32.5 $\pm$ 2.5 °C นาน 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ ปรับความขุ่นด้วย 0.5 McFarland standard จะได้เชื้อประมาณ 1.5 $\times$ 10⁸ cfu/mL สำหรับเชื้อยีสต์ให้ถ่ายเชื้อจาก SDA slant 4 °C ลง SDA fresh agar plate บ่มที่ 32.5 $\pm$ 2.5 °C นาน 24 ชั่วโมง ก่อนทดสอบ ถ่ายเชื้อ 1 loop ลงใน SDB บ่มที่ 32.5 $\pm$ 2.5 °C นาน 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่น

ด้วย 0.5 McFarland standard จะได้เชื้อประมาณ 1.4×10^6 cfu/mL ส่วนเชื้อราให้ถ่ายเชื้อจาก PDA slant 4 °C ลง PDA fresh agar plate บ่มที่ 25 ± 2.5 °C นาน 7 วัน ก่อนทดสอบ ถ่ายเชื้อ 1 loop ลงใน PDB บ่มที่ 25 ± 2.5 °C นาน 7 วัน กรองให้ได้สารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา (spore suspension) ปรับความขุ่นด้วย 0.5 McFarland standard จะได้เชื้อประมาณ $(0.6-5) \times 10^6$ cfu/mL

การเตรียม discs: นำ disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm (Whatman[®] filter paper No.1) ที่ปราศจากเชื้อ โดยอบที่ 160 °C หรือ disc สำเร็จรูปมาใส่สารสกัด 100 mg/mL ปริมาณ 20 µL ทิ้งให้ solvent ระเหยนาน 1 ชั่วโมง ในตู้ปลอดเชื้อ (เตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง) การเตรียม negative control: ดูด DMSO 20 µL ใส่ disc ปราศจากเชื้อ ทิ้งให้ระเหย การเตรียม positive control: antibiotic discs ได้แก่ chloramphenicol 30 µg/disc, tetracycline 30 µg/disc, gentamicin 10 µg/disc, amphotericin B 100 µg/disc และ clotrimazole 100 µg/disc

การทดสอบ: เท MHA (สำหรับแบคทีเรีย), SDA (สำหรับยีสต์) และ PDA (สำหรับเชื้อรา) ลง plate 15 mL รอให้แข็ง ใช้ inoculum 0.5 mL spread ลง plate ที่แข็ง 3 ระบาย (ประมาณ 60°) โดยใช้ sterile cotton wadding paper disc ที่มี test extracts (20 µL/disc), negative control และ antibiotic discs เป็น positive control บนผิว agar plate โดยระยะห่างเท่ากันด้วย sterile forcep (ห่างกันประมาณ 15 mm) บ่มเชื้อแบคทีเรียที่เจริญโดยใช้อากาศและเชื้อยีสต์ที่ 32.5 ± 2.5 °C นาน 24 ชั่วโมง (สำหรับแบคทีเรียที่เจริญโดยไม่ใช้อากาศ บ่มที่ 32.5 ± 2.5 °C นาน 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ) ส่วนเชื้อราบ่มที่ 25 ± 2.5 °C นาน 7 วัน อ่านผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ zone of inhibition หน่วยเป็น mm โดยทดสอบ 3 ซ้ำ และบันทึกผลเป็น mean $\pm$ SD

การทดสอบหาค่า Minimum inhibition concentration (MIC)

ทำการทดสอบเมื่อทราบชนิดหรือ fraction ของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา วิธี microbroth dilution โดยนำสารสกัดหรือ fraction

ของสารสกัดมาละลายใน 50% DMSO และเจือจางให้มีความเข้มข้น 100–0.05 mg/mL ด้วย tryptic soy broth (TSB) ใน 96-well microplates จากนั้นเติมเชื้อที่สารสกัดหรือ fraction ของสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อนั้น ที่ความเข้มข้นของเชื้อ 1×10^5 cfu/mL จำนวน 50 µL บ่มที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง สังเกตความขุ่น (turbidity) โดย Minimum inhibition concentration (MIC) คือ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ไม่ขุ่น โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การทดสอบหาค่า Minimum bactericidal concentration (MBC) และ Minimal fungicidal concentration (MFC)

การทดสอบหาค่า MIC ไม่เกิดความขุ่น จะใช้วิธี MBC หรือ MFC โดยใช้ broth dilution 20 µL จาก well ที่ไม่เกิดความขุ่น มา spread บน tryptic soy agar (TSA) นำไปบ่มที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง โดยค่า MBC หรือ MFC คือ ความเข้มข้นของสารสกัดหรือ fraction ของสารสกัดที่น้อยที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ 99.9% โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบ⁽³²⁻³⁴⁾

การเพาะเลี้ยงเซลล์

การศึกษานี้ใช้ Detroit-511 cell line ที่เลี้ยงใน complete DMEM เป็น model โดยทำการแบ่งเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 50,000 cell/mL ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ และการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ ใช้ Raw 264.7 cell line ที่เลี้ยงใน complete DMEM เป็น model ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยแบ่งเซลล์ให้มีความเข้มข้น 25,000 cell/mL

การทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ Detroit-551 ด้วยเทคนิค Methylthiazol tetrazolium (MTT) assay

เตรียมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 mg/mL ในสารละลาย PBS ที่ปราศจากเชื้อ โดยก่อนนำไปใช้งานจริงให้ dilute 1:10 ด้วย complete DMEM (working MTT) ทำการเจือจางความเข้มข้นของเซลล์ Detroit-551

ให้เหลือ 50,000 cells/mL โดยใช้ complete media เติม cell suspension ปริมาตร 100 μ L (มีเซลล์จำนวนประมาณ 5,000 เซลล์) ลงใน 96-well plate แต่ละหลุมเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ในตู้เพาะเลี้ยงที่ 5% CO₂ และอุณหภูมิ 37 °C เมื่อครบเวลาทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารเลี้ยง (incomplete media) ที่ผสมตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 μ g/mL ปริมาตร 100 μ L ทำการเลี้ยงต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง ในตู้เพาะเลี้ยง จากนั้นเติม 20 μ L ของ working MTT ลงใน 96-well plate ด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ นำ plate บ่มที่ 37 °C นาน 4 ชั่วโมง ดูสารละลายออกจากหลุมอย่างระมัดระวังไม่ให้กระทบกระเทือนเซลล์ เติมสารละลาย DMSO 100 μ L ต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เขย่าและทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm และทำการคัดเลือกความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในขั้นตอนต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบ

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่ต้องการในเซลล์

Raw 264.7

ทำการเจือจางความเข้มข้นของ Raw 264.7 ใน cell suspension ให้เหลือประมาณ 25,000 cells/mL โดยใช้ incomplete media เติม cell suspension ปริมาตร 2 mL ลงในแต่ละหลุม เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้เพาะเลี้ยงที่ 5% CO₂ และอุณหภูมิ 37 °C จากนั้นเตรียมสารละลายของสารที่ต้องการจะทดสอบ ความเข้มข้น 10 μ g/mL ใน incomplete DMEM เติมสารที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ลงในแต่ละหลุม โดยใส่สารละลาย LPS (เพื่อจำลองสภาวะการกระตุ้นการอักเสบ) ความเข้มข้น 1 μ g/mL ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารที่สนใจเปรียบเทียบกับสาร dexamethasone ความเข้มข้น 10⁻⁷ M โดยใช้เซลล์ที่ treat ด้วย incomplete media เพียงอย่างเดียวเป็นตัวควบคุม นำ 6-well plate ดังกล่าวบ่มตู้เพาะเลี้ยง 37 °C นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทดสอบ แยก supernatant ออกไปวิเคราะห์หาปริมาณ nitric oxide ด้วยวิธี Griess's method ส่วนของ cell จะนำไปเตรียม

total RNA สำหรับการวิเคราะห์ gene expression ในขั้นตอนถัดไป โดยเซลล์ Raw 264.7 จะทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *iNOS*, *COX2* และ *IL1B*

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่ต้องการในเซลล์

Detroit-551

ขั้นตอนการทดสอบ เซลล์ Raw 264.7 มีขั้นตอนเช่นเดียวกับข้างต้น แต่มีการเลี้ยงเซลล์ Detroit-551 ควบคู่กัน โดยทำการเจือจางความเข้มข้นของ Detroit-551 ใน cell suspension ให้เหลือประมาณ 25,000 cells/mL เติม cell suspension ปริมาตร 2 mL ลงในแต่ละหลุม เลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ในตู้เพาะเลี้ยงที่ 5% CO₂ และอุณหภูมิ 37 °C นำ plate ที่เลี้ยง Raw 264.7 ที่เติมสารละลาย LPS ความเข้มข้น 1 μ g/mL ลงในหลุมกลุ่มจำลองสภาวะการอักเสบ เพาะบ่มจนครบเวลาดูดส่วน supernatant เพื่อนำไปใส่ใน plate ที่เลี้ยง Detroit-551 ต่อ โดยแบ่งเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มจำลองสภาวะการอักเสบที่มีการ treat LPS เอาไว้ก่อนหน้านี้ จากนั้นทำการ treat สารละลายของสารที่ต้องการจะทดสอบ ความเข้มข้น 10 μ g/mL ลงไปในแต่ละกลุ่ม และใช้ dexamethasone ความเข้มข้น 10⁻⁷ M เป็นสารควบคุมบวก นำ 6-well plate ดังกล่าวบ่มในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทดสอบ ดู cell suspension ทั้งหมดในแต่ละหลุมออก สกัด total RNA สำหรับการวิเคราะห์ gene expression โดยเซลล์ Detroit-551 จะทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *MMP3* และ *COL2A1*

การตรวจวัดปริมาณ nitric oxide (NO)

ด้วยวิธี Griess's method

นำ supernatant จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการตรวจวัดปริมาณ nitric oxide ลงใน 96-well plate ปริมาตรหลุมละ 100 μ L เติม Griess's reagent หลุมละ 100 μ L ตั้งไว้ให้สารทำปฏิกิริยากัน 5 นาที นำ plate ดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm โดยวัดค่าเปรียบเทียบกับ standard curve ที่ได้จากการวัดสารมาตรฐาน sodium nitrite (NaNO₂) ช่วงความเข้มข้น 0–100 nM

การเตรียม total RNA จาก cell culture

เมื่อครบเวลานำ culture plate ออกจาก incubator ตูด media ออกจากแต่ละหลุมให้หมด ทำการล้างเซลล์ด้วย PBS ปริมาตร 1 mL เติม RA 1 buffer แต่ละหลุมปริมาตร 350 μ L ผสมให้เข้ากันจนสารละลายที่ได้มีความหนืด (เซลล์เกิดการ lysis แล้ว) ตูดสารละลายลงใน column ของชุด RNA spin mini filter unit ปั่นที่ความเร็ว 13,000 $\times$ g นาน 1 นาที เพื่อกำจัดเศษเซลล์ที่เกิดจากการแตกเซลล์ ตูด filtrate ผสมกับ 70% ethanol ปริมาตร 350 μ L ใส่ลงใน RNA spin mini column ปั่นที่ 8,000 $\times$ g นาน 30 วินาที ล้าง column ด้วย MDB buffer ปริมาตร 350 μ L ปั่นที่ 11,000 $\times$ g นาน 1 นาที เติมสารละลาย DNase 95 μ L (เจือจางจาก stock 1:10) ลงในแต่ละ column ทิ้งไว้นาน 10 นาที ล้าง column ด้วย RA2 buffer ปริมาตร 200 μ L ปั่นที่ 11,000 $\times$ g นาน 1 นาที ล้าง column ด้วย RA3 buffer ปริมาตร 600 μ L ปั่นที่ 11,000 $\times$ g นาน 1 นาที ล้างซ้ำด้วย RA3 buffer ปริมาตร 250 μ L ปั่นที่ 11,000 $\times$ g นาน 2 นาที, ปั่นแห้งที่ 11,000 $\times$ g นาน 1 นาที เติม DEPC-treated H₂O ปริมาตร 40 μ L ลงใน column ปั่นที่ 11,000 $\times$ g นาน 1 นาที ได้เป็น RNA ให้นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 °C ก่อนนำไปสังเคราะห์ complementary DNA

การสังเคราะห์ complementary cDNA จาก total RNA

ทำการสังเคราะห์ cDNA จาก RNA ที่สกัดได้จากขั้นตอนข้างต้นโดยใช้ชุดสกัด SensiFAST™ cDNA synthesis kit มีขั้นตอนการสังเคราะห์ดังนี้ นำสารที่ใช้ในการสังเคราะห์มาแช่ในน้ำแข็ง ผสมสารต่าง ๆ ลงใน PCR tube ดังนี้ total RNA: โดยให้มีปริมาณของ RNA 1 μ g, 5x TransAmp Buffer 4 μ L, reverse transcriptase 1 μ L และปรับปริมาตรให้ครบ 20 μ L ด้วย nuclease-free water ทำการผสมให้เข้ากันด้วย micropipette ทำการเพิ่มจำนวนของ cDNA ด้วยเครื่อง Thermal cycler ตั้งโปรแกรมการทำงานของ

เครื่องดังนี้ primer annealing ที่ 25 °C นาน 10 นาที reverse transcription ที่ 42 °C นาน 15 นาที และ inactivation ที่ 85 °C นาน 5 นาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็ง (หรือที่อุณหภูมิ 4 °C) ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถนำไปใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วย real-time PCR ในอัตราส่วน 1/5 ได้ หรือนำไปเก็บในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

การทดสอบปริมาณการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR

เตรียม PCR mastermix ด้วยชุด SensiFAST™ SYBR® Lo-ROX โดยใน mastermix 20 μ L ประกอบด้วย 2x SensiFAST™ SYBR® Lo-ROX 10 μ L, Forward และ reverse primer ของยีนที่ต้องการศึกษา (ได้แก่ *iNOS*, *COX2*, *IL1B*, *MMP3* และ *COL2A1*) ในความเข้มข้น 10 μ M อย่างละ 0.8 μ L, cDNA template และ nuclease-free water ในปริมาณที่เหมาะสม โดย PCR mastermix เตรียมใน PCR plate ได้โดยตรง นำ PCR plate ใส่ในเครื่อง real-time PCR ทำตามขั้นตอนในคู่มือการใช้งานของเครื่อง ตั้งค่าการทำงาน Thermal cycle ดังนี้: step 1 (polymerase activation) 95 °C นาน 2 นาที, step 2-40 เป็นการทำงานวนเป็นรอบ ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 5 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 60-65 °C นาน 10 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 5-20 วินาที (ปรับตามความเหมาะสมของการวิเคราะห์ gene แต่ละตัว) เมื่อเสร็จสิ้นรอบการทำงานให้ทำการบันทึกข้อมูลแล้วนำมาวิเคราะห์ทางสถิติต่อไป

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IBM® SPSS statistics version 20 ทดสอบด้วยสถิติ ANOVA และ Turkey's HSD test เพื่อทดสอบความแตกต่างของวิธีทดสอบ และ significant differences ตามลำดับ ใช้ Pearson's correlation coefficient ในการหาความสัมพันธ์ของข้อมูลที่ได้

ผล

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ (cannabinoids content) ที่สำคัญ ได้แก่ tetrahydrocannabinol (THC) และ cannabidiol (CBD) ในใบกัญชง ทั้ง 4 พันธุ์ปลูก ได้แก่ พันธุ์ปลูก RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 พบว่า RPF4 มีปริมาณ THC และ CBD มากที่สุด เท่ากับ 0.04 และ 0.78 %w/w ตามลำดับ ส่วน RPF1, RPF2 และ RPF3 มีปริมาณ THC และ CBD ไม่ต่างกัน เมื่อสกัดตัวอย่างใบกัญชงด้วยเมทานอล พบว่า RPF1 มีปริมาณสารสกัดหยาบเมทานอลมากที่สุด ที่ 17.62 %w/w รองลงมาได้แก่ RPF4, RPF2 และ RPF3 ซึ่งได้ปริมาณสารสกัดไม่แตกต่างกันที่ประมาณ 11 %w/w โดยสารสกัดหยาบเมทานอลของ RPF4 มีปริมาณ THC และ CBD มากที่สุด เท่ากับ 0.37 และ 6.65 %w/w ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 ผลการศึกษาองค์ประกอบสารสำคัญบางชนิดในกลุ่ม terpenoids และ cannabinoids ในตัวอย่างใบ สารสกัดหยาบเมทานอล cannabinoids fraction และ non-cannabinoids fraction ของกัญชงพันธุ์ปลูกต่างๆ พบว่าสารในกลุ่ม cannabinoids ได้แก่ CBD ในสัดส่วนที่สูงที่สุดในทุกพันธุ์ปลูก โดยในตัวอย่างใบพบในช่วง 62.07–79.25 %area สารสกัดหยาบเมทานอลพบในช่วง 42.82–69.02 %area THC พบในสัดส่วนค่อนข้างน้อย ในช่วง 0.56–3.16 %area และพบ β -caryophyllene ซึ่งเป็นสารกลุ่ม terpenoids ในตัวอย่างใบและสารสกัดหยาบเมทานอลของใบกัญชงทุกพันธุ์ปลูก ดังแสดงในตารางที่ 2

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบเมทานอล รวมทั้ง cannabinoids fraction และ non-cannabinoids fraction ของกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูก โดยทำการทดสอบ 3 ขั้ว และศึกษาเปรียบเทียบกับ 3 วิธี ได้แก่ วิธี ABTS, DPPH และ FRAP เมื่อทดสอบความสัมพันธ์โดยใช้ค่า Pearson's correlation coefficient (r) พบว่าการทดสอบทั้ง 3 วิธี มีความสัมพันธ์ในเชิงบวก ($0.63 \leq r \leq 0.86$, $p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกัญชงแต่ละพันธุ์ปลูกพบว่า เป็นไปในทางเดียวกัน คือ RPF4 มีฤทธิ์ต้านอนุมูล

อิสระดีที่สุด แตกต่างจาก RPF1, RPF2 และ RPF3 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดย RPF1, RPF2 และ RPF3 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้พบว่าแต่ละ fraction ได้แก่ สารสกัดหยาบเมทานอล cannabinoids fraction และ non-cannabinoids fraction มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน โดย cannabinoids fraction มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดหยาบเมทานอล ส่วน non-cannabinoids fraction มีฤทธิ์น้อยที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 3

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อราในสารสกัดหยาบเมทานอล รวมทั้ง cannabinoids fraction และ non-cannabinoids fraction ของกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูก เมื่อประเมินจาก zone of inhibition ที่มากกว่า 6 mm พบว่าสามารถต้านแบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Clostridium sporogenes* และ *Enterococcus faecalis* ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อบ้างเล็กน้อย และยีสต์ก่อโรค คือ *Candida albicans* แต่ไม่สามารถต้านแบคทีเรียแกรมลบได้ โดย cannabinoids fraction มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมากกว่าสารสกัดหยาบเมทานอลและ non-cannabinoids fraction ของกัญชงแต่ละพันธุ์ปลูก ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูก พบว่า cannabinoids fraction ของ RPF3 มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยสามารถต้านการเจริญของ *S. epidermidis* สูงที่สุด ส่วน cannabinoids fraction ของ RPF4 มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. sporogenes* ดีที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 4 จากนั้นทำการทดสอบหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ค่า minimal bactericidal concentration (MBC) และค่า minimal fungicidal concentration (MFC) ของสารสกัดกัญชงที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อราของ RPF1, RPF3 และ RPF4 เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดกัญชงทั้ง 3 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอล RPF4

มีฤทธิ์ดีที่สุด สามารถยับยั้งเชื้อได้ 5 ชนิด ซึ่งพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *C. sporogenes* สูงที่สุด โดยมีค่า MIC ของสารสกัดอยู่ที่ 0.9765 $\mu\text{g/mL}$ และค่า MBC ของสารสกัดอยู่ที่ 0.9765 $\mu\text{g/mL}$ รองลงมา

ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* โดยมีค่า MIC ของสารสกัดอยู่ที่ 62.5 และ 62.5 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ค่า MBC ของสารสกัดอยู่ที่ 125 และ 500 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 1 ปริมาณสารสำคัญในใบกัญชงและสารสกัดหยาบเมทานอลของใบกัญชงแห้งพันธุ์ปลูกต่างๆ (%w/w)

พันธุ์ปลูก	ปริมาณสารสำคัญในใบกัญชงแห้ง (%w/w, n = 2)		Yield of methanolic extracts (%w/w)	ปริมาณสารสำคัญใน สารสกัดหยาบเมทานอล (%w/w, n = 2)	
	THC	CBD		THC	CBD
RPF1	0.017 $\pm$ 0.001	0.608 $\pm$ 0.030	17.62	0.096 $\pm$ 0.007	3.451 $\pm$ 0.172
RPF2	0.014 $\pm$ 0.001	0.616 $\pm$ 0.036	11.48	0.122 $\pm$ 0.008	5.365 $\pm$ 0.214
RPF3	0.019 $\pm$ 0.001	0.552 $\pm$ 0.028	11.44	0.166 $\pm$ 0.010	4.825 $\pm$ 0.241
RPF4	0.043 $\pm$ 0.002	0.777 $\pm$ 0.039	11.69	0.367 $\pm$ 0.022	6.647 $\pm$ 0.266

การศึกษาความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัดใบกัญชงต่อเซลล์ผิวหนัง Detriot-551 (Dermal fibroblast cell line) ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะใช้ในการทดสอบและไม่ทำให้เซลล์เสียชีวิต โดยใช้วิธี MTT assay สารที่ต้องการศึกษา คือ สารสกัดหยาบเมทานอล cannabinoids fraction และ non-cannabinoids fraction ของสารสกัดจากใบกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูก (RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4) ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 $\mu\text{g/mL}$ ใน DMSO 0.04% โดยผลการศึกษา cytotoxicity test พบว่าที่ความเข้มข้นสูง (> 50 $\mu\text{g/mL}$) สารสกัดหยาบเมทานอลและทุก fraction ของสารสกัดจากใบกัญชงมีความเป็นพิษต่อ Detroit-551 ค่อนข้างมาก คือ % cell survival น้อยกว่า 50% แต่เมื่อลดความเข้มข้นลงเหลือ 10 $\mu\text{g/mL}$ พบว่าร้อยละของเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตรอดมากกว่า 90% จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบและทุก fraction ของ

สารสกัดจากใบกัญชงที่ 10 $\mu\text{g/mL}$ ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 1

กระบวนการอักเสบ biological marker ที่สามารถตรวจวัดได้ง่ายอย่างหนึ่ง คือ ปริมาณของสาร nitric oxide (NO) ในการศึกษาผลของสารสกัดจากใบกัญชงต่อการสร้างสาร nitric oxide เลือกใช้เซลล์ Raw 264.7 ซึ่งเป็น macrophage cell line เมื่อเติมสารสกัดหยาบเมทานอล cannabinoids fraction และ non-cannabinoids fraction ของใบกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูกในความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/mL}$ ลงในเซลล์ Raw 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบและนำไปวัดหาปริมาณ NO ด้วยวิธี Griess's method พบว่าสารสกัดใบกัญชงในกลุ่มสารสกัดหยาบเมทานอลของ RPF1 และ RPF4 และใน cannabinoids fraction เท่านั้นที่สามารถลดการสร้าง NO จากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในภาพที่ 2

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของสารบางชนิดในกลุ่ม terpenoids cannabinoids ในตัวอย่างใบ สารสกัดหยาบเมทานอล และสารสกัดแยกส่วนของกัญชงพันธุ์ปลูก RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 วิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS (เปรียบเทียบ retention time และ MS databases ของ NIST library version 2.0, 2011)

Compounds	MW	RT	%Area ในตัวอย่างใบกัญชงแห้ง				%Area ในสารสกัดหยาบเมทานอล				%Area ใน cannabinoids fraction				%Area ใน non-cannabinoids fraction			
			RPF1	RPF2	RPF3	RPF4	RPF1	RPF2	RPF3	RPF4	RPF1	RPF2	RPF3	RPF4	RPF1	RPF2	RPF3	RPF4
β -Caryophyllene	204.188	23.738	0.87	0.45	2.35	0.5	0.96	0.45	0.70	0.45	ND	ND	ND	0.23	ND	ND	ND	ND
Humulene	204.188	25.185	ND	ND	0.62	0.14	ND	ND	0.27	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Caryophyllene oxide	220.183	30.358	ND	ND	ND	ND	ND	0.78	0.63	0.64	ND	ND	0.36	0.62	ND	ND	ND	ND
α -Bisabolol	222.198	34.104	ND	0.3	ND	0.28	ND	0.27	ND	0.23	ND	ND	ND	0.27	ND	ND	ND	ND
CBDV	286.41	51.082	13.23	ND	11.23	24.82	10.70	ND	14.45	25.43	11.41	ND	15.63	28.46	ND	ND	ND	ND
THCV	286.41	53.868	ND	ND	ND	1.5	ND	ND	ND	1.81	ND	ND	ND	2.21	ND	ND	ND	ND
Cannabispiran	246.126	55.284	0.91	ND	ND	1.21	0.69	ND	0.91	1.55	ND	ND	ND	0.68	ND	ND	ND	ND
CBD	314.225	56.732	71.02	79.25	71.83	62.07	69.02	57.36	47.75	42.82	71.31	67.21	55.62	49.48	2.12	7.15	1.89	0.87
CBC	314.225	57.064	2.1	2.23	2.49	2.2	1.46	0.97	1.42	1.22	2.34	1.37	2.23	1.99	ND	ND	ND	ND
Cannabicaumaronone	328.204	58.595	0.76	ND	ND	ND	0.69	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Δ^9 -THC	314.225	59.306	2.85	0.84	1.09	1.74	1.19	0.56	1.52	2.64	2.56	1.17	2.45	3.16	ND	ND	ND	0.53

หมายเหตุ: ND = not detected

จากผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกัญชงต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์ Raw 264.7 พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลและ cannabinoids fraction จากใบกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูกสามารถลดการแสดงออกของยีน *iNOS* และ *COX2* ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่มีความสามารถในการลดการแสดงออกของยีน *IL1B* ได้ไม่ดีเท่าที่ควร ดังแสดงในภาพที่ 3

จากผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกัญชงต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์ Detroit-551 พบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลและ cannabinoids fraction จากใบกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูกลดการแสดงออกของยีน *MMP3* ได้อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่ามีเพียง crude extract และ cannabinoids fraction จากพันธุ์ปลูก RPF1 และ RPF4 ที่สามารถลดการแสดงออกของยีน *COL2A1* ได้อย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในภาพที่ 4

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูก โดยใช้วิธี ABTS, DPPH และ FRAP (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD, n = 3)

Hemp cultivars	Fraction	Anti-oxidant activity (mg TE/g สารสกัด)		
		ABTS	DPPH	FRAP
RPF1	Methanolic crude extract	97.84 $\pm$ 10.62	54.56 $\pm$ 0.48	99.82 $\pm$ 1.45
	Cannabinoid fraction	147.67 $\pm$ 9.16	73.27 $\pm$ 1.07	113.90 $\pm$ 2.13
	Non-cannabinoids fraction	66.65 $\pm$ 3.32	48.20 $\pm$ 0.87	82.42 $\pm$ 1.84
RPF2	Methanolic crude extract	139.30 $\pm$ 11.78	44.11 $\pm$ 0.78	91.13 $\pm$ 1.24
	Cannabinoid fraction	153.96 $\pm$ 2.41	62.12 $\pm$ 0.91	103.40 $\pm$ 0.92
	Non-cannabinoids fraction	89.26 $\pm$ 2.75	40.06 $\pm$ 0.57	79.37 $\pm$ 4.38
RPF3	Methanolic crude extract	104.71 $\pm$ 5.31	51.17 $\pm$ 0.51	109.55 $\pm$ 4.58
	Cannabinoid fraction	118.36 $\pm$ 4.62	62.89 $\pm$ 1.46	120.71 $\pm$ 1.30
	Non-cannabinoids fraction	76.29 $\pm$ 5.18	53.15 $\pm$ 0.31	87.21 $\pm$ 0.72
RPF4	Methanolic crude extract	115.05 $\pm$ 6.68	70.07 $\pm$ 2.42	143.24 $\pm$ 1.75
	Cannabinoid fraction	180.84 $\pm$ 6.36	88.02 $\pm$ 2.10	153.99 $\pm$ 5.92
	Non-cannabinoids fraction	114.36 $\pm$ 7.89	57.37 $\pm$ 1.36	127.93 $\pm$ 5.23

ตารางที่ 4ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและราชนิดต่างๆของสารสกัดกัญชงพันธุ์ปลูก RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 (ค่าเฉลี่ย±SD, n = 3)

Zone of inhibition (mm) (Mean±SD, n = 3)													
Hemp cultivars	Fraction/ antibiotics	<i>E. coli</i>	<i>S. Abony</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
RPF1	CE	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.67±0.58	7.00±0.00	10.00±1.00	9.50±0.87	9.67±0.58	6.17±0.29	6.00±0.00
	CBs	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	7.00±0.00	8.00±0.00	12.00±0.00	11.00±1.00	10.33±0.58	6.00±0.00	6.00±0.00
	Non-CBs	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.50±0.00	7.00±0.00	6.83±0.29	6.67±0.58	6.00±0.00	6.00±0.00
RPF2	CE	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	7.67±0.58	6.00±0.00	9.00±0.00	8.00±0.00	9.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
	CBs	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	7.00±0.00	7.00±0.00	8.33±0.58	7.33±0.58	8.00±0.00	6.17±0.29	6.00±0.00
	Non-CBs	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.50±0.00	7.00±0.00	6.33±0.29	6.17±0.29	6.00±0.00	6.00±0.00
RPF3	CE	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.83±0.29	7.67±0.58	15.33±1.53	10.00±0.00	12.00±1.00	6.67±0.58	6.00±0.00
	CBs	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	8.00±0.00	10.33±0.58	16.33±0.58	13.33±0.58	14.67±0.58	6.67±0.29	6.00±0.00
	Non-CBs	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	7.00±0.00	6.50±0.00	13.67±1.15	6.83±0.29	9.00±1.00	6.00±0.00	6.00±0.00
RPF4	CE	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.50±0.50	11.67±0.58	11.00±0.00	10.33±0.58	10.50±0.50	6.00±0.00	6.00±0.00
	CBs	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.50±0.00	13.00±0.00	9.67±0.58	10.50±0.50	9.33±0.58	6.00±0.00	6.00±0.00
	Non-CBs	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.33±0.29	6.00±0.00	9.67±1.15	7.83±0.29	8.33±0.58	14.00±0.00	6.00±0.00
control (n=2)	Chloram.	26.67±1.53	26.00±0.00	30.67±0.58	7.00±0.00	22.67±2.31	20.33±0.58	43.33±1.15	33.67±0.58	23.00±1.00	32.00±1.00	ND	ND
	Tetra.	20.33±1.15	22.67±1.53	22.33±1.53	6.67±0.29	20.00±1.73	8.33±0.58	56.00±2.65	42.00±0.00	23.00±0.00	30.00±0.00	ND	ND
	Genta.	17.67±0.58	22.00±1.00	25.00±0.00	18.67±0.58	17.67±0.58	10.67±1.15	6.50±0.50	27.00±0.00	22.00±0.00	27.00±0.00	ND	ND
	Clotri.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9.33±1.15	9.33±0.58
	Ampho.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.00±0.00	6.00±0.00

หมายเหตุ : ND = not determined, CE = methanolic crude extract, CBs = cannabinoids fraction, non-CBs = non cannabinoids fraction tested micro-organisms: *Enterococcus faecalis*, *Salmonella abony*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Clotridium sporogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*

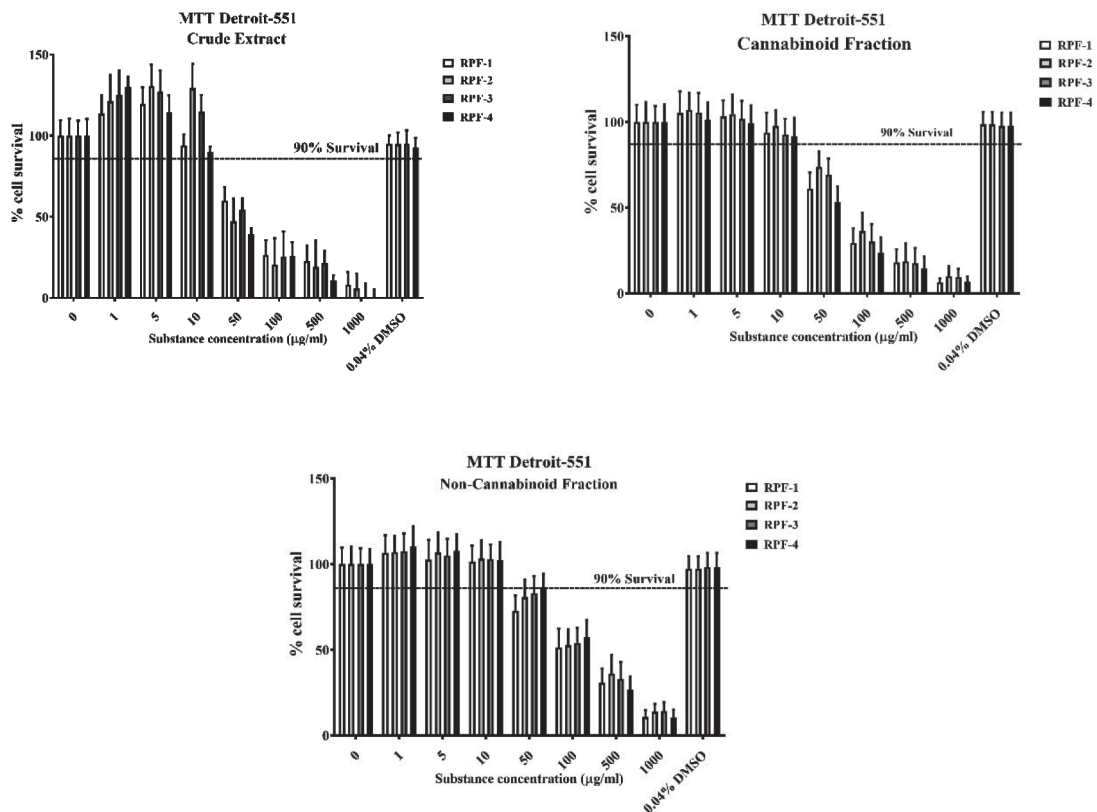
antibiotics used as positive control: Chloram. = chloramphenicol 30 µg/disc, Tetra. = tetracycline 30 µg/disc,

Genta. = gentamycin 10 µg/disc, Clotri. = clotrimazole 100 µg/disc, Ampho. = amphotericin B 100 µg/disc

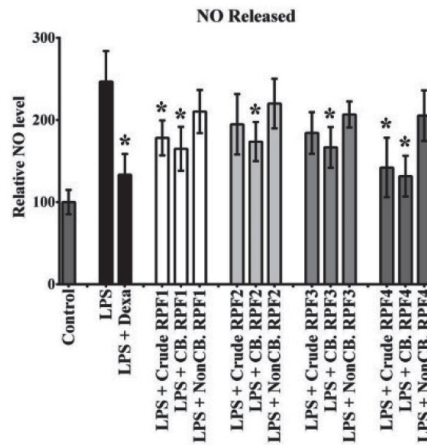
ตารางที่ 5 ค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ค่า minimal bactericidal concentration (MBC) และค่า minimal fungicidal concentration (MFC) ของสารสกัดหยาบเมทานอลกัญชงพันธุ์ปลูกร PF1, RPF3 และ RPF4 (n = 3)

ตัวอย่าง/เชื้อ	RPF1		RPF3		RPF4	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC/MFC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC/MFC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC/MFC ($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. aureus</i>	62.5	125	125	250	62.5	125
<i>S. epidermidis</i>	62.5	250	125	500	62.5	500
<i>B. subtilis</i>	250	500	250	500	250	500
<i>C. sporogenes</i>	-	-	0.9765	0.9765	0.9765	0.9765
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	250	500

หมายเหตุ: เครื่องหมาย “-” หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบเนื่องจากไม่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

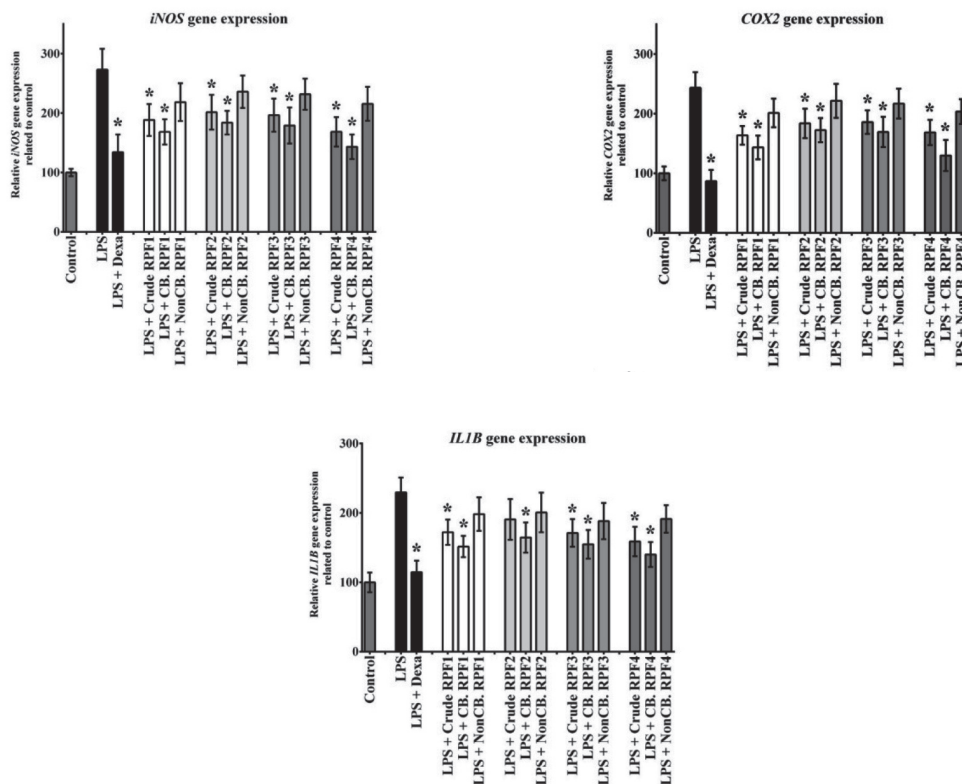


ภาพที่ 1 การศึกษาความเป็นพิษ (cytotoxicity test) ต่อเซลล์ Detroit-551 ของสารสกัดหยาบเมทานอลและสารสกัดแยกส่วนใบกัญชงพันธุ์ปลูกร PF1, RPF2, RPF3 และ RPF4



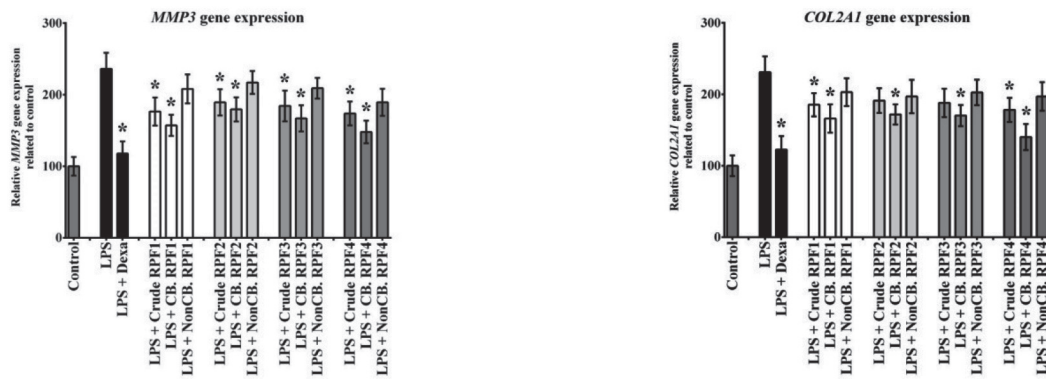
* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ถูกให้ LPS เพื่อให้เกิดการอักเสบระดับเซลล์
 LPS = lipopolysaccharide, Dexamethasone = dexamethasone
 CB = cannabinoid fraction, NonCB = non-cannabinoid fraction

ภาพที่ 2 ผลของสารสกัดหยาบเมทานอลและสารสกัดแยกส่วนใบกัญชงพันธุ์ปลูก RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 ต่อปริมาณ NO เมื่อเกิดการอักเสบในเซลล์ Raw 264.7



* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ถูกให้ LPS เพื่อให้เกิดการอักเสบระดับเซลล์
 LPS = lipopolysaccharide, Dexamethasone = dexamethasone
 CB = cannabinoid fraction, NonCB = non-cannabinoid fraction

ภาพที่ 3 ผลของสารสกัดหยาบเมทานอลและสารสกัดแยกส่วนใบกัญชงพันธุ์ปลูก RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 ต่อการแสดงออกของยีน *iNOS*, *COX2* และ *IL1B* เมื่อเกิดการอักเสบ



- * = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ถูกให้ LPS เพื่อให้เกิดการอักเสบระดับเซลล์
 LPS = lipopolysaccharide, Dexamethasone = dexamethasone
 CB = cannabinoid fraction, NonCB = non-cannabinoid fraction

ภาพที่ 4 ผลของสารสกัดหยาบเมทานอลและสารสกัดแยกส่วนใบกัญชงพันธุ์ปลูก RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 ต่อการแสดงออกของยีน *MMP3* และ *COL2A1* เมื่อเกิดการอักเสบ

