



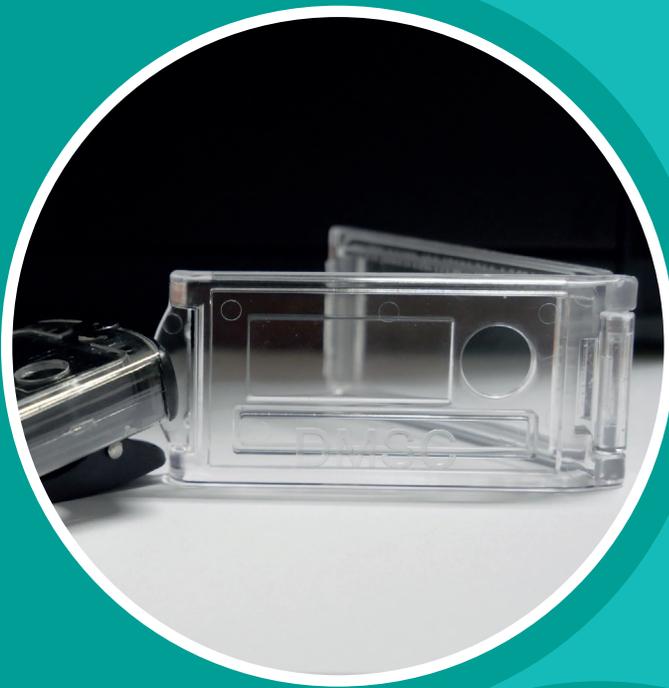
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วารสาร

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 65 ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม 2566 • Vol. 65 No. 4 October - December 2023



Approved by TCI during (2022-2024)

ISSN 0125-684X

E-ISSN 2697-4525

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 65 ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม 2566

Vol. 65 No. 4 October - December 2023

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- ความสัมพันธ์ระหว่างระดับไทรอยด์สติมูเลติงฮอร์โมนของทารกแรกเกิดกับปริมาณไอโอดีนในปัสสาวะของมารดา และการประเมินภาวะไอโอดีนระดับประชากรรายพื้นที่ในปี พ.ศ. 2562 237
หรรษา ไทยศรี เปี่ยมนุกุล กระแสร์ เพ็ญพรรณ ทองเงา สุภาพร นามมูลน้อย
ทิพวัลย์ กรศิริปัญญา นภาพรรณ วิริยะอุตสาหกุล นันทยา จงใจเทศ จุฑารัตน์ สุภานุวัฒน์
และ สุรัคเมธ มหาศิริมงคล
- การเปรียบเทียบผลการวัดความถี่ของลำรังสีเอกซเรย์ระหว่างเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล และคอลลิเมเตอร์ 248
รุ่งทิพย์ พุฒบุรี และ คทยาอุท นิกภาพฤกษ์
- การทดสอบความใช้ได้ของตลับบรรจุแผ่นวัดรังสีไอเอสแอล DMSc Holder 256
เดวิช ตุงคะเสีร์รักษ์ สถาพร กล่อมแก้ว ประเชิญ เชษฐสิงห์ ศิริณา เกิดสีทอง
และ อุดมทรัพย์ จันทพร
- การสังเคราะห์และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารกลุ่มคูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต 267
พิราภรณ์ บุญอำพล และ วันชัย ปลื้มภาณุภัทร
- การสังเคราะห์และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ 281
ศศิธร บุปผาทาโน และ วันชัย ปลื้มภาณุภัทร
- การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้วิธีวิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทนกลุ่มสารอินทรีย์ในการประเมินประสิทธิภาพการผลิตพลาสติกแปรใช้ใหม่ชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลต (rPET) โดยเทคนิค GC-MS 294
ชลธาร แสงเรืองฤทธิ์ ศศิธร ไขแก้ว ภัสสะริน สายสุวรรณ พิมพ์ดา ชาวบน
ศศิธร หอมดำรงวงศ์ และ อูมา บริบูรณ์

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

- การศึกษาย้อนหลังของผลการรักษาโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์
ด้วยยา rituximab ชนิดชีววัตถุคล้ายคลึง 312
ชวภา ปิยะบุญญานนท์ พิมพิใจ นิภารักษ์ และ นรมน อีระอัมพรพันธุ์

บทความทั่วไป

- การเตรียมห้องปฏิบัติการอณูชีวโมเลกุลในการตรวจหาเชื้ออุบัติใหม่: ประสบการณ์
จากการระบาดใหญ่ของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ที่สถาบันบำราศนราดูร 325
สุนนมาลย์ อุตยมกุล

CONTENTS

Page

Original Articles

- The Correlation between Newborn Thyroid Stimulating Hormone with Maternal Urine Iodine Levels and the Assessment of Iodine Status in the Population during 2019** 237
Hansa Thaisri, Piamnukul Krasao, Penpan Thong-ngao, Supaporn Nammoonnoy, Thippawan kornsiripanya, Napaphan Viriyautsahakul, Nuntaya Chongchaithe, Jutharat Supanuwat, and Surakameth Mahasirimongkol
- Comparison of X-ray Beam Overlap Measurements between Digital X-ray Ruler and Collimator Test Tool** 248
Rungtip Putburee and Khatayut Nigapruek
- Performance Verification of the OSL DMSc Holder** 256
Tewit Tungkasereeruk, Sataporn Klomkaew, Prachern Chethasingha, Sirina Kurdsithong, and Udomsap Chanthason
- Synthesis and α -Glucosidase Inhibitory Activity of Coumarin-3-Carboxylates** 267
Piraporn Boonumpol and Wanchai Pluempanupat
- Synthesis and Tyrosinase Inhibitory Activity of Monoterpenoid Esters** 281
Sasithorn Buppatano and Wanchai Pluempanupat
- Method Development and Validation of Surrogate Organic Contaminants Analysis for Evaluation of the Recycled Polyethylene Terephthalate (rPET) Plastic Production Process by GC-MS** 294
Chalathan Saengruengrit, Sasitorn Khaikaew, Passarin Saisuwan, Pimpisa Chaobon, Sasitorn Homdumrongvong, and Uma Boriboon

Laboratory Finding

- Biosimilars of Rituximab-based Therapy for Treatment of B-cell Lymphoma: A Retrospective Analysis** 312
Chavada Piyabun-yanon, Pimjai Niparuck and Noramon Teeraumpornpunt

General Articles

- Preparedness of Biomolecular Laboratories for Detecting Emerging Pathogens: Insights from the COVID-19 Pandemic Experiences at Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute** 325
Sumonmal Uttayamakul

บทนำ

ไอโอดีนเป็นสารตั้งต้นในการสร้างฮอร์โมนไทรอกซิน (thyroxine; T4) และไตรไอโอดิโตรนิน (triiodothyronine; T3) ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการเจริญเติบโตและพัฒนาการของร่างกาย รวมทั้งการสร้างเส้นใยสมองของทารกตั้งแต่ในครรภ์มารดาจนถึงอายุ 3 ปี^(1,2) การขาดสารไอโอดีนส่งผลให้การสร้างฮอร์โมน T3 และ T4 ไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย ทำให้เกิดการกระตุ้นต่อมใต้สมอง (pituitary gland) ให้สร้างไทรอยด์สติมูเลติงฮอร์โมน (thyroid stimulating hormone; TSH) เพิ่มขึ้น เพื่อกระตุ้นต่อมไทรอยด์สร้างฮอร์โมน T3 และ T4 ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม⁽³⁾ ดังนั้นร่างกายจำเป็นต้องมีปริมาณไอโอดีนที่เพียงพอ เพื่อให้การสร้างไทรอยด์ฮอร์โมนอยู่ในระดับปกติ ไอโอดีนจึงมีความสำคัญต่อคนทุกกลุ่มวัย โดยเฉพาะในหญิงตั้งครรภ์หากขาดไอโอดีนอาจส่งผลให้เกิดการแท้งหรือรุนแรงถึงขั้นทารกเสียชีวิตระหว่างคลอด⁽⁴⁾

องค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) แนะนำประชากรทั่วไปควรได้รับปริมาณไอโอดีน 90-150 ไมโครกรัมต่อวัน ($\mu\text{g}/\text{day}$) แต่สำหรับหญิงตั้งครรภ์และหญิงให้นมบุตรควรได้รับไอโอดีนไม่น้อยกว่า 250 $\mu\text{g}/\text{day}$ ⁽⁵⁻⁷⁾ ความต้องการสารไอโอดีนในหญิงตั้งครรภ์ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากร่างกายต้องการสร้างไทรอยด์ฮอร์โมนเพิ่มขึ้น ส่งผ่านฮอร์โมนให้ทารกในครรภ์นำไปสร้างเส้นใยประสาทในสมอง เพื่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของทารกในครรภ์และลดความเสี่ยงการสูญเสียไอโอดีนที่ขับออกเพิ่มมากขึ้นทางปัสสาวะในขณะตั้งครรภ์⁽⁸⁾

โดยทั่วไปวิธีประเมินการได้รับสารไอโอดีนอ้างอิงตามเกณฑ์ WHO ในประชากรมีดังนี้ 1) ค่ามัธยฐานไอโอดีนในปัสสาวะของกลุ่มประชากร (median urinary iodine; MUI) 2) ระดับ TSH ในทารกแรกเกิด 3) ขนาดของต่อมไทรอยด์ (thyroid gland size) และ 4) ปริมาณไทโรโกลบูลิน (thyroglobulin; Tg) โดยตัวชี้วัดหลักที่ใช้ในการประเมินสถานการณ์โรคขาดสารไอโอดีน คือ ค่ามัธยฐานไอโอดีนในปัสสาวะ ซึ่งการแปลผลใช้ในระดับประชากรรายพื้นที่ ไม่สามารถใช้สำหรับการวินิจฉัยโรคขาดสารไอโอดีนรายบุคคลได้ เนื่องจากความแปรปรวนระหว่างวันจากการขับสารไอโอดีนออกมา

ในปัสสาวะ โดยกำหนดให้ค่า MUI ของหญิงตั้งครรภ์อยู่ในช่วงมากกว่าหรือเท่ากับ 150-249 ไมโครกรัมต่อลิตร ($\mu\text{g}/\text{L}$) แสดงถึงพื้นที่ได้รับไอโอดีนเพียงพอ นอกจากนี้ยังมีการใช้ระดับ TSH ในทารกแรกเกิดเป็นตัวชี้วัดเสริมที่นำมาใช้ประเมินภาวะโภชนาการไอโอดีนในระดับประชากรรายพื้นที่ได้ โดยทารกที่อายุ 72-96 ชั่วโมงหลังเกิด จำนวนน้อยกว่าร้อยละ 3 ที่มีระดับ TSH ในซีรัมมากกว่า 11.2 mU/L (5.0 mU/L ในเลือด)