วิจารณ์

ปริมาณสารสำคัญในตัวอย่างใบกัญชง ซึ่งเป็นส่วนที่เหลือทิ้งและสารสกัดหยาบเมทานอลของใบกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูก ได้แก่ RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 พบว่าสารสำคัญที่พบมาก ได้แก่ THC และ CBD โดยไม่พบ CBN ซึ่งเป็นสารสลายตัวของ THC ในทุกตัวอย่าง ในตัวอย่างใบพบว่ามีความเข้มข้น THC ในช่วง 0.01–0.04 %w/w และปริมาณ CBD ในช่วง 0.55–0.78 %w/w ส่วนสารสกัดหยาบเมทานอลมีปริมาณ THC ในช่วง 0.09–0.36 %w/w และปริมาณ CBD ในช่วง 3.45–6.64 %w/w ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยมีอัตราส่วน CBD:THC เท่ากับ 35, 44, 29 และ 18 ตามลำดับ พบว่า RPF4 มีปริมาณ THC และ CBD มากกว่าพันธุ์ปลูกอื่น เช่นเดียวกับข้อมูลการขึ้นทะเบียนพันธุ์ของทั้ง 4 พันธุ์ปลูก เมื่อปี พ.ศ. 2554 RPF4 มี THC มากกว่าพันธุ์ปลูกอื่น อย่างไรก็ตามลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ลำต้น ใบ ดอก ไม่ต่างกัน ยกเว้นเมล็ดซึ่ง RPF3 มีเมล็ดขนาดใหญ่และมีน้ำหนักต่อ 1,000 เมล็ด มากกว่าพันธุ์ปลูกอื่น⁽³⁵⁾ เมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในกัญชง ดังแสดงในตารางที่ 2 พบสาร terpenoids เฉพาะกลุ่ม sesquiterpenoids ที่มี molecular weight มากกว่าหรือเท่ากับ 204⁽³⁶⁾ ได้แก่

β -caryophyllene, humulene และ α -bisabolol สารกลุ่ม cannabinoids ได้แก่ cannabivarin (CBDV), tetrahydrocannabivarin (THCV), cannabichromene (CBC), CBD และ THC ซึ่งแต่ละพันธุ์ปลูกมีลักษณะองค์ประกอบที่แตกต่างกัน เช่น THCV พบเฉพาะใน RPF4 สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ โดย RPF4 ได้รับการปรับปรุงพันธุ์มาจากพันธุ์ปลูก PU⁽²²⁾ อีกทั้งพบว่าปริมาณและชนิดของสารสำคัญที่พบในตัวอย่างกัญชงครั้งนี้มีน้อยกว่ามาก เนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อลดปริมาณ THC ให้ต่ำมากๆ และเพิ่มปริมาณเส้นใยทำให้สารสำคัญอื่นๆ ลดลง ปริมาณ THC จะแปรผกผันกับลักษณะทางกายภาพของต้นกัญชง ได้แก่ ปริมาณเส้นใย ขนาดความสูงและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้น⁽³⁷⁾ นอกจากนี้ใน cannabinoids fraction มีองค์ประกอบทางเคมีของสารในกลุ่ม terpenoids บางชนิด และ cannabinoids เช่นเดียวกับที่พบในสารสกัดหยาบเมทานอล ส่วน non-cannabinoids fraction พบมีสารกลุ่ม cannabinoids เช่น CBD และ THC เช่นกัน แต่มีปริมาณน้อยกว่าที่พบในสารสกัดหยาบเมทานอลและใน cannabinoids fraction อาจเนื่องจากสภาวะในการ

แยกส่วนด้วยวิธี flash chromatography ยังไม่เหมาะสม ทำให้การสกัดสารแยกส่วนไม่สมบูรณ์

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบเมทานอล รวมทั้ง cannabinoids fraction และ non-cannabinoids fraction ของกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูก ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่า RPF4 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ส่วน RPF1 RPF2 และ RPF3 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน และพบว่าตัวอย่างแต่ละชนิดของกัญชงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน โดย cannabinoids fraction มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดเมื่อทดสอบด้วย 3 วิธี โดยมีค่า Trolox equivalent antioxidant capacity เฉลี่ย ในช่วง 71.57–150.20 mg TE/g รองลงมา คือ สารสกัดหยาบเมทานอล มีค่าในช่วง 54.98–114.22 mg TE/g ส่วน non-cannabinoids fraction มีฤทธิ์น้อยที่สุด มีค่าในช่วง 49.69–94.23 mg TE/g ใน cannabinoid fraction ของกัญชง ประกอบด้วยสารสำคัญหลัก คือ CBD และ THC บ้างเล็กน้อย และสารประกอบ terpenophenolic อื่น ๆ รวมเรียกว่า phytocannabinoids ซึ่งออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาทั้ง primary และ secondary oxidation สารสกัดด้วยตัวทำละลายจะมีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ แต่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความแตกต่างกันขึ้นกับพันธุ์ปลูก การปลูก และลักษณะองค์ประกอบสารสำคัญของสารสกัดที่ได้^(38,39)

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อราในสารสกัดหยาบเมทานอลรวมทั้ง cannabinoids fraction และ non-cannabinoids fraction ของสารสกัดกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูก พบว่า cannabinoids fraction มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ดีที่สุด เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมี cannabinoids fraction มีสารสำคัญในกลุ่ม cannabinoids เช่น CBDV, CBD, CBC และ THC ไม่ต่างจากที่พบในสารสกัดหยาบ แต่มีสัดส่วนสูงกว่าทำให้มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียดีกว่า จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่าโครงสร้างของ cannabinoids ที่มีโครงสร้างเป็น monoterpene moiety ร่วมกับมี pentyl side chain ได้แก่ CBG, CBD, CBC และ THC มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดีที่สุด

โดยเฉพาะพันธุ์ปลูกที่มี THC สูง⁽⁴⁰⁾ จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ cannabinoids fraction ไม่ต่างจากสารสกัดหยาบเมทานอล การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อเพิ่มมูลค่าเพิ่มของส่วนเหลือทิ้งของกัญชง ดังนั้นเพื่อประหยัดต้นทุนของสารสกัดจึงทำการศึกษาทดสอบหาค่า MIC, MBC และ MFC โดยใช้สารสกัดหยาบเมทานอลและศึกษาเฉพาะพันธุ์ปลูก RPF1, RPF3 และ RPF4 เนื่องจากเมล็ดพันธุ์ปลูก RPF2 มีปริมาณน้อยไม่เพียงพอที่จะส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก ทำให้ตัวอย่าง RPF2 ในงานวิจัยนี้มีปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อการศึกษา อีกทั้งเป็นการส่งเสริมเกษตรกรของมูลนิธิโครงการหลวงและสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) ให้สามารถปลูกกัญชงได้ทั่วไปและสามารถใช้ประโยชน์ได้ทั้งเส้นใยและเมล็ด แต่พันธุ์ปลูก RPF1 และ RPF4 มีข้อจำกัดคือ ต้องปลูกในพื้นที่ที่มีความสูงมากกว่า 1,200 เมตร จากระดับน้ำทะเลและมีอากาศค่อนข้างเย็น ปัจจุบัน RPF3 ได้รับการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกมากที่สุด เนื่องจากสามารถปลูกได้ในพื้นที่ราบทั่วไปที่มีอุณหภูมิสูงกว่าพื้นที่สูง ดังแสดงในตารางที่ 4 และ 5 จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลของทั้ง 3 พันธุ์ปลูก มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *B. subtilis* โดยมีค่า MIC ในช่วง 62.5–250 µg/mL และค่า MBC ในช่วง 125–500 µg/mL โดยเฉพาะ RPF3 และ RPF4 มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. sporogenes* ดีที่สุด โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ที่ 0.9765 µg/mL นอกจากนี้พบว่า RPF4 มีฤทธิ์ต้าน *C. albicans* ได้บ้าง โดยมีค่า MIC อยู่ที่ 250 µg/mL ค่า MFC อยู่ที่ 500 µg/mL และพบว่าฤทธิ์ของสารสกัดหยาบในการศึกษานี้ดีกว่าที่เคยศึกษาในสารสกัดหยาบเมทานอลของ *C. sativa* ที่สามารถต้านเชื้อ *S. aureus* และ *B. subtilis* มี MIC เท่ากับ 1.56 mg/mL⁽⁴¹⁾ แต่มีฤทธิ์น้อยกว่าที่มีในรายงานของ Martinenghi LD และคณะ⁽²¹⁾ ซึ่งศึกษาโดยการแยกสาร CBDA และ CBD จากสารสกัดกัญชงที่สกัดด้วยเอทานอลให้มีความบริสุทธิ์สูง สามารถต้านเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* โดยมีค่า MIC ของสารสกัดอยู่ที่ 1–2 µg/mL แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่

E. coli และ *Ps. aeruginosa* นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยจากกัญชง ซึ่งมีสารสำคัญในกลุ่ม terpenes ได้แก่ monoterpenes และ sesquiterpenes มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อดื้อยาและเชื้อกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกส่วนใหญ่และแกรมลบบางส่วน เช่น *C. sporogenes*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* ซึ่งพันธุ์ปลูกกัญชงที่แตกต่างกันให้ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแตกต่างกัน⁽²⁰⁾ จากผลการศึกษาสารสกัดกัญชงมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกและก่อให้เกิดโรคได้ดี โดยเฉพาะ *C. sporogenes* ที่พบค่า MIC ต่ำถึง 0.9765 µg/mL แสดงถึงฤทธิ์การต้านเชื้อที่ดีมาก และสารสกัดจากพืชที่ MIC น้อยกว่า 100 µg/mL ยังจัดว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย⁽⁴²⁾

ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากใบกัญชงต่อเซลล์ Detroit-551 พบว่าทุกพันธุ์ปลูกที่ความเข้มข้น 10 µg/mL เซลล์ยังคงมีชีวิตรอดมากกว่า 90% จึงเลือกใช้ความเข้มข้นนี้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยศึกษาในเซลล์ Raw 264.7 ซึ่งเป็น macrophage cell line ที่สามารถกระตุ้นกระบวนการอักเสบได้ง่ายและผลิต nitric oxide (NO) ออกมาในปริมาณสูง เมื่อใช้ LPS ความเข้มข้น 1 µg/mL สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดการอักเสบได้โดยปริมาณ NO ที่เซลล์สร้างขึ้นเพิ่มขึ้นประมาณ 2.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และ dexamethasone ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม steroids ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ความเข้มข้น 10^{-7} M ที่ใช้เป็น positive control สามารถลดระดับของ NO จากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นทำให้การอักเสบกลับมาอยู่ในระดับปกติได้ สำหรับผลในการลดการอักเสบมีเพียง cannabinoids fraction ของสารสกัดใบกัญชง ทั้ง 4 พันธุ์ปลูก และสารสกัดหยาบเมทานอลของพันธุ์ปลูก RPF1 และ RPF4 เท่านั้น ที่สามารถลดการสร้าง NO อย่างมีนัยสำคัญ อาจเนื่องมาจากสารกลุ่ม cannabinoids และมีความสัมพันธ์กับ antioxidant properties ของสารสกัด เมื่อพิจารณากระบวนการอักเสบในระดับเซลล์ NO ถูกสร้างขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ iNOS ซึ่งถูกกระตุ้นให้มีการสร้างและทำงานมากขึ้นเมื่อเกิดการอักเสบ มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์ COX-2 ที่ควบคุมกระบวนการสร้างสารกลุ่ม

prostaglandin ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ เมื่อเกิดการอักเสบในระดับเซลล์จะมีการสร้างสาร cytokines เรียกว่า IL-1β ซึ่งมีหน้าที่ในการขยายสัญญาณการอักเสบระดับเซลล์ให้มากยิ่งขึ้นและมีบทบาทสำคัญที่สุดในกระบวนการอักเสบ จึงสามารถใช้การแสดงออกของเอนไซม์หรือยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์เหล่านี้เป็น biomarker เพื่อติดตามกระบวนการอักเสบในระดับเซลล์ได้ โดยทำการศึกษาการแสดงออกของยีน iNOS ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ iNOS ยีน COX2 ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ COX-2 และยีน IL1B ซึ่งควบคุมการสร้างสาร IL-1β ประกอบการตรวจวัดระดับ NO ที่ถูกผลิตขึ้น พบว่าผลการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ตัว มีความสอดคล้องกับผลการศึกษา ระดับ NO โดย LPS มีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS COX2 และ IL1B อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและยา dexamethasone มีผลในการยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ตัวได้ ผลของสารสกัดจากใบกัญชง พบว่ามีเพียงสารสกัดหยาบเมทานอล และ cannabinoids fraction ของสารสกัดจากใบกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูก เท่านั้น ที่มีผลในการลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดย cannabinoids fraction มีผลในการลดการแสดงออกของยีนมากกว่าเล็กน้อย และสารสกัดที่ได้จากพันธุ์ปลูก RPF4 มีประสิทธิภาพในการลดการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ชนิด มากที่สุด แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบภายในเซลล์ Raw 264.7 อาจเป็นผลจากปริมาณและชนิดของสารกลุ่ม cannabinoids ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในสารสกัด

เซลล์ที่ใช้เป็นตัวแทนของเซลล์ผิวหนังในการศึกษาครั้งนี้ คือ เซลล์ Detroit-551 ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่ได้มีการแสดงออกของยีน iNOS, COX2 และ IL1B ในระดับที่ชัดเจน รวมถึงไม่สามารถผลิต NO ในระดับที่สูงเมื่อถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ จึงเปลี่ยน biomarker เพื่อติดตามกระบวนการอักเสบในระดับเซลล์เป็นการติดตามยีน MMP3 ซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์ matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) ที่สลาย matrix ภายในเซลล์ผิวหนังเมื่อเกิดกระบวนการ

อักเสบและยีน *COL2A1* ที่ควบคุมการสร้าง collagen ชนิด 2A1 ซึ่งเป็นคอลลาเจนชนิดที่เซลล์สร้างขึ้นเมื่อเริ่มเกิดการอักเสบ โดยผลการทดสอบกระบวนการอักเสบในระดับเซลล์ เมื่อกระตุ้นด้วย LPS และให้ dexamethasone เพื่อลดการอักเสบ พบว่าไม่แตกต่างจากการศึกษาในเซลล์ Raw 264.7 โดยยีน *MMP3* และ *COL2A1* มีการแสดงออกที่สูงขึ้น เมื่อถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS และ dexamethasone มีความสามารถในการลดการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ตัวอย่างมีนัยสำคัญ ประสิทธิภาพในการลดการอักเสบของสารสกัดจากใบกัญชง พบว่ามีเพียงสารสกัดหยาบเมทานอล และ cannabinoid fraction ของสารสกัดจากใบกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูกเท่านั้น ที่สามารถลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบทั้ง 2 ชนิด ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดย cannabinoid fraction มีความสามารถในการลดการแสดงออกของยีนได้มากกว่าเล็กน้อยและสารสกัดที่ได้จากพันธุ์ปลูก RPF4 สามารถลดการแสดงออกของยีน *MMP3* และ *COL2A1* ได้ชัดเจนกว่าพันธุ์ปลูกอื่น ๆ และผลการศึกษาี้สอดคล้องกับผลการศึกษาใน Raw 264.7 สรุปได้ว่าความสามารถในการลดการอักเสบในระดับเซลล์ของสารสกัดจากใบกัญชงอาจมาจากสารกลุ่ม cannabinoids ที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัด⁽⁴³⁾ เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของสารกลุ่ม cannabinoids ได้สารที่พบเฉพาะในสารสกัดจากพันธุ์ปลูก RPF4 ซึ่งอาจมีผลทำให้มีประสิทธิภาพเหนือกว่าพันธุ์ปลูกอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา คือ THCV ซึ่งจากการศึกษาพบว่ามีเพียง RPF4 เท่านั้น ที่ตรวจพบ THCV อยู่ภายในองค์ประกอบ และจากการศึกษาก่อนหน้า พบว่าสาร THCV มีผลช่วยลดอาการอักเสบในหนูทดลอง⁽⁴⁴⁾ และมีประสิทธิภาพในการลดการสร้าง NO จากเซลล์ macrophage จากหนูเมื่อถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบในระดับหลอดทดลอง⁽⁴⁵⁾ จึงเป็นที่น่าสนใจว่า THCV อาจมีส่วนสำคัญในการลดการอักเสบในเซลล์ผิวหนัง ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษายืนยันต่อไปในอนาคต

สรุป

การศึกษานี้ศึกษาสารสกัดหยาบเมทานอลและสารสกัดแยกส่วนจากใบกัญชงไทยที่เป็นส่วนเหลือทิ้งของกัญชงที่ขึ้นทะเบียนพันธุ์ เพื่อใช้ประโยชน์จากเส้นใย ได้แก่ พันธุ์ปลูก RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 พบว่า cannabinoids fraction ของ RPF4 มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านอักเสบ โดยสามารถลดการอักเสบในระดับเซลล์รวมถึงเซลล์ผิวหนังได้ดีที่สุด เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าเพิ่มของส่วนเหลือทิ้งของกัญชงและเพื่อประหยัดต้นทุนของสารสกัดจึงสนใจฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเฉพาะในสารสกัดหยาบ จากผลการศึกษาสารสกัดหยาบเมทานอลของ RPF3 ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูกที่เกษตรกรปลูกมากที่สุด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียค่อนข้างดีต่อ *C. sporogenes*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* และมีฤทธิ์ต้านอักเสบ โดยสามารถลดการสร้าง nitric oxide (NO) จากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ได้แก่ *iNOS*, *COX2* และ *IL1B* นอกจากนี้สามารถลดการแสดงออกของยีน *MMP3* และ *COL2A1* เมื่อเกิดการอักเสบในระดับเซลล์ของเซลล์ผิวหนังได้ ซึ่งข้อมูลการศึกษาในครั้งนี้มีประโยชน์ต่อการศึกษาเพิ่มเติมด้านการทดสอบความเป็นพิษและประสิทธิผลของฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาข้างต้นในสัตว์ทดลอง เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพร เช่น ผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลินทรีย์และต้านอักเสบ เพื่อเพิ่มมูลค่าของใบกัญชงที่เหลือจากการนำไปใช้ประโยชน์ทางเศรษฐกิจอื่น ๆ ได้หลากหลายมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำหรับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัย ขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับการสนับสนุนครุภัณฑ์ในการวิจัย ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา

พื้นที่สูง (องค์การมหาชน) สำหรับการสนับสนุนตัวอย่าง ใบกัญชง และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานยา ศูนย์ วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ ทุกท่านที่ให้ความ ช่วยเหลือในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

- Johnson R. Defining hemp: a fact sheet. Congressional Research Service. [online]. 2019; [cited 2022 Oct 23]; [12 screens]. Available from: URL: <https://crsreports.congress.gov/product/pdf/R/R44742>.
- Clarke RC, Watson DP. Cannabis and natural Cannabis medicine. In: ElSohly MA, editor. Marijuana and the Cannabinoids. New Jersey: Humana Press; 2007. p. 1-16.
- Brenneisen R. Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other Cannabis constituents. In: ElSohly MA, editor. Marijuana and the Cannabinoids. New Jersey: Humana Press; 2007. p. 17-49.
- Department of Justice Parliamentary Counsel's Office. Industrial Hemp Amendment Act 2018 No.15 of 2018. [online]. 2018; [cited 2022 Oct 23]; [8 screens]. Available from: URL: https://www.legislation.wa.gov.au/legislation/statutes.nsf/RedirectURL?OpenAgent&query=mrdoc_41245.pdf.
- ประกาศคณะกรรมการควบคุมยาเสพติดให้โทษ เรื่อง กำหนดลักษณะกัญชง (Hemp) พ.ศ. 2562. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 136 ตอนพิเศษ 264 ง (วันที่ 24 ตุลาคม 2562). หน้า 7.
- Dabrowska A, Green VR, Johnson R, Sacco LN. FDA regulation of cannabidiol (CBD) consumer products: overview and considerations for Congress. Congressional Research Service. [online]. 2020; [cited 2022 Oct 23]; [33 screens]. Available from: URL: <https://crsreports.congress.gov/product/pdf/R/R46189>.
- Stott CG, Guy GW. Cannabinoids for the pharmaceutical industry. Euphytica 2004; 140: 83-93.
- Pertwee RG. Cannabinoids and multiple sclerosis. Pharmacol Ther 2002; 95: 165-74.
- Baker D, Pryce G, Giovannoni G, Thompson AJ. The therapeutic potential of cannabis. Lancet Neurol 2003; 2: 291-8.
- Russo E, Guy GW. A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. Med Hypotheses 2006; 66: 234-46.
- Borgelt LM, Franson KL, Nussbaum AM, Wang GS. The pharmacologic and clinical effects of medical cannabis. Pharmacotherapy 2013; 33(2): 195-209.
- Svíženská I, Dubový P, Sulcová A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. Pharmacol Biochem Behav 2008; 90: 501-11.
- Fukuda S, Kohsaka H, Takayasu A, Yokoyama W, Miyabe C, Miyabe Y, et al. Cannabinoid receptor 2 as a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis. BMC Musculoskelet Disord 2014; 15: 275. (10 pages).
- Wilkinson JD, Williamson EM. Cannabinoids inhibit human keratinocyte proliferation through a non-CB1/CB2 mechanism and have a potential therapeutic value in the treatment of psoriasis. J Dermatol Sci 2007; 45: 87-92.
- Zheng D, Bode AM, Zhao Q, Cho YY, Zhu F, Ma WY, et al. The cannabinoid receptors are required for ultraviolet-induced inflammation and skin cancer development. Cancer Res 2008; 68(10): 3992-8.
- Lastres-Becker I, Molina-Holgado F, Ramos JA, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J. Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hy-

- droxydopamine toxicity *in vivo* and *in vitro*: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2005; 19: 96-107.
17. Mechoulam R, Sumariwalla PF, Feldmann M, Gallily R. Cannabinoids in models of chronic inflammatory conditions. *Phytochem Rev* 2005; 4: 11-8.
 18. Gaffal E, Cron M, Glodde N, Bald T, Kuner R, Zimmer A, et al. Cannabinoid 1 receptors in keratinocytes modulate proinflammatory chemokine secretion and attenuate contact allergic inflammation. *J Immunol* 2013; 190(10): 4929-36.
 19. Albanesi C. Keratinocytes in allergic skin diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010; 10: 452-6.
 20. Nissen L, Zatta A, Stefanini I, Grandi S, Sgorbati B, Biavati B, et al. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia* 2010; 81(5): 413-9.
 21. Martinenghi LD, Jonsson R, Lund T, Jenssen H. Isolation, purification, and antimicrobial characterization of cannabidiolic acid and cannabidiol from *Cannabis sativa* L. *Biomolecules* 2020; 10: 900. (16 pages).
 22. Duangnin N, Klangjorhor J, Tipparat P, Pinmanee S, Phitak T, Pothacharoen P, et al. Anti-inflammatory effect of methanol extracts of hemp leaf in IL-1 β -induced synovitis. *Trop J Pharm Res* 2017; 16(7): 1553-63.
 23. Meyer M, Müller AK, Yang J, Sulcova J, Werner S. The role of chronic inflammation in cutaneous fibrosis: fibroblast growth factor receptor deficiency in keratinocytes as an example. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2011; 15: 48-52.
 24. Tipparat P. Factors affecting cannabinoid contents for classification of hemp (*Cannabis sativa* L.) in Northern Thailand [dissertation]. Chiang Mai: Graduate school, Chiang Mai University; 2014.
 25. Fishedick JT, Hazekamp A, Erkelens T, Choi YH, Verpoorte R. Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry* 2010; 71: 2058-73.
 26. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Radical Biol Med* 1999; 26: 1231-7.
 27. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss u Technol* 1995; 28: 25-30.
 28. Benzei IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the Frap assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70-6.
 29. Hudzicki J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. American Society for Microbiology [online]. 2009; [cited 2022 Feb 1]; [23 screens]. Available from: URL: <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf>.
 30. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45: 493-6.
 31. M07-A9: Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 9th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.



32. Murakami A, Miyamoto M, Ohigashi H. Zerumbone, an anti-inflammatory phytochemical, induces expression of proinflammatory cytokine genes in human colon adenocarcinoma cell lines. *Biofactors* 2004; 21(1-4): 95-101.
33. Yoon WJ, Ham YM, Kim SS, Yoo BS, Moon JY, Baik JS, et.al. Suppression of pro-inflammatory cytokines, *iNOS* and *COX-2* expression by brown algae *Sargassum micracanthum* in RAW 264.7 macrophages. *EurAsia J BioSci* 2009; 3: 130-43.
34. Phitak T, Pothacharoen P, Settakorn J, Poompomol W, Caterson B, Kongtawelert P. Chondroprotective and anti-inflammatory effects of sesamin. *Phytochemistry* 2012; 80: 77-88.
35. สิริดา ปันมณี. ขึ้นทะเบียนพันธุ์กัญชง (Hemp) สำคัญอย่างไร?. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 14 พ.ค. 2566]; [5 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.hrdi.or.th/Articles/Detail/1482>.
36. Hillig KW. A chemotaxonomic analysis of terpenoid variation in *Cannabis*. *Biochem Systemat Ecol* 2004; 32: 875-91.
37. Tipparat P, Kunkaew W, Julsrigival S, Pinmanee S, Natakankitkul S. Classification of cannabis plants grown in Northern Thailand using physico-chemical properties. *J Nat Sci Res* 2014; 4(4): 46-54.
38. Cásedas G, Moliner C, Maggi F, Mazzara E, López V. Evolution of two different *Cannabis sativa* L. extracts as antioxidant and neuroprotective agents. *Front Pharmacol*. [online]. 2022; [cited 2022 Nov 8]; [11 screens]. Available from: URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.1009868/pdf>.
39. Cantele C, Bertolino M, Bakro F, Giordano M, Jedryczka M, Cardenia V. Antioxidant effects of hemp (*Cannabis sativa* L.) inflorescence extract in stripped linseed oil. Antioxidants. [online]. 2020; [cited 2022 Nov 8]; [18 screens]. Available from: URL: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/11/1131/pdf?version=1605515769>.
40. Appendino G, Gibbons S, Giana A, Pagani A, Grassi G, Stavri M, et.al. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. *J Nat Prod* 2008; 71: 1427-30.
41. Kaur S, Sharma C, Chaudhry S, Aman R. Antimicrobial potential of three common weeds of kurukshetra: an *in vitro* study. *Res J Microbiol* 2015; 10(6): 280-7.
42. Ríos JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 2005; 100: 80-4.
43. Anil SM, Peeri H, Kolti H. Medical cannabis activity against inflammation: active compounds and modes of action. *Front Pharmacol*. [online]. 2022; [cited 2022 Nov 8]; [9 screens]. Available from: URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.908198/pdf>.
44. Bolognini D, Costa B, Maione S, Comelli F, Marini P, Di Marzo V, et al. The plant cannabinoid Δ^9 -tetrahydrocannabivarin can decrease signs of inflammation and inflammatory pain in mice. *Br J Pharmacol*. [online]. 2010; [cited 2022 Nov 8]; [11 screens]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2931567/pdf/bph0160-0677.pdf>.
45. Romano B, Pagano E, Orlando P, Capasso R, Cassio MG, Pertwee R, et al. Pure Δ^9 -tetrahydrocannabivarin and a *Cannabis sativa* extract with high content in Δ^9 -tetrahydrocannabivarin inhibit nitrite production in murine peritoneal macrophages. *Pharmacol Res* 2016; 113: 199-208.

Anti-inflammatory Activity on Skin Cells, Antibacterial and Antifungal Activities of Methanolic Thai Hemp Leaves Extracts

Prapatsorn Tipparat¹, Prachya Kongtawelert², Natthachai Duangnil¹, Sarinya Julsrigivan¹, Patcharin Juntranimit¹, and Sarita Pinmanee³

¹Regional Medical Sciences Center 1 Chiang Mai, Department of Medical Sciences, Chiang Mai, 50180

²Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200

³Highland Research and Development Institute (Public Organization), Chiang Mai, 50200

ABSTRACT Since The Thai government has a policy for promoting hemp (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*) as an economic crop for fiber. Therefore, the utilizing feasibility of hemp leaves, a by-product of post-harvest hemp fiber production, would be considered in order to create added value to the business. The purpose of this research was to investigate the pharmacological effects of leaves extracts of four cultivars of Thai hemp, RPF1–4, including antioxidant, antibacterial, antifungal, and anti-inflammatory activities. The results revealed that the cannabinoid fraction of RPF4 possessed the highest antioxidant activities presenting as Trolox equivalent antioxidant capacity in the range of 88.02–180.84 mg/g. The extracts from RPF3 and RPF4 cultivars had antimicrobial activities against gram-positive bacteria and fungi (*Candida albicans*), but had no inhibitory effect on gram-negative bacteria. The methanolic crude extracts of RPF3 and RPF4 cultivars had the highest activities against *Clostridium sporogenes* with the minimal inhibitory concentration (MIC) of 976.5 ng/mL. Concerning the anti-inflammatory activity of hemp leaves extracts, it was found that methanolic crude extracts and cannabinoid fraction of all cultivars could suppress nitric oxide (NO) production in the inflammatory process, significantly reduce the pro-inflammatory genes, including iNOS, COX2, and IL-1B, and lower MMP3 and COL2A1 gene expression. Of those, the RPF4 extract had cannabinoids in a rather high amount and tetrahydrocannabinol (THCV) that exerted the highest anti-inflammatory activity comparable to dexamethasone. The study results are beneficial for using hemp leaves from post-harvest fiber production as herbal products. However, in vivo studies of toxicity and efficacy of those pharmacological activities should be further performed.

Keywords: Anti-inflammatory, Antibacterial, Antifungal, Antioxidant, Thai hemp leaves extracts

การพัฒนาตัวอย่างทดสอบความชำนาญสำหรับ การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของกัญชา ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

ศิริพร ทองประกายแสง และ จำเริญ ดวงงามยิ่ง

สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ ตามที่กระทรวงสาธารณสุขออกกฎกระทรวงและประกาศกระทรวงเกี่ยวกับกัญชาและกัญชง 4 ฉบับ ในปี พ.ศ. 2564-2565 เพื่อให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ รวมทั้งนำส่วนต่างๆ ของพืชกัญชาและกัญชงมาใช้ประโยชน์ ในเชิงพาณิชย์ โดยควบคุมปริมาณสารที่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท คือ tetrahydrocannabinol (THC) ในผลิตภัณฑ์ สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้พัฒนาห้องปฏิบัติการบริการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ THC และ cannabidiol (CBD) ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ในปี พ.ศ. 2564 การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาห้องปฏิบัติการเครือข่ายทั้งภาครัฐและเอกชนที่ให้บริการตรวจวิเคราะห์ สาร THC และ CBD ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง จึงจัดให้มีโปรแกรมทดสอบความชำนาญ ซึ่งยังไม่มีผู้ให้บริการทดสอบ ความชำนาญ โดยพัฒนาการทดสอบความชำนาญของตัวอย่าง 2 ชนิด คือ ครีมที่มีความเข้มข้นของสาร THC ร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนัก และแซมพูที่มีความเข้มข้นของ CBD ร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนัก นำมาทดสอบคุณสมบัติความเป็นเนื้อเดียวกัน ความคงตัว และประเมินทางสถิติตามมาตรฐาน ISO 13528:2015 พบว่าตัวอย่างสูตรตำรับครีมที่ผสม THC มีความเป็นเนื้อ เดียวกัน ความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) ในสภาวะเร่งที่ 45 ± 2 องศาเซลเซียส รวมถึงสภาวะการขนส่งมี ความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการดำเนินกิจกรรมเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ พบว่าสูตรตำรับแซมพูผสม CBD มีปัญหาด้านความคงตัวจำเป็นต้องพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป เพื่อนำไปสู่การขอรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2022 และ ขยายขอบข่ายการให้บริการด้านการทดสอบความชำนาญของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คำสำคัญ: THC, CBD, เครื่องสำอาง, ทดสอบความชำนาญ, สารสกัดกัญชา

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

Received: 11 January 2023

Revised: 4 August 2023

Accepted: 11 August 2023

บทนำ

เครื่องสำอาง ตามพระราชบัญญัติเครื่องสำอาง พ.ศ. 2558 หมายถึง วัตถุที่มุ่งหมายสำหรับใช้ทา ถู นวด โรย พ่น หยอด ใส่ อบ หรือกระทำด้วยวิธีอื่นใดกับ ส่วนภายนอกของร่างกายมนุษย์และให้หมายรวมถึง การใช้กับฟันและเยื่อในช่องปาก โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อความสะอาด ความสวยงาม หรือเปลี่ยนแปลงลักษณะ ที่ปรากฏ หรือระงับกลิ่นกาย หรือปกป้องดูแลส่วนต่าง ๆ ให้อยู่ในสภาพดี รวมทั้งเครื่องประพินผิวต่าง ๆ แต่ไม่รวม เครื่องประดับและเครื่องแต่งตัว ซึ่งเป็นอุปกรณ์ ภายนอกร่างกาย⁽¹⁾ ปัจจุบันเครื่องสำอางเป็นปัจจัยที่ 5 ที่มีความสำคัญกับมนุษย์ทุกเพศทุกวัย ทำให้ธุรกิจ ด้านเครื่องสำอางระดับโลกเติบโตมาอย่างต่อเนื่อง คาดการณ์ว่าปี ค.ศ. 2021–2028 ธุรกิจนี้จะมีอัตราการเติบโตรายปีแบบผสม (compound annual growth rate, CAGR) ประมาณร้อยละ 8⁽²⁾

มนุษย์ใช้ประโยชน์จากกัญชาและกัญชงมา ตั้งแต่สมัยโบราณ ด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่ ก้าวหน้าทำให้ปัจจุบันมนุษย์สามารถนำสารสำคัญต่าง ๆ ในกัญชาและกัญชงมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง สารสำคัญ ดังกล่าว ได้แก่ แคนนาบินอยด์ (cannabinoids) ซึ่งมี 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีฤทธิ์ต่อจิตและประสาท (psychotropic substances) เช่น tetrahydrocannabinol (THC) ได้แก่ Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, และ THCA เป็นต้น และกลุ่มที่ไม่มีฤทธิ์ต่อจิตและประสาท (non psychotropic substances) เช่น cannabidiol (CBD) cannabigerolic acid (CBGA) cannabidiolic acid (CBDA) และ cannabinolic acid (CBNA) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบ flavonoids และ terpenoids โดย cannabinoids ที่พบมาก คือ Δ^9 -THC และ CBD⁽³⁾ รัฐบาลเล็งเห็นการใช้ประโยชน์ จากกัญชาและกัญชงทางการแพทย์และในอุตสาหกรรม อื่น ๆ จึงได้ออกประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อ ยาเสพติดให้โทษในประเภท 5⁽⁴⁾ ส่งผลให้ตั้งแต่วันที่ 9 มิถุนายน พ.ศ. 2565 กัญชาและกัญชงไม่ใช่ยาเสพติด ในกรณีสารสกัดที่มีปริมาณ THC เกินร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก และช่อดอกมีปริมาณ THC สูง จะถูกกำหนด

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข วันที่ 16 มิถุนายน พ.ศ. 2565 เรื่อง สมุนไพรควบคุม (กัญชา)⁽⁵⁾ ประเทศไทย มีผู้สนใจนำกัญชาและกัญชงมาเป็นส่วนผสมของ เครื่องสำอางจำนวนมาก โดยสารสำคัญที่นิยมนำมาใช้ ได้แก่ น้ำมันจากเมล็ดกัญชงมีคุณสมบัติเด่นในการรักษา สมดุลของสภาพผิว ช่วยลดริ้วรอย ชะลอความเสื่อมของ ผิว และ CBD เป็นสารที่ทำให้รู้สึกผ่อนคลายแต่ไม่มี ผลต่อจิตและประสาท มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ รักษาผิว แพ้ง่าย นอกจากนี้สารสกัดในรูปน้ำมัน CBD oil นิยม นำมาผสมร่วมกับ hemp seed oil หรือ coconut oil หรือผสมในครีมและแชมพู กระทรวงสาธารณสุขจึงได้ออกประกาศ เรื่อง การใช้ส่วนของกัญชงในเครื่องสำอาง⁽⁶⁾ และเรื่อง การใช้สารสกัดที่มีสารแคนนาบินอยด์ออกจากกัญชา และกัญชงในเครื่องสำอาง⁽⁷⁾ เพื่อความปลอดภัยของ ผู้บริโภค กล่าวคือ การใช้ประโยชน์จากน้ำมัน หรือ สารสกัดจากเมล็ดกัญชง หรือส่วนของใบ ราก กิ่ง และ ลำต้น การใช้สารสกัดที่มีสาร CBD ในผลิตภัณฑ์ เครื่องสำอางปนเปื้อนของสาร THC ได้ไม่เกินร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก และไม่เกินร้อยละ 0.001 โดยน้ำหนัก ใน เครื่องสำอางพร้อมใช้รูปแบบน้ำมันหรือ soft gelatin capsule ห้ามใช้กับผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในช่องปากและ ผลิตภัณฑ์ที่ใช้บริเวณจุดซ่อนเร้น โดยผู้ประกอบการ ที่ต้องการผลิตเครื่องสำอางผสมกัญชาและกัญชงต้อง ยื่นขอจดแจ้งกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ซึ่งในการขอจดแจ้งผู้ประกอบการจำเป็นต้องมีเอกสาร แสดงผลทดสอบปริมาณ THC ในวัตถุดิบหรือ ผลิตภัณฑ์ทำให้ห้องปฏิบัติการทดสอบมีบทบาทสำคัญ ในการสนับสนุนและส่งเสริมการผลิตเครื่องสำอาง ผู้ประกอบการภายในของประเทศ

สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านเครื่องสำอาง ของประเทศ ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 รายการทดสอบสาร Δ^9 -THC และ CBD โดยเครื่อง ultra-high performance liquid chromatograph (UPLC) ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ผสมกัญชาและกัญชง เมื่อวันที่ 11 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2565 เพื่อสนองนโยบายของรัฐบาลตระหนักถึงความสำคัญ

ของการพัฒนาขีดความสามารถของห้องปฏิบัติการ และการพัฒนาโครงสร้างพื้นฐานด้านคุณภาพของประเทศ (national quality infrastructure, NQI) ตลอดจนข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025:2017 ข้อ 7.7⁽⁸⁾ ซึ่งกำหนดให้ห้องปฏิบัติการต้องสร้างความมั่นใจ เรื่องความถูกต้องของผลการทดสอบ ซึ่งวิธีการที่นิยม คือ interlaboratory comparison และ/หรือ proficiency test ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีการพัฒนาตัวอย่างต้นแบบ เครื่องสำอางสำหรับทดสอบความชำนาญรายการทดสอบ THC และ CBD ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ได้แก่ ครีมผสม THC และแชมพูผสม CBD โดยดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของตัวอย่างที่เตรียมตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2010⁽⁹⁾ และประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว โดยใช้สถิติตามมาตรฐาน ISO 13528:2015⁽¹⁰⁾ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของการนำไปใช้ประโยชน์ในการขยายขอบข่ายของการให้บริการทดสอบความชำนาญของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) (Lipomed[®], AG, Switzerland) ความเข้มข้น 1.025 mg/mL เกรดวัสดุ อ้างอิง ค่าความไม่แน่นอน 0.40% (total uncertainty), cannabidiol (CBD) ความบริสุทธิ์ 99.85% ได้รับจาก สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

สารเคมีใช้สำหรับเตรียมตัวอย่างครีมและแชมพู

sodium polyacrylate, dicaprylyl ether, glycerine, mineral oil, sodium stearyl glutamate, sodium lauryl ether sulfate (28% surfactant), cocamidopropyl betaine, coco-glucoside (and) glyceryl oleate และ cocamide diethanolamine เกรดวัตถุดิบ โดยเป็นสารเคมีที่ซื้อจากร้านฮงฮวด กรุงเทพมหานคร

สารสำคัญในการเตรียมตัวอย่างทดสอบครีมและแชมพู

cannabis extracts (THC และ CBD extract) ได้รับความอนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา วิทยาเขตสมุทรสงคราม เตรียมจากส่วนช่อดอกกัญชาที่ได้จากการปลูก ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา วิทยาเขตสมุทรสงคราม นำมาทำความสะอาด ผึ่งลมให้แห้ง ก่อนนำมาสกัดด้วยเอทานอล ได้สารสกัดในรูปน้ำมันดิบ สีเหลืองทอง นำมาผ่านกระบวนการแยกไขด้วยเทคนิค winterization และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค molecular distillation แยก THC และ CBD โดยใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ด้วยเครื่อง Glass Wiped (Thin) Film (Molecular) Distillation System (Valuen[®], People's Republic of China) สารสกัดที่ได้เก็บในขวดแก้วสีชา ปิดฉลากระบุชื่อ และวันที่เตรียม เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเทคนิค HPLC

acetonitrile, methanol และ isopropanol (HPLC gradient grade, Thomas Baker, Mumbai, India), formic acid (AR grade, Darmstadt, Germany)

เครื่องมือและอุปกรณ์

ultra-high performance liquid chromatograph (UPLC) (WatersTM, Waters Corporation, United States) with Photodiode array detector (PDA), water purification (MilliporeTM, Merck Millipore, Germany), hotplate-Stirrer (IKATM, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Germany), vortex mixer (GenieTM, Scientific Industries, Inc., United States), incubator (MammertTM, Memmert GmbH & Co. KG, Germany), homogenizer (Huxi, Shanghai yanhe, People's Republic of China)

วิธีการ

การวิเคราะห์ปริมาณสาร THC และ CBD ในสารสกัด

นำcannabis extract (THC และ CBD extract) ผ่านกระบวนการ decarboxylation โดยละลายด้วย methanol 50 มิลลิลิตรใน evaporating dish ใช้แห้งแก้ว คนจนสารสกัดละลายหมด นำไปให้ความร้อนบน hot plate ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทั้งให้เย็นจะได้ของเหลวชั้นหนืดสีน้ำตาล โดยอนุพันธ์ของ THC extract และ CBD extract ที่ได้ กำหนดชื่อว่า cannabis extract A และ cannabis extract B ตามลำดับ จากนั้นทดสอบหาปริมาณ

Δ^9 -THC และ CBD ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ โดยวิธีทดสอบ ที่ได้รับการรับรอง ISO/IEC 17025:2017⁽¹¹⁾ สภาวะของ เครื่องมือที่ใช้ ได้แก่ คอลัมน์ชนิด (Kinetex[®] C18, 2.6 $\mu\text{m} \times 2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ หรือ Acquity[®] BEH C18, 1.7 μm λ_{max} 280 นาโนเมตร) ปริมาตรที่ฉีด 2 ไมโครลิตร อุณหภูมิคอลัมน์ 45 องศาเซลเซียส วัฏภาค เคลื่อนที่ (mobile phase) ใช้โปรแกรมปรับเปลี่ยน อัตราส่วนผสม (gradient program) ของอัตราส่วน A คือ 0.1% formic acid in deionized water และ อัตราส่วน B คือ 0.1% formic acid in acetonitrile ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Gradient program ของอัตราส่วนผสมของ A และ B

	Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B
1	Initial	0.45	40	60
2	9	0.45	15	85
3	10	0.45	40	60

การเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญสำหรับทดสอบ THC และ CBD ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

การเตรียมตัวอย่างครีมสำหรับทดสอบหาปริมาณ THC ตามสูตร 3 กิโลกรัม คำนวณส่วนผสมตามสัดส่วน ร้อยละ ดังแสดงในตารางที่ 2 การผสมส่วนที่เป็น oil based คือ A1, A2 และ A3 ให้เป็นเนื้อเดียวกันได้เป็นส่วนผสม A จากนั้นละลายสารสกัด B2 ด้วย B1 จนหมด ได้เป็นส่วนผสม B แล้วนำไปผสมกับส่วนผสม A กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน ได้เป็นส่วนผสม AB เตรียมส่วนผสม C โดยผสม C1 และ C2 เข้าด้วยกัน จากนั้นนำส่วนผสม AB และ C ผสมรวมกันและกวนให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย homogenizer จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นครีมสีขาว แบ่งบรรจุในตลับแก้ว ฝาเกลียว

พลาสติก ปริมาตร 30 กรัม จำนวน 80 ตลับ ติดฉลาก และหมายเลขกำกับว่า cream sample 1-80

เตรียมตัวอย่างแชมพูสำหรับทดสอบ CBD ตามสูตร 3 กิโลกรัม คำนวณส่วนผสมตามสัดส่วนร้อยละ ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยค่อยๆ ละลายสารสกัด cannabis extract B ในส่วนประกอบที่ 2, 3 และ 4 กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน ค่อยๆ เติมส่วนประกอบที่ 1 และ 7 ปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง homogenizer ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นสารละลายหนืด สี ไม่มีสี ค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ระหว่างช่วง 6-7 แบ่งบรรจุในขวดพลาสติก ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จำนวน 80 ขวด ติดฉลากและหมายเลขกำกับว่า shampoo sample 1-80

ตารางที่ 2 สูตร cannabis PT cream

	ส่วนประกอบ	ร้อยละโดยน้ำหนัก
A1	sodium polyacrylate	1.20
A2	dicaprylyl ether	3.00
A3	glycerine	4.00
B1	mineral oil	4.00
B2	cannabis extract A	0.05
C1	sodium stearyl glutamate	0.20
C2	water	87.55
	รวม	100.00

ตารางที่ 3 สูตร cannabis PT shampoo

	ส่วนประกอบ	ร้อยละโดยน้ำหนัก
1	sodium lauryl ether sulfate 28% surfactant	33.33
2	cocamidopropyl betaine	5.00
3	coco-glucoside (and) glyceryl oleate	5.00
4	cocamide diethanolamine	3.33
5	cannabis extract B	0.10
6	water	53.24
	รวม	100.00

การศึกษาความใช้ได้ของตัวอย่างทดสอบ (validation of sample for proficiency test)

การทดสอบคุณสมบัติความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity testing) ตามมาตรฐาน ISO 13528:2015⁽¹⁰⁾

สุ่มตัวอย่างครีมและแชมพูที่เตรียมแบบสุ่มอิสระ (random sampling) โดยใช้คำสั่ง RANBETWEEN ในโปรแกรม Excel ชนิดละ 10 ตัวอย่าง นำมาทดสอบหาปริมาณสาร THC ในครีม และ CBD ในแชมพู

นำผลวิเคราะห์ของตัวอย่างทดสอบ จำนวน 10 ตัวอย่าง ๆ ละ 2 ขั้ว ทดสอบความเบี่ยงเบนภายในตัวอย่าง (within-sample standard deviation) โดยใช้

Cochran's test คำนวณและเปรียบเทียบค่าที่ได้กับ Cochran critical value ที่ 95% CI หากค่าที่ได้จากการคำนวณน้อยกว่า แสดงว่าไม่มีความแตกต่างภายในตัวอย่างทดสอบ จากนั้นทดสอบความเบี่ยงเบนระหว่างตัวอย่าง (between-sample standard deviation, s_s) โดยเปรียบเทียบค่าความเบี่ยงเบนของการประเมินการทดสอบความชำนาญ (σ_{pt}) ถ้า $s_s \leq 0.3 \sigma_{pt}$ แสดงว่าตัวอย่างทดสอบมีความเป็นเนื้อเดียวกัน (adequately homogeneous)

วิธีทดสอบความเบี่ยงเบนภายในตัวอย่าง (within-sample variation) โดยใช้ Cochran's test คำนวณค่า C_{cal} ดังนี้

$$C_{cal} = \frac{D^2_{max}}{\sum D_i^2}$$

เมื่อ

$$D_i = \text{ค่าแตกต่างของค่าซ้ำ คู่ที่ } i = 1, 2, 3 \dots, 10$$

$$D_{max} = \text{ค่าแตกต่างของค่าซ้ำ คู่ที่มีค่าสูงสุด}$$

วิธีทดสอบความเบี่ยงเบนระหว่างตัวอย่าง (between-sample standard deviation, s_s) โดยใช้สูตร

$$s_s = \sqrt{S_x^2 - \left(\frac{S_w^2}{2}\right)}$$

เมื่อ

$$S_x = \text{standard deviation of sample average}$$

$$S_w = \text{within-sample standard deviation}$$

การคำนวณค่าความเบี่ยงเบนของการประเมินการทดสอบความชำนาญ (σ_{pt}) ได้จากการคำนวณจากสมการ Horwitz equation⁽¹²⁾ ดังนี้

$$RSDp = 2^{(1-0.5\log C)} = 2C^{-0.1505}$$

$$C = \text{fractional concentration}$$

การประเมินผลความคงตัวของตัวอย่างทดสอบ (stability testing)⁽¹⁰⁾

สุ่มตัวอย่างครีมและแชมพูที่เตรียมแบบสุ่มอิสระ (random sampling) โดยใช้คำสั่ง RANBETWEEN ในโปรแกรม Excel เพื่อทดสอบความคงตัว 3 สภาวะ ดังนี้

สภาวะอุณหภูมิห้อง (27–30 องศาเซลเซียส) รวมระยะเวลา 60 วัน โดยนำตัวอย่างครีมและแชมพูที่สุ่มไว้อย่างละ 12 ตัวอย่าง เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง สุ่มทดสอบครั้งละ 2 ตัวอย่าง ดำเนินการทดสอบทุก 10 วัน รวม 6 ครั้ง

สภาวะอุณหภูมิเร่ง (45±2 องศาเซลเซียส)⁽¹³⁾ รวมระยะเวลา 50 วัน นำตัวอย่างครีมและแชมพูที่สุ่มไว้อย่างละ 10 ตัวอย่าง ใส่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

สุ่มทดสอบครั้งละ 2 ตัวอย่าง ดำเนินการทดสอบทุก 10 วัน รวม 5 ครั้ง

สภาวะของการขนส่ง นำตัวอย่างครีมและแชมพูที่สุ่มไว้อย่างละ 8 ตัวอย่าง ส่งไปรษณีย์ไปจังหวัดตัวแทน 4 ภาค ได้แก่ ภาคใต้ (ภูเก็ต) ภาคตะวันออก (ฉะเชิงเทรา) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (อุบลราชธานี) และภาคเหนือ (เชียงใหม่) จังหวัดละ 2 ตัวอย่างต่อชนิด รวมเป็น 4 ตัวอย่างต่อจังหวัด เมื่อตัวแทนแต่ละจังหวัดได้รับตัวอย่างแล้วให้ส่งกลับทางไปรษณีย์เพื่อทำการทดสอบ

นำผลการทดสอบมาหาค่าเฉลี่ยและเปรียบเทียบกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบความชำนาญ โดยใช้เกณฑ์การยอมรับ (ISO 13528)⁽¹⁰⁾ ดังนี้

$$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| \leq 0.3\sigma_{pt}$$

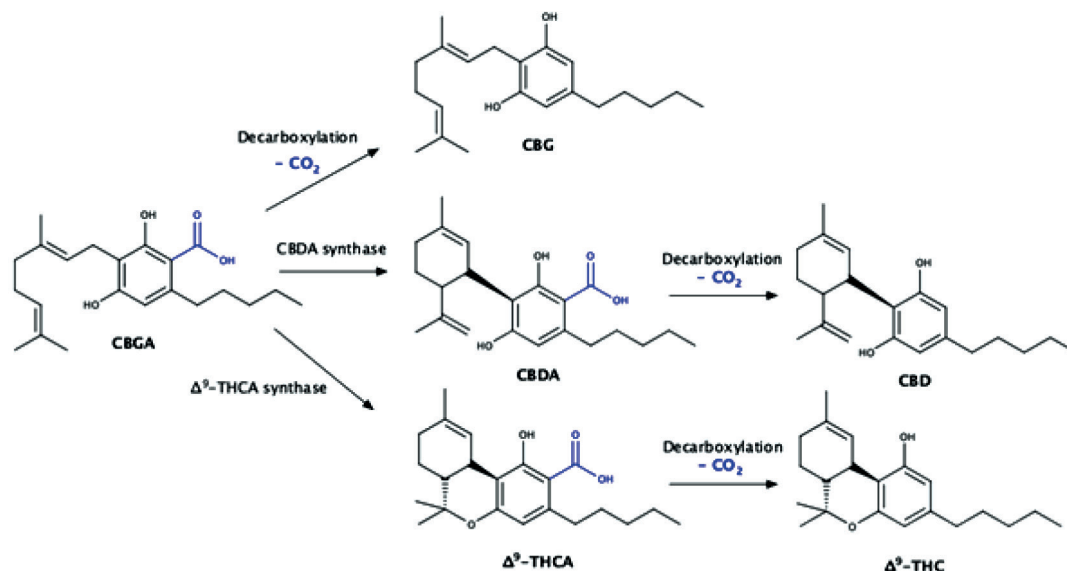
$\bar{y}_1$ = ค่าเฉลี่ยของปริมาณสารที่วิเคราะห์เมื่อทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ($\bar{y}_{\text{homo}}$)

$\bar{y}_2$ = ค่าเฉลี่ยของปริมาณสารที่วิเคราะห์แต่ละสภาวะ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง หรืออุณหภูมิเร่งทุก 10 วัน หรือการขนส่งในแต่ละภาค 4 แห่ง

σ_{pt} = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบความชำนาญ ได้จากการคำนวณจากสมการ Horwitz equation

ผล

กระบวนการ decarboxylation เป็นการให้ความร้อนแก่สารสกัดกัญชาและกัญชง (cannabis extracts) เพื่อเปลี่ยนรูปของ Δ^9 -THCA หรือ CBDA ให้อยู่ในรูป Δ^9 -THC และ CBD ตามลำดับ โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยา ดังแสดงในภาพที่ 1 จากผลการวิเคราะห์สารสกัดด้วย UPLC พบว่า cannabis extract A พบ THC สูงร้อยละ 83.27 โดยน้ำหนัก และตรวจพบ CBD เล็กน้อย ส่วน cannabis extract B พบ CBD ร้อยละ 30.51 โดยน้ำหนัก และพบ THC ร้อยละ 4.16 โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 4 จากโครมาโทแกรมบ่งชี้ว่า cannabis extract B มีสารชนิดอื่นผสมอยู่ในปริมาณสูง ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 1 กระบวนการ decarboxylation of CBGA, CBDA และ THCA⁽¹⁴⁾

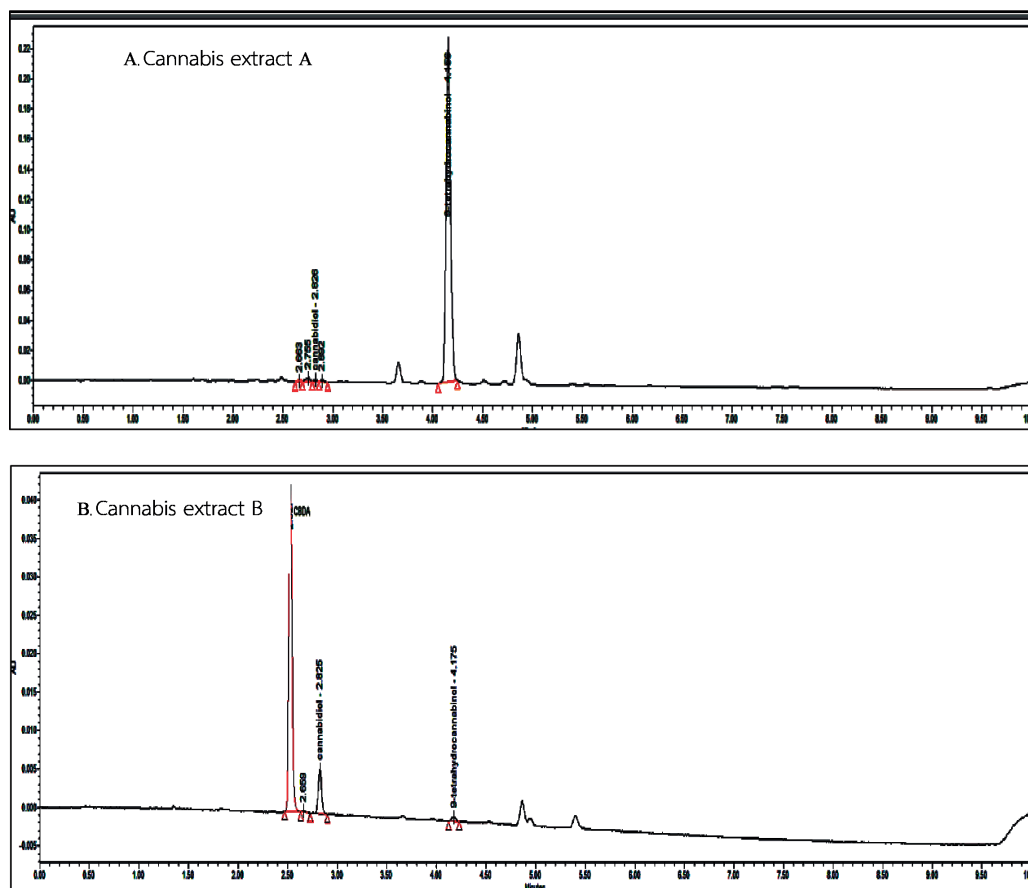
ตารางที่ 4 การวิเคราะห์สารสกัด cannabis extract A และ cannabis extract B

ครั้งที่	cannabis extract A		cannabis extract B	
	THC, %w/w	CBD, %w/w	THC, %w/w	CBD, %w/w
1	83.25	nd	4.18	30.48
2	83.26	nd	4.17	30.52
3	83.28	nd	4.16	30.53
4	83.31	nd	4.15	30.50
5	83.23	nd	4.15	30.54
mean	83.27	-	4.16	30.51
%RSD	2.75	-	1.11	2.03

หมายเหตุ: nd = not detected

การศึกษาค่าความใช้ได้ของความเป็นเนื้อเดียวกันในตัวอย่าง โดยตัวอย่างครีมพิจารณาจากปริมาณ THC และตัวอย่างแอมพูลพิจารณาจากปริมาณ CBD พบว่าทั้ง 2 ตัวอย่าง มีค่าความเป็นเนื้อเดียวกันผ่านเกณฑ์ที่ยอมรับ กล่าวคือ ค่า Cochran's test ของตัวอย่างครีมและแอมพูลเท่ากับ 0.400 และ 0.167 ตามลำดับ มีค่าน้อยกว่า Cochran critical value, 95% CI (0.602) และ

ค่า s_s ของตัวอย่างครีมและแอมพูลเท่ากับ 0.0001 และ 0.000034 ตามลำดับ และมีค่าน้อยกว่า $0.3 \sigma_{pt}$ (0.0009 และ 0.00028 ตามลำดับ) ซึ่งแสดงว่าทั้งตัวอย่างครีมและแอมพูลตัวที่เตรียมมีความเป็นเนื้อเดียวกันเพียงพอ (adequately homogeneous) สามารถใช้เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญได้ ดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารสกัดกัญชาที่ผ่านกระบวนการ decarboxylation ด้วยวิธี UPLC

A. cannabis extract A (retention time ของ CBD ที่ 2.826 นาที และ THC ที่ 4.166 นาที)

B. cannabis extract B (retention time ของ CBD ที่ 2.825 นาที และ THC ที่ 4.175 นาที)

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ปริมาณ Δ^9 -THC ของตัวอย่างสูตรตำรับ cannabis PT cream จำนวน 10 ตัวอย่าง ๆ ละ 2 ซ้ำ และการคำนวณทางสถิติ

ลำดับที่	ตัวอย่าง	ความเข้มข้น THC, %w/w		Mean	%RPD
		A	B		
1	cream sample 09	0.0477	0.0478	0.0478	0.2092
2	cream sample 19	0.0475	0.0476	0.0476	0.2101
3	cream sample 06	0.0475	0.0475	0.0475	0.0000
4	cream sample 12	0.0475	0.0475	0.0475	0.0000
5	cream sample 03	0.0475	0.0477	0.0476	0.4202
6	cream sample 07	0.0477	0.0476	0.0477	0.2096
7	cream sample 10	0.0476	0.0475	0.0476	0.2101
8	cream sample 08	0.0476	0.0476	0.0476	0.0000
9	cream sample 11	0.0476	0.0477	0.0477	0.2096
10	cream sample 45	0.0477	0.0478	0.0478	0.2092

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ปริมาณ Δ^9 -THC ของตัวอย่างสูตรตำรับ cannabis PT cream จำนวน 10 ตัวอย่าง ๗ ละ 2 ซ้ำ และการคำนวณทางสถิติ (ต่อ)

SD	0.0001
%RSD	0.2145
general average of sample mean, %w/w	0.0476
Cochran's test	0.400
Cochran critical value, 95% CI	0.602
standard deviation of sample averages (s_x)	0.0001
within-samples standard deviation (s_w)	0.0001
between-samples standard deviation (s_s)	0.0001
σ_{pt}	0.0031
$0.3\sigma_{pt}$	0.0009

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์ปริมาณ CBD ของตัวอย่างสูตรตำรับ cannabis PT shampoo จำนวน 10 ตัวอย่าง ๗ ละ 2 ซ้ำ และการคำนวณทางสถิติ

ลำดับที่	ตัวอย่าง	ความเข้มข้น THC, %w/w		Mean	%RPD
		A	B		
1	shampoo sample 22	0.0122	0.0123	0.0123	0.8130
2	shampoo sample 15	0.0122	0.0121	0.0122	0.8197
3	shampoo sample 19	0.0121	0.0121	0.0121	0.0000
4	shampoo sample 48	0.0122	0.0122	0.0122	0.0000
5	shampoo sample 04	0.0122	0.0121	0.0122	0.8197
6	shampoo sample 30	0.0122	0.0123	0.0123	0.8130
7	shampoo sample 11	0.0121	0.0122	0.0122	0.8197
8	shampoo sample 06	0.0122	0.0122	0.0122	0.0000
9	shampoo sample 09	0.0123	0.0122	0.0123	0.8130
10	shampoo sample 01	0.0122	0.0122	0.0122	0.0000

SD	0.0001
%RSD	0.5252
general average of sample mean, %w/w	0.0122
Cochran's test	0.167
Cochran critical value, 95% CI	0.602
standard deviation of sample averages (s_x)	0.000052
within-samples standard deviation (s_w)	0.000055
between-samples standard deviation (s_s)	0.000034
σ_{pt}	0.00095
$0.3\sigma_{pt}$	0.00028

ความคงตัวของตัวอย่างครีมและแซมพูพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของปริมาณ THC หรือ CBD ที่เปลี่ยนแปลงน้อยกว่าหรือเท่ากับ $0.3\sigma_{pt}$ ในสภาวะต่างๆ ที่กำหนด 3 สภาวะ คือ อุณหภูมิห้อง (27–30 องศาเซลเซียส) สภาวะเร่ง (45±2 องศาเซลเซียส) และการขนส่งตัวอย่างไปกลับในแต่ละภาค โดยเริ่มนับวันที่ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันเป็นวันแรกหรือ day 0 (เริ่มทดสอบในวันที่ 29 มกราคม พ.ศ. 2565) พบว่าส่วนของตัวอย่างครีมมีความคงตัวของ THC ทั้ง 3 สภาวะกล่าวคือ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 วัน ที่สภาวะเร่งเป็นเวลา 50 วัน และสภาวะขนส่งตัวอย่างไปจังหวัดตัวแทน 4 แห่ง ดังแสดงในตารางที่ 7–9

สำหรับตัวอย่างแซมพูได้ทดสอบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ CBD ใน 3 สภาวะ ตามที่กล่าวข้างต้น (เริ่มการทดสอบในวันที่ 31 มกราคม พ.ศ. 2565) พบว่ามีความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง 30 วัน และไม่มีความคงตัวทั้งในสภาวะเร่งตั้งแต่ 10 วันแรก ที่ทำการทดสอบ (day 10) และการขนส่งตัวอย่างไปจังหวัดตัวแทน 4 แห่ง ดังแสดงในตารางที่ 10–12 เมื่อนำข้อมูลความคงตัวของ CBD ที่สภาวะอุณหภูมิห้องและสภาวะเร่งมาสร้างกราฟ เพื่อดูแนวโน้มของปริมาณสาร CBD ที่เปลี่ยนแปลงไป พบความแตกต่างของปริมาณสาร CBD ของ 2 สภาวะ ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 3

ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ปริมาณ THC และการประเมินทางสถิติของตัวอย่างทดสอบสูตรตำรับครีมในสภาวะอุณหภูมิห้อง (27–30 องศาเซลเซียส) โดยวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบทุก 10 วัน จำนวน 6 ครั้ง รวม 60 วัน

วันที่ทดสอบ วัน/เดือน/ปี	Cannabis Cream Sample No.	A (%w/w)	B (%w/w)	Mean, $\bar{y}_1$ (%w/w)	Mean, $\bar{y}_2$ (%w/w)	$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 $	ผลการประเมิน
29/01/2565 (day 0)				0.0476			
10/02/2565 (day 10)	33	0.0474	0.0473		0.0475	0.0001	ผ่าน
	51	0.0476	0.0477				
20/02/2565 (day 20)	64	0.0474	0.0476		0.0476	0.0000	ผ่าน
	59	0.0476	0.0477				
03/03/2565 (day 30)	28	0.0477	0.0478		0.0476	0.0000	ผ่าน
	34	0.0474	0.0476				
12/03/2565 (day 40)	33	0.0476	0.0476		0.0476	0.0000	ผ่าน
	39	0.0475	0.0475				
22/03/2565 (day 50)	38	0.0475	0.0477		0.0476	0.0000	ผ่าน
	04	0.0476	0.0476				
04/04/2565 (day 60)	01	0.0475	0.0474		0.0475	0.0001	ผ่าน
	56	0.0474	0.0475				

ตารางที่ 8 การวิเคราะห์ปริมาณ THC และการประเมินทางสถิติของตัวอย่างทดสอบสูตรตำรับครีมในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส โดยวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบทุก 10 วัน จำนวน 5 ครั้ง รวม 50 วัน

วันที่ทดสอบ วัน/เดือน/ปี	Cannabis Cream Sample No.	A (%w/w)	B (%w/w)	Mean, $\bar{y}_1$ (%w/w)	Mean, $\bar{y}_2$ (%w/w)	$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 $	ผลการประเมิน
29/01/2565 (day 0)				0.0476			
10/02/2565 (day 10)	42	0.0476	0.0477		0.0475	0.0001	ผ่าน
	52	0.0474	0.0474				
20/02/2565 (day 20)	44	0.0474	0.0475		0.0476	0.0000	ผ่าน
	49	0.0477	0.0478				
03/03/2565 (day 30)	40	0.0477	0.0475		0.0476	0.0000	ผ่าน
	13	0.0478	0.0475				
12/03/2565 (day 40)	43	0.0475	0.0477		0.0476	0.0000	ผ่าน
	53	0.0476	0.0475				
22/03/2565 (day 50)	46	0.0476	0.0477		0.0476	0.0000	ผ่าน
	48	0.0476	0.0476				

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ปริมาณ THC และการประเมินทางสถิติของตัวอย่างทดสอบสูตรตำรับครีมที่มีการขนส่งทางไปรษณีย์จากจังหวัดนนทบุรีไป-กลับ 4 จังหวัด ตัวแทนของภาคใต้ (ภูเก็ต) ภาคตะวันออก (ฉะเชิงเทรา) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (อุบลราชธานี) และภาคเหนือ (เชียงใหม่)

จังหวัด (วันที่ทดสอบ)	Cannabis Cream Sample No.	A (%w/w)	B (%w/w)	Mean, $\bar{y}_1$ (%w/w)	Mean, $\bar{y}_2$ (%w/w)	$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 $	ผลการประเมิน
29/01/2565 (day 0)				0.0476			
ภูเก็ต (10/02/2565)	60	0.0475	0.0475		0.0475	0.0001	ผ่าน
	75	0.0475	0.0476				
ฉะเชิงเทรา (10/02/2565)	63	0.0476	0.0475		0.0476	0.0001	ผ่าน
	67	0.0476	0.0475				
อุบลราชธานี (20/02/2565)	64	0.0474	0.0476		0.0476	0.0000	ผ่าน
	59	0.0476	0.0477				
เชียงใหม่ (20/02/2565)	54	0.0475	0.0474		0.0475	0.0001	ผ่าน
	58	0.0475	0.0476				

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ปริมาณ CBD และการประเมินทางสถิติของตัวอย่างทดสอบสูตรตำรับแชมพูในสถานะอุณหภูมิห้อง (27–30 องศาเซลเซียส) โดยวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบทุก 10 วัน จำนวน 6 ครั้ง รวม 60 วัน

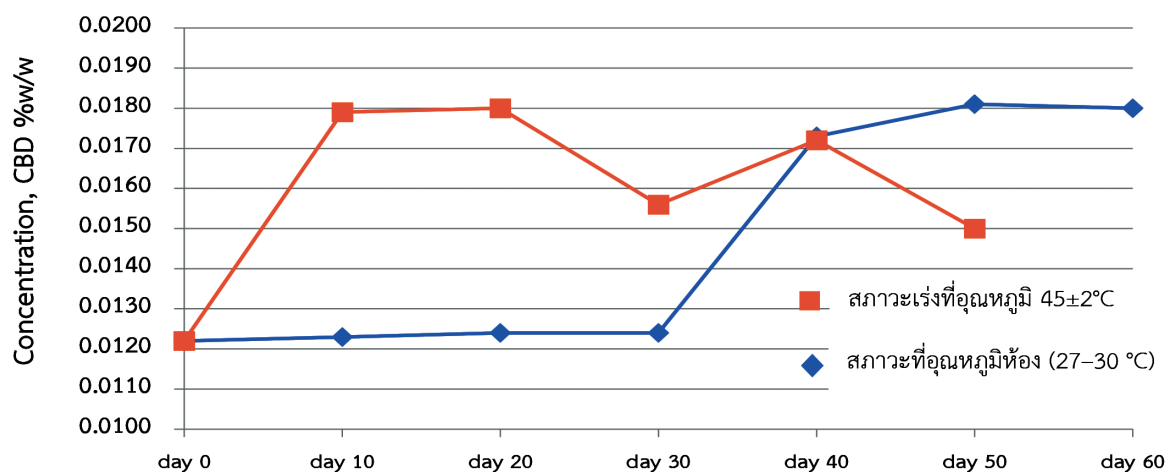
วันที่ทดสอบ วัน/เดือน/ปี	Cannabis Cream Sample No.	A (%w/w)	B (%w/w)	Mean, $\bar{y}_1$ (%w/w)	Mean, $\bar{y}_2$ (%w/w)	$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 $	ผลการประเมิน
31/01/2565 (day 0)				0.0122			
10/02/2565 (day 10)	37	0.0122	0.0123		0.0123	0.0001	ผ่าน
	39	0.0123	0.0122				
20/02/2565 (day 20)	40	0.0123	0.0124		0.0124	0.0002	ผ่าน
	03	0.0124	0.0124				
03/03/2565 (day 30)	35	0.0124	0.0124		0.0124	0.0002	ผ่าน
	31	0.0122	0.0124				
12/03/2565 (day 40)	67	0.0173	0.0172		0.0173	0.0051	ไม่ผ่าน
	34	0.0173	0.0172				
22/03/2565 (day 50)	32	0.0181	0.0180		0.0181	0.0059	ไม่ผ่าน
	36	0.0181	0.0181				
04/04/2565 (day 60)	66	0.0179	0.0179		0.0180	0.0058	ไม่ผ่าน
	21	0.0181	0.0180				

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ปริมาณ CBD และการประเมินทางสถิติของตัวอย่างทดสอบสูตรตำรับแชมพูในสถานะเร่งที่อุณหภูมิ 45±2 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 50 วัน

วันที่ทดสอบ วัน/เดือน/ปี	Cannabis Cream Sample No.	A (%w/w)	B (%w/w)	Mean, $\bar{y}_1$ (%w/w)	Mean, $\bar{y}_2$ (%w/w)	$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 $	ผลการประเมิน
31/01/2565 (day 0)				0.0122			
10/02/2565 (day 10)	57	0.0179	0.0179		0.0179	0.0057	ไม่ผ่าน
	55	0.0179	0.0180				
20/02/2565 (day 20)	16	0.0180	0.0180		0.0180	0.0058	ไม่ผ่าน
	50	0.0180	0.0179				
03/03/2565 (day 30)	60	0.0155	0.0156		0.0156	0.0034	ไม่ผ่าน
	43	0.0157	0.0155				
12/03/2565 (day 40)	47	0.0172	0.0172		0.0172	0.0050	ไม่ผ่าน
	53	0.0172	0.0173				
22/03/2565 (day 50)	54	0.0149	0.0150		0.0150	0.0028	ไม่ผ่าน
	63	0.0151	0.0149				

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ปริมาณ CBD และการประเมินทางสถิติของตัวอย่างทดสอบสูตรตำรับแชมพูที่มีการขนส่งทางไปรษณีย์จากจังหวัดนนทบุรีไป-กลับ 4 จังหวัด ตัวแทนของภาคใต้ (ภูเก็ต) ภาคตะวันออก (ฉะเชิงเทรา) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (อุบลราชธานี) และภาคเหนือ (เชียงใหม่)

จังหวัด (วันที่ทดสอบ)	Cannabis Cream Sample No.	A (%w/w)	B (%w/w)	Mean, $\bar{y}_1$ (%w/w)	Mean, $\bar{y}_2$ (%w/w)	$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 $	ผลการประเมิน
31/01/2565 (day 0)				0.0122			
ภูเก็ต (10/2/2565)	77 65	0.0180 0.0180	0.0181 0.0181		0.0181	0.0059	ไม่ผ่าน
ฉะเชิงเทรา (10/2/2565)	78 72	0.0179 0.0181	0.0181 0.0182		0.0181	0.0059	ไม่ผ่าน
อุบลราชธานี (20/2/2565)	73 64	0.0179 0.0182	0.0179 0.0181		0.0180	0.0058	ไม่ผ่าน
เชียงใหม่ (20/2/2565)	69 70	0.0182 0.0181	0.0181 0.0181		0.0181	0.0059	ไม่ผ่าน



ภาพที่ 3 การศึกษาความคงตัวสาร CBD ในตัวอย่างแชมพูที่สภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 45±2 องศาเซลเซียส และสภาวะที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) ระยะเวลา 50 และ 60 วัน ตามลำดับ

วิจารณ์

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ตัวอย่างทดสอบความชำนาญสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร $\Delta 9$ -THC และ CBD ในเครื่องสำอางผสมกัญชงและกัญชา ในการเตรียมสูตรตำรับพิจารณาเลือกสูตรตำรับครีมและแซมพู เพื่อเป็นตัวแทนสูตรประเภท oil based และ water based ของเครื่องสำอางผสมกัญชงและกัญชาที่มีการผลิตและจำหน่ายในท้องตลาด โดยใช้สูตรตำรับตั้งต้นจากร้านจำหน่ายวัตถุดิบ ลดทอนส่วนของน้ำ และไม่เติมสารกันเสียหรือน้ำหอม สำหรับอัตราส่วนผสมของสารสกัด cannabis extract A และ cannabis extract B ที่เตรียมได้จากอนุพันธ์ของ THC extract และ CBD extract ด้วยวิธี decarboxylation ที่ร้อยละ 0.05 และ 0.1 โดยน้ำหนัก เนื่องจากปริมาณสารสำคัญของ CBD ใน cannabis extract B มีเพียง 30.51 %w/w จึงต้องใช้สัดส่วนของ cannabis extract B สูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ cannabis extract A ที่มีปริมาณ THC สูงถึง 83.27 %w/w ทั้งนี้เพื่อให้มีปริมาณ $\Delta 9$ -THC และ CBD ในครีมหรือแซมพูอยู่ระหว่างความเข้มข้น 0.01–0.05 %w/w ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่ตรวจพบในตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ ในระหว่างปี พ.ศ. 2565–2566

เนื่องจากมีข้อจำกัดเรื่องสารมาตรฐานที่มีเพียง $\Delta 9$ -THC และ CBD เท่านั้น และข้อจำกัดเรื่องสารสกัดกัญชาและกัญชงที่ทราบปริมาณและชนิด THC และ CBD ที่แน่นอนในการเตรียมตัวอย่างครีมและแซมพูจึงใช้สารสกัดจากกัญชา คือ cannabis extract A และ cannabis extract B ที่ได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา วิทยาเขตสมุทรสงคราม ซึ่งเป็นสถานที่ผลิตที่ผ่านการตรวจประเมินจากกระทรวงสาธารณสุข สารสกัดมีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองทอง โดยผ่านกระบวนการ decarboxylation เพื่อเปลี่ยน THCA ให้เป็น $\Delta 9$ -THC และเปลี่ยน cannabigerolic acid (CBGA) cannabidiolic acid (CBDA) cannabinolic acid (CBNA) ให้เป็น CBD ก่อนนำมาใช้งาน ดังแสดงในภาพที่ 1 จากนั้นนำมาทดสอบหาปริมาณ $\Delta 9$ -THC และ CBD ซึ่งพบว่า cannabis extract A พบ $\Delta 9$ -THC สูงร้อยละ 83.27 โดยน้ำหนัก

และพบ CBD ปริมาณน้อยมาก ส่วน cannabis extract B พบ CBD ร้อยละ 30.51 และพบ $\Delta 9$ -THC ร้อยละ 4.16 โดยน้ำหนัก และมีข้อสังเกตว่า cannabis extract B ยังพบ CBDA และสารอื่นๆ ที่ไม่ทราบชนิดผสมอยู่ ซึ่งอาจเกิดจากกระบวนการ decarboxylation ไม่สมบูรณ์ อาจเนื่องมาจากปัจจัยเรื่องอุณหภูมิที่ใช้และระยะเวลาในการให้ความร้อนยังไม่เหมาะสม เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของ Fućak T และคณะ⁽¹⁵⁾ พบว่าสภาวะที่ทำให้เกิดกระบวนการ decarboxylation ของ CBDA เป็น CBD ที่สมบูรณ์ คือ ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในขั้นตอนนี้ควรมีการควบคุมเพื่อให้ได้สารสกัดที่มี CBDA เหลือน้อยที่สุดและไม่ส่งผลต่อความคงตัวของ CBD ในตัวอย่างทดสอบต่อไป ซึ่งโครมาโทแกรมของ cannabis extract A และ cannabis extract B ดังแสดงในภาพที่ 2

การออกแบบการศึกษาและเกณฑ์การประเมินตัวอย่างทดสอบที่เตรียมใช้มาตรฐาน ISO/IEC 17043 และ ISO 13528 คุณสมบัติที่สำคัญของตัวอย่างทดสอบความชำนาญ 2 ประการ คือ ความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของตัวอย่างทดสอบ โดยพิจารณาจากปริมาณสาร $\Delta 9$ -THC และ CBD ที่วิเคราะห์ได้จากห้องปฏิบัติการ พบว่าตัวอย่างทดสอบครีมและแซมพูที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเป็นเนื้อเดียวกันเพียงพอ จากผลการประเมินทางสถิติค่าความเบี่ยงเบนภายในตัวอย่างผ่านเกณฑ์ของ Cochran's test และค่าความเบี่ยงเบนระหว่างตัวอย่างมีค่าน้อยกว่า $0.3 \sigma_{pt}$ ที่คำนวณมาจาก Horwitz equation

ในการทดสอบความใช้ได้และความเหมาะสมของตัวอย่างครีมและแซมพูที่ผสมสารสกัดกัญชาสำหรับใช้เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญ โดยพิจารณาจากค่าความเป็นเนื้อเดียวกันและค่าความคงตัวของตัวอย่างตามเกณฑ์ทางสถิติ ISO 13528⁽⁹⁾ พบว่าตัวอย่างครีมที่ผสม cannabis extract A มีความเหมาะสมใช้เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญสำหรับทดสอบ $\Delta 9$ -THC ได้อย่างน้อย 50 วัน แม้ในสภาวะเร่งที่ 45 ± 2 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิห้อง (27–30 องศาเซลเซียส) นาน 60 วัน ซึ่งระยะเวลาเพียงพอสำหรับรอบของการดำเนินการทดสอบความชำนาญ ตั้งแต่การเตรียม

ตัวอย่างจนถึงสมาชิกห้องปฏิบัติการดำเนินการทดสอบ และรายงานผลการทดสอบ ซึ่งใช้เวลา 50 วัน ขณะที่ตัวอย่างแซมพูที่ผสมสารสกัด cannabis extract B สำหรับทดสอบ CBD มีความเป็นเนื้อเดียวกัน ผ่านเกณฑ์ แต่มีความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง 30 วัน หลังจากการเตรียม และไม่ผ่านเกณฑ์ที่อุณหภูมิแรงตั้งแต่ครั้งแรก ที่ทดสอบ คือ หลังจากเก็บไว้ 10 วัน และตัวอย่างแซมพูที่ขนส่งทางไปรษณีย์ไป-กลับทั้ง 4 ภาค นำมาทดสอบ 2 รอบ คือ ที่ 10 และ 20 วัน หลังการเตรียม ไม่ผ่านเกณฑ์ทั้ง 4 แห่ง การศึกษาเรื่องความคงตัว ที่สภาวะอุณหภูมิห้องและสภาวะแรงตามวิธีการที่กล่าวข้างต้นใช้ช่วงเวลาในการศึกษาช่วงละ 10 วัน ขึ้นกับปัจจัยการบริหารจัดการทรัพยากรภายในของห้องปฏิบัติการ ได้แก่ สารมาตรฐาน เครื่องมือ และบุคลากร เนื่องจากธรรมชาติของสารอาจมีความแปรปรวนมาก ในการทดสอบความคงตัวอาจต้องเพิ่มจำนวนซ้ำของการทดสอบมากขึ้น

จากผลการศึกษาแนวโน้มปริมาณ CBD ในแซมพูที่อุณหภูมิห้องและสภาวะแรง โดยนำมาสร้างกราฟ พบว่าตัวอย่างแซมพูที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 วัน มีปริมาณ CBD คงที่ในช่วง 30 วันแรก และเพิ่มขึ้นในช่วง 30-60 วัน ซึ่งต่างจากที่สภาวะแรง คือ ปริมาณ CBD สูงสุดในช่วง 10-20 วัน และลดลงในช่วง 20-30 วัน จากนั้นเพิ่มขึ้นในช่วง 30-40 วัน และลดลงในช่วง 40-50 วัน ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3 ผลการทดสอบนี้ตรงข้ามกับผลการศึกษาความคงตัวของงานวิจัยต่างประเทศ พบว่า CBD สามารถสลายตัวกลายเป็น mono หรือ dimer quinone ได้จากการถูก oxidation โดยแสงหรือความร้อน^(16,17) จากลักษณะดังกล่าวคาดว่าสารสกัด cannabis extract B ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างทดสอบมีอนุพันธ์ของ CBD อื่นทำให้อาจเปลี่ยนรูปแบบกลายเป็น CBD ได้เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ถึงแม้สารสกัดจะผ่านกระบวนการ decarboxylation แล้ว แต่ปฏิกิริยาอาจจะไม่สมบูรณ์ ดังนั้นในการเตรียมผลิตภัณฑ์ของ CBD ในตัวอย่างเครื่องสำอางจำเป็นต้องมีการพัฒนาสูตรตำรับเพื่อให้มีความคงตัวมากขึ้น

สรุป

ผลการศึกษาพบตัวอย่างครีมที่ผสมสารสกัด cannabis extract A ที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมสามารถนำไปใช้เป็นตัวอย่งทดสอบความชำนาญสำหรับทดสอบ Δ^9 -THC ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทครีม แต่มีข้อจำกัดสำหรับตัวอย่างแซมพูที่ผสมสารสกัด cannabis extract B เนื่องจากมีความไม่คงตัวของปริมาณ CBD จึงไม่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวอย่งทดสอบความชำนาญจำเป็นต้องพัฒนาต่อไป โดยพัฒนาสูตรตำรับให้มีความคงตัวมากขึ้น หรือมีการใช้สารสกัดที่มีชนิดของแคนนาบินอยด์ที่นิยมใช้ในเครื่องสำอางและความบริสุทธิ์สูงขึ้น รวมทั้งการจัดหาสารมาตรฐานแคนนาบินอยด์ที่สำคัญมาใช้ในการทดสอบ เนื่องจากการใช้ประโยชน์จากกัญชาและกัญชงเป็นเรื่องใหม่ของอุตสาหกรรมเครื่องสำอางไทย ดังนั้นการพัฒนาระบบที่เกี่ยวข้องกับขีดความสามารถ สมรรถนะ คุณภาพ และมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ จึงเป็นโครงสร้างพื้นฐานด้านคุณภาพที่จำเป็นต้องได้รับการพัฒนาอย่างเร่งด่วน เพื่อสนับสนุนอุตสาหกรรมดังกล่าวให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่สนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงานกิจกรรมนี้ภายใต้โครงการพัฒนาศักยภาพและเครือข่ายห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์คุณภาพสารสกัดและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางผสมกัญชากัญชา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 และขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา (วิทยาลัยสหเวชศาสตร์ หลักสูตรกัญชาเวชศาสตร์) ที่ให้ความอนุเคราะห์สารสกัดกัญชาสำหรับการเตรียมตัวอย่างทดสอบ ตลอดจนเจ้าหน้าที่สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตรายทุกท่านที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. พระราชบัญญัติเครื่องสำอาง พ.ศ. 2558. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 132 ตอนที่ 86 ก (วันที่ 8 กันยายน 2558) หน้า 5.
2. Fortune Business Insides. Market research report: cosmetics market. [online]. 2021; [cited 2022 Nov 20]; Available from: URL: <https://www.fortunebusinessinsights.com/cosmetics-market-102614>.
3. Atakan Z. Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals. *Ther Adv Psychopharmacol* 2012; 2(6): 241–54.
4. กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 พ.ศ. 2565. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 139 ตอนพิเศษ 35 ง (วันที่ 9 กุมภาพันธ์ 2565). หน้า 8.
5. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง สมุนไพรควบคุม (กัญชา) พ.ศ. 2565. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 139 ตอนพิเศษ 137 ง (วันที่ 16 มิถุนายน 2565). หน้า 9.
6. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การใช้ส่วนของกัญชาในเครื่องสำอาง พ.ศ. 2564. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 138 ตอนพิเศษ 105 ง (วันที่ 17 พฤษภาคม 2564). หน้า 1.
7. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การใช้สารสกัดที่มีสารแคนนาบินอยด์ออกจากกัญชาและกัญชงในเครื่องสำอาง พ.ศ. 2564. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 138 ตอนพิเศษ 105 ง (วันที่ 17 พฤษภาคม 2564). หน้า 4.
8. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 3rd ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.
9. ISO/IEC 17043:2010. Conformity assessment – general requirements for proficiency testing. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2010.
10. ISO 13528:2015. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. 2nd ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2015.
11. สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย. SOP 06-02-396: การตรวจวิเคราะห์สาร Δ^9 -tetrahydrocannabinol และ Cannabidiol โดยวิธี UPLC แก๊สครั้งที่ 1, 18 พฤษภาคม 2566. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข: 2566.
12. Horwitz W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Anal Chem* 1982; 54(1): 67–76.
13. Cosmetics Europe. Guidelines on stability testing of cosmetic products. [online]. 2004; [cited 2022 Nov 1]; [10 screens]. Available from: URL: https://www.cosmeticseurope.eu/files/5914/6407/8121/Guidelines_on_Stability_Testing_of_Cosmetics_CE-CTFA_-_2004.pdf.
14. Wang M, Wang YH, Avula B, Radwan MM, Wanas AS, van Antwerp J, et al. Decarboxylation study of acidic cannabinoids: a novel approach using ultra-high-performance supercritical fluid chromatography/photodiode array-mass spectrometry. *Cannabis Cannabinoid Res*. [serial online] 2016; [cited 2022 Dec 29]; 1(1): [10 screens]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5549281/pdf/can.2016.0020.pdf>.
15. Fućak T, Kreft S, Svedružić ŽM, Tavčar E. Mechanism and kinetics of CBDA decarboxylation into CBD in hemp. *J Plant Biochem Biotechnol* 2023; 32(3): 608–21.
16. Merrick J, Lane B, Sebree T, Yaksh T, O'Neill C, Banks SL. Identification of psychoactive degradants of cannabidiol in simulated gastric and physiological fluid. *Cannabis Cannabinoid Res*. [serial online] 2016; [cited 2022 Dec 29]; 1(1): [11 screens]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5576596/pdf/can.2015.0004.pdf>.
17. Caprioglio D, Mattoteia D, Pollastro F, Negri R, Lopatriello A, Chianese G, et al. The oxidation of phytocannabinoids to cannabinoquinoids. *J Nat Prod*. [serial online] 2020; [cited 2022 Dec 29] 83(5): [5 screens]. Available from: URL: <https://pubs.acs.org/doi/epdf/10.1021/acs.jnatprod.9b01284>.