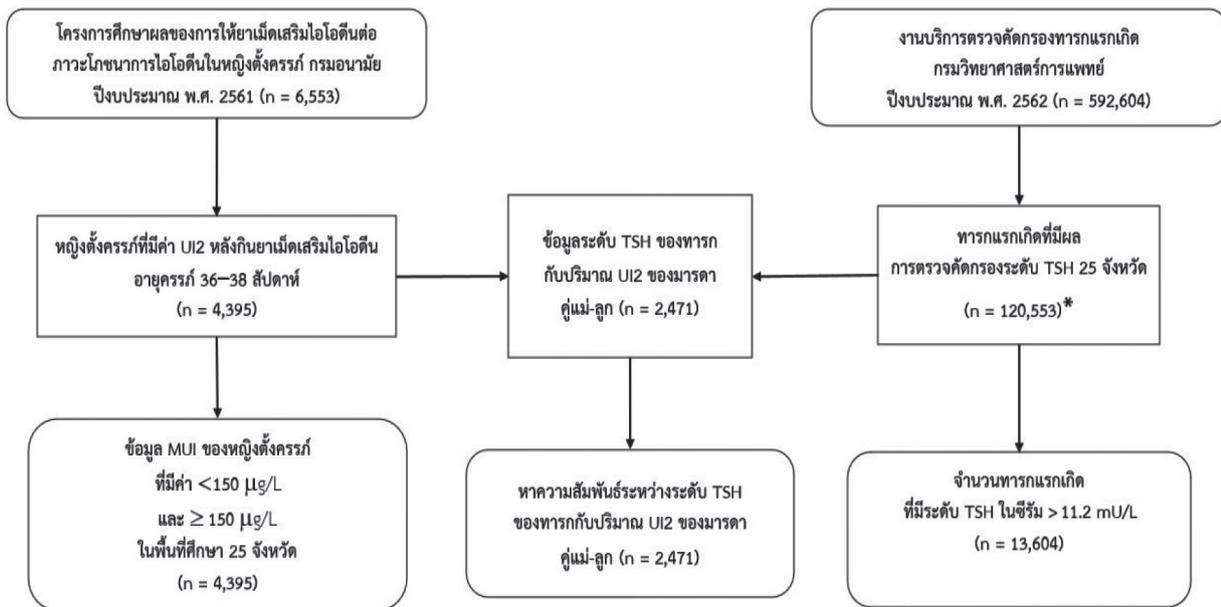
สำหรับประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขโดยศูนย์ปฏิบัติการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ดำเนินการตรวจคัดกรองภาวะพร่องไทรอยด์ฮอร์โมนแต่กำเนิด (congenital hypothyroidism; CHT) จากการตรวจวัดระดับ TSH ในทารกแรกเกิดทุกรายช่วงอายุ 48-72 ชั่วโมงหลังเกิด โดยเจาะส้นเท้าหรือหลังมือของทารกเพื่อเก็บตัวอย่างเลือดหยดลงบนกระดาษซับ และประยุกต์ใช้ระดับ TSH ประเมินภาวะไอโอดีนในระดับประชากรรายพื้นที่ โดยอ้างอิงเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก เนื่องจากยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าผลที่ได้จากการตรวจระดับ TSH ของทารกแรกเกิดจะสามารถสะท้อนสถานการณ์การขาดสารไอโอดีนได้อย่างแท้จริงหรือไม่ เพราะมีปัจจัยหลายอย่างที่ส่งผลต่อการแปลผล เช่น ชนิดของตัวอย่างเลือดจาก cord blood มักมีค่า TSH สูงกว่าที่เก็บจากส้นเท้าของทารกแรกเกิดที่อายุมากกว่า 48 ชั่วโมง วิธีการตรวจหาระดับ TSH ด้วยวิธี immunoradiometric assay (IRMA) จะพบค่า TSH สูงกว่าการตรวจด้วยวิธี immunofluorometric assay (IFMA) และอายุของทารกแรกเกิดที่ทำการเก็บตัวอย่างเลือด หากน้อยกว่า 48 ชั่วโมง ค่า TSH จะสูงกว่าการเจาะที่อายุมากกว่า 48 ชั่วโมง⁽⁹⁾ ระดับ TSH ของประเทศไทยส่วนใหญ่ได้จากการคัดกรอง CHT ในทารกที่อยู่ในช่วงอายุ 48-72 ชั่วโมง

กระทรวงสาธารณสุขมีนโยบายการจ่ายยาเม็ดเสริมไอโอดีนให้กับหญิงตั้งครรภ์ทุกรายและหญิงให้นมบุตรจนถึง 6 เดือน โดยบรรจุในชุดสิทธิประโยชน์ตั้งแต่ พ.ศ. 2553 ภายหลังจากดำเนินการตามนโยบายดังกล่าว เพื่อให้ได้ข้อมูลเชิงประจักษ์และเป็นแนวทางการเสริมไอโอดีนแก่หญิงตั้งครรภ์และหญิงให้นมบุตร รวมทั้งเป็นข้อมูลแสดงสถานการณ์โรคขาดสารไอโอดีน