Proficiency Testing Sample Development for Active Ingredients Determination of Cannabis in Cosmetic Products

Siriporn Thongpakaisang and Jumrern Duangngamyin

Bureau of Cosmetics and Hazardous substances, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT During 2021–2022, the Ministry of Public Health issued four ministerial regulations related to cannabis (marijuana) and hemp (kanchong) for medical and commercial uses of parts of such plants, while regulating the amounts of psychotropic substances, i.e. tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). The Bureau of Cosmetics and Hazardous Substances (BCHS) within the Department of Medical Sciences, recognizing the need to enhance THC and CBD testing capabilities in cosmetic products at its laboratories, aimed to provide services using ISO/IEC 17025:2017 accredited test methods of 2021. Furthermore, they sought to establish a network of THC and CBD testing laboratories for cosmetic products in both government and private sectors. The proficiency testing program was introduced to assess the competence of these laboratories. Currently, there is no THC and CBD proficiency testing program available domestically or internationally for cosmetic products. To address this, two cosmetic proficiency testing samples were developed: a cream formula with a THC concentration of 0.05% w/w and a shampoo with a CBD concentration of 0.01% w/w. These samples underwent testing and were statistically evaluated for homogeneity and stability according to ISO 13528:2015. The results indicated that the THC in the cream samples exhibited satisfactory homogeneity and stability under three experimental conditions: room temperature ($27-30\text{ }^{\circ}\text{C}$), accelerated temperature ($45\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), and transportation conditions. However, the CBD in the shampoo samples did not meet the requirements for homogeneity and stability. Thus, further product improvement is needed to fulfill a requirement for ISO/IEC 17043:2022 certification and expanding the scope of proficiency testing services of the Department of Medical Sciences.

Keywords: THC, CBD, Cosmetic, Proficiency testing, Cannabis extract

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ Quercitrin ในสารสกัดน้ำพลูควาดด้วย วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

สุนันทา ศรีโสภณ สมจิตร เนียมสกุล สรวุฒ จันทรโคตรแก้ว ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง กรวิชัย สมคิด
และ ศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ พลูควาด (*Houttuynia cordata* Thunb.) ใช้ประโยชน์ในยาไทยพื้นบ้านและตำรับยาแผนโบราณที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทยโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ในต่างประเทศใช้รักษาอาการไข้ ไอ อาการอักเสบ และขับปัสสาวะ เป็นต้น มีรายงานว่าพลูควาดสามารถต้านเชื้อไวรัส ต้านเชื้อจุลินทรีย์ เสริมภูมิคุ้มกัน ต้านอักเสบ ตำรับยาจีนที่มีพลูควาดเป็นส่วนประกอบหลักมีรายงานว่าใช้เพื่อบรรเทาอาการอักเสบในระหว่างการแพร่ระบาดของ COVID-19 กลุ่มสารที่พบมากในพลูควาดคือ phenolics ซึ่ง quercitrin เป็นองค์ประกอบหลัก และไม่พบว่ามีวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพทางเคมีสำหรับสารสกัดพลูควาด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ quercitrin ในสารสกัดน้ำพลูควาดด้วยโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง วัตถุประสงค์ที่ คือ ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD 2.1×50 mm, 1.8 μ m อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัฏภาคเคลื่อนที่คือ สารละลายผสมระบบ gradient ของ 0.2% v/v phosphoric acid ในน้ำและเมทานอล อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที วัดที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร เตรียมสารละลายตัวอย่างโดย reflux ในเมทานอล 30 นาที ผลพบว่าวิธีนี้มีความจำเพาะ มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.04–0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) เท่ากับ 0.99997 ร้อยละการคืนกลับ (%recovery) เท่ากับร้อยละ 99.76–103.16 HORRAT ของ repeatability และ intermediate precision < 2 ชี้ดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก วิธีที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำและความเที่ยง สามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ quercitrin เพื่อควบคุมคุณภาพของสารสกัดน้ำพลูควาดเดี่ยวที่มีการจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ได้

คำสำคัญ: การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์, Quercitrin, สารสกัดน้ำพลูควาด, UHPLC

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

Received: 29 March 2023

Revised: 15 August 2023

Accepted: 23 August 2023

บทนำ

พลูความีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Houttuynia cordata* Thunb. จัดอยู่ในวงศ์ Saururaceae มีชื่อท้องถิ่นอื่น ๆ ได้แก่ ผักคาวตอง ผักก้านตอง ผักเข้าตอง ผักคาวทอง พลูแฉ เป็นต้น พลูควาเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี พบได้ตามพื้นที่เปิดโล่งที่ชื้นแฉะ อยู่สูงเกินกว่า 1,000 เมตรจากระดับน้ำทะเลปานกลาง มีเขตการกระจายพันธุ์ตั้งแต่ประเทศเนปาลจนถึงเอเชียตะวันออกเฉียงและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยพบมากตามภูเขาสูงบริเวณภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ^(1,2) ใช้เป็นอาหารรับประทานคู่กับน้ำพริกหรือลาบ ประโยชน์ทางยาใช้เป็นยาแผนโบราณและยาพื้นบ้าน ได้แก่ ยาแก้กามโรคทำให้น้ำเหลืองแห้ง แก้โรคผิวหนัง แก้พิษฝี แก้ริดสีดวง และใช้ในสูตรตำรับยาแผนโบราณหลายตำรับที่กระทรวงสาธารณสุขขึ้นทะเบียน ในต่างประเทศ เช่น จีน เกาหลี ญี่ปุ่น และอินเดีย รวมถึงภูมิภาคอินโดจีน มีการนำพลูควาทั้งต้นไปใช้กับอาการผิดปกติที่เกิดขึ้นกับร่างกาย เช่น ไข้ ไอ อาการอักเสบ ขับปัสสาวะ เป็นต้น⁽²⁾ ดังแสดงในภาพที่ 1

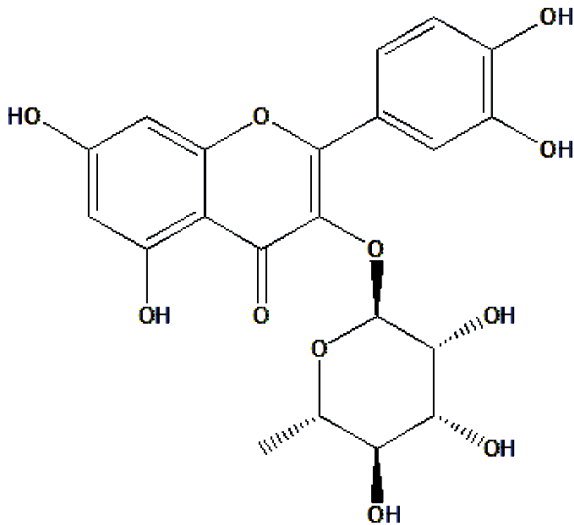


ภาพที่ 1 พลูควา (ส่วนเหนือดิน)

ในช่วงปี พ.ศ. 2563 เป็นต้นมา ทั่วโลกประสบกับปัญหาด้านสาธารณสุขจากการแพร่ระบาดของ SARS-CoV-2 ซึ่งเป็นไวรัสชนิดใหม่ในขณะนั้นทำให้เกิดการเสียชีวิตของประชากรเป็นจำนวนมาก เพื่อการป้องกัน รักษา และยับยั้งเชื้อชนิดนี้จึงมีการศึกษาวิจัยหลายแขนง รวมถึงมีความสนใจในงานวิจัยด้านสมุนไพรเพิ่มมากขึ้น พลูควาจึงเป็นสมุนไพรที่หลายประเทศให้ความสำคัญ เนื่องจากมีการใช้ในยาตำรับพื้นบ้านทั้งในไทยและต่างประเทศมานานและมีฤทธิ์ต้านไวรัส เช่น herpes simplex virus (HSV)⁽³⁾ และ influenza virus H1N1⁽⁴⁾ ต้านเชื้อจุลชีพ เช่น *Staphylococcus aureus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans* และ *Candida albicans*⁽⁵⁾ และเสริมภูมิคุ้มกัน⁽⁶⁾ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารออกฤทธิ์ในสารสกัดพลูควาสามารถยับยั้ง RdRp enzyme ของ SARS-CoV-2 ได้⁽⁷⁾ นอกจากนี้สารสกัดพลูควายังช่วยฟื้นฟูความเสียหายที่เกิดขึ้นกับ aortic endothelial ในระหว่างกระบวนการเกิดภาวะไขมันในเลือดสูง⁽⁸⁾ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองได้^(9,10) การศึกษาในไต้หวัน พบว่ายาตำรับของจีน Zheng-Yi-Fang มีลักษณะเป็นถุงชา ขนาดบรรจุ 4 กรัมต่อถุง ประกอบด้วยพลูควาเป็นส่วนประกอบหลักในตำรับ มีปริมาณเท่ากับ 20% และสมุนไพรอื่นอีก 10 ชนิด ยาตำรับนี้มีผลในการบรรเทาอาการจมูกอักเสบจากการแพ้ (allergic rhinitis) ที่เกิดขึ้นระหว่างการระบาดของ COVID-19⁽¹¹⁾

พลูความีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด เช่น สารกลุ่ม phenolics ได้แก่ p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, syringic acid, p-coumaric acid และ ferulic acid⁽¹²⁾ สารกลุ่ม flavonoids ได้แก่ chlorogenic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, rutin, hyperin, hyperoside, isoquercitrin, quercitrin และ quercetin^(12,13) และสารกลุ่ม alkaloids ได้แก่ norcepharadione, 4,5-dioxodehydroasimilobine, cepharadione B, aristololactam B II, aristololactam A II, sauristolactam, piperolactam A, splendidine และ aristololactam⁽¹⁴⁾ เป็นต้น จากรายงานการวิจัย

การประเมินคุณภาพของพลาควาจำนวน 35 ตัวอย่าง ด้วยวิธี HPLC-DAD พบว่า quercitrin เป็นองค์ประกอบหลัก โดยมีปริมาณ 0.002–0.550%⁽¹⁵⁾ ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ Quercitrin⁽¹⁵⁾

สาร quercitrin มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านอักเสบ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของร่างกาย ฤทธิ์แก้ปวด ฤทธิ์สมานแผล และฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อ เป็นต้น ซึ่งมีรายงานการศึกษาวิจัยที่นำ quercitrin มาใช้กับโรคต่างๆ ได้แก่ โรคกระดูกที่เกิดจากความผิดปกติของกระบวนการเมตาบอลิก (bone metabolic diseases) เช่น โรคกระดูกพรุน (osteoporosis) โรคกระดูกข้ออ่อนเสื่อม (osteoarthritis) เป็นต้น โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารและลำไส้ (gastrointestinal diseases) เช่น แผลในทางเดินอาหาร (gastric ulcer) การอักเสบของลำไส้ (inflammatory bowel diseases) เป็นต้น โรคทางระบบประสาท (neuropathy) เช่น การเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative diseases) หลอดเลือดสมองอุดตัน (ischemic stroke) อาการวิตกกังวลและซึมเศร้า (anxiety and depressive disorder) อาการหูหนวกจากระบบประสาท (nerve deafness) เป็นต้น โรคทางด้านระบบภูมิคุ้มกัน (immune diseases) เช่น โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) โรคภูมิแพ้ตัวเอง (systemic lupus erythematosus) อาการไวต่อการสัมผัส (contact hypersensitivity) เป็นต้น ภาวะ

หลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) มะเร็ง (cancer) การบาดเจ็บของตับ (liver injury) และการกระตุ้นการเติบโตของเส้นผม⁽¹⁶⁾

การวิเคราะห์ quercitrin ในสมุนไพร มีการศึกษาเพื่อตรวจสอบองค์ประกอบของสารในพลาควาเท่านั้น ไม่ได้เป็นการศึกษาเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณของ quercitrin ในพลาควา โดยใช้ HPLC และ UPLC ดังนั้น การศึกษาองค์ประกอบในสารสกัดจากพลาควาที่ได้จากส่วนลำต้นและใบด้วย HPLC ตรวจพบ quercitrin ที่ retention time 29 นาที ใช้เวลาวิเคราะห์ 50 นาที⁽¹²⁾ การประเมินคุณภาพของพลาควาในประเทศจีนจากแหล่งปลูกหลายแห่ง โดยการวิเคราะห์ phenolics จำนวน 16 ชนิด ในพลาควาด้วย HPLC-DAD พบ quercitrin ที่ retention time 44 นาที ใช้เวลาวิเคราะห์ 80 นาที⁽¹⁵⁾ การวิเคราะห์สาร จำนวน 7 ชนิดของพลาควาในประเทศเกาหลีจากแหล่งปลูกหลายแห่งด้วย UHPLC-PDA โดยใช้ column ต่างชนิดกัน ตรวจพบ quercitrin ที่ retention time ต่างกัน ตั้งแต่ 8–14 นาที⁽¹⁷⁾ เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาระหว่าง HPLC และ UPLC พบว่าการตรวจหา quercitrin ด้วยวิธี UHPLC สามารถทำได้รวดเร็วกว่า HPLC

สมุนไพรพลาควาเป็นสมุนไพรที่ภาคเอกชนให้ความสนใจและมีการผลิตออกสู่ตลาดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากมีสรรพคุณต่อร่างกายหลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านการบำรุงสุขภาพและเสริมภูมิคุ้มกัน จากการสืบค้นข้อมูลผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการอนุญาตจากเว็บไซต์ของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข⁽¹⁸⁾ พบว่ามีผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับพลาควาหลายชนิดทั้งแบบเดี่ยวและผสมมากกว่า 200 รายการ โดยพลาควาที่ระบุในฉลากของผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ระบุเป็นสารสกัดพลาควา แต่ยังไม่พบว่ามีวิธีการควบคุมคุณภาพทางเคมีที่เป็นมาตรฐานสำหรับตรวจปริมาณสารสำคัญในสารสกัดพลาควา ผู้วิจัยจึงพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อตรวจปริมาณ quercitrin ซึ่งเป็นสารสำคัญในสารสกัดพลาควาด้วยวิธี UHPLC ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วกว่า HPLC การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นใหม่

ในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับควบคุมคุณภาพสารสกัดน้ำพลูควาได้

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมสารสกัดน้ำพลูควา

สมุนไพรพลูควาเก็บตัวอย่างจากแหล่งปลูกในจังหวัดจันทบุรีและเชียงใหม่ โดยเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยสมุนไพรและได้รับการระบุชื่อวิทยาศาสตร์ตามหลักอนุกรมวิธานพืชจากห้องปฏิบัติการพิพิธภัณฑ์พืช สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หมายเลข Herbarium specimen DMSC 5320 นำสมุนไพรพลูควาส่วนเหนือดินมาตัดแยก ล้าง หั่น และตากให้แห้ง จากนั้นนำไปอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 45–50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 32 ชั่วโมง นำมาบดเป็นผงและผ่านร่อนเบอร์ 180 เก็บตัวอย่างที่ได้ในขวดแก้วสีชาปิดสนิท ปิดฉลากระบุชื่อ แหล่งที่มา และหมายเลขตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างผงพลูควาแห้ง 500 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วก้นกลมขนาด 4 ลิตร เติมน้ำกลั่น 3.5 ลิตร สกัดด้วยวิธี reflux แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 สกัดซ้ำจำนวน 2 ครั้ง ทำให้สารสกัดน้ำพลูควาเข้มข้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศและทำให้แห้งด้วยวิธีระเหิดด้วยความเย็น (freeze drying) เก็บสารสกัดน้ำพลูควาในขวดสีชาปิดสนิทที่อุณหภูมิ 2–8 องศาเซลเซียส ปิดฉลากระบุชื่อ แหล่งที่มา วิธีเตรียม และหมายเลขตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควา

สารมาตรฐาน

quercitrin ความบริสุทธิ์ 99.9% และ 98.6% (Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd., China, Lot. PRF21120302 และ PRF22062201)

สารเคมี

เมทานอล (HPLC grade), น้ำ (ultra purified water) และ phosphoric acid (AR grade)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง UHPLC (ultra high performance liquid chromatography) รุ่น 1290 Infinity II (Agilent Technologies®, Germany) ประกอบด้วย 1290 flexible pump, 1290 vialsampler, ICC (integrated column compartment) และ 1290 DAD FS (diode array detector fixed slit), guard column ชนิด ZORBAX Extend-C18 ขนาด 2.1×5 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร column ชนิด ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD ขนาด 2.1×50 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร (Agilent®, USA), เครื่องชั่งความละเอียด 0.1–0.01 มิลลิกรัม (Mettler Toledo®, Switzerland), เครื่องระเหยสุญญากาศ (Eyela®, USA), ตู้อบร้อน (Mettmert®, Germany), อ่างน้ำร้อน (Contherm scientific Ltd., New Zealand), sonicator (Ney®, Ultra sonikTM, USA), freeze dryer (Labconco®, USA), PVDF syringe membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร, กระดาษกรองเบอร์ 4 และ software Chemdraw version 8.0

วิธีวิเคราะห์

สารละลายตัวอย่าง เตรียมโดยชั่งผงสารสกัดน้ำพลูควา 500 มิลลิกรัม เติมนเมทานอล 20 มิลลิลิตร นำไป reflux ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 50 มิลลิลิตร กรองสารละลายที่ได้ผ่าน PVDF syringe membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สารละลายมาตรฐาน เตรียม stock standard solution โดยชั่ง quercitrin 20 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 50 มิลลิลิตร แล้วเตรียม 6 ระดับความเข้มข้น เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดย pipet stock standard solution จำนวน 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิลิตร ตามลำดับ เจือจางและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร กรองสารละลายที่ได้ผ่าน PVDF membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

ระบบโครมาโทกราฟี วัฏภาคคงที่ คือ column ชนิด ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD ขนาด 2.1×50 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร อุณหภูมิ column เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส

วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ ระบบ gradient ของ 0.2%v/v phosphoric acid ในน้ำ และเมทานอล ดังแสดงในตารางที่ 1 อัตราการไหลเท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย DAD (diode array detector) ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร

ตารางที่ 1 ระบบของวัฏภาคเคลื่อนที่แบบ gradient

Time (min)	0.2%v/v Phosphoric acid ในน้ำ (%)	Methanol (%)
0	75	25
0.5	60	40
3	55	45
4	75	25
6	75	25

วิธีวิเคราะห์นี้เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการ โดยก่อนการนำไปตรวจสอบความถูกต้องของวิธีได้ทำการตรวจสอบพารามิเตอร์ต่างๆ จากผลการวิเคราะห์โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างด้วยโปรแกรม control panel for OpenLAB software version 2.3 (Agilent Technologies®, Germany) พบว่าผ่านเกณฑ์ของวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม⁽¹⁹⁾ คือ resolution > 2, tailing factor < 2, theoretical plate number > 2000 และ symmetry factor < 1.5

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ความจำเพาะ (specificity)

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควาดด้วยเครื่อง UHPLC รุ่น 1290 Infinity II แล้วเปรียบเทียบผลของ UV spectrum ที่ได้

ความเป็นเส้นตรง (linearity)

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน 6 ระดับความเข้มข้นที่ 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.20 และ 0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง ทำซ้ำ 3 วัน

สร้างกราฟมาตรฐานของ quercitrin ระหว่างความเข้มข้น (แกน x) กับ peak area (แกน y) ของแต่ละวันของการวิเคราะห์ พิจารณาความเป็นเส้นตรงของช่วงที่ทำการทดสอบจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ

(coefficient of determination, r^2) และ residual plot โดยเกณฑ์การยอมรับความเป็นเส้นตรง คือ $r^2 > 0.999$ และ residual plot ที่ได้จากผลต่างของความเข้มข้นสังเกตและค่าความเข้มข้นประมาณ (y-residual) ของทุกระดับความเข้มข้นมีการกระจายตัวรอบๆ ค่าศูนย์⁽²⁰⁾

ความแม่นยำ (accuracy)

unspiked sample คือ ตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควาดที่มีปริมาณ quercitrin น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควาดอื่นในการศึกษานี้

การหาความเข้มข้นของ quercitrin ใน unspiked sample ทำโดยเตรียมสารละลาย unspiked sample จำนวน 10 ขั้ว แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC ขั้วละ 3 ครั้ง

การหาความเข้มข้นของ target value ทำโดยเตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควาดที่ไม่ใช่ unspiked sample จำนวน 10 ขั้ว นำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC ขั้วละ 2 ครั้ง และคำนวณความเข้มข้นเฉลี่ย

การประมาณค่าความเข้มข้นของ spiked sample 3 ระดับความเข้มข้น (ต่ำ กลาง สูง) โดยคำนวณที่ร้อยละ 50, 100 และ 150 ของความเข้มข้น target value ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.05, 0.08 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การวิเคราะห์ spiked sample ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น

ระดับความเข้มข้นต่ำ ทำโดยซัง unspiked sample 500 มิลลิกรัม จำนวน 7 ซ้ำ เติมสารละลายมาตรฐาน quercitrin ความเข้มข้น 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

ระดับความเข้มข้นกลาง ทำโดยซัง unspiked sample 500 มิลลิกรัม จำนวน 7 ซ้ำ เติมสารละลายมาตรฐาน quercitrin ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

ระดับความเข้มข้นสูง ทำโดยซัง unspiked sample 500 มิลลิกรัม 7 ซ้ำ เติมสารละลายมาตรฐาน quercitrin ความเข้มข้น 3.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

จากนั้นเติมเมทานอล ปริมาตร 18 มิลลิลิตร ลงใน unspiked sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานแต่ละระดับความเข้มข้นไว้แล้ว นำไป reflux ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 และปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 50 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของความเข้มข้นในระดับ ต่ำ กลาง สูง เท่ากับ 0.05, 0.08 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กรองสารละลายที่ได้ผ่าน PVDF syringe membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC ซ้ำ 2 ครั้งต่อตัวอย่าง (duplicate)

คำนวณความเข้มข้นของ quercitrin จากกราฟมาตรฐาน และคำนวณร้อยละการคืนกลับ (%recovery) เกณฑ์การยอมรับความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ อยู่ในช่วงร้อยละ 95–105⁽²⁰⁾

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

C_1 คือ ความเข้มข้นที่วัดได้ของสารใน spiked sample

C_2 คือ ความเข้มข้นที่วัดได้ของสารใน unspiked sample

C_3 คือ ความเข้มข้นของ added analyte

ความเที่ยง (precision)

repeatability วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควาดที่เติมสารมาตรฐาน quercitrin 3 ระดับความเข้มข้น ซึ่งสารละลายที่นำไปวิเคราะห์มีความเข้มข้นสุดท้ายของ quercitrin เท่ากับ 0.05, 0.08 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารละลายนี้เตรียมขึ้นในขั้นตอนของการทดสอบความแม่นยำ ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ฉีด UHPLC ซ้ำ 2 ครั้งต่อตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันด้วยนักวิเคราะห์ 1 คน คำนวณร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

intermediate precision วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควาดที่เติมสารมาตรฐาน quercitrin 3 ระดับความเข้มข้น โดยสารละลายที่นำไปวิเคราะห์มีความเข้มข้นสุดท้ายของ quercitrin เท่ากับ 0.05, 0.08 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ฉีด UHPLC ซ้ำละ 2 ครั้ง วิเคราะห์ด้วยนักวิเคราะห์ 2 คน ต่างวันกัน คำนวณร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

ประเมินค่า Horwitz's equation และ HORRAT ของ repeatability และ intermediate precision เกณฑ์การยอมรับคือ HORRAT < 2⁽²¹⁾

ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

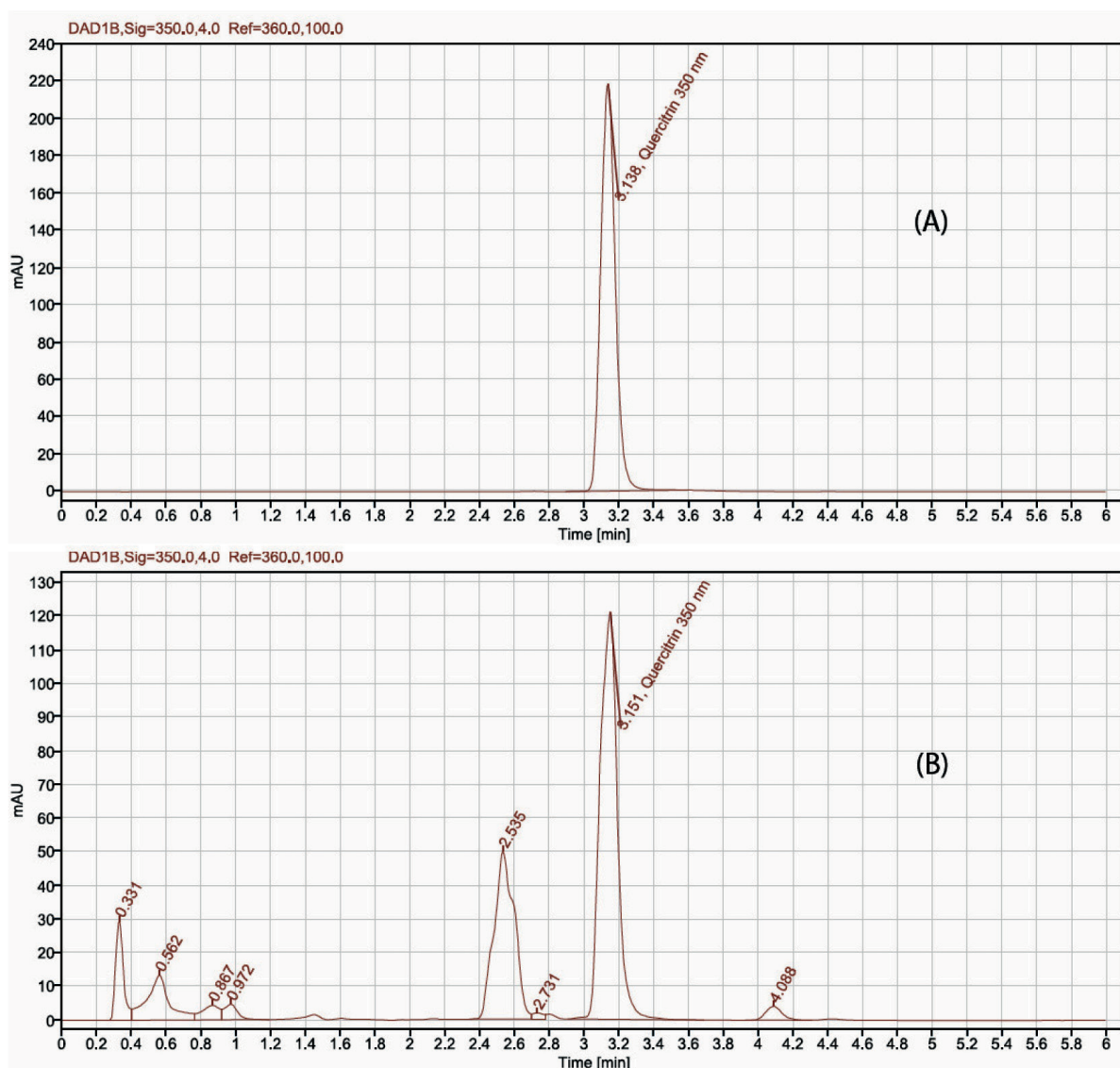
วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควาดที่เติมสารมาตรฐาน quercitrin โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายมี quercitrin เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ แล้ววิเคราะห์ด้วย UHPLC ซ้ำ 2 ครั้งต่อตัวอย่าง คำนวณความเข้มข้นของ quercitrin ในสารละลายตัวอย่างข้างต้น จากกราฟมาตรฐานยืนยัน LOQ ด้วยการประเมินค่าความแม่นยำจาก %recovery และประเมินค่าความเที่ยงด้วย %RSD

ผล

วิธีวิเคราะห์

ผลการวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างสารสกัดพลูควา พบ quercitrin ที่ retention time เท่ากับ 3.151 นาที

โดย resolution, tailing factor, theoretical plate และ symmetry factor มีค่าเท่ากับ 2.7412, 1.0600, 5351 และ 1.1918 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ความเหมาะสมสำหรับวิธีวิเคราะห์ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของ (A) สารละลายมาตรฐาน quercitrin ความเข้มข้น 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ (B) สารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควา ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ความจำเพาะ (specificity)

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ของสารละลายมาตรฐานและสารละลายสารสกัดน้ำพลูควา ดังแสดงใน

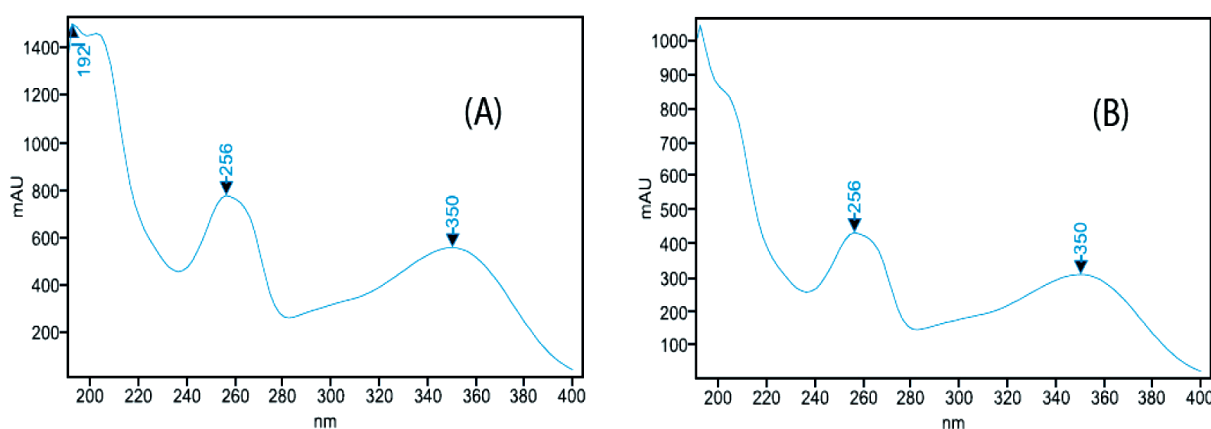
ภาพที่ 3 พบว่า retention time ของสารละลายมาตรฐาน quercitrin ปรากฏที่ 3.138 นาที และ quercitrin ในตัวอย่างสารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควา ปรากฏที่ 3.151 นาที และ ผลการวิเคราะห์ UV spectrum

ของ quercitrin peak ทั้งในสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควาด ดังแสดงในภาพที่ 4 พบว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ

ความเป็นเส้นตรง (linearity)

เมื่อทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน และสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น (แกน x) กับ

peak area (แกน y) พบว่ามีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.04–0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยผลการวิเคราะห์ทั้ง 3 วัน มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) เท่ากับ 0.99997 ดังแสดงในภาพที่ 5

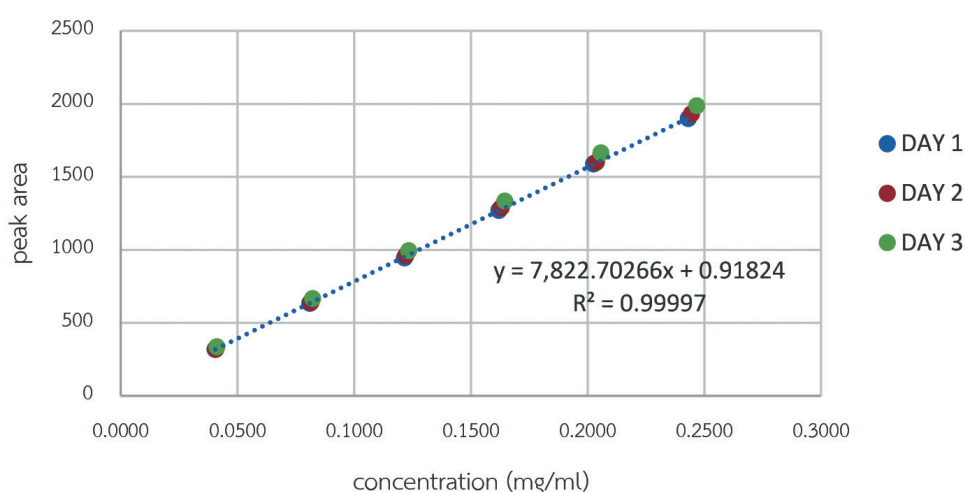


ภาพที่ 4 UV spectrum ของ quercitrin peak จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC

(A) สารละลายมาตรฐาน quercitrin ความเข้มข้น 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ

(B) สารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูควาด ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Calibration curve of quercitrin



ภาพที่ 5 กราฟมาตรฐานของ quercitrin ที่ความเข้มข้น 0.04–0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ($n = 3$)

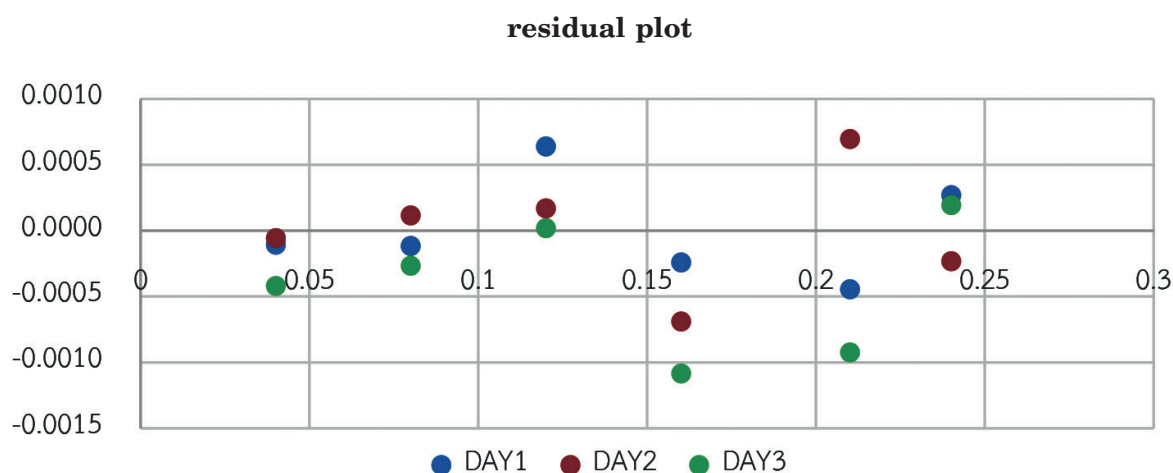
เมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน จำนวน 3 วัน พบว่า y-residual ของ quercitrin ที่ความเข้มข้นแต่ละระดับ มีการกระจายรอบๆ ค่าศูนย์ ดังแสดงในภาพที่ 6

ความแม่นยำ (accuracy)

ความเข้มข้นของ quercitrin ที่เติมลงใน unspiked sample ที่ค่าประมาณร้อยละ 50, 100 และ 150 ของ target value เท่ากับ 0.05, 0.08 และ 0.15

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยความเข้มข้นเฉลี่ยของ target value เมื่อวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำพลูคาว จำนวน 10 ข้าง พบว่าเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการทดสอบความแม่นยำที่ 3 ระดับความเข้มข้น พบว่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 103.16 ± 0.68 , 100.58 ± 0.51 และ 99.76 ± 0.62 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 6 residual plot ของ quercitrin ที่ความเข้มข้น 0.04–0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ($n = 3$)

ความเที่ยง (precision)

repeatability ผลการทดสอบความเที่ยงที่ 3 ระดับความเข้มข้น มีค่า %RSD เท่ากับ 0.61, 0.61 และ 0.60 ตามลำดับ และ HORRAT เท่ากับ 0.23, 0.24 และ 0.23 ตามลำดับ

intermediate precision ผลการทดสอบความเที่ยงที่ 3 ระดับความเข้มข้น มีค่า %RSD เท่ากับ 1.69, 2.63 และ 1.10 ตามลำดับ และ HORRAT

เท่ากับ 0.65, 1.01 และ 0.42 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

การทดสอบขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ พบว่า LOQ เท่ากับร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก โดย %recovery เท่ากับร้อยละ 100.18 ± 1.24 และ %RSD เท่ากับ 0.93

ตารางที่ 2 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของวิธีวิเคราะห์

Unspiked sample (%w/w)	Level/ Added analyte (%w/w)	Spiked sample (%w/w)	Accuracy* (n = 14)		Precision*			
			%Recovery	Mean±SD	Spiked sample (%w/w)		Intermediate precision (n = 28)	
					Analyst 1	Analyst 2	%RSD	HORRAT
0.0416	Low/0.4811	0.5371	102.99	103.16±0.68	0.5371	0.5208	0.61	0.23
		0.5355	102.64		0.5355	0.5203		
		0.5371	102.98		0.5371	0.5186		
		0.5375	103.07		0.5375	0.5222		
		0.5358	102.71		0.5358	0.5229		
		0.5374	103.05		0.5374	0.5217		
		0.5451	104.65		0.5451	0.5227		
		0.8734	101.26		0.8734	0.8166		
		0.8650	100.23		0.8650	0.8173		
		0.8626	99.94		0.8626	0.8198		
0.0416	Mid/0.8214	0.8729	101.20	100.58±0.51	0.8729	0.8239	0.61	0.24
		0.8646	100.19		0.8646	0.8150		
		0.8692	100.75		0.8692	0.8248		
		0.8672	100.51		0.8672	0.8190		
		1.4997	99.78		1.4997	1.4743		
0.0416	High/1.4613	1.5026	99.98	99.76±0.62	1.5026	1.4730	0.60	0.23
		1.5066	100.25		1.5066	1.4712		
		1.5129	100.68		1.5129	1.4738		
		1.4924	99.28		1.4924	1.4851		
		1.4951	99.47		1.4951	1.4632		
		1.4861	98.85		1.4861	1.4630		

*เกณฑ์การยอมรับ^(๑): recovery = 95–105%; repeatability as %RSD < 2, HORRAT < 2; intermediated precision as %RSD < 3, HORRAT < 4

วิจารณ์

การวิเคราะห์ปริมาณ quercitrin ในสารสกัดน้ำพลูควาดด้วยวิธี UHPLC เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการการเตรียมตัวอย่างสารละลายสารสกัดน้ำพลูควาดใช้วิธี reflux เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบการเตรียมด้วยการหมัก การ sonicate และการ reflux พบว่าการ reflux ทำให้ได้สารละลายตัวอย่างที่มีปริมาณ quercitrin มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอีก 2 วิธี ที่กล่าวข้างต้น ตัวทำละลายที่ใช้ คือ เมทานอล เนื่องจากสาร quercitrin สามารถละลายในเมทานอลได้ดี เมื่อได้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาแล้วจำเป็นต้องมีการทดสอบความถูกต้องของวิธี เพื่อให้มั่นใจว่าผลวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ วิธีวิเคราะห์นี้ใช้วัฏภาคคงที่ คือ column ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD ขนาด 2.1×50 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ 0.2%v/v phosphoric acid ในน้ำและเมทานอล ซึ่งใช้ระบบ gradient อัตราการไหลเท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร วิธีนี้เป็นวิธีที่มีระบบการแยกเหมาะสม เนื่องจาก resolution > 2, tailing factor < 2, theoretical plate number > 2000 และ symmetry factor < 1.5 ซึ่งผ่านเกณฑ์ตาม CDER⁽¹⁹⁾ จากการทดสอบความถูกต้องของวิธีแสดงให้เห็นว่าเป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ได้ เนื่องจากมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.04–0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์การตัดลิเนียร์เท่ากับ 0.99997 ร้อยละการคืนกลับของการวิเคราะห์ quercitrin ที่ความเข้มข้น 3 ระดับของค่าเป้าหมายเท่ากับร้อยละ 103.16±0.68, 100.58±0.51 และ 99.76±0.62 ตามลำดับ และค่า HORRAT ของ repeatability และ intermediate precision น้อยกว่า 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC guideline⁽²¹⁾ ขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณของวิธีนี้เท่ากับร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก นอกจากนี้วิธีวิเคราะห์นี้จะมีประสิทธิภาพแล้ว ยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการปฏิบัติงานได้ เนื่องจากใช้ระยะเวลาการวิเคราะห์ต่อการฉีด 1 ครั้ง เท่ากับ 6 นาที ในขณะที่

การศึกษาอื่นใช้เวลาในการวิเคราะห์ด้วย HPLC ประมาณ 40–80 นาที^(12,15) และใช้เวลาการวิเคราะห์ด้วย UPLC เท่ากับ 14 นาที⁽¹⁷⁾ ซึ่งเป็นผลมาจากการปรับชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่ ระบบ gradient ชนิดของคอลัมน์ อุณหภูมิของคอลัมน์ และอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำให้สามารถวิเคราะห์จำนวนตัวอย่างได้มากขึ้น ในระยะเวลาที่เท่ากันและใช้สารเคมีในการวิเคราะห์น้อยลง ซึ่งเป็นข้อดีในการลดจำนวนของเสียเคมีที่จะออกสู่สิ่งแวดล้อมได้

สรุป

วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจปริมาณ quercitrin ในสารสกัดน้ำพลูควาดได้อย่างถูกต้องเที่ยงตรง รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ ซึ่งมีประโยชน์ในการนำไปใช้ควบคุมคุณภาพของสารสกัดน้ำพลูควาดในเชิงพาณิชย์ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการสนับสนุนครุภัณฑ์สำหรับการวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยสมุนไพรทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. Larsen K. Saururaceae. In: Flora of Thailand vol. 7 part 2. Bangkok: The Forest Herbarium, Royal Forest Department; 2000. p. 344–346.
2. สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. สมุนไพรน่ารู้ 1: ผักคาวตอง ฉบับปรับปรุงเพิ่มเติม พ.ศ. 2553. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ; 2553.
3. Li JJ, Chen GD, Fan HX, Hu D, Zhou ZQ, Lan KH, et al. Houttuynoid M, an anti-HSV active houttuynoid from *Houttuynia cordata* featuring a bis-houttuynin chain tethered to a flavonoid core. J Nat Prod 2017; 80(11): 3010–3.

4. Ling LJ, Lu Y, Zhang YY, Zhu HY, Tu P, Li H, et al. Flavonoids from *Houttuynia cordata* attenuate H1N1-induced acute lung injury in mice via inhibition of influenza virus and Toll-like receptor signalling. *Phytomedicine* 2020; 67: 153150.
5. Sekita Y, Murakami K, Yumoto H, Amoh T, Fujiwara N, Ogata S, et al. Preventive effects of *Houttuynia cordata* extract for oral infectious diseases. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 2581876. (8 pages).
6. Garg CK, Sahu NP, Maiti MK, Shamna N, Deo AD, Sardar P. Dietary *Houttuynia cordata* leaf extract and meal enhances the immunity and expression of immune genes in *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Aquac Res* 2021; 52(1): 381-94.
7. Gurung AB, Ali MA, Lee J, Farah MA, Al-Anazi KM, Al-Hemaid F. Identification of SARS-CoV-2 inhibitors from extracts of *Houttuynia cordata* Thunb. *Saudi J Biol Sci* 2021; 28(12): 7517-27.
8. Liu X, Cao K, Lv W, Liu J, Gao J, Wang Y, et al. Aqueous extract of *Houttuynia cordata* ameliorates aortic endothelial injury during hyperlipidemia via FoxO1 and p38 MAPK pathway. *J Funct Foods* 2019; 62: 103510. (8 pages).
9. Li J and Zhao F. Anti-inflammatory functions of *Houttuynia cordata* Thunb. and its compounds: a perspective on its potential role in rheumatoid arthritis (Review). *Exp Ther Med* 2015; 10: 3-6.
10. Woranam K, Senawong G, Utaiwat S, Yunchalard S, Sattayasai J, Senawong T. Anti-inflammatory activity of the dietary supplement *Houttuynia cordata* fermentation product in RAW264.7 cells and Wistar rats. *PLoS One* 2020; 15(3): e0230645. (18 pages).
11. Chang KW, Lin TY, Fu SL, Ping YH, Chen FP, Kung YY. A *Houttuynia cordata*-based Chinese herbal formula improved symptoms of allergic rhinitis during the COVID-19 pandemic. *J Chin Med Assoc* 2022; 85(6): 717-22.
12. Tian L, Shi X, Yu L, Zhu J, Ma R, Yang X. Chemical composition and hepatoprotective effects of polyphenol-rich extract from *Houttuynia cordata* tea. *J Agric Food Chem* 2012; 60(18): 4641-8.
13. Yan L, Wei X, Ji T, Hong LC, Yan YS, Guo ZG, et al. Development of a novel method combining multi-wavelength HPLC fingerprint and quantitative analysis of multi-component by single marker for quality control of *Houttuynia cordata*. *J. Chem Pharm Res* 2014; 6(8): 347-56.
14. Wei QU, Fei-Hua WU, Juan LI, Liang JY. Alkaloids from *Houttuynia cordata* and their antiplatelet aggregation activities. *Chin J Nat Med* 2011; 9(6): 425-8.
15. Yang ZN, Sun YM, Luo SQ, Chen JW, Yu ZW, Sun M. Quality evaluation of *Houttuynia cordata* Thunb. by high performance liquid chromatography with photodiode-array detection (HPLC-DAD). *Pak J Pharm Sci* 2014; 27(2): 223-31.
16. Chen J, Li G, Sun C, Peng F, Yu L, Chen Y, et al. Chemistry, pharmacokinetics, pharmacological activities, and toxicity of Quercitrin. *Phytother Res* 2022; 36(4): 1545-75.
17. Kim HS, Lee AY, Park JY, Jo JE, Moon BC, Chun JM, et al. Simultaneous determination of seven compounds in *Houttuynia cordata* using UPLC-PDA. *Nat Prod Res* 2012; 18(3): 158-65.

18. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ตรวจสอบผลิตภัณฑ์. [ออนไลน์]. [เข้าถึงเมื่อ 3 มี.ค. 2566]. เข้าถึงได้จาก: URL: https://porta.fda.moph.go.th/FDA_SEARCH_ALL/MAIN/SEARCH_CENTR_MAIN.aspx.
19. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Reviewer guidance validation of chromatographic methods. [online]. 1994; [cited 2023 Mar 14]; [33 screens]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/media/75643/download>.
20. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
21. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals [online]. 2002; [cited 2023 Mar 1]; [38 screens]. Available from: URL: <https://www.farmacia.ufmg.br/wp-content/uploads/2015/06/AOAC-Guidelines-for-Single-Laboratory.pdf>.

Method Validation of Quercitrin Content in *Houttuynia cordata* Aqueous Extract Using Ultra High Performance Liquid Chromatography

Sununta Srisopon, Somchit Niumsakul, Sarawut Chankhotkaew, Sakwichai Ontong, Koravit Somkid, and Siriwan Chaisomboonpan

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

ABSTRACT Heartleaf (*Houttuynia cordata* Thunb.) is used for Thai traditional medicine and preparations registered by the Thai food and drug administration. It has been used for treating various symptoms such as fever, cough, and inflammation, and as diuretic. Additionally, it was reported as antiviral, antimicrobial, immune stimulant and anti-inflammatory. From Traditional Chinese Medicine, which heartleaf, as the main ingredient for allergic rhinitis during the COVID-19 pandemic, was reported. Phenolics were found as main compounds in this plant, of which quercitrin was reported as a major ingredient. Since the quality control of heartleaf aqueous extract has not been regulated, the objective of this study was to validate the method for analysis of the content of quercitrin in heartleaf aqueous extract Using Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC). The stationary phase was ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD 2.1x50 mm, 1.8 μ m at a temperature of 30 °C. The mobile phase was a mixture of 0.2%v/v phosphoric acid in water and methanol as a gradient system. The flow rate was 0.4 mL/min. It was detected using photodiode array detector at 350 nm. The sample solution was prepared by refluxing with methanol for 30 minutes. The results showed that this method was specific. Linearity was between 0.04–0.24 mg/ml with $r^2 = 0.99997$. The accuracy (% recovery) was 99.76–103.16%. The HORRAT of repeatability and intermediate precision was less than 2. Limit of quantitation (LOQ) was 0.1 %w/w. The developed method was accurate and precise. Therefore, it can be used for the determination of quercitrin content as the quality control method of single heartleaf aqueous extracts which are commercially available.

Keywords: Method validation, Quercitrin, Heartleaf aqueous extract, UHPLC

การศึกษาปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอจาก หยดเลือดบนกระดาษกรองในงานนิติเวช

ธนิศเชษฐ์ เขตคาม¹ และ ทศนัย พิพัฒน์โชติธรรม²

¹สาขานิติเวช โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

²ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ สาขานิติเวช โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ มีการเก็บหยดเลือดของผู้เสียชีวิตที่เสียชีวิตไม่เกิน 24 ชั่วโมง ลงบนกระดาษกรอง Whatman เพื่อลดพื้นที่ในการจัดเก็บและลดการเน่าเสียของวัตถุพยาน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเลือดบนกระดาษซับที่เก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 1-5 ปี จำนวน 49 ตัวอย่าง ผลการวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260/280 nm พบมีความเข้มข้นในช่วง 6.10-200.60 ng/μl และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอระหว่าง 1.04-1.56 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี real-time PCR พบมีความเข้มข้นดีเอ็นเอในช่วง 0.24-66.32 ng/μl โดยมีค่า degradation index ในช่วง 1.00-5.02 ค่า male degradation index ในช่วง 0.50-1.90 ซึ่งอยู่ในค่ายอมรับได้ แต่มีค่า inhibition index ในช่วง 7.26-34.88 และค่า mixture index ในช่วง 3.61-6.20 ซึ่งมากกว่าค่ายอมรับได้ ผลการศึกษานี้พบว่าดีเอ็นเอมีแนวโน้มเสื่อมสภาพเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการเก็บตัวอย่างเลือดบนกระดาษซับที่มากขึ้นในช่วงการศึกษา 1-5 ปี แต่ยังมีปริมาณเพียงพอต่อการนำไปใช้การตรวจพิสูจน์ระบุตัวบุคคล การพัฒนาต่อเพื่อให้มีวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพเพื่อกำจัดสารยับยั้ง จะช่วยให้การนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากการเก็บตัวอย่างเลือดบนกระดาษซับไปใช้งานทางนิติเวชได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไป

คำสำคัญ: หยดเลือดบนกระดาษกรอง, การเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอ, นิติเวช

Corresponding author E-mail: khetkhamtu@gmail.com

Received: 9 March 2023

Revised: 23 August 2023

Accepted: 24 August 2023

บทนำ

การตรวจพิสูจน์บุคคล เป็นการใช้ความรู้ทางวิทยาศาสตร์แขนงต่าง ๆ เพื่อตรวจพิสูจน์และระบุตัวบุคคลทั้งผู้ที่มีชีวิตและเสียชีวิต โดยใช้ศพ โครงกระดูก ชิ้นเนื้อ และเลือด ตลอดจนคราบต่าง ๆ ที่เป็นสารคัดหลั่งของมนุษย์ เป็นวัตถุพยานทางชีวภาพที่ใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อการตรวจพิสูจน์บุคคลและตรวจหาความสัมพันธ์ทางสายเลือดในครอบครัวเดียวกันและในระดับเครือญาติ ซึ่งการดำเนินการทุกขั้นตอนในกระบวนการตรวจดีเอ็นเอต้องมีความน่าเชื่อถือ แม่นยำ เพื่อนำผลตรวจไปใช้ในกระบวนการยุติธรรมได้ คุณภาพของดีเอ็นเอจึงเป็นสิ่งสำคัญ ดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างต้องมีปริมาณเพียงพอ มีความบริสุทธิ์ และไม่มีสารหรือตัวอย่างอื่นปนเปื้อน สาขานิติเวช โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ดำเนินการการเก็บตัวอย่างวัตถุพยาน โดยเก็บตัวอย่างเลือดผู้เสียชีวิตที่เสียชีวิตไม่เกิน 24 ชั่วโมง กรณีไม่สามารถเก็บเลือดได้จะเก็บชิ้นส่วนเนื้อเยื่อหรือกระดูกแทน ปัญหาที่พบจากการเก็บตัวอย่างวัตถุพยานทางชีวภาพ ได้แก่ การเสื่อมสลายของตัวอย่าง ที่มีผลต่อคุณภาพของดีเอ็นเอจากปัจจัยต่าง ๆ จึงเป็นข้อจำกัดและปัญหาในกรณีที่ต้องมีการรื้อคดีหรือการตรวจพิสูจน์วัตถุพยานใหม่อีกครั้ง การเน่าเสียของวัตถุพยานที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติระหว่างนำส่งวัตถุพยานให้กับพนักงานสอบสวน และการจัดเก็บวัตถุพยานชนิดหลอดเลือดที่ต้องใช้ตู้เย็นในการจัดเก็บใช้พื้นที่มากและสิ้นเปลืองพลังงานไฟฟ้าในการเก็บรักษา การเก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้กระดาษพิเศษ FTA card จึงเป็นทางเลือกที่มีประสิทธิภาพ สามารถเก็บตัวอย่างเลือดจากศพไว้ได้นานมากกว่า 16 ปี⁽¹⁾ แต่มีราคาแพง

ในปี พ.ศ. 2556 สาขานิติเวช โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ เริ่มเก็บหยดเลือดบนกระดาษกรอง Whatman (dried blood spot: DBS) แทนการเก็บในหลอดเลือดและเก็บไว้ในช่องสำหรับเตรียม นำส่งให้พนักงานสอบสวนต่อไป เพื่อลดพื้นที่ในการจัดเก็บและลดการเน่าเสียของวัตถุพยาน⁽²⁻⁷⁾ คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ศึกษาคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดที่สกัดจากกระดาษกรองดังกล่าว มีช่วง

การเก็บรักษา 1-5 ปี เพื่อให้ทราบถึงการเสื่อมสภาพของตัวอย่างดีเอ็นเอในระยะเวลาการเก็บเลือดสำหรับพัฒนามาตรฐานการจัดเก็บวัตถุพยาน

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างเลือดเก็บจากผู้เสียชีวิตที่เสียชีวิตไม่เกิน 24 ชั่วโมง เก็บรักษา ณ ห้องผ่าศพ สาขานิติเวช โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ระหว่างปี พ.ศ. 2558-2562 ปีละ 10 ตัวอย่าง (เพศชาย เท่ากับ เพศหญิง เท่ากับ 5 ตัวอย่าง) เมื่อครบ 5 ปี ได้ตัวอย่างเลือดจากศพเพศชาย จำนวน 25 ราย และเพศหญิง จำนวน 24 ราย รวม 49 ตัวอย่าง โดยการเก็บตัวอย่างเลือดจากการเจาะหลอดเลือดดำบริเวณขาหนีบ (femoral vein) ปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง (EDTA-blood) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเก็บ DBS โดยดูดเลือดจากหลอด EDTA-blood หยดลงบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (Cytiva, China) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 70 มิลลิเมตร จำนวน 5 หยด หยดละประมาณ 50 ไมโครลิตร และปล่อยให้แห้งในอุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany) โดยตัด DBS ขนาด 3×3 มิลลิเมตร จำนวน 1 ชิ้น ต่อ 1 ราย ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการสกัดตามวิธีการของคู่มือชุดน้ำยาได้ตัวอย่างดีเอ็นเอ 50 µl และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer (Biophotometer รุ่น Basic, Eppendorf, Germany) ที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร⁽⁸⁾ จำนวน 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย

ปริมาณดีเอ็นเอเป็นนาโนกรัมต่อไมโครลิตร และค่า 230/260 และ 260/280 ratio

การวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี real-time PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณโดยวิธี real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ต่อ autosomal short tandem repeat (STR) markers ตรงตำแหน่ง 4*NS1C* gene^(9,10) ด้วยชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป Investigator® Quantiplex® Pro Kit (QIAGEN, Germany) และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง real-time PCR (Rotor-Gene®-Pure Detection, QIAGEN, Germany) ซึ่งมี software คำนวณอัตโนมัติสำหรับคุณภาพดีเอ็นเอใน parameter ต่าง ๆ ดังนี้

ค่า degradation index เป็นค่าการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอ) จะเป็นการคำนวณอัตราส่วนระหว่าง human target แบบ large autos ที่มีขนาดของ PCR product เท่ากับ 353 base pair (bp) และ human target แบบ small autos ที่มีขนาดของ PCR product เท่ากับ 91 bp หากมีการแตกหักหรือการเสื่อมสภาพหรือการย่อยสลายของดีเอ็นเอมาก ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจะมีขนาดเล็ก การคำนวณสัดส่วนของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่และขนาดเล็ก จึงใช้เป็นดัชนีชี้วัดการเสื่อมสภาพหรือการย่อยสลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในการวิเคราะห์ในแต่ละรอบ โดยมีค่าตั้งอยู่ที่น้อยกว่า 10 (default threshold ≤ 10) ถือว่าดีเอ็นเอไม่มีการเสื่อมสภาพ

ค่า male degradation index เป็นค่าการเสื่อมสภาพของโครโมโซมเพศชาย เป็นการคำนวณอัตราส่วนระหว่างขนาดของ human male target แบบ large autos ที่มีขนาดของ PCR product ที่ 359 bp ที่ human male target แบบ small autos ที่ 81 bp กรณีที่ดีเอ็นเอไม่มีการแตกหักหรือมีการเสื่อมสภาพน้อย ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะมีขนาดใหญ่ และได้ค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 (default threshold ≤ 10)

ค่า inhibition index เป็นค่าของปฏิกิริยายับยั้ง PCR โดยวัดจากค่า internal PCR control ที่มีขนาดของ PCR product เท่ากับ 434 bp ควรมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 (default threshold ≤ 1)

ค่า mixture index เป็นค่าการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ โดยการคำนวณอัตราส่วนระหว่าง human target แบบ large autos ที่มีขนาดของ PCR product เท่ากับ 353 bp และ human male target แบบ large autos ที่มีขนาดของ PCR product เท่ากับ 359 bp ควรมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 (default threshold ≤ 2) ถือว่าไม่มีการปนเปื้อนหรือมีการปนเปื้อนน้อยมาก

การใช้สถิติในการวิเคราะห์

ใช้สถิติเชิงบรรยาย (descriptive statistics) ด้วยโปรแกรม microsoft excel for office 365 โดยใช้ค่าเฉลี่ย ค่าสูงสุด และค่าต่ำสุด ของค่าการเสื่อมสภาพดีเอ็นเอ (degradation index) ค่าปฏิกิริยายับยั้งพีซีอาร์ (inhibition index) ค่าการเสื่อมสภาพของโครโมโซม Y (male degradation index) และค่าการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ (mixture index)

จริยธรรมการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการยื่นขอจริยธรรมวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ และผ่านการรับรอง เมื่อวันที่ 30 กรกฎาคม พ.ศ. 2563 รหัสโครงการวิจัยที่ 027/2563

ผล

ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

ค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดจาก DBS วิเคราะห์ด้วยอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสง 260 nm พบว่าความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอจาก DBS ที่เก็บในแต่ละปีมีความแตกต่างกัน โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ 6.10 ng/ μ l และสูงสุดที่ 200.60 ng/ μ l มีความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอต่ำสุดที่ 1.04 และสูงสุดที่ 1.56 พบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (260/280 ratio) มีค่าเฉลี่ยในช่วง 1.15-1.29 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยเฉลี่ยมีค่าต่ำกว่าวิธีการวัดการดูดกลืนแสง มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ 0.24 ng/ μ l และสูงสุดที่ 66.32 ng/ μ l ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากหยดเลือดบนกระดาษกรอง (DBS) ที่เก็บเป็นระยะเวลา 1 – 5 ปี

DBS Storage duration (year)	UV-VIS spectrophotometer					real-time RCR	
	N	Concentration (ng/μl)		Purity (260/280)		Concentration (ng/μl)	
		Average	Min–Max	Average	Min–Max	Average	Min–Max
5	10	25.76	8.60–49.80	1.19	1.11–1.40	1.89	0.35–4.11
4	10	47.76	14.70–200.60	1.17	1.10–1.34	8.32	0.29–66.32
3	10	26.27	6.60–107.00	1.29	1.12–1.56	3.33	0.85–12.13
2	9	30.07	6.70–153.00	1.15	1.09–1.23	0.94	0.19–2.11
1	10	14.26	6.10–64.60	1.20	1.04–1.50	1.27	0.24–4.01

คุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ พบว่าค่า degradation index มีค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาเก็บ DBS ที่นานขึ้น โดยที่ 1 ปี มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 1.00 และที่ 5 ปี มีค่าสูงสุดเท่ากับ 5.02 เช่นเดียวกับค่า male degradation index ที่มีค่าเฉลี่ยต่ำสุดเท่ากับ 0.500 เมื่อเก็บ DBS นาน 1 ปี และสูงสุดเท่ากับ 1.901 เมื่อเก็บ DBS นาน 5 ปี ทุกตัวอย่างมีค่าอยู่ในระดับยอมรับได้ (default threshold ≤ 10) ถือว่าดีเอ็นเอมีการเสื่อมสภาพน้อย ค่าเฉลี่ยคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดจาก DBS ดังแสดงในตารางที่ 2

ค่า inhibition index มีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น โดยมีค่าเฉลี่ยต่ำสุดเท่ากับ 7.26 เมื่อเก็บ DBS นาน 1 ปี และสูงสุดเท่ากับ 34.88 เมื่อเก็บ DBS นาน 5 ปี ซึ่งเป็นค่าที่มากกว่าค่ายอมรับได้ (default threshold ≤ 1) เช่นเดียวกับค่า mixture index มีค่าเฉลี่ยต่ำสุดที่ 3.61 และสูงสุดที่ 6.20 โดยเป็นค่าที่มากกว่าค่ายอมรับได้ (default threshold ≤ 2) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 คุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดจาก DBS เก็บระหว่างปี พ.ศ. 2558–2562 วิเคราะห์โดยเทคนิค real-time PCR แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของ degradation index, male degradation index, inhibition index, และ mixture index

Parameter	Default threshold	DBS storage (years)				
		5	4	3	2	1
Degradation index	≤ 10	5.02	2.10	1.80	1.66	1.00
Male degradation index	≤ 10	1.90	1.50	0.60	0.77	0.50
Inhibition index	≤ 1	7.26	9.91	12.90	12.52	34.88
Mixture index	≤ 2	3.61	4.70	6.20	6.00	5.70

วิจารณ์

การศึกษาความเข้มข้นเฉลี่ยของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจาก DBS เก็บเป็นเวลา 1–5 ปี (ปี พ.ศ. 2558–2562) พบว่าแต่ละปีมีความแตกต่างกันโดย

ไม่สัมพันธ์กับระยะเวลา ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลต่อความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอมาจากความเข้มข้นของเลือดหรือปริมาณเม็ดเลือดขาวของผู้เสียชีวิต ซึ่งในแต่ละคนหรือแต่ละศพจะมีปริมาณที่แตกต่างกัน^(11,12) เป็นข้อจำกัด

ของการศึกษานี้ที่ไม่สามารถเปรียบเทียบดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเลือดของศพเดียวกันมีระยะเวลาเก็บรักษา DBS ต่างกันได้ เนื่องจากมีตัวอย่างที่จำกัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก DBS เก็บไว้ 5 ปี พบว่ามีความเข้มข้นด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 6.10 – 200.60 ng/ul และด้วยวิธี real-time PCR อยู่ในช่วง 0.24 ng/μl – 66.32 ng/μl ซึ่งโดยทั่วไปปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่นำไปใช้วิเคราะห์ทางนิติเวชควรอยู่ในช่วง 0.1–0.5 ng/μl⁽¹³⁾ จึงจะสามารถตรวจพบ full profile ของการตรวจ short tandem repeat (STR) บนโครโมโซมทั้งหมด 13–24 ตำแหน่ง ตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยมาก เรียกว่า trace DNA หรือ touch DNA ที่เก็บตัวอย่างมาจากสถานที่เกิดเหตุ อาจสกัดดีเอ็นเอได้เพียง 0.01 ng/μl แต่ยังสามารถตรวจพบ full profile ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kangsan W. et al.⁽¹⁴⁾ ทำการเปรียบเทียบชุดน้ำยา Qiagen® Investigation® 24plex QS และชุดน้ำยา ampFISTR® Identifiler® Plus PCR Amplification ในการตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 ng/μl พบว่าร้อยละของ allele detection มีค่าลดลงตามความเข้มข้นของตัวอย่างที่ลดลง

เมื่อเก็บตัวอย่าง DBS เป็นเวลานาน อาจเกิดการแตกหักของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ตามธรรมชาติ พบว่าในช่วงระยะเวลา 1–5 ปี ค่า degradation index (ค่าการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอ) มีค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เก็บ โดยที่ 5 ปี มีค่าสูงสุดที่ 5.02 ซึ่งต่ำกว่าค่ายอมรับ (default threshold ≤ 10) แสดงให้เห็นว่าตัวอย่าง DBS ที่เก็บไว้เป็นระยะเวลา 5 ปี มีการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอที่ไม่สูงมาก การเก็บ DBS จากหลอดเลือดที่มี EDTA เป็นสารกันการแข็งตัว มีข้อดีคือ EDTA ยับยั้งการทำงานของ DNase ช่วยปกป้องการทำลายจาก DNase ให้ดีเอ็นเอคงสภาพอยู่ได้ ปัจจัยการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเออาจเกิดได้จาก programmed cell death⁽¹⁵⁾ ที่เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติและมีผลต่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ทั้งนี้ตัวอย่างประเภทชีววัตถุพยานจะมีการเสื่อมสภาพของเซลล์หรือการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอซึ่งเป็นเรื่อง

ปกติที่พบได้ แต่จะพบมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ระยะเวลา ความชื้น แสงแดด อุณหภูมิ และสารเคมีเป็นต้น^(16–19) วิธีการเก็บตัวอย่าง DBS ไว้ในที่แห้งไม่ชื้น ไม่โดนแสงแดด และอุณหภูมิที่เหมาะสมมีส่วนช่วยรักษาสภาพดีเอ็นเอไม่ให้ถูกทำลาย อย่างไรก็ตามดีเอ็นเอมีการย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ หลังจากการเสียชีวิตหรือเก็บตัวอย่างออกจากร่างกาย จึงเป็นข้อกำหนดให้ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้เสียชีวิตที่เสียชีวิตไม่เกิน 24 ชั่วโมง

ค่า male degradation index จากกลุ่มตัวอย่างของเพศชาย ในช่วงระยะเวลาการเก็บ DBS นาน 1–5 ปี จากการศึกษ พบว่ามีค่าเฉลี่ยต่ำสุดที่ 0.50 และสูงสุดที่ 1.90 ซึ่งไม่เกินค่ายอมรับ (default threshold ≤ 10) ทำให้เห็นว่าตัวอย่าง DBS ที่เก็บไว้เป็นระยะเวลา 5 ปี มีการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอที่เป็นโครโมโซม Y ของเพศชายค่อนข้างน้อย แม้มีการแตกหักของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ตามธรรมชาติ แต่ยังคงอยู่ในระดับที่สามารถนำไปใช้ในการระบุตัวบุคคลได้ ทั้งในกรณีคดีความผิดทางเพศหรือการหาความสัมพันธ์ทางสายเลือดร่วมบิดาเดียวกัน

นอกจากนี้ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ถือเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการตรวจทางนิติเวชว่ามีสิ่งปนเปื้อนหรือมีแนวโน้มที่จะเกิดการยับยั้งปฏิกิริยา PCR หรือไม่ โดยความบริสุทธิ์ (260/280 ratio) ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ควรอยู่ในช่วง 1.5–2.0⁽²⁰⁾ หากต่ำกว่า 1.5 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้อาจปนเปื้อนโปรตีน และฟีนอล แต่ถ้ามากกว่า 2.0 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีการปนเปื้อนอาร์เอ็นเอ จากผลการทดลองช่วงระยะเวลา 1–5 ปีที่ผ่านมา พบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 1.04–1.56 สอดคล้องกับค่า inhibition index ที่มากกว่า 1 และ mixture index ที่มากกว่า 2 ซึ่งแสดงว่าตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจาก DBS มีการปนเปื้อนของโปรตีนและ/หรือฟีนอล เนื่องจากตัวอย่างเลือดหรือองค์ประกอบต่างๆ ที่มีอยู่ในกระดาดชกรองอาจมีสารที่ยับยั้งปฏิกิริยาและ PCR ดังนั้นก่อนการนำตัวอย่างดีเอ็นเอไปทดสอบในขั้นตอนการตรวจทางนิติเวชระดับที่ละเอียดขึ้น ควรทำให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้ในครั้งแรกมีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยการทำ re-extraction หรือพิจารณาเลือกชุดสกัด

ที่สามารถจัดการปนเปื้อนที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น การศึกษานี้ไม่ได้นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจวิเคราะห์ STR จึงไม่มีข้อมูลว่าดีเอ็นเอมีคุณภาพเพียงพอต่อการตรวจหรือไม่ ซึ่งควรมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

ในการพัฒนากระบวนการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อระบุตัวบุคคลให้มีคุณภาพและประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น ด้วยวิธีการเพิ่มจำนวนตำแหน่งบนโครโมโซมให้มีความหลากหลายและมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น โดยหลักการตรวจเพื่อระบุตัวบุคคลจะเป็นไปตามหลักสากล Combined DNA Index System (CODIS)⁽²¹⁾ ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้ตัวอย่างเพื่อการสกัดดีเอ็นเอที่หลากหลาย เช่น เลือด เนื้อเยื่อ เส้นผม โครงกระดูก เซลล์เยื่อกระดูกงูแก่ หรือเนื้อเยื่อต่างๆ เป็นต้น ทำให้ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้แตกต่างกัน ทั้งนี้การเลือกชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอมีส่วนทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอมีความเข้มข้นที่พอเหมาะหรือปริมาณน้อยมากหรือเป็นดีเอ็นเอในกลุ่ม touch DNA หรือ trace DNA ที่เก็บจากผิวสัมผัสที่มีตัวอย่างเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เช่น จากเซลล์ผิวหนังที่หลงเหลืออยู่บนวัตถุหลังจากการสัมผัสหรือหยิบจับโดยไม่ตั้งใจ ในทางปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการมีวิธีการแก้ปัญหาด้วยการเพิ่มจำนวนตำแหน่งของ STR ให้มีตำแหน่งมากขึ้นจาก 16 เป็น 19, 24 หรือ 32 ตำแหน่ง เพื่อให้มีความถูกต้องแม่นยำและมีความน่าเชื่อถือเพิ่มขึ้น เนื่องจากอาจมีบางตำแหน่งขาดหายไปหรือเกิด allele drop out ขึ้น เพราะปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้เริ่มต้นมีปริมาณน้อยและส่งผลต่อการแปลผล ดังนั้นการเพิ่มตำแหน่งของ STR จึงเป็นสิ่งสำคัญในการระบุเอกลักษณ์บุคคล⁽²²⁻²⁷⁾ แต่การเพิ่มตำแหน่ง STR ต้องใช้ชุดทดสอบที่มีราคาสูงขึ้น

เนื่องจากงานวิจัยนี้ไม่มีผลการศึกษาของเลือดที่เก็บใหม่ day 0 จึงทำให้ไม่สามารถตรวจเปรียบเทียบได้ในแต่ละปีจะมีตัวอย่างเลือดของผู้เสียชีวิตที่ผ่านหลักเกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างที่น้อยดังนั้นเพื่อข้อมูลที่สมบูรณ์ควรมีการคัดเลือกตัวอย่างหรือปรับเกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างใหม่ เพื่อให้ได้จำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นงานนำตัวอย่างที่มีอยู่มาทำการศึกษา ดังนั้นเพื่อให้งานวิจัยสมบูรณ์ที่สุดผู้วิจัยควรมีการนำตัวอย่างที่เก็บในระยะเวลา day 0 มาตรวจเปรียบเทียบต่อไปในอนาคต

สรุป

จากผลการศึกษาคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอจากหยดเลือดบนกระดาษกรอง พบว่าหยดเลือดที่เก็บไว้บนกระดาษกรองยี่ห้อ Whatman เบอร์ 1 มีช่วงระยะเวลาการเก็บ 1-5 ปี ตัวอย่างทั้งหมดมีการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอในปริมาณน้อย มีปริมาณและคุณภาพเพียงพอต่อการนำไปใช้ในกระบวนการระบุตัวบุคคลสำหรับงานนิติเวชได้ต่อไป โดยมีประเด็นเรื่องความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ต้องพิจารณาวิธีการสกัดหรือวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่มีผลกระทบจากความปนเปื้อนของดีเอ็นเอ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย ขอขอบคุณ ผศ.นพ.ทศนัย พิพัฒน์โชติธรรม ในการตรวจสอบความถูกต้องและให้คำปรึกษา เพื่อให้ผลงานสมบูรณ์ และขอขอบคุณบุคลากรสาขานิติเวช โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ทุกท่าน สำหรับการให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลืองานวิจัยสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Rahikainen AL, Palo JU, de Leeuw W, Budowle B, Sajantila A. DNA quality and quantity from up to 16 years old post-mortem blood stored on FTA cards. *Forensic Sci Int* 2016; 261: 148-53.
2. Chaisomchit S, Wichajarn R, Chowpreecha S, Chareonsirawatana W. A simple method for extraction and purification of genomic DNA from dried blood spots on filter paper. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003; 34(3): 641-5.
3. Choi EH, Lee SK, Ihm C, Sohn YH. Rapid DNA extraction from dried blood spots on filter paper: potential applications in biobanking. *Osong Public Health Res Perspect* 2014; 5(6): 351-7.

4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Blood collection on filter paper for newborn screening program; approved standard-sixth edition. CLSI document NBS01-A6. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
5. Lin Z, Suzow JG, Fontaine JM, Naylor EW. A simple automated DNA extraction method for dried blood specimens collected on filter paper. *JALA: J Assoc Lab Autom* 2005; 10(5): 310-4.
6. Hue NT, Chan ND, Phong PT, Linh NT, Giang ND. Extraction of human genomic DNA from dried blood spots and hair roots. *Int J Biosci Biochem Bioinforma* 2012; 2(1): 21-6.
7. Fischer A, Lejczak C, Lambert C, Servais J, Makombe N, Rusine J, et al. Simple DNA extraction method for dried blood spots and comparison of two PCR assays for diagnosis of vertical human immunodeficiency virus type 1 transmission in Rwanda. *J Clin Microbiol* 2004; 42(1): 16-20.
8. Chathirat N. Predicting the UV spectrum of single stranded DNA. *Appl Mech Mater* 2015; 804: 163-6.
9. US 2014/0234834 A1. Method for quantifying human DNA. Patent Application Publication. [online]. 2014; [16 screens]. Available from: URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/fe/3b/41/28b4f9b2bdcbe5/US20140234834A1.pdf>.
10. Lee SB, McCord B, Buel E. Advances in forensic DNA quantification: a review. *Electrophoresis* 2014; 35(21-22): 3044-52.
11. Wilantho A, Mokmak W, Jenwitheesuk E. Genomics DNA extraction from clotted blood of cattle. *KKU Vet J* 2009; 19(1): 16-29.
12. St Julien KR, Jelliffe-Pawlowski LL, Shaw GM, Stevenson DK, O'Brodovich HM, Krasnow MA, Stanford BPD Study Group. High quality genome-wide genotyping from archived dried blood spots without DNA amplification. *PLoS One* 2013; 8(5): e64710. (7 pages).
13. Moretti TR, Moreno LI, Smerick JB, Pignone ML, Hizon R, Buckleton JS, et al. Population data on the expanded CODIS core STR loci for eleven populations of significance for forensic DNA analyses in the United States. *Forensic Sci Int Genet* 2016; 25: 175-81.
14. Kangsanon W, Somboonngern O, Pitileartpanya S, Pipatsatitpong D. Comparisons of DNA analysis using Qiagen® Investigator® 24plex QS kit and AmpFlSTR® Identifier® Plus PCR amplification kit. *Science & Technology Asia* 2020; 25(2): 75-85.
15. Nagata S. DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 853-875.
16. Chadatong P, Lomthaisong K, Muisuk K. The effect of the sunlight on autosomal STR analysis of bloodstains on different types of clothes. In: The 19th National and international graduate research conference; 2018 March 9. Khon Kaen, Thailand: Khon Kaen University; 2018. p. 635-641.
17. Al-Kandari NM, Singh J, Sanger VC. Time-dependent effects of temperature and humidity on quantity of DNA in samples of human saliva, blood and semen in Kuwait. *IJPSR* 2016; 7(7): 2852-73.
18. Garvin AM, Holzinger R, Berner F, Krebs W, Hostettler B, Lardi E, et al. The forensiX evidence collection tube and its impact on DNA preservation and recovery. *BioMed Res Int* 2013; 2013: 105797. (7 pages).
19. Agetsuma-Yanagihara Y, Inoue E, and Agetsuma N. Effects of time and environmental conditions on the quality of DNA extracted from fecal samples for genotyping of wild deer in a warm temperate broad-leaved forest. *Mamm Res* 2017; 62: 201-7.
20. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 1997; 22(3): 474-81.