คือ 1) ณ วันที่เจาะเลือด ทารกมีอายุน้อยกว่า 48 ชั่วโมง
 2) ทารกมีน้ำหนักน้อยกว่า 2,500 กรัม 3) อายุครรภ์มารดาน้อยกว่า 36 สัปดาห์ และ 4) เป็นทารกแฝด เพื่อตัดตัวอย่างที่มีโอกาสให้ผลการตรวจ TSH ผิดปกติก่อน ได้ข้อมูลทารก จำนวน 120,553 ราย นำมาเชื่อมโยงกับข้อมูลของหญิงตั้งครรภ์ที่มีค่า UI2 จำนวน 4,395 ราย พบทารกจำนวน 2,471 ราย ที่เป็นคุณแม่-ลูก และมีทารกจำนวน 13,604 ราย⁽¹³⁾ ที่มีระดับ TSH ในซีรัมมากกว่า 11.2 mU/L โดยระดับ TSH ในซีรัมคำนวณจากระดับของ TSH ที่ตรวจจากกระดาษซับเลือดเตรียมจากเลือดครบส่วน โดยอนุมานว่าประกอบด้วยเม็ดเลือดแดงร้อยละ 55 ผสมกับซีรัมร้อยละ 45 (55% hematocrit) ดังนั้นระดับ TSH = 5 mU/L ในเลือดคำนวณเทียบเท่ากับระดับ TSH 11.12 mU/L ในซีรัม

การตรวจคัดกรอง CHT ในทารกหลังคลอดที่มีอายุ 48-72 ชั่วโมง โดยการตรวจหาระดับ TSH ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ดำเนินการโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽¹⁴⁾ มีมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ โดยเข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญ Newborn Screening Program จาก United Kingdom National External Quality Assessment Scheme (UK-NEQAS) และผ่านการรับรองคุณภาพตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ISO 15189:2012 จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

จำนวนข้อมูล UI และ MUI ของหญิงตั้งครรภ์ และจำนวนข้อมูลระดับ TSH ของทารกมีแผนภูมิการคัดเลือกข้อมูลที่น่ามาวิเคราะห์ความสัมพันธ์และประเมินผลดังแสดงในภาพที่ 1



หมายเหตุ: *จำนวนข้อมูลที่ผ่านมาเกณฑ์การคัดเลือกข้อมูลตัวอย่าง

ภาพที่ 1 ขั้นตอนการคัดเลือกข้อมูลระดับไอโอดีนในปัสสาวะของหญิงตั้งครรภ์และระดับ TSH ของทารกแรกเกิด

การวิเคราะห์ข้อมูลและการประเมินผล

ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ TSH ของทารกแรกเกิดกับปริมาณ UI ของมารดา

วิเคราะห์หาระดับความสัมพันธ์ระหว่างระดับ TSH ของทารกแรกเกิด (ลูก) กับปริมาณ UI ของหญิงตั้งครรภ์ (แม่) ภายหลังจากได้รับการเสริมไอโอดีนด้วยวิธีทางสถิติสเปียร์แมน (Spearman's correlation test; r) ที่ระดับนัยสำคัญ p -value < 0.05

การประเมินภาวะไอโอดีนในระดับประชากรรายพื้นที่ อ้างอิงตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก

ประเมินภาวะไอโอดีนของประชากรในพื้นที่ 25 จังหวัด ใช้ข้อมูล 1) ค่า MUI ของหญิงตั้งครรภ์ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 150 $\mu\text{g/L}$ หรือจำนวนทารกแรกเกิดที่อายุ 48-72 ชั่วโมงหลังเกิด น้อยกว่าร้อยละ 3 มีระดับ TSH มากกว่า 11.2 mU/L ในซีรัมของแต่ละจังหวัด นำมาเขียนแผนผังบนแผนที่ประเทศไทย

ผลการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

โครงการศึกษาผลของการให้ยาเม็ดเสริมไอโอดีนต่อภาวะโภชนาการไอโอดีนในหญิงตั้งครรภ์ของ

กรมอนามัย และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยของกรมอนามัย เมื่อวันที่ 22 มิถุนายน พ.ศ. 2560 รหัสโครงการ 150 และผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการศึกษาวิจัยในคนกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เมื่อวันที่ 9 สิงหาคม พ.ศ. 2561 เลขที่ 3/2561

ผล

ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ TSH ของทารกแรกเกิดกับปริมาณ UI ของมารดา

ข้อมูล UI₂ ของหญิงตั้งครรภ์ภายหลังจากได้รับยาเม็ดเสริมไอโอดีน เมื่อนำมาเชื่อมโยงกับข้อมูลของทารกจากตัวอย่างที่ส่งตรวจคัดกรอง CHT ที่ระดับ TSH ได้คุณแม่-ลูก จำนวน 2,471 คู่ พบหญิงตั้งครรภ์มีค่ามัธยฐานปริมาณ UI₂ ที่ 156.8 $\mu\text{g/L}$ พบมีค่า UI น้อยกว่า 150 $\mu\text{g/L}$ จำนวน 1,212 ราย คิดเป็นร้อยละ 49.05 และพบทารกมีค่ามัธยฐานระดับ TSH ในซีรัมมากกว่า 11.2 mU/L จำนวน 256 ราย คิดเป็นร้อยละ 10.36 รายละเอียดค่ามัธยฐาน UI₂ และ TSH ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณ UI₂ ของหญิงตั้งครรภ์ภายหลังจากได้รับยาเม็ดเสริมไอโอดีนและระดับ TSH ในซีรัมของทารกแรกเกิดในตัวอย่างคุณแม่-ลูก จำนวน 2,471 คู่

ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ	median (IQR)	ร้อยละของจำนวนที่เกินเกณฑ์ WHO
ปริมาณ UI ของหญิงตั้งครรภ์ ($\mu\text{g/L}$)	156.8 (95.2-250.6)	49.05
ระดับ TSH ในซีรัมทารกแรกเกิด (mU/L)	5.2 (3.5-8.0)	10.36

หมายเหตุ: IQR = inter-quartile range

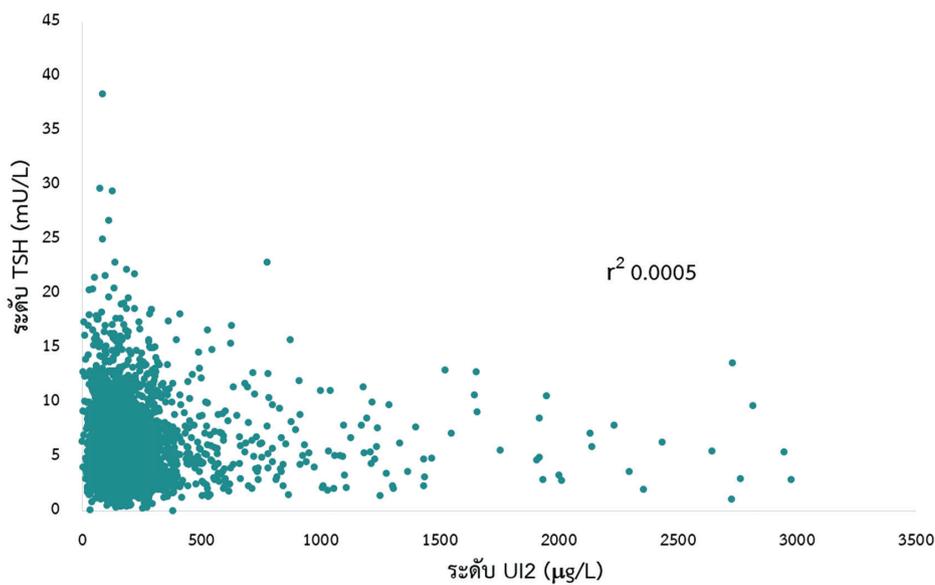
เมื่อนำข้อมูลปริมาณ UI₂ ของมารดาภายหลังจากได้รับยาเม็ดเสริมไอโอดีนในตัวอย่างคุณแม่-ลูก หาค่าความสัมพันธ์กับระดับ TSH ในซีรัมของทารก โดยใช้ Spearman's correlation test (r) พบค่า correlation coefficient เท่ากับ - 0.024 และ p -value = 0.233 ซึ่งแสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน (ที่ $\alpha = 0.05$) สอดคล้องกับ scatter

plot ของชุดข้อมูลปริมาณไอโอดีนในปัสสาวะของมารดาภายหลังจากได้รับยาเม็ดเสริมไอโอดีน UI₂ (แกน X) และชุดข้อมูลระดับ TSH ของทารก (แกน Y) ในตัวอย่างคุณแม่-ลูก (รายบุคคล) ดังแสดงในภาพที่ 2 พบว่าชุดข้อมูลมีการกระจายตัวแบบไม่สัมพันธ์กัน

การประเมินภาวะไอโอดีนระดับประชากรรายพื้นที่

หญิงตั้งครรภ์ภายหลังได้รับยาเม็ดเสริมไอโอดีน จาก 25 จังหวัด (จำนวน 4,395 ราย) มีค่า MUI เท่ากับ 156.7 µg/L โดย 9 จังหวัด มีค่า MUI น้อยกว่า 150 µg/L และมี 16 จังหวัด มีค่า MUI มากกว่าหรือเท่ากับ 150 µg/L จังหวัดอ่างทองมีค่า MUI สูงสุดที่ 226.7 µg/L และ จังหวัดอำนาจเจริญมีค่า MUI ต่ำสุดที่ 107.4 µg/L การวิเคราะห์ข้อมูลระดับ TSH ของทารกแรกเกิด ทุกรายในพื้นที่ 25 จังหวัด จำนวน 120,553 ราย พบทารก ที่มีระดับ TSH ในซีรัมมากกว่า 11.2 mU/L จำนวน

13,604 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.3 โดยทุกจังหวัด พบทารกแรกเกิดเกินกว่าร้อยละ 3 ที่มีระดับ TSH ใน ซีรัมมากกว่า 11.2 mU/L โดยจังหวัดชลบุรีพบจำนวน สูงสุดที่ร้อยละ 17.5 และจังหวัดชุมพรพบจำนวนต่ำสุดที่ ร้อยละ 5.7 รายละเอียดค่า MUI และ TSH ของแต่ละ จังหวัด ดังแสดงในตารางที่ 2 และนำข้อมูลจังหวัดที่ได้ รับสารไอโอดีนเพียงพอโดยใช้ค่า MUI พบ 16 จังหวัด แสดงด้วยสีเขียว TSH ไม่พบจังหวัดใดที่มีภาวะไอโอดีน เพียงพอแสดงด้วยสีแดง และจังหวัดที่ไม่ได้ประเมิน หรือไม่เกี่ยวข้องแสดงด้วยสีเทา ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 2 ระดับ TSH ของทารกกับปริมาณ UI ของมารดา ตัวอย่างคุณแม่ - ลูก