21. Hares DR. Selection and implementation of expanded CODIS core loci in the United States. *Forensic Sci Int Genet* 2015; 17: 33-4.
22. Zahra A, Hussain B, Jamil A, Ahmed Z, Mahboob S. Forensic STR profiling based smart barcode, a highly efficient and cost effective human identification system. *Saudi J Biol Sci* 2018; 25(8): 1720-3.
23. Fan GY, Wang DP, Song DL, Zheng XK, Zhu J, Long B. Developmental validation study of a 32-plex STR direct amplification system for forensic reference samples. *Forensic Sci Int* 2021; 327: 110977. (8 pages).
24. Phua CH, Kitpipit T, Pradutkanchana J, Duangsuwan P, Samai W, Thanakiatkrai P. Direct STR typing from human bones. *Forensic Sci Int* 2022; 330: 111099.
25. Xiao C, Yang X, Liu H, Liu C, Yu Z, Chen L, et al. Validation and forensic application of a new 19 X-STR loci multiplex system. *Leg Med* 2021; 53: 101957. (4 pages).
26. Emery MV, Bolhofner K, Winingear S, Oldt R, Montes M, Kanthaswamy S, et al. Reconstructing full and partial STR profiles from severely burned human remains using comparative ancient and forensic DNA extraction techniques. *Forensic Sci Int Genet* 2020; 46: 102272. (8 pages).
27. Hall CL, Kesharwani RK, Phillips NR, Planz JV, Sedlazeck FJ, Zascavage RR. Accurate profiling of forensic autosomal STRs using the Oxford Nanopore Technologies MinION device. *Forensic Sci Int Genet* 2022; 56: 102629. (10 pages).

A Study on the Quality and Quantity of DNA from Dried Blood Spots in Forensic Case Work

Thanitchet Khetkham¹ and Tossanai Pipatchotitham²

¹*Division of Forensic Medicine, Thammasat University Hospital, Patumtani 12120, Thailand*

²*Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine Thammasat University, Patumtani 12120, Thailand*

ABSTRACT The Division of Forensic Medicine at Thammasat University Hospital collected dried blood spots (DBS) on Whatman filter paper from deceased individuals who had died within 24 hours. To reduce sample storage space in collecting biological evidence, sample spoilage and biodegradation, which frequently occur, this study was undertaken aiming to explore the DNA content and quality of 49 DBS specimens that had been kept for 1–5 years. The results showed that DNA concentrations as measured by 260/280 nm absorbances were 6.10–200.60 ng/μL with DNA purity of 1.04–1.56. In addition, as analyzed with real-time PCR, the DNA concentrations were 0.24–66.32 ng/μL. Other DNA quality parameters or indices were found: Degradation index, 1.000–5.020; Inhibition index, 7.266–34.882; Mixture index, 3.613–6.200, and Male degradation index, 0.500–1.901. In conclusion, DNA degradation values increased more over time during the period of 1–5 years, but the DNA quantity was sufficient for forensic human identification. Further development efforts should be made to create a method for effective DNA extraction and inhibitive substance elimination; then the DNA samples extracted from DBS filter paper would be better used in forensic medicine.

Keywords: Dried blood spot on filter paper, DNA degradation, Forensic medicine

การยกระดับความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ ด้านเคมีของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ สู่มาตรฐานห้องปฏิบัติการในรูปแบบ Peer evaluation

ปาริชาติ กัญญาบุญ ทิพย์ภรณ์ วินิจสร อุษา ถนอมเงิน ดนุสดา แก้วมัน มุกิตา คณหา พิราม พานทอง
ศัลยาภรณ์ ทวีทัศน์โรจน์ และ วิสิฐศักดิ์ วุฒิอดิเรก
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ นครสวรรค์ 60000

บทคัดย่อ มาตรฐานด้านความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการที่มีประสิทธิภาพและครอบคลุมทุกมิติมีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการปฏิบัติงานอย่างปลอดภัย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ จุดอ่อน จุดแข็ง และช่องว่างศักยภาพความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการเคมีของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ เพื่อให้เกิดการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการ ตามแนวทางคู่มือการตรวจประเมินความปลอดภัยห้องปฏิบัติการของสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม ครั้งที่ 2 ปี พ.ศ. 2558 โดยใช้แบบสำรวจ ESPReL checklist จำนวน 162 รายการ เป็นเครื่องมือประเมินห้องปฏิบัติการปลอดภัย 7 องค์ประกอบ เพื่อชี้บ่งอันตรายทางห้องปฏิบัติการระหว่างปี พ.ศ. 2562-2564 จากผลการตรวจประเมินโดยแม่ข่ายมหาวิทยาลัยนเรศวร เมื่อเดือนกันยายน พ.ศ. 2564 พบว่าห้องปฏิบัติการได้รับคะแนนประเมินรวมร้อยละ 82.6 องค์ประกอบที่มีคะแนนประเมินต่ำกว่าร้อยละ 80.0 ได้แก่ การบริหารระบบการจัดการด้านความปลอดภัย การให้ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับด้านความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ ระบบการจัดการของเสีย และระบบการจัดการสารเคมี ที่ร้อยละ 66.7, 66.7, 71.4 และ 74.6 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลในเชิงระบบและดำเนินการพัฒนาระดับความปลอดภัย หลังจากนั้นตรวจประเมินซ้ำโดยแม่ข่ายมหาวิทยาลัยนเรศวร เมื่อเดือนธันวาคม พ.ศ. 2564 พบว่าห้องปฏิบัติการมีสถานภาพความปลอดภัยเพิ่มขึ้นที่คะแนนประเมินรวมร้อยละ 94.2 การสื่อสารและสร้างความตระหนักรู้ด้านความปลอดภัยในบุคลากรทุกระดับ สามารถสร้างระบบการทำงานด้านความปลอดภัยที่ครอบคลุมในทุกองค์ประกอบ ส่งเสริมให้เกิดวัฒนธรรมความปลอดภัยที่ยั่งยืน มีระบบการจัดการด้านความปลอดภัยในทุกมิติ และเป็นไปตามมาตรฐานการรับรองในรูปแบบ peer evaluation อย่างไรก็ตามการเฝ้าระวังและการวิเคราะห์ข้อมูลอย่างต่อเนื่องจะช่วยให้เกิดระบบความปลอดภัยที่ยั่งยืนของหน่วยงานต่อไป

คำสำคัญ: ESPReL checklist, มาตรฐานด้านความปลอดภัย, Peer evaluation

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

Received: 23 March 2023

Revised: 26 July 2023

Accepted: 27 July 2023

บทนำ

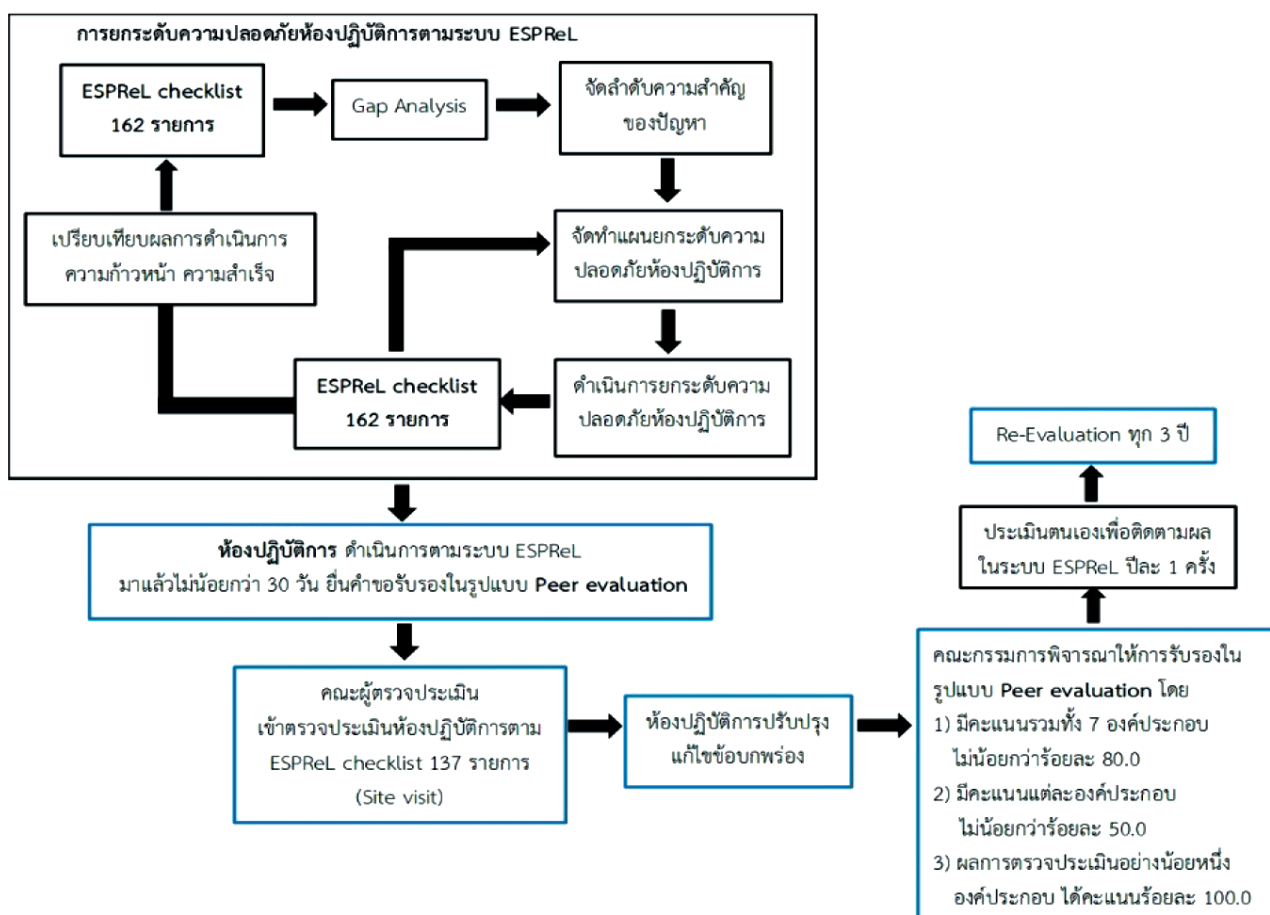
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีภารกิจหลักในการให้บริการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการด้านชั้นสูตรสาธารณสุข และด้านคุ้มครองผู้บริโภคด้านสาธารณสุข การปฏิบัติงานทางห้องปฏิบัติการหลายกิจกรรมมีความเสี่ยงอันตราย เช่น อันตรายทางด้านกายภาพ สารเคมี สารพิษ สารก่อมะเร็ง สารกัมมันตรังสี สารชีวภาพ และของเสียที่เกิดจากห้องปฏิบัติการอาจแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก ดังนั้นเพื่อป้องกันไม่ให้ผู้ปฏิบัติงานเกิดอันตรายจากการทำงานและป้องกันไม่ให้เกิดสารชีวภาพและสารเคมีอันตรายแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อม การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการอย่างถูกต้องและปลอดภัยจึงถือเป็นหัวใจสำคัญ⁽¹⁾ ปัจจุบันการดำเนินงานด้านความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการด้านชั้นสูตรสาธารณสุขเป็นไปตามหลักความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosafety) และการรักษาความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosecurity) อยู่ภายใต้พระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2558 และผ่านการรับรองด้านความปลอดภัยห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามระบบมาตรฐาน ISO 15190 แต่การรับรองนี้ ยังไม่ครอบคลุมความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการด้านเคมีของหน่วยงานที่ปฏิบัติงานกับสารเคมี ซึ่งมีอันตรายต่อสุขภาพและมีความเสี่ยงสูง ดังนั้นการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการด้านเคมีของหน่วยงานไปสู่การรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการในรูปแบบ peer evaluation ซึ่งเป็นมาตรฐานในระดับประเทศเพื่อให้เกิดการพัฒนาและสร้างระบบการจัดการความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการในรูปแบบห้องปฏิบัติการปลอดภัยอย่างเป็นรูปธรรม ส่งเสริมให้เกิดวัฒนธรรมความปลอดภัยที่ยั่งยืน มีระบบการจัดการด้านความปลอดภัยที่ครอบคลุมทุกมิติ ตลอดจนพัฒนาศักยภาพบุคลากรในทุกกระดับให้เกิดการพัฒนาด้านความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการอย่างต่อเนื่อง ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ จึงได้เข้าร่วมโครงการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการภาคเหนือตอนล่างของสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ กับแม่ข่ายมหาวิทยาลัยนเรศวร ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2562 ถึงปัจจุบัน

สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ มีนโยบายการจัดการความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการภายใต้โครงการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการวิจัยในประเทศไทย (enhancement of safety practice of research laboratory in Thailand, ESPReL) เพื่อขับเคลื่อนให้เกิดลักษณะของห้องปฏิบัติการปลอดภัยอย่างเป็นรูปธรรม^(2,3) โดยใช้แบบประเมินมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการ หรือ ESPReL checklist จำนวน 162 รายการ เป็นเครื่องมือประเมินตามกรอบแนวคิดห้องปฏิบัติการปลอดภัย 7 องค์ประกอบ ที่เชื่อมโยงกัน เพื่อชี้ให้เห็นถึงความเสี่ยงแต่ละด้านที่สัมพันธ์กัน ประกอบด้วย 1) การบริหารระบบการจัดการด้านความปลอดภัย ทำหน้าที่เชื่อมโยงกับทุกองค์ประกอบ ตั้งแต่ระดับนโยบาย โครงสร้างการบริหารจัดการความปลอดภัย และการกำหนดหน้าที่รับผิดชอบของห้องปฏิบัติการ 2) ระบบการจัดการสารเคมี เพื่อควบคุมดูแลสารเคมีให้มีความปลอดภัยทั้งระบบ ตั้งแต่ระบบข้อมูล การจัดเก็บ การเคลื่อนย้าย การจัดการสารเคมีที่ไม่ใช้แล้ว การนำข้อมูลไปใช้เพื่อจัดการความเสี่ยง การบริหารจัดการ และการจัดสรรงบประมาณ 3) ระบบการจัดการของเสีย เพื่อให้มีระบบข้อมูล การจัดทำแนก และการเก็บที่ถูกต้อง ไม่แพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อม เป็นประโยชน์ต่อการบริหารจัดการ การประเมินความเสี่ยงที่อันตรายจากของเสีย และมีมาตรการลดการเกิดของเสียในหน่วยงาน 4) ลักษณะทางกายภาพของห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ และเครื่องมือ เพื่อให้เกิดลักษณะของห้องปฏิบัติการที่เอื้อต่อการทำงานอย่างปลอดภัยทั้งในภาวะปกติและภาวะฉุกเฉิน 5) ระบบการป้องกันและแก้ไขภัยอันตราย เพื่อให้เกิดระบบบริหารความเสี่ยงจากข้อมูลจริงในทุกด้าน มีแผนป้องกันและความพร้อมต่อการตอบโต้เหตุฉุกเฉิน 6) การให้ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับด้านความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ เพื่อสร้างความตระหนักและให้ความรู้พื้นฐานด้านความปลอดภัยที่เหมาะสม จำเป็นและต่อเนื่องแก่ผู้เกี่ยวข้องแต่ละกลุ่มเป้าหมายที่มีบทบาทหน้าที่แตกต่างกัน เพื่อให้เกิดความเข้าใจและสามารถปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ หรือทำงานที่เกี่ยวข้องกับสารเคมีได้อย่างปลอดภัยและลดความเสี่ยงในการเกิดอุบัติเหตุได้ และ 7) การจัดการข้อมูลและเอกสาร เพื่อให้เกิดระบบเอกสารด้านความปลอดภัยที่สามารถ

ใช้เป็นบทเรียนและส่งเสริมกันได้เมื่อเปลี่ยนผู้รับผิดชอบ เป็นการต่อยอดความรู้ในทางปฏิบัติ เพื่อให้การพัฒนา ด้านความปลอดภัยเป็นไปได้อย่างต่อเนื่อง⁽⁴⁾

peer evaluation หรือรูปแบบการยอมรับร่วม หมายถึง การยอมรับในความเท่าเทียมกันและกันในระดับ พหุภาคี ในผลการตรวจประเมินและการรับรองสำหรับ ระบบการจัดการความปลอดภัยของห้องปฏิบัติการ หรือหน่วยงานที่ยื่นขอรับรอง จัดทำขึ้นเพื่อตรวจประเมิน และรับรองมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการ โดยใช้ระบบ ESPReL เป็นเครื่องมือในการประเมิน สภาพความปลอดภัยของห้องปฏิบัติการร่วมกับการตรวจ ประเมินและรับรองห้องปฏิบัติการ โดยคณะกรรมการ ตรวจประเมินที่ได้รับการแต่งตั้งจากสำนักงานการวิจัย

แห่งชาติ มุ่งเน้นให้เกิดเครือข่ายด้านความปลอดภัย ของห้องปฏิบัติการ ร่วมขับเคลื่อนการพัฒนามาตรฐาน ห้องปฏิบัติการปลอดภัยที่เป็นมาตรฐานเดียวกันใน ระดับประเทศ โดยห้องปฏิบัติการที่จะได้รับการรับรอง ในรูปแบบ peer evaluation ต้องดำเนินการตามระบบ ESPReL (ESPReL checklist จำนวน 162 รายการ) มาแล้วไม่น้อยกว่า 30 วัน และต้องผ่านการตรวจประเมิน ตามข้อกำหนดพื้นฐาน ESPReL checklist จำนวน 137 รายการ จากคณะผู้ตรวจประเมินโดยมีผลคะแนนเฉลี่ย ทั้ง 7 องค์ประกอบ ไม่น้อยกว่าร้อยละ 80.0 แต่ละองค์ ประกอบต้องมีคะแนนไม่น้อยกว่าร้อยละ 50.0 และมีผล การตรวจประเมินอย่างน้อย 1 องค์ประกอบ ได้คะแนน ร้อยละ 100.0⁽⁵⁾ กระบวนการขอรับรอง ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แนวทางการยกระดับความปลอดภัยห้องปฏิบัติการตามระบบ ESPReL และการขอรับรองมาตรฐาน ห้องปฏิบัติการในรูปแบบ peer evaluation^(2,4,5)

การศึกษาค้างนี้เป็นการวิเคราะห์ผลการดำเนินงานของการยกระดับความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการเคมีจากการประเมินตามแบบสำรวจ ESPReL checklist ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ในช่วงปี พ.ศ. 2562-2564 เพื่อหาจุดอ่อน จุดแข็ง และช่องว่างศักยภาพความปลอดภัย (gap analysis) ในห้องปฏิบัติการด้านเคมี สำหรับกำหนดมาตรการและแนวปฏิบัติ เพื่อนำไปสู่การบริหารจัดการความเสี่ยงด้านความปลอดภัย และการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการด้านเคมีของหน่วยงานในการขอรับรองห้องปฏิบัติการในรูปแบบ peer evaluation

วัสดุและวิธีการ

การศึกษาค้างนี้เป็นการวิเคราะห์ผลการดำเนินงานตามแนวทางเพื่อความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการของสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ^(2,4) เก็บข้อมูลจากการประเมินสถานภาพความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการด้านเคมีเพื่อป้องกันอันตรายระหว่างปี พ.ศ. 2562-2564 จำนวน 5 ครั้ง โดยแบ่งเป็นการตรวจประเมินด้วยตนเองตามแบบสำรวจ ESPReL checklist 162 รายการ จำนวน 3 ครั้ง และการตรวจประเมินความปลอดภัยห้องปฏิบัติการ

ตามมาตรฐาน ESPReL checklist จำนวน 162 รายการของห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ เลขทะเบียน: 2-0100-0086-6 โดยแม่ข่ายมหาวิทยาลัยนเรศวร จำนวน 2 ครั้ง วิเคราะห์ข้อมูลผ่านเว็บไซต์สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (<http://esprel.labsafety.nrct.go.th>) ประมวลผลออกมาในรูปแบบร้อยละ ผลที่ได้นำมาวิเคราะห์หาจุดอ่อน จุดแข็ง และช่องว่างศักยภาพความปลอดภัย (gap analysis) ในห้องปฏิบัติการด้านเคมี โดยพิจารณาองค์ประกอบความปลอดภัยที่มีคะแนนน้อยกว่าร้อยละ 80.0 และองค์ประกอบที่มีผลกระทบสูง นำมาจัดทำกระบวนการพัฒนาระดับความปลอดภัยโดยจัดลำดับความสำคัญของปัญหาภายใต้ทรัพยากรที่มีอยู่เป็นหลัก ดำเนินการปรับปรุงพัฒนาห้องปฏิบัติการในรายการกิจกรรมที่สามารถดำเนินการให้แล้วเสร็จภายในระยะเวลา 6 เดือน หลังจากนั้นทำการตรวจประเมินซ้ำตามมาตรฐาน ESPReL checklist จำนวน 162 รายการ ในครั้งที่ 6 (ธันวาคม พ.ศ. 2564) โดยแม่ข่ายมหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อประเมินสถานภาพความปลอดภัยห้องปฏิบัติการหลังการพัฒนาระดับมาตรฐานความปลอดภัย และเตรียมความพร้อมในการขอรับรองห้องปฏิบัติการในรูปแบบ peer evaluation ในลำดับถัดไป รายละเอียดหัวข้อการประเมิน ดังแสดงในตารางที่ 1^(4,6)

ตารางที่ 1 รายละเอียดหัวข้อการประเมินตามมาตรฐาน ESPReL checklist ทั้ง 7 องค์ประกอบ^(4,6)

องค์ประกอบ	วัตถุประสงค์	รายละเอียดการประเมิน
องค์ประกอบที่ 1 การบริหารจัดการระบบความปลอดภัย	เพื่อประเมินความจริงจังตั้งแต่ระดับนโยบายด้านความปลอดภัยของห้องปฏิบัติการ	ข้อมูลระดับนโยบาย/แผนงานเชิงโครงสร้าง การกำหนดผู้รับผิดชอบ คำสั่ง ประกาศ แต่งตั้ง และ/หรือแผนปฏิบัติการ
องค์ประกอบที่ 2 ระบบการจัดการสารเคมี	เพื่อประเมินสถานภาพการจัดการสารเคมีในห้องปฏิบัติการ	สารบบสารเคมี การจัดเก็บ การเคลื่อนย้าย การจัดการสารเคมีที่ไม่ใช้แล้ว การควบคุมความเสี่ยงที่เกิดจากอันตรายสารเคมี และการใช้ประโยชน์จากข้อมูลเพื่อการบริหารจัดการ
องค์ประกอบที่ 3 ระบบการจัดการของเสีย	เพื่อประเมินสถานภาพการจัดการของเสียในห้องปฏิบัติการ	ระบบข้อมูล การจำแนก การเก็บ การใช้ประโยชน์จากข้อมูลเพื่อการบริหารจัดการ การลดการเกิดของเสีย การบำบัดและการกำจัดของเสีย
องค์ประกอบที่ 4 ลักษณะทางกายภาพของห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ และเครื่องมือ	เพื่อประเมินความสมบูรณ์เหมาะสมของโครงสร้างพื้นฐานทางกายภาพ อุปกรณ์ และเครื่องมือภายในห้องปฏิบัติการ	ข้อมูลเชิงสถาปัตยกรรม สถาปัตยกรรมภายในวิศวกรรมโครงสร้าง พื้นที่การใช้งานจริง วัสดุที่ใช้ ระบบสัญญาณ ระบบไฟฟ้า ระบบระบายอากาศ ระบบสาธารณูปโภค ระบบฉุกเฉินและระบบติดต่อสื่อสาร

ตารางที่ 1 รายละเอียดหัวข้อการประเมินตามมาตรฐาน ESPReL checklist ทั้ง 7 องค์ประกอบ^(4,6) (ต่อ)

องค์ประกอบ	วัตถุประสงค์	รายละเอียดการประเมิน
องค์ประกอบที่ 5 ระบบการป้องกันและแก้ไข ภัยอันตราย	เพื่อประเมินความพร้อมและ การตอบโต้ภาวะฉุกเฉิน	การบริหารความเสี่ยง การสื่อสารความเสี่ยง การ จัดการด้านความปลอดภัย มาตรการป้องกัน แผนป้องกันและตอบโต้ภาวะฉุกเฉิน ข้อปฏิบัติ เพื่อความปลอดภัยส่วนบุคคล และระเบียบ ปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยระดับห้องปฏิบัติการ
องค์ประกอบที่ 6 การให้ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับ ด้านความปลอดภัยใน ห้องปฏิบัติการ	เพื่อประเมินการให้ความรู้แก่ บุคลากรทุกระดับที่เกี่ยวข้อง	การให้ความรู้พื้นฐานที่เหมาะสมและต่อเนื่อง ในกลุ่มเป้าหมายที่มีบทบาทต่างกัน
องค์ประกอบที่ 7 การจัดการข้อมูลและเอกสาร	เพื่อประเมินการจัดการข้อมูล และเอกสาร	ระบบเอกสารระบบการบันทึกข้อมูล คู่มือการปฏิบัติงาน

ผล

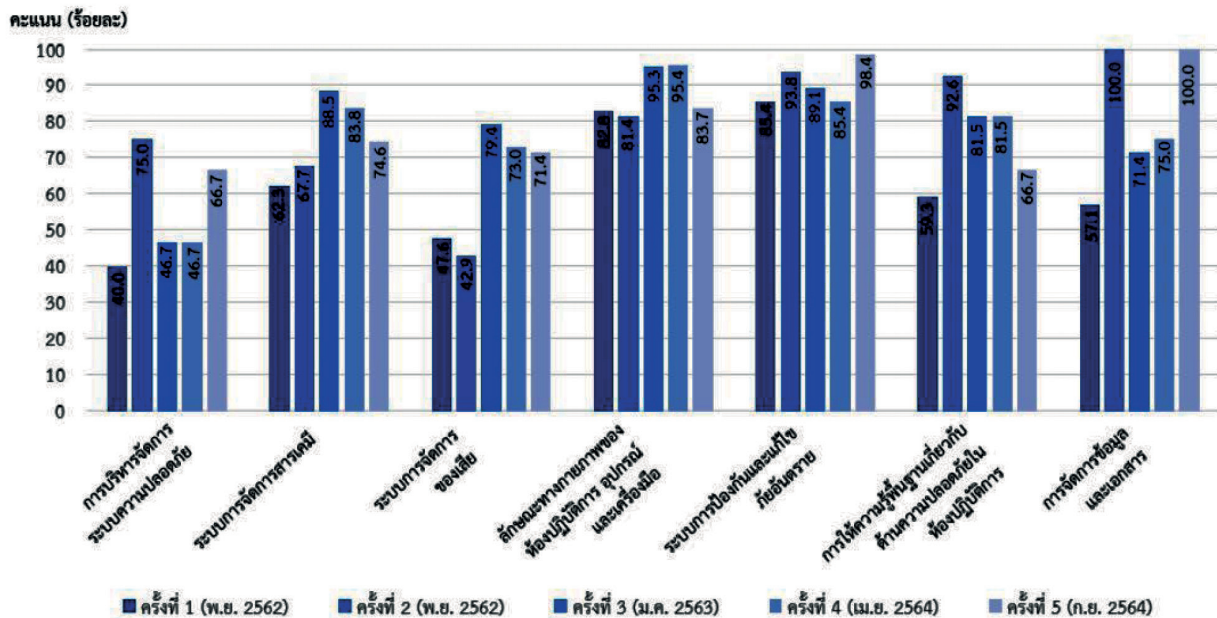
การยกระดับความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ
ด้านเคมีของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์
ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2564 โดยใช้แบบสำรวจ ESPReL
checklist จำนวน 162 รายการ ตามคู่มือการประเมิน
ความปลอดภัยห้องปฏิบัติการ รวม 5 ครั้ง โดยผลคะแนน
จากการสำรวจในครั้งที่ 1, 3 และ 4 เป็นการประเมิน
ด้วยตนเอง ผลจากการประเมินตนเองในครั้งที่ 1 พบว่า
มีองค์ประกอบที่มีคะแนนไม่ถึงร้อยละ 80.0 จำนวน
5 องค์ประกอบ ขณะที่ผลจากการตรวจประเมินในครั้งที่
3 และ 4 ทุกองค์ประกอบมีคะแนนเพิ่มขึ้นจากครั้งที่ 1
แต่ไม่แตกต่างกันมากระหว่างครั้งที่ 3 และ 4 ส่วนผล
คะแนนในครั้งที่ 2 และ 5 เป็นผลจากการตรวจประเมิน
โดยแม่ข่ายมหาวิทยาลัยนเรศวร เมื่อมีการตรวจประเมิน
ในครั้งที่ 5 พบว่ามี 4 องค์ประกอบ ที่ได้รับคะแนนประเมิน
น้อยกว่าร้อยละ 80.0 ได้แก่ การบริหารระบบการจัดการ
ด้านความปลอดภัย (องค์ประกอบที่ 1) การให้ความรู้
พื้นฐานเกี่ยวกับด้านความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ
(องค์ประกอบที่ 6) ระบบการจัดการของเสีย (องค์ประกอบ
ที่ 3) และระบบการจัดการสารเคมี (องค์ประกอบที่ 2)
โดยมีคะแนนประเมินที่ร้อยละ 66.7, 66.7, 71.4 และ
74.6 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลเฉพาะผลการตรวจ
ประเมินโดยแม่ข่าย พบว่าการบริหารจัดการระบบความ
ปลอดภัย (องค์ประกอบที่ 1) และการให้ความรู้พื้นฐาน

ด้านความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ (องค์ประกอบที่ 6)
ได้รับคะแนนประเมินลดลงที่ร้อยละ 66.7 ในทั้งสอง
องค์ประกอบ จุดแข็งของการพัฒนา ได้แก่ การจัดการ
ข้อมูลและเอกสาร (องค์ประกอบที่ 7) ระบบการป้องกัน
และแก้ไขภัยอันตราย (องค์ประกอบที่ 5) และลักษณะ
ทางกายภาพของห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ และเครื่องมือ
(องค์ประกอบที่ 4) โดยมีคะแนนประเมินที่ร้อยละ
100.0, 98.4 และ 83.7 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2

เมื่อนำข้อมูลความไม่สอดคล้อง ข้อเสนอแนะ
และจุดที่ควรพัฒนาในองค์ประกอบที่มีคะแนนประเมิน
น้อยกว่าร้อยละ 80.0 ได้แก่ องค์ประกอบที่ 1-3 และ
6 และในกิจกรรมที่มีผลกระทบต่อภาพรวมด้านความ
ปลอดภัยของหน่วยงาน เช่น งานระบบฉุกเฉินและระบบ
ติดต่อสื่อสาร (องค์ประกอบที่ 4) การเตรียมความพร้อม/
ตอบโต้ภาวะฉุกเฉิน (องค์ประกอบที่ 5) จัดลำดับ
ความสำคัญ ความเร่งด่วน ผลกระทบโดยรวม และความ
เป็นไปได้ในการดำเนินการให้แล้วเสร็จภายในระยะเวลา
6 เดือน โดยแบ่งเป็นกิจกรรมที่สามารถดำเนินการได้
ภายใน 3 เดือน และภายหลัง 3 เดือน เป็นข้อมูลนำเข้าใน
การดำเนินการยกระดับความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ
ด้านเคมีของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์
พบข้อมูลกิจกรรมที่สามารถดำเนินการได้ ดังแสดง
ในตารางที่ 2 และ 3 ได้แก่ การจัดการข้อมูลสารเคมี

การจัดเก็บสารเคมี การจัดการข้อมูลของเสีย การลด การเกิดของเสีย หลักฐานการให้ความรู้ด้านความปลอดภัย และกฎหมายที่เกี่ยวข้องแก่ ผู้บริหาร หัวหน้าห้องปฏิบัติการ

ผู้ปฏิบัติงาน และแม่บ้าน การแสดงข้อมูลจำเพาะหรือ เครื่องหมายสากลแสดงอันตรายแยกแยะรายห้องปฏิบัติการ การระบุตำแหน่งอุปกรณ์สื่อสารลงในแผนที่ตั้ง เป็นต้น



ภาพที่ 2 การยกระดับความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการด้านเคมีทั้ง 7 องค์ประกอบ ตาม ESPReL checklist จำนวน 162 รายการ โดยการตรวจประเมินด้วยตนเอง (ครั้งที่ 1, 3 และ 4) และการตรวจประเมินโดยแม่ข่ายมหาวิทยาลัยนเรศวร (ครั้งที่ 2 และ 5) ทางห้องปฏิบัติการด้านเคมีของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2564

ตารางที่ 2 การจัดลำดับความสำคัญแยกรายการกิจกรรมเพื่อพัฒนายกระดับความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการด้านเคมีของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์

กิจกรรมที่สามารถทำได้ภายใน 3 เดือน	กิจกรรมที่สามารถทำได้ภายหลัง 3 เดือน
2.2 การจัดเก็บสารเคมี	2.1 การจัดการข้อมูลสารเคมี
2.3 การเคลื่อนย้ายสารเคมี	3.1.3 การจัดการข้อมูลของเสีย
3.1.1 การจัดการข้อมูลของเสีย	4.7 งานระบบฉุกเฉินและระบบติดต่อสื่อสาร
3.3 การลดการเกิดของเสีย	
1.1 การบริหารระบบการจัดการด้านความปลอดภัย	
6.1 การให้ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับด้านความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ	
4.7 งานระบบฉุกเฉินและระบบติดต่อสื่อสาร	
5.2 การเตรียมความพร้อม/ตอบโต้ภาวะฉุกเฉิน	

ตารางที่ 3 กิจกรรมการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการด้านเคมีของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์
ที่ 3 นครสวรรค์

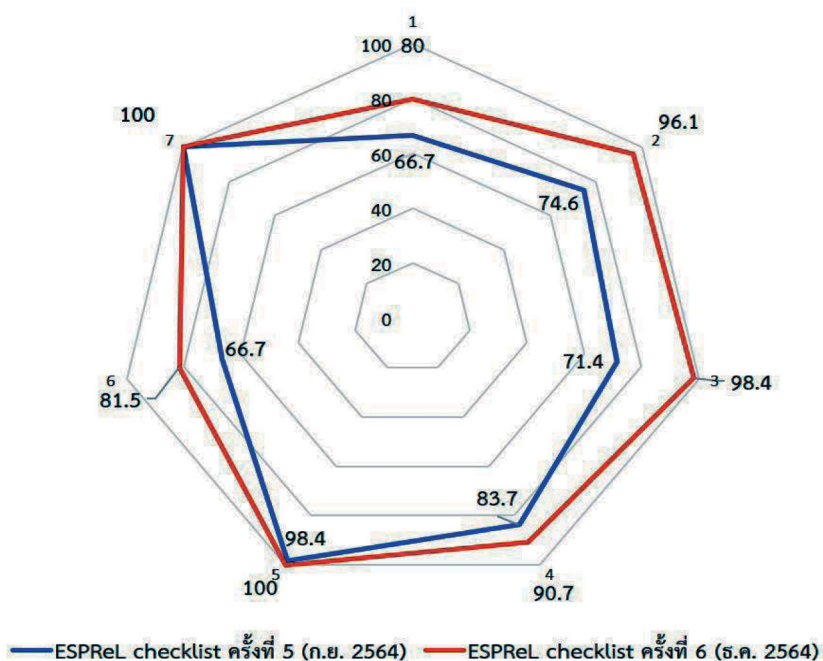
ความไม่สอดคล้อง/ข้อเสนอแนะ/ จุดที่ควรพัฒนา	กระบวนการ/กิจกรรม	ผลลัพธ์/ผลผลิตที่เป็นรูปธรรม
องค์ประกอบที่ 1 การบริหารระบบการจัดการด้านความปลอดภัย		
มีนโยบายและแผนงาน	จัดทำนโยบายและแผนงาน	ได้นโยบายและแผนงาน
ด้านความปลอดภัยระดับหน่วยงาน	ด้านความปลอดภัย	ด้านความปลอดภัย
และระดับกรมฯ แต่ยังไม่พบในระดับ ห้องปฏิบัติการ (1.1.1-1.1.2)	ระดับห้องปฏิบัติการ	ระดับห้องปฏิบัติการ
องค์ประกอบที่ 2 ระบบการจัดการสารเคมี		
1. ตรวจไม่พบหลักฐาน ระบบการบันทึกข้อมูลสารเคมี (2.1)	1. ใช้โปรแกรม ChemInvent ในการบริหารจัดการข้อมูล สารเคมี	1. มีโปรแกรมบันทึกข้อมูล สารเคมีที่มีรายละเอียดข้อมูล ที่ครบถ้วน
2. การจัดเก็บสารเคมีให้จัดเก็บ สารเคมีในตู้หรือชั้นตามหลัก incompatibility (2.2)	2. จัดเก็บสารเคมีตามหลัก incompatibility	2. มีระบบจัดวางสารเคมีที่เป็น มาตรฐานสากล
3. จัดหาภาชนะรองรับสารเคมีที่ เป็นของเหลวในตู้/ชั้นเก็บสารเคมี (2.2)	3. จัดหาภาชนะรองรับ สารเคมีที่เป็นของเหลว	3. ลดความเสี่ยงจากสารเคมี รั่วไหล
องค์ประกอบที่ 3 ระบบการจัดการของเสีย		
1. ตรวจไม่พบการบันทึกข้อมูลของเสีย (3.1.1)	1. ทบทวนการบันทึกข้อมูลของเสีย ที่มีโครงสร้างของข้อมูลที่ครบถ้วน	1. มีข้อมูลการบันทึกของเสียที่มีโครงสร้าง ของข้อมูลครบถ้วน
2. ตรวจไม่พบหลักฐานการนำข้อมูล ของเสียไปใช้ประโยชน์ ในด้าน การประเมินความเสี่ยงและการจัด เตรียมงบประมาณในการกำจัด (3.1.3)	2. จัดทำแผนและงบประมาณ ในการกำจัดของเสีย	2. มีการกำจัดของเสียออกจาก ห้องปฏิบัติการตามแผน
3. ตรวจไม่พบหลักฐานแนวปฏิบัติหรือ มาตรการในการลดการเกิดของเสีย ในห้องปฏิบัติการ (3.3)	3. ประเมินความเสี่ยงของเสีย และจัดทำแนวปฏิบัติ ในการลดของเสียที่เกิดขึ้น	3. ได้แนวปฏิบัติ (SOP) ในการลดการเกิดของเสีย ในห้องปฏิบัติการและมีแนวปฏิบัติ ในการกำจัดของเสีย
องค์ประกอบที่ 4 ลักษณะทางกายภาพของห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ และเครื่องมือ		
1. ขาดการแสดงป้ายข้อมูลในลักษณะ ข้อมูลจำเพาะ รวมถึงสัญลักษณ์หรือ เครื่องหมายสากลแสดงอันตรายแยก เป็นรายห้อง (4.7.9)	1. แสดงป้ายข้อมูลและเครื่องหมาย แสดงอันตราย แยกรายห้องปฏิบัติการ	1. มีการแสดงป้ายข้อมูลและเครื่องหมาย อันตรายครอบคลุมทุกห้องปฏิบัติการ
2. ควรมีการระบุตำแหน่งโทรศัพท์ที่ เข้าถึงได้ลงในแผนที่แสดงข้อมูลที่ตั้ง หรือมีป้ายสัญลักษณ์บอกตำแหน่ง (4.7.7)	2. ระบุตำแหน่งอุปกรณ์สื่อสาร เช่น โทรศัพท์ โดยใช้ป้ายสัญลักษณ์ บอกตำแหน่ง	2. มีป้ายสัญลักษณ์แสดงตำแหน่ง จุดวางอุปกรณ์ สื่อสาร

ตารางที่ 3 กิจกรรมการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการด้านเคมีของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ (ต่อ)

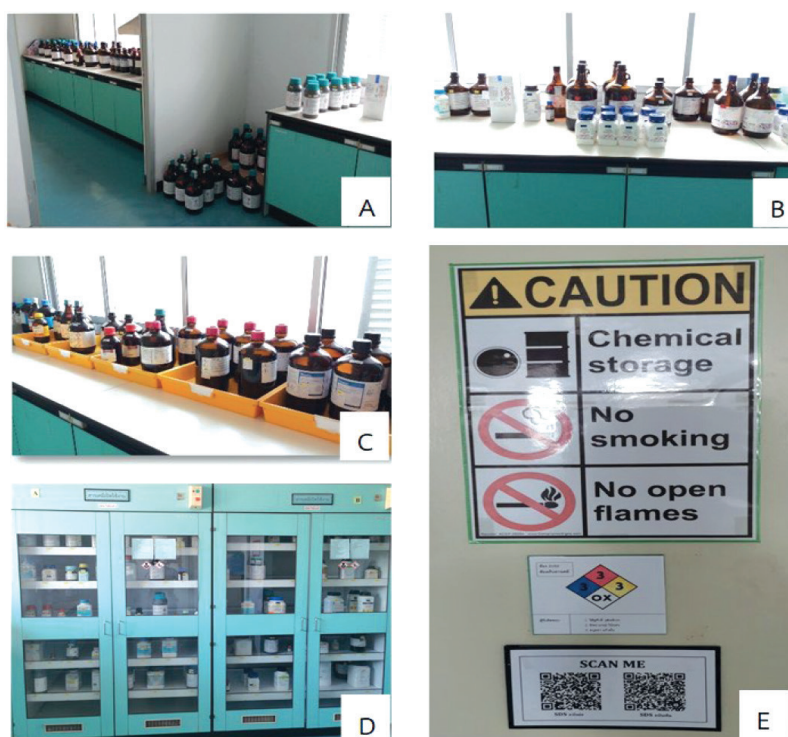
ความไม่สอดคล้อง/ข้อเสนอแนะ/ จุดที่ควรพัฒนา	กระบวนการ/กิจกรรม	ผลลัพธ์/ผลผลิตที่เป็นรูปธรรม
องค์ประกอบที่ 5 ระบบการป้องกันและแก้ไขภัยอันตราย		
ไม่พบการทดสอบการช้อมดับเพลิง โดยการปฏิบัติจริงของผู้ที่เข้าทำงานใหม่ เป็นการอบรมออนไลน์ เนื่องจากสถานการณ์ โรคระบาด (5.2.2)	1. ทบทวนการช้อมดับเพลิง ให้แก่ บุคลากรใหม่หลังจากอบรม ทางออนไลน์แล้ว 2. จัดทำวิธีการใช้งานถังดับเพลิง อย่างง่ายติดไว้ ที่ถังดับเพลิง	1. บุคลากรใหม่สามารถใช้ถังดับเพลิงได้ หากเกิดเหตุฉุกเฉิน 2. มีวิธีการใช้งานถังดับเพลิงที่เข้าใจง่าย ติดไว้ที่ถังดับเพลิง
องค์ประกอบที่ 6 การให้ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับด้านความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ		
1. ตรวจไม่พบหลักฐานการให้ความรู้ พื้นฐาน แก่ ผู้บริหาร หัวหน้า ห้องปฏิบัติการ ผู้ปฏิบัติงาน เรื่อง ระบบบริหารจัดการ ด้านความปลอดภัยและกฎหมาย ที่เกี่ยวข้อง (6.1-6.4)	จัดทำสรุปรายงานการให้ความรู้พื้นฐาน ด้านความปลอดภัยแก่ผู้บริหาร หัวหน้าห้องปฏิบัติการ ผู้ปฏิบัติงาน และแม่บ้าน	ผู้บริหาร หัวหน้าห้องปฏิบัติการ ผู้ปฏิบัติงาน และแม่บ้านได้รับ ความรู้ความเข้าใจด้านความปลอดภัย
2. ตรวจไม่พบการอบรมให้ความรู้ พื้นฐานแก่แม่บ้าน (6.5)		

ผลจากการตรวจประเมินซ้ำในครั้งที่ 6 (ธันวาคม พ.ศ. 2564) โดยแม่ข่ายมหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อเปรียบเทียบผลการดำเนินการก่อน-หลังของการพัฒนายกระดับมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการพบว่าห้องปฏิบัติการด้านเคมีของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ มีสถานภาพความปลอดภัยเพิ่มขึ้นในทุกองค์ประกอบ โดยมีผลการดำเนินการด้านการบริหารจัดการระบบความปลอดภัย (องค์ประกอบที่ 1) ระบบการจัดการสารเคมี (องค์ประกอบที่ 2) ระบบการจัดการของเสีย (องค์ประกอบที่ 3) ลักษณะทางกายภาพของห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

(องค์ประกอบที่ 4) ระบบการป้องกันและแก้ไขภัยอันตราย (องค์ประกอบที่ 5) การให้ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับด้านความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ (องค์ประกอบที่ 6) และการจัดการข้อมูลและเอกสาร (องค์ประกอบที่ 7) ได้รับคะแนนประเมินที่ร้อยละ 80.0, 96.1, 98.4, 90.7, 100.0, 81.5 และ 100.0 ตามลำดับ คะแนนประเมินในภาพรวมทั้ง 7 องค์ประกอบ เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 82.6 เป็นร้อยละ 94.2 และในองค์ประกอบด้านการจัดการข้อมูลและเอกสาร ยังคงรักษามาตรฐานไว้ได้ ดังแสดงในภาพที่ 3 และ 4



ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบการประเมินของห้องปฏิบัติการก่อนและหลังการพัฒนาระดับความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการด้านเคมี ครั้งที่ 5 และ 6 จากการตรวจประเมินของแม่ข่ายมหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์



ภาพที่ 4 การเปรียบเทียบก่อนและหลังการปรับปรุงความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการด้านเคมีของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ A และ B = ห้องเก็บสารเคมีรวมก่อนการปรับปรุง C และ D = การจัดเก็บสารเคมีตามหลัก chemical incompatibility และ E = การแสดงป้ายข้อมูลอันตรายและเครื่องหมายสากลแสดงอันตรายของแต่ละห้องปฏิบัติการ

วิจารณ์

จากผลการศึกษาการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการเคมีของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ผ่านโครงการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการภาคเหนือตอนล่างของสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ภายใต้การดูแลของแม่ข่ายมหาวิทยาลัยนเรศวร เริ่มดำเนินการในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2562 โดยคณะกรรมการความปลอดภัยห้องปฏิบัติการของหน่วยงาน เริ่มต้นจากการศึกษาข้อคำถามและกฎหมายอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง หลังจากนั้นทำการประเมินตนเองครั้งที่ 1 (พฤศจิกายน พ.ศ. 2562) เพื่อได้ข้อมูลนำเข้าสู่สำหรับจัดทำแผนปฏิบัติการความปลอดภัยของหน่วยงานให้ครอบคลุมตามระบบ ESPReL โดยมุ่งเน้นพัฒนาที่ระบบการจัดการสารเคมีและระบบการจัดการของเสียเป็นหลัก เนื่องจากเป็นองค์ประกอบที่ยังไม่ได้ดำเนินการตามระบบมาตรฐานด้านความปลอดภัยมาก่อนและต้องมีการบริหารจัดการเพิ่มเติมมากกว่าองค์ประกอบอื่น เพื่อให้สอดคล้องกับข้อคำถามของ ESPReL checklist ผลการดำเนินงานหลังการตรวจประเมินครั้งที่ 2 และ 3 (พ.ศ. 2562-2563) ดังแสดงในภาพที่ 2 ใช้ข้อเสนอแนะคำแนะนำ และองค์ความรู้จากแม่ข่ายมหาวิทยาลัยนเรศวร มาแก้ไขปรับปรุงและพัฒนา หลังจากนั้นในเดือนมกราคม พ.ศ. 2563 ได้เข้าร่วมกิจกรรม KM กับเครือข่ายภาคเหนือตอนล่างและเข้าเยี่ยมชมห้องปฏิบัติการต้นแบบที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์และคณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยได้นำองค์ความรู้มาแก้ไขปรับปรุง และทำการตรวจประเมินตนเองครั้งที่ 4 แต่ยังไม่ได้ใช้การแก้ไขในเชิงระบบและยังไม่ครอบคลุมในรายละเอียดของแต่ละองค์ประกอบ เนื่องจากขณะนั้นมีข้อจำกัดด้านทรัพยากรบุคคลที่จะปฏิบัติงานด้านความปลอดภัยตามระบบ ESPReL จากการระบาดของโรค COVID-19 (พ.ศ. 2563-2565) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลเฉพาะผลการตรวจประเมินโดยแม่ข่าย พบว่าการบริหารจัดการระบบความปลอดภัยและการให้ควมรู้พื้นฐานด้านความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการได้รับคะแนนประเมินลดลง เนื่องจากหน่วยงานยังไม่สามารถแก้ไขความไม่สอดคล้องได้ครบถ้วนในทุกระดับ เช่น

มีนโยบายด้านความปลอดภัยในระดับกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และระดับศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ แต่ยังคงขาดนโยบายด้านความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการย่อย ตรวจไม่พบหลักฐานการให้ความรู้พื้นฐานแก่ผู้บริหาร และการอบรมให้ความรู้แก่แม่ข่าย เป็นต้น นอกจากนี้พบว่าหน่วยงานมีความเข้าใจต่อข้อคำถามในบางองค์ประกอบไม่ถูกต้องชัดเจน ส่งผลให้คะแนนจากการตรวจประเมินระหว่าง 2 หน่วยงาน ในบางองค์ประกอบมีความไม่สอดคล้องกัน ได้แก่ การบริหารจัดการด้านความปลอดภัย และการจัดการข้อมูลและเอกสาร ดังนั้นการศึกษาข้อคำถามตามคู่มือการตรวจประเมินความปลอดภัยห้องปฏิบัติการ⁽⁴⁾ ให้มีความถูกต้องชัดเจน เพื่อให้เกิดการดำเนินการที่ถูกต้อง สอดคล้อง และเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งมีความสำคัญต่อการประเมินตนเองในอนาคตต่อไป

จากผลการตรวจประเมินในครั้งที่ 5 (กันยายน พ.ศ. 2564) ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยแม่ข่ายมหาวิทยาลัยนเรศวร พบว่าการดำเนินการปรับปรุงและยกระดับความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการเคมีในช่วงเวลาที่ผ่านมา ซึ่งใช้เพียงการแก้ไขปัญหาแบบเฉพาะหน้าไม่เพียงพอที่จะบริหารจัดการความเสี่ยง และทำให้เกิดแนวโน้มการพัฒนาที่ชัดเจน พบ 4 องค์ประกอบ ที่มีคะแนนประเมินน้อยกว่าร้อยละ 80.0 ได้แก่ องค์ประกอบที่ 1-3 และ 6 ซึ่งสอดคล้องกับผลการสำรวจระดับความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ จากผลการศึกษา เรื่อง ผลการสำรวจปัจจัยอันตรายและวิเคราะห์ความเสี่ยงในห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽⁷⁾ และการสำรวจประเมินองค์ประกอบด้านลักษณะทางกายภาพที่เกี่ยวข้องกับระบบการจัดการความปลอดภัย: อาคารมหามกุฏ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย⁽⁸⁾ จึงได้ปรับใช้การวิเคราะห์หาจุดอ่อน จุดแข็ง ช่องว่างศักยภาพความปลอดภัย (gap analysis) และจัดทำกระบวนการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการ พบกิจกรรมที่ไม่สามารถดำเนินการให้แล้วเสร็จได้ภายในระยะเวลา 6 เดือน เนื่องจากต้องใช้งบประมาณและเวลาในการดำเนินการ เช่น การจัดหาตู้เก็บสารไวไฟ การบำรุงรักษาระบบแสงสว่างฉุกเฉิน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษา เรื่อง การยกระดับความปลอดภัย

ห้องปฏิบัติการเคมี L-210 มหาวิทยาลัยมหิดล⁽⁶⁾ เบื้องต้นดำเนินการแก้ไขการจัดเก็บสารไวไฟโดยใช้การจัดเก็บแยกจากสารออกซิไดซ์ จัดหาภาชนะสำหรับรองรับ เพิ่มระยะการจัดวางภายในตู้เพื่อลดความหนาแน่น ควบคุมระบบระบายอากาศ เช่น เปิดพัดลมดูดอากาศของตู้เก็บเปิดหน้าต่างระบายอากาศ และตรวจสอบระบบคลังสารเคมีเดือนละ 1 ครั้ง เพื่อควบคุมการจัดซื้อและปริมาณสารเคมีของหน่วยงานให้เหมาะสมกับการใช้งานจริง สำหรับระบบแสงสว่างฉุกเฉินได้ดำเนินการแก้ไข โดยนำเข้าข้อมูลในกิจกรรมระบบบริหารโครงสร้างอาคารและสิ่งแวดล้อมของแผนปฏิบัติการความปลอดภัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566 และได้จัดทำบันทึกการตรวจสอบความพร้อมใช้งานของระบบแสงสว่างฉุกเฉินเพิ่มเติม

สำหรับองค์ประกอบที่ 2 หน่วยงานใช้ระบบการจัดการ การจัดเก็บ และการเบิกจ่ายสารเคมีในรูปแบบระบบสารเคมีรวม ซึ่งมีประโยชน์ต่อการแบ่งปันข้อมูลและการใช้สารเคมีร่วมกันอย่างคุ้มค่า แต่ผลจากการสำรวจพบว่าการจัดเก็บสารเคมียังแยกตามประเภทของแข็งของเหลว และจัดวางเรียงลำดับตามตัวอักษรเป็นหลัก ไม่ได้ใช้การแยกประเภทการจัดเก็บสารเคมีตามคุณสมบัติความเป็นอันตรายและตามคุณสมบัติการเข้ากันไม่ได้ของสารเคมี (chemical incompatibility) ซึ่งมีความเสี่ยงสำหรับการเกิดการทำปฏิกิริยาระหว่างสารเคมีหรือเกิดการระเบิดได้ สอดคล้องกับผลการศึกษา เรื่อง การชี้บ่งอันตรายห้องปฏิบัติการเคมี: กรณีศึกษาห้องปฏิบัติการเคมีอุตสาหกรรม⁽⁹⁾ ส่วนการแก้ไขด้านการจัดการข้อมูลสารเคมี ตามเดิมกำหนดใช้โปรแกรม ChemInvent ในการบริหารจัดการข้อมูลสารเคมีของหน่วยงาน แต่ติดขัดเรื่องการเข้าใช้งานโปรแกรมดังกล่าว ปัจจุบันหน่วยงานจึงได้พัฒนาโปรแกรมระบบสารสนเทศคลังสารเคมี (CHEMMA) บนฐานข้อมูลประยุกต์ Microsoft Access เพื่ออำนวยความสะดวกในการดูแลคลังสารเคมีและระบบการจัดการข้อมูลสารเคมี โดยให้มีข้อมูลรายละเอียดครอบคลุมตามข้อกำหนดของ ESPReL checklist สอดคล้องกับผลการศึกษา เรื่อง การพัฒนาสารบบสารเคมีในห้องปฏิบัติการทันตวัสดุ คณะทันตแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์⁽¹⁰⁾ ซึ่งปัจจุบันโปรแกรม CHEMMA อยู่ในระหว่างการทดลองใช้โดยผู้ใช้งาน

องค์ประกอบที่ 3 ก่อนการยกระดับความปลอดภัยห้องปฏิบัติการเคมี หน่วยงานใช้ระบบการจัดการของเสียตามแนวทางของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ แต่ขาดการจัดการข้อมูลของเสียและไม่มีแนวปฏิบัติหรือมาตรการในการลดการเกิดของเสียในห้องปฏิบัติการ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษา เรื่อง การประเมินความเสี่ยงด้านระบบการจัดการของเสียอันตรายจากสารเคมีในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา⁽¹¹⁾ ปัจจุบันหน่วยงานได้จัดทำระเบียบปฏิบัติ เรื่อง การจัดการสารเคมี เพื่อใช้เป็นแนวทางในการจัดการระบบสารเคมีและการจัดการระบบของเสียเคมี ดังแสดงในตารางที่ 4 แต่ขาดข้อมูลการดำเนินการตามแนวปฏิบัติหรือมาตรการในการลดการเกิดของเสียในห้องปฏิบัติการและการใช้ประโยชน์ข้อมูลของเสียในการประเมินความเสี่ยง

องค์ประกอบที่ 1 หน่วยงานดำเนินการด้านความปลอดภัยห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้วยระบบ ISO 15190 แต่ขาดนโยบาย แนวปฏิบัติด้านความปลอดภัยในระดับห้องปฏิบัติการย่อย และการกำหนดผู้รับผิดชอบด้านความปลอดภัยที่ครอบคลุมตามที่ ESPReL checklist กำหนด ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานที่ต่อเนื่องและชัดเจนของหน่วยงาน ดังนั้นหน่วยงานได้ดำเนินการจัดทำนโยบายและแผนงานด้านความปลอดภัยระดับห้องปฏิบัติการเพิ่มเติม ดังแสดงในตารางที่ 4

องค์ประกอบที่ 6 หน่วยงานมีการพัฒนาบุคลากรที่สอดคล้องกับงานที่ได้รับมอบหมายตามแผนพัฒนาบุคลากร และมีการอบรมให้ความรู้ด้านความปลอดภัยแก่บุคลากรของหน่วยงาน ซึ่งเป็นไปตามกฎหมายที่เกี่ยวข้องเป็นประจำทุกปี แต่การให้ความรู้ด้านความปลอดภัยตามระบบ ESPReL ให้ความสำคัญกับบุคลากรในทุกระดับที่เกี่ยวข้องและครอบคลุมความรู้ด้านความปลอดภัย 6 ด้าน เพื่อให้มีความรู้และความตระหนักถึงอันตรายสามารถปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการหรือทำงานเกี่ยวกับสารเคมีได้อย่างปลอดภัย ดังแสดงในตารางที่ 4 หลังการสำรวจพบว่าหน่วยงานยังขาดหลักฐานการให้ความรู้ที่ครอบคลุมในบุคลากรบางระดับ เช่น ผู้บริหาร และ

พนักงานทำความสะอาด โดยปัจจุบันหน่วยงานได้จัดทำคู่มือบุคลากรใหม่ด้านความปลอดภัย จัดทำสื่อการเรียนรู้ผ่านสื่อคอมพิวเตอร์ด้านความปลอดภัยในสถานที่ปฏิบัติงาน จัดอบรม สื่อสารเรื่องสัญลักษณ์ และป้ายเตือนด้านความปลอดภัยให้กับพนักงานทำความสะอาด และสนับสนุนให้ผู้บริหาร หัวหน้าห้องปฏิบัติการ ผู้ปฏิบัติงาน และผู้เกี่ยวข้องเข้ารับการอบรมออนไลน์กับทางมหาวิทยาลัยนเรศวร ซึ่งมีหลักสูตรครอบคลุมความรู้ด้านความปลอดภัยทั้ง 6 ด้าน และครบถ้วนทุกองค์ประกอบตามระบบ ESPReL

องค์ประกอบที่ 4 อาคารปฏิบัติการมีลักษณะทางกายภาพของห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ และเครื่องมือด้านความปลอดภัยที่สอดคล้องกับมาตรฐาน ISO 15190 แต่ขาดการแสดงป้ายข้อมูลในลักษณะของข้อมูลจำเพาะของห้องปฏิบัติการ รวมถึงสัญลักษณ์หรือเครื่องหมายสากลแสดงถึงอันตรายแยกเป็นรายห้องและไม่มีการระบุตำแหน่งอุปกรณ์สื่อสารที่สามารถเข้าถึงได้ลงในแผนที่แสดงข้อมูลที่ตั้ง ดังนั้นหน่วยงานจึงได้จัดทำป้ายข้อมูลและเครื่องหมายอันตราย เพื่อแสดงข้อมูลให้ครอบคลุมห้องปฏิบัติการทั้งหมดและจัดทำป้ายสัญลักษณ์แสดงตำแหน่งจุดวางอุปกรณ์สื่อสาร เพื่อการใช้งานในกรณีฉุกเฉินเพิ่มเติม

องค์ประกอบที่ 5 หน่วยงานมีการเตรียมความพร้อมการตอบโต้ต่อภาวะฉุกเฉินที่เป็นรูปธรรม แต่พบว่าขาดการทวนสอบการซ้อมดับเพลิงด้วยการปฏิบัติจริงของผู้ที่เข้ามาทำงานใหม่ จึงจัดอบรมการใช้ถังดับเพลิงแก่บุคลากรใหม่และจัดทำวิธีการใช้งานถังดับเพลิงที่เข้าใจง่ายติดไว้ที่ถังดับเพลิงเพิ่มเติม สำหรับการอบรมทบทวนและให้ความรู้ด้านความปลอดภัยของหน่วยงานเป็นไปตามข้อมูลที่แสดงไว้ในองค์ประกอบที่ 6

องค์ประกอบที่ 7 พบว่าเป็นองค์ประกอบที่เป็นจุดแข็ง เนื่องจากหน่วยงานมีการดำเนินงานตามระบบคุณภาพมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 และ ISO 15189 ซึ่งข้อกำหนดดังกล่าวทำให้หน่วยงานมีการจัดการด้านข้อมูลและเอกสารที่ครบถ้วน เพียงพอ เป็นปัจจุบัน สะดวกต่อการเก็บรักษา และง่ายต่อการสืบค้น ผ่านโปรแกรมฐานข้อมูลระบบการจัดการเอกสารคุณภาพ (DOC-IS)⁽¹²⁾

การเตรียมความพร้อมเพื่อรองรับการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการในรูปแบบ peer evaluation ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ มีการดำเนินการพัฒนา ปรับปรุง และแก้ไขผลการประเมินตาม ESPReL checklist เพื่อให้มีคะแนนประเมินเฉลี่ยไม่น้อยกว่าร้อยละ 80.0 โดยดำเนินการแก้ไข ปรับปรุงในแต่ละองค์ประกอบที่ไม่ครอบคลุมด้านความปลอดภัย ได้แก่ องค์ประกอบที่ 1-3 และ 6 ตามที่กล่าวมาข้างต้น นอกจากนั้นได้จัดตั้งคณะทำงานพัฒนาระบบความปลอดภัยใหม่ 7 คณะ เมื่อเดือนตุลาคม พ.ศ. 2565 ได้แก่ คณะทำงานความปลอดภัยด้านเคมี คณะทำงานความปลอดภัยด้านชีวภาพ คณะทำงานความปลอดภัยด้านระบบแก๊ส คณะทำงานความปลอดภัยด้านโครงสร้างอาคารและสภาพแวดล้อม คณะทำงานความปลอดภัยด้านสุขภาพ และคณะทำงานความปลอดภัยด้านเทคโนโลยีสารสนเทศ เพิ่มเติมจากเดิมที่เป็นเพียงการดำเนินการโดยคณะกรรมการความปลอดภัยเท่านั้น เพื่อให้เกิดการทำงานที่มีประสิทธิภาพและครอบคลุมตาม ESPReL checklist ดังนั้นการให้ความรู้แก่คณะทำงานใหม่จึงมีความสำคัญและจำเป็น เพื่อให้การดำเนินงานด้านความปลอดภัยมีความต่อเนื่อง โดยมีการจัดการความรู้ด้วยการแลกเปลี่ยนประสบการณ์ การเรียนรู้จากการทำงานจริง การตรวจเยี่ยมห้องปฏิบัติการต้นแบบ และการเข้าร่วมอบรมออนไลน์กับทางมหาวิทยาลัยนเรศวร การดำเนินการเพื่อเตรียมความพร้อมในการขอรับรองห้องปฏิบัติการในรูปแบบ peer evaluation ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ใช้เวลาในการดำเนินการรวม 3 ปี (พฤศจิกายน พ.ศ. 2562-ตุลาคม พ.ศ. 2565) เนื่องจากช่วงเวลาดังกล่าวมีสถานการณ์ระบาดของโรค COVID-19 ทำให้มีข้อจำกัดหลายด้านโดยเฉพาะด้านทรัพยากรบุคคล ผู้ปฏิบัติงานส่วนใหญ่ต้องไปช่วยงานตรวจวิเคราะห์ COVID-19 ช่วยจัดการความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการด้านชีวภาพเป็นหลัก ในช่วงระยะแรกของการระบาด แม้ช่วยไม่สามารถเข้าตรวจประเมินห้องปฏิบัติการ ณ สถานที่ปฏิบัติงานจริงได้ ในการตรวจประเมินครั้งที่ 5 (กันยายน พ.ศ. 2564) จึงปรับใช้การตรวจประเมินห้องปฏิบัติการในรูปแบบออนไลน์ทดแทน ร่วมกับการส่งไฟล์วิดีโอและไฟล์เอกสารการดำเนินการ

ด้านความปลอดภัยตามแต่ละองค์ประกอบ ซึ่งมีรายละเอียดที่แตกต่างจากการตรวจประเมิน ณ สถานที่ปฏิบัติงานจริง

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ปัจจัยความสำเร็จในการพัฒนาระดับมาตรฐานความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการด้านเคมีของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ เพื่อขอรับรองห้องปฏิบัติการในรูปแบบ peer evaluation เกิดจากความร่วมมือของบุคลากรในทุกระดับ ตั้งแต่ผู้บริหารจนถึงผู้ปฏิบัติงานทำให้องค์ประกอบที่ 1 และ 6 มีคะแนนเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 80.0 และ 81.5 ตามลำดับ ในการตรวจประเมินในครั้งที่ 6 (ธันวาคม พ.ศ. 2564) รวมทั้งมีคะแนนเพิ่มขึ้นในองค์ประกอบที่ 2-4 เป็นร้อยละ 96.1, 98.4 และ 90.7 และคะแนนในองค์ประกอบที่ 5 และ 7 เป็นร้อยละ 100.0 ดังแสดงในภาพที่ 3 รวมทั้งมีการทำงานในรูปแบบคณะกรรมการร่วมกับคณะทำงาน เพื่อให้เกิดการทำงานที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจากเป็นหน่วยงานที่ดำเนินงานด้วยระบบคุณภาพตามมาตรฐานสากล (ISO) จึงมีหลายองค์ประกอบที่เกี่ยวเนื่องและเป็นประโยชน์ต่อกัน นอกจากนี้มีคณะกรรมการตรวจประเมินความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยนเรศวร ทำหน้าที่ประเมินห้องปฏิบัติการลูกข่ายและให้คำปรึกษาแนะนำ ดังนั้นห้องปฏิบัติการควรวิเคราะห์ข้อมูลด้านความปลอดภัยอย่างสม่ำเสมอ เพื่อเฝ้าระวังความเสี่ยงและนำไปสู่การวางแผนพัฒนาที่มีประสิทธิภาพอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะองค์ประกอบที่ 1, 4 และ 6 ซึ่งห้องปฏิบัติการด้านเคมีของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ได้เข้ารับการตรวจประเมินและผ่านการรับรองห้องปฏิบัติการในรูปแบบ peer evaluation จากศูนย์บริหารความปลอดภัย อาชีวอนามัย และสภาพแวดล้อมในการทำงาน มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อวันที่ 16 ธันวาคม พ.ศ. 2565

สรุป

การยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการด้านเคมีของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ จากการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการเพื่อชี้บ่งอันตราย ตามแบบสำรวจ ESPReL checklist จำนวน

162 รายการ ตามกรอบแนวคิดห้องปฏิบัติการปลอดภัย 7 องค์ประกอบ ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2564 พบว่าห้องปฏิบัติการมีระดับคะแนนความปลอดภัยคิดเป็นร้อยละ 82.6 เมื่อวิเคราะห์หาจุดอ่อน จุดแข็ง และช่องว่างความปลอดภัย (gap analysis) เพื่อจัดลำดับความสำคัญของกิจกรรมและจัดทำกระบวนการพัฒนาระดับมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการ พบว่าห้องปฏิบัติการมีสถานภาพความปลอดภัยเพิ่มขึ้นจากเดิมเป็นร้อยละ 94.2 โดยทุกองค์ประกอบมีคะแนนประเมินมากกว่าร้อยละ 80.0 ได้แก่ การบริหารระบบการจัดการด้านความปลอดภัย ระบบการจัดการสารเคมี ระบบการจัดการของเสีย ลักษณะทางกายภาพของห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์และเครื่องมือ ระบบการป้องกันและแก้ไขภัยอันตราย การให้ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับด้านความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ และการจัดการข้อมูลและเอกสาร ได้รับคะแนนประเมินที่ร้อยละ 80.0, 96.1, 98.4, 90.7, 100.0, 81.5 และ 100.0 ตามลำดับ ผลการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการจัดการความเสี่ยงด้านความปลอดภัย ใช้เป็นข้อมูลนำเข้าในการจัดทำแนวทาง เพื่อนำไปสู่การพัฒนาและยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการให้มีประสิทธิภาพของหน่วยงานและห้องปฏิบัติการอื่นๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ที่สนับสนุน ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการดำเนินงานด้านความปลอดภัย ขอขอบคุณคณะทำงานพัฒนาระบบความปลอดภัย และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ที่ให้ความร่วมมือในการดำเนินงานด้านระบบความปลอดภัยของหน่วยงาน ขอขอบคุณ นางสาวโลมไสล วงศ์จินตนา นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ ที่พัฒนาโปรแกรมสารสนเทศคลังสารเคมี CHEMMA เพื่ออำนวยความสะดวกในการดูแลคลังสารเคมีและระบบการจัดการข้อมูลสารเคมีของหน่วยงาน และขอขอบคุณคณะกรรมการตรวจประเมินความปลอดภัยห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้คำปรึกษา

และคำแนะนำช่วยให้การดำเนินการในครั้งนี้ประสบความสำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- พระราชบัญญัติความปลอดภัย อาชีวอนามัย และสภาพแวดล้อมในการทำงาน พ.ศ. 2554. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 128 ตอนที่ 4 ก (วันที่ 17 มกราคม 2554).
- โครงการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการวิจัยในประเทศไทย. แนวปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ; 2555.
- ฉัตรชัย วิริยะไกรกุล. การพัฒนาตัวอย่างห้องปฏิบัติการวิจัยปลอดภัยในประเทศไทย. ว วิชาการ คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย [วารสารออนไลน์]. 2558; [สืบค้น 7 ก.พ. 2566]; 64(2558): [14 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://so01.tci-thaijo.org/index.php/AJA/article/view/164448>.
- โครงการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการวิจัยในประเทศไทย. คู่มือการประเมินความปลอดภัยห้องปฏิบัติการ ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2558.
- ศูนย์บริหารความปลอดภัย อาชีวอนามัย และสภาพแวดล้อมในการทำงาน มหาวิทยาลัยมหิดล. คู่มือขอรับการตรวจประเมินและรับรองห้องปฏิบัติการในรูปแบบ peer evaluation. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ; 2563.
- กาญจนา สุรีย์พิศล. การยกระดับความปลอดภัยห้องปฏิบัติการเคมี L-210 มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี ตามมาตรฐานความปลอดภัยห้องปฏิบัติการวิจัยในประเทศไทย. Mahidol R2R e-Journal [วารสารออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 7 ก.พ. 2566]; 8(1): [14 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/mur2r/article/view/248622>.
- พรเพ็ญ กำนารายณ์. ผลการสำรวจชี้บ่งอันตรายและวิเคราะห์ความเสี่ยงในห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์การแพทย์. ว วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2558; 23(4): 667-81.
- ฉัตรชัย วิริยะไกรกุล. การสำรวจประเมินองค์ประกอบด้านลักษณะทางกายภาพของอาคารที่เกี่ยวข้องกับระบบการจัดการความปลอดภัย: อาคารมหามกุฏ (รหัสอาคาร: SCI25) คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ว วิชาการ คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย [วารสารออนไลน์]. 2560; [สืบค้น 7 ก.พ. 2566]; 66(2560): [18 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://so01.tci-thaijo.org/index.php/AJA/article/view/115359>.
- จินตวาลย์ เพ็ชรสูงเนิน, สาริณี ลิพันธ์, สุราณี โฉมทัยรุ่งรัตน์, โกวิทย์ ปิยะมั่งคณา. การชี้บ่งอันตรายห้องปฏิบัติการเคมี: กรณีศึกษาห้องปฏิบัติการเคมีอุตสาหกรรม. SDU Res J [วารสารออนไลน์]. 2559; [สืบค้น 7 ก.พ. 2566]; 9(1): [14 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <http://www.thaiscience.info/Journals/Article/SDUJ/10984833.pdf>.
- จรรยา ชื่นอารมณ์. การพัฒนาระบบสารเคมีในห้องปฏิบัติการทันตวัสดุ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. Mahidol R2R e-Journal [วารสารออนไลน์]. 2565; [สืบค้น 7 ก.พ. 2566]; 9(1): [14 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/mur2r/article/view/251594>.
- นันทวรรณ จินากุล. การประเมินความเสี่ยงด้านระบบการจัดการของเสียอันตรายจากสารเคมีในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา. บุรพาเวชสาร [วารสารออนไลน์]. 2561; [สืบค้น 7 ก.พ. 2566]; 5(1): [16 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/BJmed/article/view/138812>.
- โลมไสล วงศ์จินดา, เต็มศิริ เคนคำ. การพัฒนาระบบการจัดการเอกสารคุณภาพ. ว กรรมวิทย์ พ 2559; 58(1): 61-71.

Enhancing Chemical Laboratory Safety Standards of Regional Medical Sciences Center 3 Nakhon Sawan: A Peer Evaluation

Parichat Kanyaboon, Thippayaporn Vinissorn, Usa Thanomngoen, Danulada Kgewman, Muthita Khontha, Phiram Panthong, Sinatsakon Thawithatsanarot, and Wisitsak Wuttiadirek

Regional Medical Science Center 3 Nakhonsawan, Nakhonsawan 60000, Thailand

ABSTRACT To ensure the safety of laboratory operations, it is essential to enhance and strengthen laboratory safety standards in order to make them more effective and comprehensive. The objective of this study was to analyze strengths, weaknesses and gaps in the implementation of safety standards in the chemistry laboratories of the Regional Medical Sciences Center 3, Nakhon Sawan. The study utilized the Laboratory Safety Inspection Manual of the National Research Council of Thailand (NRCT), 2nd edition, 2015, as a reference to improve laboratory safety standards. The assessment of safety hazards was conducted using the ESPReL Checklist, which consisted of 162 items based on the seven components of laboratory safety. The data from 2019 to 2021 were assessed by Naresuan University in September 2021 and had an overall score of 82.6%. However, there were certain components that had a score below 80%; the safety management system, basic knowledge of laboratory safety, waste management system, and chemical management system had scores of 66.7%, 66.7%, 71.4%, and 74.6%, respectively. Communication and raising awareness of safety among personnel at all levels are able to create a safety working system that covers all components, enhance a sustainable safety culture and drive the development of effective and comprehensive safety standards that meet the peer evaluation criteria. However, it is crucial to continue regular monitoring and data analysis on an annual basis to establish a sustainable safety system for relevant safety agencies.

Keywords: ESPReL checklist, Safety standards, Peer evaluation

ความชุกและชนิดการกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมีย ในคู่สามี-ภรรยา ที่เสี่ยงต่อโรคเบตาธาลัสซีเมีย: ข้อมูลเขตสุขภาพที่ 10 พ.ศ. 2557 - 2564

ชาคริต เชาวฤทธิ์, สุภาพร ช่างคำ และ นวินดา วณิชกุลธาดา

โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34190

บทคัดย่อ โรคเบตาธาลัสซีเมียเป็นโรคถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่มีความชุกสูงในประเทศไทย การศึกษานี้รวบรวมข้อมูลผลการตรวจวินิจฉัยยีนเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุล ย้อนหลัง 8 ปี ตั้งแต่ พ.ศ. 2557-2564 ของห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ซึ่งเป็นศูนย์ตรวจของรัฐแห่งเดียวที่ให้บริการตรวจวินิจฉัยเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุลในเขตสุขภาพที่ 10 เพื่อศึกษาความชุกและชนิดการกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมีย ผลการศึกษากลุ่มตัวอย่างส่งตรวจจากหญิงตั้งครรภ์และสามีที่เป็นคู่เสี่ยงในการให้กำเนิดบุตรเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมีย จากการตรวจคัดกรองทั้งหมด 1,248 คู่ พบเป็นกลุ่มเสี่ยงจริง จำนวน 1,203 คู่ ให้ผลตรวจการกลายพันธุ์ยีนเบตาธาลัสซีเมียเป็นบวก จำนวน 483 คู่ โดยชนิดการกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมียที่พบมากที่สุด คือ Nucleotide-28 (A-G) ที่ร้อยละ 30.7 รองลงมา คือ CD41/42 (-TTCT) ที่ร้อยละ 28.5 และ CD17 (A-T) ที่ร้อยละ 14.6 โดยเป็นคู่เสี่ยงที่มีโอกาสให้กำเนิดบุตรเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง จำนวน 254 คู่ (ร้อยละ 52.6) ข้อผิดพลาดในการส่งตัวอย่างต่อเพื่อตรวจวินิจฉัยเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุลโดยไม่จำเป็น จำนวน 45 คู่ ส่วนใหญ่ร้อยละ 93.3 (42 คู่) เกิดจากผลตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินได้ปริมาณ Hb A₂ สูงปลอม การศึกษานี้วิเคราะห์ผลการตรวจที่รวบรวมจากศูนย์บริการเพียงแห่งเดียว ซึ่งมีโรงพยาบาลบางแห่งส่งตรวจศูนย์บริการอื่น การรวบรวมข้อมูลจากหลายศูนย์บริการจะทำให้ได้ข้อมูลที่สะท้อนความจริงเกี่ยวกับสถานการณ์ความชุกและชนิดการกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมียในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างได้ดียิ่งขึ้น

คำสำคัญ: เบตาธาลัสซีเมีย, คู่เสี่ยง, เขตสุขภาพที่ 10

Corresponding author E-mail: chakritchawarit@gmail.com

Received: 19 April 2023

Revised: 22 August 2023

Accepted: 31 August 2023

บทนำ

โรคโลหิตจางธาลัสซีเมียเป็นปัญหาทางสุขภาพ สังคมและเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขได้จัดตั้งโครงการควบคุมและป้องกันธาลัสซีเมียขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2536⁽¹⁾ โดยกำหนดให้มีการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อการคัดกรองและวินิจฉัยธาลัสซีเมีย ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในกระบวนการควบคุมและป้องกันโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง 3 ชนิด ได้แก่ ชนิดโฮโมไซกัส อัลฟา-ธาลัสซีเมีย 1 (homozygous alpha-thalassemia-1) ชนิดโฮโมไซกัส เบตาธาลัสซีเมีย (homozygous beta-thalassemia) และชนิดเบตาธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี (beta-thalassemia/Hb E)⁽²⁾ ประเทศไทยมีความพยายามในการเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมและป้องกันธาลัสซีเมีย โดยเพิ่มศูนย์รับบริการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียในแต่ละเขตสุขภาพ จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่ามีรายงานเกี่ยวกับความชุกและชนิดการกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมียในเขตสุขภาพที่ 10 ไม่มาก โดยในปี พ.ศ. 2560 ชลันดา ลาวีลาศ และคณะ⁽³⁾ ได้รายงานความชุกของเบตาธาลัสซีเมียในคู่สมรสที่มีการส่งตัวอย่างเลือด เพื่อตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์บริการในเขตสุขภาพที่ 10 พบการกลายพันธุ์ยีนเบตาธาลัสซีเมียชนิด CD41/42 (-TTCT) มากที่สุด คล้ายกับการศึกษาก่อนหน้าในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากรายงานในประเทศไทยของสุพรรณ พูเจริญ และคณะ⁽⁴⁾ มุลินีโรโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย⁽⁵⁾ และสุภาวดี แยมศรี และคณะ⁽⁶⁾ ที่พบเบตาธาลัสซีเมียชนิด CD41/42 (-TTCT) มากที่สุด การศึกษาของชลันดา ลาวีลาศ และคณะ เป็นการรวบรวมข้อมูลย้อนหลัง 3 ปี (2557-2559) และการศึกษาอื่นๆ ได้ผ่านมาเป็นระยะเวลาแล้ว ในขณะที่ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี เป็นห้องปฏิบัติการรัฐแห่งเดียวในเขตสุขภาพที่ 10 ที่ให้บริการตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของยีนเบตาธาลัสซีเมีย⁽⁷⁾ เปิดบริการเป็นเวลา 8 ปี มีจำนวนตัวอย่างเข้ารับบริการเพิ่มขึ้น จากประสบการณ์ในงานตรวจประจำวันตรวจพบยีนเบตาธาลัสซีเมียกลายพันธุ์ที่หลากหลาย รวมทั้งพบยีนเบตาธาลัสซีเมียกลายพันธุ์ชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยพบเป็นครั้งแรกจากผู้ป่วยในเขตสุขภาพที่ 10 การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อ

ศึกษาความชุกและชนิดการกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมียในสามี-ภรรยาที่เสี่ยงในเขตสุขภาพที่ 10 จากตัวอย่างเลือดถูกส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โดยรวบรวมข้อมูลย้อนหลัง 8 ปี เพื่อวิเคราะห์และสรุปผลการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมียในคู่สามี-ภรรยาที่เสี่ยงโรคเบตาธาลัสซีเมีย ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2557 ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2564 เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์และเป็นปัจจุบันยิ่งขึ้น เป็นข้อมูลให้ห้องปฏิบัติการนำไปใช้ออกแบบวิธีการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมียได้อย่างเหมาะสม และครอบคลุม รวมทั้งแพทย์และพยาบาลสามารถนำข้อมูลไปใช้ในการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมที่เหมาะสม ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อประชาชนในการควบคุมป้องกันโรคธาลัสซีเมียของเขตสุขภาพที่ 10 และประเทศต่อไป

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้เป็น retrospective descriptive study ใช้ผลการตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของโรคเบตาธาลัสซีเมียของห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ย้อนหลัง 8 ปี ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2557 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2564 โครงการวิจัยนี้ผ่านการรับรองจริยธรรมจากคณะกรรมการจริยธรรมในมนุษย์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี หมายเลขใบรับรอง UBU-REC-175/2564 อนุมัติเมื่อวันที่ 8 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2565

กลุ่มตัวอย่างเป็นคู่สามี-ภรรยา ที่เสี่ยงต่อโรคเบตาธาลัสซีเมียในเขตสุขภาพที่ 10 ที่มีผลการตรวจคัดกรองทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ one tube osmotic fragility test (OF test) และ dichlorophenol indophenol precipitation test (DCIP test) หรือ mean corpuscular volume/mean corpuscular hemoglobin (MCV/MCH) และ DCIP test ที่เป็นบวกทั้งคู่มีโอกาสเสี่ยงในการให้กำเนิดบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมีย ซึ่งมีผลตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb typing) ที่มีโอกาสเสี่ยงในการให้กำเนิดบุตรเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมีย ตัวอย่างเลือดจากกลุ่มคู่เสี่ยง

ได้ถูกส่งจากโรงพยาบาลที่อยู่ในเขตสุขภาพที่ 10 เพื่อรับบริการตรวจรายการ PCR for beta-thalassemia และการตรวจ $\delta\beta^0$ -thalassemia PCR ด้วยเทคนิค allele-specific PCR และ gap-PCR รวมทั้งมีตัวอย่างน้ำคร่ำก่อนคลอดของหญิงตั้งครรภ์ที่มีผลการตรวจเป็นคู่เสี่ยงในการให้กำเนิดบุตรเป็นเบตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงระหว่างปี พ.ศ. 2560-2564 เพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมียของทารกในครรภ์