ตารางที่ 2 ค่า MUI ของหญิงตั้งครรภ์และร้อยละของจำนวนทารกที่มีระดับ TSH ในซีรัมมากกว่า 11.2 mU/L (ตุลาคม พ.ศ. 2561 ถึง กันยายน พ.ศ. 2562)

พื้นที่จังหวัด	หญิงตั้งครรภ์		ทารกแรกเกิด		ร้อยละ
	จำนวน (ราย)	MUI (µg/L)	จำนวน (ราย)	TSH > 11.2 mU/L (ราย)	
กระบี่	262	200.0	4,540	355	7.8
กาฬสินธุ์	113	130.0	2,225	264	11.9
กำแพงเพชร	279	143.5	3,293	332	10.1
ขอนแก่น	172	162.0	9,915	879	8.9
ชลบุรี	137	178.1	15,902	2,784	17.5
ชัยภูมิ	98	150.0	5,034	417	8.3
ชุมพร	197	143.4	3,832	217	5.7
นครราชสีมา	173	174.0	11,337	1,210	10.7
บึงกาฬ	296	112.7	1,593	180	11.3

วิจารณ์

ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ TSH ของทารกแรกเกิดกับปริมาณ UI2 ของมารดาภายหลังได้รับยาเม็ดเสริมไอโอดีน จำนวน 2,471 คู่ การศึกษานี้พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันที่ระดับสัมพันธ์ความสัมพันธ์สเปียร์แมน (r) เท่ากับ -0.024 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในประเทศนิวซีแลนด์โดย Skeaff SA และคณะ 2012⁽¹⁵⁾ พบว่าการใช้ระดับ TSH, T4 และ T3 ในการประเมินภาวะพร่องไทรอยด์ฮอร์โมนไม่สัมพันธ์กับปริมาณ UI ขณะที่การศึกษาในประเทศกานา โดย Dei-Tutu SA และคณะ 2020⁽¹⁶⁾ พบว่าระดับ TSH มีความสัมพันธ์กับค่า UI แต่ในระดับต่ำ ($r = 0.1, p\text{-value} = 0.02$)

สำหรับการประเมินภาวะไอโอดีนจากการใช้ค่า MUI ในหญิงตั้งครรภ์ภายหลังได้รับยาเม็ดเสริมไอโอดีน จำนวน 4,395 ราย ในพื้นที่ 25 จังหวัด พบมีค่า MUI เท่ากับ $156.7 \mu\text{g/L}$ มี 16 จังหวัด ที่ไม่ขาดสารไอโอดีน ในหญิงตั้งครรภ์ภายหลังกินยาเม็ดเสริมไอโอดีนแล้ว โดยจังหวัดอ่างทองมีค่า MUI สูงสุดที่ $226.7 \mu\text{g/L}$ ซึ่งยังอยู่ในเกณฑ์ปกติ คือ $150\text{--}249 \mu\text{g/L}$ แสดงถึงการได้รับสารไอโอดีนในหญิงตั้งครรภ์ที่เพียงพอตามเกณฑ์ของ WHO และสอดคล้องกับนโยบายการจ่ายยาเม็ดเสริมไอโอดีนในหญิงตั้งครรภ์ รวมทั้งพบว่ามี 9 จังหวัด (ร้อยละ 36) มีค่า MUI น้อยกว่า $150 \mu\text{g/L}$ ถือเป็นพื้นที่ขาดสารไอโอดีน อาจเกิดจากสาเหตุหลัก (ร้อยละ 9.2) ที่หญิงตั้งครรภ์ไม่ได้รับยาเนื่องจากโรคประจำตัวอยู่ในข่ายโรคที่ไม่สามารถจ่ายยาเม็ดเสริมไอโอดีนให้ได้ และยังมีสาเหตุอื่นๆ เช่น ลืมกิน กินแล้วอาเจียน ปวดหัว แน่นหน้าอก และท้องผูก เป็นต้น⁽¹⁰⁾

การประเมินภาวะไอโอดีนจากการใช้ข้อมูลร้อยละของทารกแรกเกิดในพื้นที่ 25 จังหวัด พบร้อยละ 11.3 (13,604 ราย จาก 120,553 ราย) ที่มีระดับ TSH ในซีรัมมากกว่า 11.2 mU/L โดยทุกจังหวัดพบทารกแรกเกิดเกินกว่าร้อยละ 3 ที่มีระดับ TSH ในซีรัมมากกว่า 11.2 mU/L แสดงถึงพื้นที่ที่ได้รับไอโอดีนไม่เพียงพอ ดังแสดงในภาพ 3B ซึ่งไม่สอดคล้องกับการประเมินจากการใช้ค่า MUI ในหญิงตั้งครรภ์ที่มากกว่าหรือเท่ากับ $150 \mu\text{g/L}$ มีเพียง 9 จังหวัด ที่เป็นพื้นที่ขาดสารไอโอดีน ดังแสดงในภาพ 3A สอดคล้องกับการศึกษาของ Vandevijvere S