วิธีการรวบรวมผลการตรวจวิเคราะห์

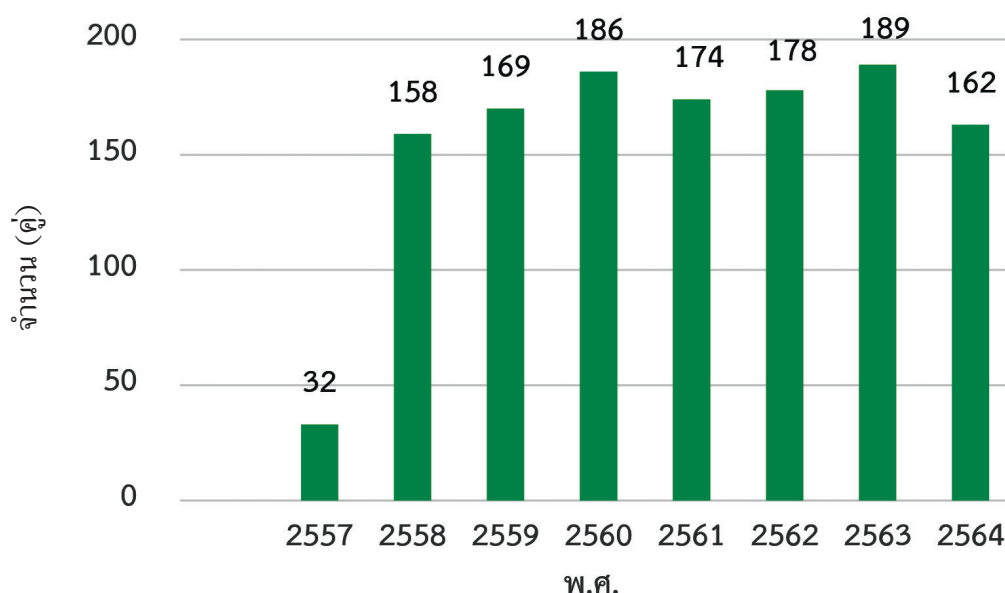
รวบรวมผลการตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของโรคเบตาธาลัสซีเมียและข้อมูลผู้รับบริการ ได้แก่ เพศและอายุ จากสมุดบันทึกการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียและระบบสารสนเทศของห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2557 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2564 กำหนดรหัสผลของตัวอย่างที่ส่งตรวจ บันทึกข้อมูลลงในแบบบันทึกข้อมูล และคัดลอกข้อมูลลงใน Microsoft Excel

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลตัวอย่าง ได้แก่ จำนวนตัวอย่างของคู่เสี่ยงที่ส่งเข้ามาตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียระดับโมเลกุล จำนวนข้อผิดพลาดที่เป็นสาเหตุของการส่งตัวอย่างให้ผลคัดกรองบวกปลอมของตัวอย่างที่ส่งเข้ามาตรวจวิเคราะห์ ความชุกของตัวอย่างคู่สามี-ภรรยาที่ให้ผลบวกในการตรวจวินิจฉัยโรคเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุล จำนวนของคู่เสี่ยงโรคเบตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงที่ส่งตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ และจำนวนของเบตาธาลัสซีเมียการกลายพันธุ์แต่ละชนิดที่ตรวจพบ จากนั้นคำนวณเป็นความชุกรายงานในรูปแบบจำนวนและร้อยละ

ผล

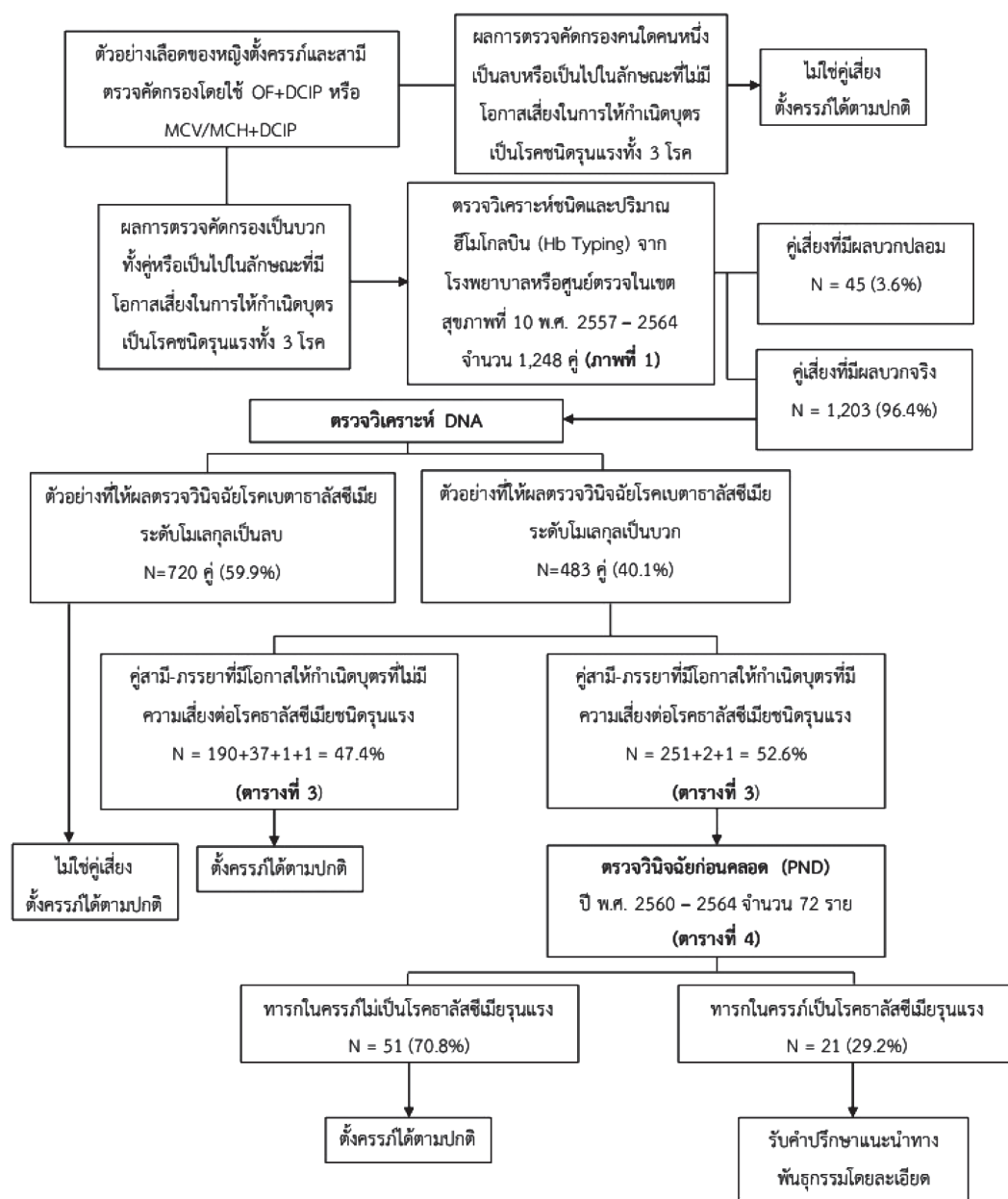
ผลการวิเคราะห์จากงานบริการของห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2557 - 2564 มีตัวอย่างเลือดของคู่สามี-ภรรยาคู่เสี่ยงจากผลการตรวจคัดกรองที่ส่งตรวจวินิจฉัยโรคเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุล จำนวน 1,248 คู่ ภรรยาที่มีค่าเฉลี่ยอายุ 27 ± 7 ปี (อายุต่ำสุด 13 ปี, อายุสูงสุด 46 ปี) สามีมีค่าเฉลี่ยอายุ 29 ± 8 ปี (อายุต่ำสุด 15 ปี, อายุสูงสุด 58 ปี) จำนวนตัวอย่าง (คู่) ที่ส่งตรวจในแต่ละปี ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 จำนวนตัวอย่างเลือดของคู่สามี-ภรรยาคู่เสี่ยง ที่ส่งตรวจวินิจฉัยโรคเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุล ระหว่างปี พ.ศ. 2557-2564 จำนวน 1,248 คู่

ผลการสำรวจข้อผิดพลาดในการส่งสิ่งส่งตรวจ เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุล พบ ตัวอย่างที่ส่งตรวจโดยไม่จำเป็น จำนวน 45 คู่ จากทั้งหมด 1,248 คู่ คิดเป็นร้อยละ 3.6 โดยมีสาเหตุจากผลตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินได้ปริมาณ Hb A₂ สูงปลอม 42 คู่ (ร้อยละ 93.3) และเป็นตัวอย่างโรคฮีโมโกลบินเอช 3 คู่ (ร้อยละ 6.7) ดังนั้นเหลือเป็นตัวอย่างคู่เสี่ยงต่อโรคเบตาธาลัสซีเมีย 1,203 คู่ มีผลคัดกรองเป็นผลบวกจริง ที่มีความเสี่ยงในการให้กำเนิดบุตรเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมีย

รุนแรง ได้แก่ ชนิด homozygous beta-thalassemia และชนิด beta-thalassemia/Hb E ผลตรวจวิเคราะห์ DNA เป็นบวก จำนวน 483 คู่ (ร้อยละ 40.1) โดยเป็นคู่เสี่ยงที่มีโอกาสให้กำเนิดบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมีย ชนิดรุนแรง จำนวน 254 คู่ (ร้อยละ 52.6) มีการเจาะน้ำคร่ำ ก่อนคลอด ซึ่งเปิดให้บริการในปี พ.ศ. 2560-2564 เพื่อส่งตรวจต่อ จำนวน 72 ราย พบผลการในครรภ์ เป็นโรคธาลัสซีเมียรุนแรง จำนวน 21 ราย (ร้อยละ 29.2) ขั้นตอนการตรวจ ดังแสดงในภาพที่ 2



หมายเหตุ: OF = One tube osmotic fragility test, DCIP = Dichlorophenol indophenol precipitation test, MCV/MCH = Mean Corpuscular Volume/Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH)

ภาพที่ 2 ขั้นตอนการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยโรคเบตาธาลัสซีเมีย จำนวนและความชุกจากผลการศึกษา

ผลการวิเคราะห์ความชุกของคู่สามี-ภรรยา ที่ให้ผลบวกในการตรวจวินิจฉัยโรคเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุล แบ่งตามอำเภอในแต่ละจังหวัดที่อยู่ในเขตสุขภาพที่ 10 ประกอบด้วย 5 จังหวัด ได้แก่ อุบลราชธานี

ศรีสะเกษ ยโสธร อำนาจเจริญ และมุกดาหาร จำนวนคู่เสี่ยงทั้งหมดที่ส่งตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ จำนวนคู่เสี่ยงที่ให้ผลบวก และความชุกในแต่ละอำเภอ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความชุกของตัวอย่างของคู่สามี-ภรรยา ที่ให้ผลบวกในการตรวจวินิจฉัยโรคเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุล แบ่งตามอำเภอในแต่ละจังหวัดที่อยู่ในเขตสุขภาพที่ 10

จังหวัด/อำเภอ	จำนวนคู่เสี่ยงทั้งหมด	จำนวนคู่เสี่ยงที่ให้ผลบวก (%ความชุก)
อุบลราชธานี		
เขมราฐ	45	24 (53.3)
เขื่องใน	38	21 (55.3)
เดชอุดม	73	28 (38.4)
โขงเจียม	26	4 (15.4)
โพธิ์ไทร	22	10 (45.5)
กุดข้าวปุ้น	12	3 (25)
ดอนมดแดง	5	1 (20)
ตระการพืชผล	38	15 (39.5)
ตาลชุม	9	4 (44.4)
นาเยีย	5	2 (40)
นาจะหลวย	3	2 (66.7)
นาตาล	2	2 (100)
น้ำยืน	25	2 (8)
บุญศรี	25	14 (56)
พิบูลมังสาหาร	49	28 (57.1)
ม่วงสามสิบ	29	19 (65.5)
เมืองอุบลราชธานี	116	49 (42.3)
วารินชำราบ	41	12 (29.3)
ศรีเมืองใหม่	31	15 (48.4)
สว่างวีระวงศ์	14	8 (57.1)
ลำโรง	29	13 (44.8)
สิรินธร	26	12 (46.2)
ศรีสะเกษ		
กันทรารมย์	29	13 (44.8)
ขุนหาญ	71	17 (23.9)
เบญจลักษ์	12	3 (25)
เมืองจันทร์	3	1 (33.3)
โนนคูณ	15	4 (26.7)

ตารางที่ 1 ความชุกของตัวอย่างของคู่สามี-ภรรยา ที่ให้ผลบวกในการตรวจวินิจฉัยโรคเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุล แบ่งตามอำเภอในแต่ละจังหวัดที่อยู่ในเขตสุขภาพที่ 10 (ต่อ)

จังหวัด/อำเภอ	จำนวนคู่เสี่ยงทั้งหมด	จำนวนคู่เสี่ยงที่ให้ผลบวก (%ความชุก)
ไทรบุรี	20	4 (20)
น้ำเกลี้ยง	25	8 (32)
บึงบูรพ์	2	1 (50)
ปรางค์กู่	38	7 (18.4)
พยุห์	1	0 (0)
ภูสิงห์	36	10 (27.8)
เมืองศรีสะเกษ	8	0 (0)
ยางชุมน้อย	4	2 (50)
ราษีไศล	11	3 (27.3)
วังหิน	20	7 (35)
ศรีรัตนะ	13	1 (7.7)
ศิลาลาด	1	0 (0)
ยโสธร		
กุดชุม	22	10 (45.5)
คำเขื่อนแก้ว	15	8 (53.3)
เลิงนกทา	28	12 (42.9)
ไทยเจริญ	5	2 (40)
ทรายมูล	9	6 (66.7)
ป่าดัว	5	1 (20)
มหาชนะชัย	6	2 (33.3)
เมืองยโสธร	4	4 (100)
อำนาจเจริญ		
ชานุมาน	19	6 (31.6)
ปทุมราชวงศา	17	8 (47.1)
พนา	1	1 (100)
เมืองอำนาจเจริญ	33	20 (60.6)
ลืออำนาจ	2	1 (5)
ห้วยตะพาน	1	1 (100)
มุกดาหาร		
คำชะอี	3	1 (33.3)
ดอนตาล	14	1 (7.1)
เมืองมุกดาหาร	37	17 (45.9)
รวม	1,248	483

ผลจากการตรวจวินิจฉัยโรคเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุลที่ให้ผลเป็นบวก จำนวน 483 คู่ พบยืนยันผิดปกติทั้งหมด 485 ราย ร่วมกับผู้ที่มิมี Hb E จำนวน 480 ราย จำแนกชนิดการกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมียได้ทั้งหมด 24 ชนิด โดยพบ Uncharacterized Hb Varaint จำนวน 1 ราย พบการกลายพันธุ์ชนิด NT-28 (A-G) ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ β^+ -thalassemia

มากที่สุดจำนวน 149 ราย คิดเป็นร้อยละ 30.7 รองลงมาคือ ชนิด CD 41/42 (-TTCT) ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ β^0 -thalassemia จำนวน 138 ราย คิดเป็นร้อยละ 28.5 และชนิด CD 17 (A-T) ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ β^0 -thalassemia จำนวน 71 ราย คิดเป็นร้อยละ 14.6 ตามลำดับ การกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมียชนิดอื่นๆ ที่ตรวจพบ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดการกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมียที่ตรวจพบ เปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้าที่มีรายงานในประเทศไทย (ข้อมูลเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ)

ชนิดการกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมีย	ชนิด	จำนวนการกลายพันธุ์ที่พบ (%)			
		การศึกษานี้	สุพรรณ พุเจริญ และคณะ ⁽⁴⁾	มูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย ⁽⁵⁾	สุภาวดี แยมศรี และคณะ ⁽⁶⁾
NT-28 (A-G)	β^+	149 (30.7)	2 (2.8)	1 (1.7)	151 (22.1)
CD 41/42 (-TTCT)	β^0	138 (28.5)	31 (43.7)	19 (31.6)	245 (35.9)
CD 17 (A-T)	β^0	71 (14.6)	14 (19.7)	13 (21.7)	167 (24.5)
$\delta\beta^0$ -thalassemia gene (12.6 kb del)	$\delta\beta^0$	37 (7.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
NT-31 (A-G)	β^+	17 (3.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
CD 71/72 (+A)	β^0	15 (3.1)	2 (2.8)	8 (13.3)	29 (4.2)
Hb Tak	β^+	11 (2.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
IVSI-1 (G-T)	β^0	10 (2.1)	1 (1.4)	1 (1.7)	18 (2.6)
3.4-kb deletion	β^0	5 (1.0)	0 (0)	0 (0)	5 (0.7)
CD 27 (+C)	β^0	5 (1.0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.1)
Hb Dhonburi	β^+	5 (1.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Hb Malay	β^+	4 (0.8)	3 (4.2)	0 (0)	1 (0.1)
CD 35 (C-A)	β^0	3 (0.6)	1 (1.4)	0 (0)	3 (0.4)
CD 26 (G-T)	β^0	2 (0.4)	0 (0)	9 (15)	4 (0.6)
* IVSII-654 (C-T)	β^+	2 (0.4)	9 (12.8)	5 (8.3)	16 (2.3)
IVSI-5 (G-C)	β^+	2 (0.4)	8 (11.2)	0 (0)	11 (1.6)
CD121 (-G)	β^0	1 (0.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
CD 95; (+A)	β^0	1 (0.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Filipino deletion	β^0	1 (0.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
NT-90 (C-T)	β^+	1 (0.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
CD 41 (-C)	β^+	1 (0.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

ตารางที่ 2 ชนิดการกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมียที่ตรวจพบ เปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่มีรายงานในประเทศไทย (ข้อมูลเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) (ต่อ)

ชนิดการกลายพันธุ์ ของยีนเบตาธาลัสซีเมีย	ชนิด	จำนวนการกลายพันธุ์ที่พบ (%)			
		การศึกษานี้	สุพรรณ พุเจริญ และคณะ ⁽⁴⁾	มูลนิธิ โรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย แห่งประเทศไทย ⁽⁵⁾	สุภาวดี แยมศรี และคณะ ⁽⁶⁾
Hb C	β^+	1 (0.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
NT-50 (G-A)	β^+	1 (0.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
NT-86 (C-G)	β^+	1 (0.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Uncharacterized Hb Variant	~	1 (0.2)	0 (0)	3 (5)	27 (4.0)
CD43 (G-T)	β^0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0.3)
CD15 (-T)	β^0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.1)
NT-87 (C-A)	β^+	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0.3)
รวม		485	71	60	683

* IVSII-654 (C-T) = β^+ ชนิดก่อให้เกิดอาการรุนแรง

จากการตรวจวินิจฉัยโรคเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุลที่ให้ผลเป็นบวก จำนวน 483 คู่ สามารถแยกจำนวนคู่เสี่ยงที่มีโอกาสเสี่ยงให้กำเนิดบุตรเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียชนิดไม่รุนแรง จำนวน 230 คู่ (ร้อยละ 47.5) มีความเสี่ยงเป็น β^+ /Hb E thalassemia จำนวน 190 คู่ โดยเป็นชนิด NT-28 (A-G) ร่วมกับ Hb E มากที่สุด จำนวน 147 คู่ มีความเสี่ยงเป็น $\delta\beta^0$ /Hb E thalassemia จำนวน 37 คู่ โดยทั้งหมดเป็นชนิด $\delta\beta^0$ -thalassemia gene (12.6 kb del) ร่วมกับ Hb E มีความเสี่ยงเป็น β^0/β^+ thalassemia จำนวน 1 คู่ โดยเป็นชนิด CD 41/42 (-TTCT) ร่วมกับ NT-28

(A-G) และ Uncharacterized Hb Variant ร่วมกับ Hb E 1 คู่ ส่วนจำนวนคู่เสี่ยงที่มีโอกาสให้กำเนิดบุตรเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง จำนวน 254 คู่ (ร้อยละ 52.6) มีความเสี่ยงเป็น β^0 /Hb E thalassemia จำนวน 251 คู่ โดยเป็นชนิด CD 41/42 (-TTCT) ร่วมกับ Hb E มากที่สุด จำนวน 135 คู่ มีความเสี่ยงเป็น β^+ /Hb E thalassemia ที่ก่อให้เกิดอาการรุนแรง จำนวน 2 คู่ โดยเป็นชนิด IVSII-654 (C-T) ร่วมกับ Hb E และมีความเสี่ยงเป็น β^0/β^0 thalassemia จำนวน 1 คู่ โดยเป็นชนิด homozygous CD 41/42 (-TTCT) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 จำนวนคู่สามี-ภรรยาที่มีโอกาสเสี่ยงให้กำเนิดบุตรเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียแต่ละชนิด ที่ให้ผลตรวจวินิจฉัยยีนเบตาธาลัสซีเมียเป็นบวก จำนวน 483 คู่

ชนิดของโรคเบตาธาลัสซีเมีย	ความชุก (%)
β^0 /Hb E Thalassemia (Major)	251 (52.0)
β^+ /Hb E Thalassemia (Intermedia)	190 (39.3)
$\delta\beta^0$ /Hb E Thalassemia (Intermedia)	37 (7.7)
β^+ /Hb E Thalassemia (Major)	2 (0.4)

ตารางที่ 3 จำนวนคู่สามี-ภรรยาที่มีโอกาสเสี่ยงให้กำเนิดบุตรเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียแต่ละชนิด ที่ให้ผลตรวจวินิจฉัยยีนเบตาธาลัสซีเมียเป็นบวก จำนวน 483 คู่ (ต่อ)

ชนิดของโรคเบตาธาลัสซีเมีย	ความชุก (%)
β^0/β^0 Thalassemia (Major)	1 (0.2)
β^0/β^+ Thalassemia	1 (0.2)
Uncharacterized Hb Variant	1 (0.2)
รวม	483 (100)

จากการศึกษาพบการส่งตรวจน้ำคร่ำเพื่อตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดที่ห้องปฏิบัติการเปิดให้บริการในภายหลังระหว่างปี พ.ศ. 2560 - 2564 มีตัวอย่างน้ำคร่ำส่งตรวจจำนวน 72 ราย โดยเป็นตัวอย่างที่ส่งต่อเนื่องจากคู่สามี-ภรรยาที่มีโอกาสเสี่ยงให้กำเนิดบุตรเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง พบว่าทารกในครรภ์เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงจำนวน 21 ราย (ร้อยละ 29.2) โดยเป็นชนิด Hb E ร่วมกับ β^0 -thalassemia ชนิด

CD 41/42 (-TTCT) จำนวน 10 ราย, CD 17 (A-T) จำนวน 7 ราย และ β^+ -thalassemia ชนิด IVSII-654 (C-T) ซึ่งเป็นชนิดก่อให้เกิดอาการรุนแรง จำนวน 1 ราย และ ทารกในครรภ์ไม่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง จำนวน 51 ราย โดยเป็นปกติ จำนวน 12 ราย เป็นพาหะ Hb E จำนวน 30 ราย และเป็นพาหะ β^0 -thalassemia จำนวน 8 ราย และเป็นพาหะ β^+ -thalassemia ชนิดก่อให้เกิดอาการรุนแรง จำนวน 1 ราย ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดจากตัวอย่างน้ำคร่ำที่ส่งตรวจวินิจฉัยโรคเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุลระหว่างปี พ.ศ. 2560-2564

ชนิดของโรคเบตาธาลัสซีเมีย	ความชุก (%)
Normal	12 (16.7)
Hb E carrier	30 (41.7)
β^0 -thalassemia carrier	
CD 41/42 (-TTCT)	6 (8.3)
CD 17 (A-T)	2 (2.8)
β^+ -thalassemia carrier (ชนิดก่อให้เกิดอาการรุนแรง)	
IVSII-654 (C-T)	1 (1.4)
β^0 /Hb E Thalassemia	
CD 41/42 (-TTCT)/Hb E	10 (13.9)
CD 17 (A-T) /Hb E	7 (9.7)
CD 71/72 (+A) /Hb E	3 (4.2)
β^+ /Hb E Thalassemia (ชนิดก่อให้เกิดอาการรุนแรง)	
IVSII-654 (C-T) /Hb E	1 (1.4)
รวม	72 (100)

วิจารณ์

เขตสุขภาพที่ 10 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง ประกอบด้วย จังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ ยโสธร อำนาจเจริญ และมุกดาหาร มีศูนย์รับบริการของรัฐเพียงแห่งเดียวที่เป็นศูนย์รับบริการตรวจวินิจฉัยโรคเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุล คือ ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี⁽⁷⁾ ตลอดระยะเวลา 8 ปี ที่เปิดบริการ รวมทั้งผลการบริหารจัดการเครือข่ายธาลัสซีเมียและการรณรงค์ของประเทศไทยและเขตสุขภาพที่ 10 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจหาความเสี่ยง พบว่าจำนวนตัวอย่างเลือดของคู่สามี-ภรรยาที่ส่งตรวจวินิจฉัยโรคเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุลหลังจากปีแรกที่เปิดให้บริการมีจำนวนมากกว่า 150 คู่ หรือ 300 ตัวอย่างต่อปี ดังแสดงในภาพที่ 1

ผลการสำรวจข้อผิดพลาดในการส่งตัวอย่างต่อเพื่อตรวจวินิจฉัยโรคเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุล พบจำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจโดยไม่จำเป็น จำนวน 45 คู่ จาก 1,248 คู่ คิดเป็นร้อยละ 3.6 ขณะที่ผลการศึกษาของ สุภาวดี แยมศรี และคณะ⁽⁶⁾ พบร้อยละ 11.8 โดยมีปัญหาในการส่งต่อตัวอย่างที่ไม่จำเป็นคล้ายๆ กัน คือ ตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินได้ปริมาณ Hb A₂ สูงปลอม ซึ่งตัวอย่างที่ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจวินิจฉัยโรคเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุลได้ผลเป็นลบ เมื่อทวนสอบค่าพารามิเตอร์ของเม็ดเลือดแดง พบว่าไม่เข้าข่ายผู้ที่เป็นโรคเบตาธาลัสซีเมีย MCV/MCH ต่ำ และค่า Hb A₂ สูง (Hb A₂ มากกว่าร้อยละ 3.5)⁽⁷⁾ จึงทำการตรวจซ้ำอีกครั้ง พบมีผล Hb A₂ ≤ ร้อยละ 3.5 ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบินจึงต้องมีมาตรฐาน มีการถ่ายทอดความรู้ การอบรมเจ้าหน้าที่ตรวจวิเคราะห์ และการควบคุมคุณภาพทั้งภายในและภายนอกองค์กร เพื่อให้ความถูกต้องแม่นยำในแต่ละห้องปฏิบัติการเป็นมาตรฐานเดียวกัน ซึ่งมีความสำคัญในการลดจำนวนตัวอย่างที่ส่งผิดพลาดหรือไม่จำเป็นต้องส่งตรวจต่อในระดับโมเลกุล การศึกษานี้พบการส่งตัวอย่างที่เป็นโรคฮีโมโกลบินเอช เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุล ซึ่งอาจเกิดจาก human error โรงพยาบาลที่ส่งตรวจควรตรวจสอบผลก่อนส่งตัวอย่างตรวจ และ

ห้องปฏิบัติการควรตรวจสอบผลการตรวจก่อนการตรวจในระดับโมเลกุลอีกครั้ง

ผลการจำแนกชนิดการกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมีย พบว่า Nucleotide-28 (A-G) เป็นการกลายพันธุ์ที่พบมากที่สุด (ร้อยละ 30.7) รองลงมา คือ CD 41/42 (-TTCT) และ CD 17 (A-T) (ร้อยละ 28.5 และ 14.6 ตามลำดับ) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีรายงานในประเทศไทยทั้งของ สุพรรณ พุเจริญ และคณะ⁽⁴⁾ มุลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย⁽⁵⁾ ที่ไม่มีการตรวจตำแหน่งการกลายพันธุ์นี้ จึงไม่พบการรายงาน หรือการศึกษาของสุภาวดี แยมศรี และคณะ⁽⁶⁾ ที่กลุ่มประชากรมีความแตกต่างกันทั้ง 3 การศึกษาพบการกลายพันธุ์ชนิด CD 41/42 (-TTCT) มากที่สุด (ร้อยละ 43.7, 31.6 และ 35.9 ตามลำดับ) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีรายงานจากภูมิภาคอื่นในประเทศไทยของมูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย⁽⁵⁾ ภาคกลาง พบการกลายพันธุ์ชนิด CD 41/42 (-TTCT), CD 17 (A-T) และ NT-28 (A-G) มากที่สุด (ร้อยละ 36.3, 17.4 และ 14.5 ตามลำดับ) ภาคใต้ พบการกลายพันธุ์ชนิด codon 26, CD 41/42 (-TTCT) และ IVSI-5 (G-C) มากที่สุด (ร้อยละ 33.7, 15.1 และ 13.6 ตามลำดับ) และภาคเหนือ พบชนิดการกลายพันธุ์ชนิด CD 41/42 (-TTCT), CD 17 (A-T) และ IVSI-1 (G-T) มากที่สุด (ร้อยละ 49.5, 34.4 และ 6.9 ตามลำดับ) พบว่าข้อมูลของเขตสุขภาพที่ 10 พบชนิดการกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมียคล้ายกับภาคกลาง คือ Nucleotide-28 (A-G), CD 41/42 (-TTCT) และ CD 17 (A-T) แต่ลำดับที่พบอันดับ 1 ไม่เหมือนกัน นอกจากนี้พบเดลตา-เบตาธาลัสซีเมียร้อยละ 7.8 ดังแสดงในตารางที่ 2 เป็นการยืนยันว่าเดลตา-เบตาธาลัสซีเมียมีจำนวนไม่น้อย และให้ผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินคล้ายคลึงกับเบตาธาลัสซีเมียจำเป็นต้องวินิจฉัยยืนยันแยกจากเบตาธาลัสซีเมียโดยตรวจระดับโมเลกุล⁽⁸⁾ จากตัวอย่างที่ให้ผลตรวจวินิจฉัยยีนเบตาธาลัสซีเมีย ระดับโมเลกุลเป็นบวก จำนวน 483 คู่ จำนวนคู่เสี่ยงที่มีโอกาสเสี่ยงให้กำเนิดบุตรเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง

ตามที่กระทรวงสาธารณสุขไทย ควบคุมและป้องกัน ทั้ง 2 โรค⁽²⁾ อยู่ที่ร้อยละ 52.5 โดยพบมากที่สุด คือ $\beta^0/\text{Hb E}$ thalassemia ร้อยละ 51.9 ซึ่งคล้ายกันกับการศึกษาของ สุภาวดี แยมศรี และคณะ⁽⁶⁾ ที่พบ $\beta^0/\text{Hb E}$ thalassemia มากที่สุด ร้อยละ 66.0 และคู่เสี่ยงที่มีโอกาสให้กำเนิดบุตรเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียชนิดไม่รุนแรง 47.5 ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าคู่สามี-ภรรยาที่มีโอกาสให้กำเนิดบุตรเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงและไม่รุนแรงมีส่วนประมาณครึ่งต่อครึ่ง แสดงให้เห็นว่าความจำเป็นที่ต้องทำหัตถการเพื่อตรวจวินิจฉัยโรคเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุลของทารกในครรภ์ต่อ เช่น การเจาะน้ำคร่ำ เพื่อวินิจฉัยก่อนคลอด (prenatal diagnostic) ลดลงตามไปด้วย

จากการศึกษาข้อมูลการส่งตรวจน้ำคร่ำเพื่อตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดที่ห้องปฏิบัติการเปิดให้บริการในปี พ.ศ. 2560-2564 จากคู่เสี่ยงที่มีโอกาสให้กำเนิดบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง จำนวน 171 คู่ มีการส่งตรวจน้ำคร่ำ จำนวน 72 ราย คิดเป็นร้อยละ 42.1 ของจำนวนคู่เสี่ยงในระยะเวลาที่ทำการศึกษา ผลพบว่าทารกในครรภ์เป็นโรคธาลัสซีเมียรุนแรง จำนวน 21 ราย โดยเป็น $\beta^0/\text{Hb E}$ thalassemia จำนวน 20 ราย คิดเป็นร้อยละ 27.8 พบชนิด CD 41/42 (-TTCT) ร่วมกับ Hb E มากที่สุด จำนวน 10 ราย คิดเป็นร้อยละ 13.9 สอดคล้องกับผลการตรวจยืนยันคู่เสี่ยงก่อนหน้าที่ยืนยัน β^0 -thalassemia เป็นชนิด CD 41/42 (-TTCT) มากที่สุดและเป็น $\beta^+/\text{Hb E}$ thalassemia ชนิดก่อให้เกิดอาการรุนแรง จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 1.4 ส่วนทารกในครรภ์ที่ให้ผลไม่เป็นโรคธาลัสซีเมียรุนแรง จำนวน 51 ราย คิดเป็นร้อยละ 70.8 ซึ่งมีทั้งทารกที่มีผลปกติ พาหะ Hb E พาหะ β^0 -thalassemia และพาหะ β^+ -thalassemia ชนิดก่อให้เกิดอาการรุนแรง ซึ่งสามารถตั้งครภ์ได้ตามปกติ ดังแสดงตารางที่ 4 โดยผลตรวจน้ำคร่ำเพื่อวินิจฉัยก่อนคลอดสอดคล้องกับผลตรวจยืนยันหญิงตั้งครภ์และสามีคู่เสี่ยงในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ก่อนหน้าทั้งหมด

ข้อมูลจำนวนการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดนี้อาจไม่สอดคล้องกับจำนวนคู่เสี่ยงที่ตรวจพบยีนผิดปกติทั้งหมด เนื่องจากห้องปฏิบัติการเปิดให้บริการในภายหลัง

โรงพยาบาลที่ส่งตัวอย่างหรือคู่สามี-ภรรยาคู่เสี่ยงนั้น อาจไปโรงพยาบาลหรือศูนย์นอกพื้นที่เขตสุขภาพที่ 10 แต่ข้อมูลเหล่านี้สะท้อนให้เห็นถึงประสิทธิภาพการทำงาน การควบคุมและป้องกันโรคเบตาธาลัสซีเมียของห้องปฏิบัติการที่เปิดให้บริการมาเป็นระยะเวลา 8 ปี ทั้งด้านการให้ความรู้แก่นักศึกษา ประชาชน ผู้ป่วย หรือบุคลากรทางการแพทย์ การตรวจหาผู้ป่วยหรือพาหะ การตรวจคัดกรอง การตรวจวินิจฉัยโรคเบตาธาลัสซีเมียจากสามี-ภรรยาคู่เสี่ยงหรือทารกในครรภ์ รวมถึงการให้คำแนะนำทางพันธุกรรมต่อแพทย์ พยาบาลและบุคลากร ทางแพทย์ เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้ป่วยและครอบครัว บุคลากร และการสาธารณสุข ของประเทศ

สรุป

การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบความชุกและชนิดการกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมียในคู่สามี-ภรรยาคู่เสี่ยงในเขตสุขภาพที่ 10 ที่ส่งตัวอย่างเลือดเข้ารับการตรวจวินิจฉัยโรคเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุล ซึ่งชนิดการกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมียที่พบมากที่สุด คือ Nucleotide-28 (A-G) แตกต่างจากการศึกษาที่ผ่านมาที่มีรายงานในประเทศไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบ CD41/42 (-TTCT) มากที่สุดและสามารถเปรียบเทียบความชุกและชนิดการกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมียกับภูมิภาคอื่น ๆ ของประเทศไทย ข้อมูลที่ได้ทำให้ห้องปฏิบัติการสามารถออกแบบวิธีการตรวจวินิจฉัยยีนเบตาธาลัสซีเมียเบื้องต้นได้อย่างเหมาะสม และครอบคลุม แพทย์และพยาบาลสามารถนำข้อมูลไปใช้ในการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมที่เหมาะสม ผลการศึกษาครั้งนี้วิเคราะห์จากศูนย์บริการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างเพียงแห่งเดียว ซึ่งอาจมีบางโรงพยาบาลที่ส่งตรวจกับภาคเอกชนหรือศูนย์บริการอื่น หากทำการรวบรวมข้อมูลจากหลายแห่งที่เปิดให้บริการอาจได้ข้อมูลที่สะท้อนความจริงเกี่ยวกับสถานการณ์การตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียระดับโมเลกุลในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียของประเทศ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะบดีวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่อนุญาตการเข้าถึงข้อมูลผลการตรวจย้อนหลังของห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และขอขอบคุณ วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่สนับสนุนทุนวิจัยภายใต้โครงการวิจัยการเรียนการสอน หรือพัฒนานักศึกษา หรือการพัฒนางานประจำเป็นงานวิจัย (Routine to Research) งบประมาณเงินรายได้ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2565

เอกสารอ้างอิง

1. Thalassemia Foundation of Thailand. The First Annual Conference on thalassemia prevention and control in Thailand; 1993 April 30; Songkla, Thailand: Prince of Songkla University: Thailand; 1993
2. Fucharoen S, Winichagoon P. Thalassemia in Southeast Asia: problem and strategy for prevention and control. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1992; 23: 647-55.
3. ชลันดา ลาวิลาศ, สุภาพร ช่างคำ, กมลชนกงามดี, ไพเราะ แสนหวั่ง, นวินดา เจียมบุญศรี, รสริน การ-เพียร. เอกสารสืบเนื่องการประชุมวิชาการวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข ครั้งที่ 6 Thailand 4.0 กับผู้สูงอายุไทยเรื่อง สถานการณ์การตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียระดับโมเลกุลในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง: ข้อมูล 3 ปีย้อนหลังจากศูนย์รับบริการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย 1 แห่ง. วันที่ 3 พฤษภาคม 2560. อุบลราชธานี: มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี; 2560.
4. Fucharoen S, Fucharoen G, Sriroongrueng W, Laosombat V, Jetsrisuparb A, Prasatkaew S, et al. Molecular basis of beta-thalassemia in Thailand: analysis of beta-thalassemia mutations using the polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1989; 84: 41-6.
5. สุทัศน์ พุเจริญ, วรพรรณ ตันไพจิตร, กิตติ ต่อจรัส, วิปร วิประกษิต, อรุณทัย มีแก้วกฤษ, บรรณาธิการ. แนวทางการวินิจฉัยและการรักษาโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย มูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ: สถาบันสุขภาพแห่งชาติมหาราชินี, 2557.
6. Yamsri S, Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Sae-ung N, Ratanasiri T, Fucharoen S. Prevention of severe thalassemia in northeast Thailand: 16 years of experience at a single university center, *Prenat. Diagn.* 2010; 30(6): 540-546.
7. คณะทำงานทบทวนแนวทางปฏิบัติในการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อสนับสนุนการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมีย. แนวทางปฏิบัติในการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อสนับสนุนการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมีย. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2559.
8. Sae-ung N, Srivorakun H, Fucharoen G, Yamsri S, Sanchisuriya K, Fucharoen S. Phenotypic expression of hemoglobins A2, E and F in various hemoglobin E related disorders. *Blood Cells Mol Dis.* 2012; 48(1): 11-6.

Prevalence and Molecular Characterization of Beta-Thalassemia Gene Mutations in At-Risk Couples: A Retrospective Study in Health Region 10, 2014–2021

Chakrit Chawarit, Supaporn Changkam and Nawinda Vanichakulthada

Ubon Ratchathani University Hospital, College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

ABSTRACT This study aimed to collect the results of beta-thalassemia mutation testing conducted at the medical laboratory of Ubon Ratchathani University Hospital, which serves as the sole public service center in Health Region 10. The study spanned from 2014 to 2021. Its objective was to assess the prevalence and types of beta-thalassemia gene mutations using the molecular diagnostic tests provided in the laboratory for beta-thalassemia. Out of the 1,248 sample pairs obtained from at-risk couples, 483 pairs exhibited positive beta-thalassemia gene mutations. The most frequently observed mutation was nucleotide-28 (A-G), occurring at a rate of 30.7%. Additional beta-thalassemia gene mutations were also identified, including CD41/42 (-TTCT) at 28.5% and CD17 (A-T) at 14.6%. Within the cohort of at-risk couples, 254 pairs (52.6%) were identified as being at high risk of severe beta-thalassemia disease. Errors in the unnecessary transport of blood samples occurred in 45 pairs, most of which (93.3%, or 42 pairs) were found to have falsely elevated Hb A₂ levels. However, it is important to note that this study is retrospective and limited to just one out of several referral centers in the region. Collecting data from multiple centers would offer more precise evidence and greatly contribute to the development of prevention and control programs for these prevalent genetic disorders in the region.

Keywords: Beta-thalassemia, At-risk couples, Health Region 10

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
	Padet Siriyasatien	Chulalongkorn University
	Pornpimol Kongtip	Mahidol University
	Srisurang Tantimavanich	Mahidol University
	Sunee Sirivichayakul	Chulalongkorn University
	Chanitra Thuwajit	Mahidol University
	Pintip Pongpech	Independent Scholar
	Suwanna Charunut	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
	Uruyakorn 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.dmssc@dmssc.mail.go.th	
Acknowledgment	Mr. Sakwichai Ontong from Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences for generosity and permission to use the image of <i>Houttuynia cordata</i> leaves and flowers as cover illustration	
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>