และคณะ 2012⁽¹⁷⁾ ในประเทศเบลเยียมพบว่าระดับ TSH ของทารกไม่สะท้อนถึงภาวะโภชนาการของทารกที่ขาดสารไอโอดีนเพียงเล็กน้อย ดังนั้นประเทศไทยไม่ควรนำระดับ TSH ในซีรัมมากกว่า 11.2 mU/L ที่ได้จากการตรวจคัดกรองภาวะพร่องไทรอยด์ฮอร์โมนในทารกแรกเกิดมาประเมินภาวะไอโอดีนในระดับประชากรรายพื้นที่ เนื่องจากมีปัจจัยของอายุทารกที่จัดเก็บตัวอย่างเลือดหลังเกิดอายุ 48–72 ชั่วโมง ส่วนใหญ่เป็นมารดาที่คลอดโดยวิธีธรรมชาติมักออกจากโรงพยาบาลไม่เกิน 3 วัน (72 ชั่วโมง) ซึ่งอายุทารกนี้ไม่เป็นไปตามเกณฑ์ของ WHO ที่กำหนดว่าต้องเก็บจากทารกอายุ 72–96 ชั่วโมง อายุทารกที่เก็บเลือดเร็ว 48–72 ชั่วโมง ของประเทศไทยอาจส่งผลให้ระดับ TSH สูง^(18,19) กว่าทารกอายุ 72–96 ชั่วโมง (ยังไม่ลดต่ำลงมาในระดับปกติ) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของประเทศไทย โดย Rajatanavin R., 2007⁽²⁰⁾ ประเทศไอซ์แลนด์ โดย Burns R และคณะ 2008⁽²¹⁾ และประเทศอาร์เจนตินา โดย Gruñeiro-Papendieck L และคณะ 2004⁽²²⁾ ที่เสนอให้มีการทบทวนเกณฑ์การประเมินเช่นเดียวกันนับจากปี พ.ศ. 2566 เป็นต้นไป

ประกาศในราชกิจจานุเบกษาของสำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ⁽²³⁾ ประเทศไทยได้ขยายบริการตรวจคัดกรองทารกแรกเกิดแบบเพิ่มจำนวนโรค และขยายหน่วยบริการให้ครอบคลุมทั้ง 13 เขตสุขภาพ ทำให้การตรวจคัดกรองภาวะพร่องไทรอยด์ฮอร์โมนแต่กำเนิดดำเนินการโดยห้องปฏิบัติการ 10 แห่ง ซึ่งใช้เทคโนโลยีชุดน้ำยาและระดับ TSH รายงานและติดตามตัวอย่างที่ผลการตรวจคัดกรองผิดปกติมาตรวจยืนยันไม่เหมือนกัน ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลสำคัญที่ประเทศไทยไม่ควรใช้ระดับ TSH ที่ได้จากการตรวจคัดกรองภาวะพร่องไทรอยด์ฮอร์โมนในทารกแรกเกิดเพื่อประเมินภาวะไอโอดีนในระดับประชากรรายพื้นที่ ปัจจุบันหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยมีการเฝ้าระวังและประเมินสถานการณ์การขาดสารไอโอดีนด้วยการสำรวจภาวะโภชนาการไอโอดีนจากการตรวจหาปริมาณ UI ในประชากรกลุ่มเสี่ยง เช่น ในหญิงตั้งครรภ์ที่เป็นตัวแทนกลุ่มประชากรในพื้นที่ศึกษา และมีความจำเป็นที่ต้องเฝ้าระวังสำรวจซ้ำเป็นระยะๆ อย่างต่อเนื่อง (surveillance) รวมทั้งมีการประเมินภาวะไอโอดีนระดับประชากรรายพื้นที่เป็นการเฝ้าระวังทุก 3 ปี

สรุป

การวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าระดับ TSH ในซีรัมของทารกแรกเกิดไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณ UI ของมารดาที่เป็นคุณแม่-ลูก ($r = -0.024$, $p\text{-value} = 0.233$) และการนำข้อมูลระดับ TSH จากการตรวจคัดกรองภาวะพร่องไทรอยด์ฮอร์โมนแต่กำเนิดของประเทศไทยมาใช้ในการประเมินภาวะไอโอดีนของประชากรรายพื้นที่ตามเกณฑ์ของ WHO ให้ผลการประเมินที่ไม่สอดคล้องกับการประเมินโดยใช้ค่า MUI ในหญิงตั้งครรภ์ การประเมินโดยใช้ระดับ TSH มีปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่ออายุของทารกที่เก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจคัดกรองของประเทศไทย ส่วนใหญ่อยู่ที่ 48-72 ชั่วโมง ทำให้ระดับ TSH สูง ไม่เป็นไปตามเกณฑ์การประเมินของ WHO ที่ระบุช่วงอายุทารก 72-96 ชั่วโมง ดังนั้นจึงไม่ควรนำระดับ TSH มาใช้ประเมินภาวะไอโอดีนของประชากรรายพื้นที่

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข สำหรับการสนับสนุนงบประมาณในการศึกษาวิจัย และขอขอบคุณ สำนักโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลระดับปริมาณไอโอดีนในปัสสาวะของหญิงตั้งครรภ์ เพื่อใช้ประกอบการการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev* 2010; 31(2): 139-70.
- Williams GR. Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. *J Neuroendocrinol* 2008; 20(6): 784-94.
- Kogai T, Taki K, Brent GA. Enhancement of sodium/iodide symporter expression in thyroid and breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13(3): 797-826.
- Chawanpaiboon S, Titapant V. A randomized controlled trial of the correlation between iodine supplementation in pregnancy and maternal urine iodine and neonatal thyroid stimulating hormone levels. *Siriraj Med J* 2019; 71(1): 59-65.
- WHO, UNICEF, ICCIDD. Assessment of the iodine deficiency disorders and monitoring their elimination: a guide for programme managers. 3rd ed. Geneva: World Health Organization; 2007.
- WHO. Urinary iodine concentrations for determining iodine status deficiency in populations. Geneva: World Health Organization; 2013.
- Glinoe D. The regulation of thyroid function during normal pregnancy: importance of the iodine nutrition status. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2004; 18(2): 133-52.
- de Escobar GM, Obregon MJ, del Rey FE. Maternal thyroid hormones early in pregnancy and fetal brain development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2004; 18(2): 225-48.
- Ng SM, Wong SC, Paize F, Chakkarapani E, Newland P, Isherwood D, et al. Multivariate analyses of factors that affect neonatal screening thyroid stimulating hormone. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2011; 24(9-10): 727-32.
- นภาพรรณ วิริยะอุตสาหกรรม, บรรณาธิการ. รายงานการศึกษาผลของการให้ยาเม็ดเสริมไอโอดีนต่อภาวะโภชนาการไอโอดีนในหญิงตั้งครรภ์. นนทบุรี: สำนักโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข; 2562.
- Pino S, Fang SL, Braverman LE. Ammonium persulfate: a safe alternative oxidizing reagent for measuring urinary iodine. *Clin Chem* 1996; 42(2): 239-43.
- Ohashi T, Yamaki M, Pandav CS, Karmarkar MG, Irie M. Simple microplate method for determination of urinary iodine. *Clin Chem* 2000; 46(4): 529-36.

13. ศูนย์ปฏิบัติการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. สถิติการตรวจคัดกรอง 2539-65. [ออนไลน์]. 2565; [สืบค้น 17 มี.ค. 2566]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.neoscreen.go.th/index.php/th/screening/statistic-64>.
14. เปี่ยมนุกุล กระแสร์, เพ็ญพรรณ ทองเงา, จารณี พึ่งโพธิ์สภ, วิยะดา เจริญศิริวัฒน์, ھرรษา ไทยศรี, อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์. ภาวะพร่องไทรอยด์ฮอร์โมนแต่กำเนิดในทารกแรกเกิดใน 4 ภูมิภาคของประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2559 ถึง 2561. ว กรมวิทย์ พ 2564; 63(2): 259-74.
15. Skeaff SA, Thomson CD, Wilson N, Parnell WR. A comprehensive assessment of urinary iodine concentration and thyroid hormones in New Zealand schoolchildren: a cross-sectional study. *Nutr J* 2012; 11: 31. (7 pages).
16. Dei-Tutu SA, Manful A, Heimburger DC, Malechi H, Moore DJ, Oppong SA, et al. Correlating maternal iodine status with neonatal thyroid function in two hospital populations in Ghana: a multicenter cross-sectional pilot study. *BMC Pediatr* 2020; 20: 26. (9 pages).
17. Vandevijvere S, Coucke W, Vanderpas J, Trumpff C, Fauvart M, Meulemans A, et al. Neonatal thyroid-stimulating hormone concentrations in Belgium: a useful indicator for detecting mild iodine deficiency? *PLoS One* 2012; 7(10): e47770. (6 pages).
18. Maahs DM, Zeitler P. Newborn screening in the United States may miss mild persistent hypothyroidism. *J Pediatr* 2018; 192: 1-2.
19. Di Dalmazi G, Carlucci MA, Semeraro D, Giuliani C, Napolitano G, Caturegli P, et al. A detailed analysis of the factors influencing neonatal TSH: Results from a 6-year congenital hypothyroidism screening program. *Front Endocrinol* 2020; 11: 456. (11 pages).
20. Rajatanavin R. Iodine deficiency in pregnant women and neonates in Thailand. *Public Health Nutr* 2007; 10(12A): 1602-5.
21. Burns R, Mayne PD, O’Herlihy C, Smith DF, Higgins M, Staines A, et al. Can neonatal TSH screening reflect trends in population iodine intake? *Thyroid* 2008; 18(8): 883-8.
22. Gruñeiro-Papendieck L, Chiesa A, Mendez V, Bengolea S, Prieto L. Neonatal TSH levels as an index of iodine sufficiency: differences related to time of screening sampling and methodology. *Horm Res* 2004; 62(6): 272-6.
23. ประกาศคณะกรรมการหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ เรื่อง ประเภทและขอบเขตของบริการสาธารณสุข พ.ศ. 2565. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 139 ตอนพิเศษ 127 ง (วันที่ 7 มิถุนายน 2565). หน้า 21.

การเปรียบเทียบผลการวัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีเอกซเรย์ระหว่างเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลและคอลลิเมเตอร์

รุ่งทิพย์ พุฒบุรี¹ และ คทายุทธ นิกภาพฤษ์²

¹ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 8 อุตรธานี อำเภอเมือง จังหวัดอุตรธานี 41330

²ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

บทคัดย่อ เครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล (digital X-ray ruler) เป็นเครื่องมือที่พัฒนาขึ้นใหม่สำหรับตรวจสอบขนาดของลำรังสีเอกซเรย์และตรวจสอบความเหลื่อมล้ำของลำรังสีกับลำแสงไฟ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลการวัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีเอกซเรย์กับลำแสงไฟระหว่างเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลและเครื่องมือมาตรฐานที่ใช้ในปัจจุบัน คือคอลลิเมเตอร์ (collimator test tool) ซึ่งเป็นอุปกรณ์วัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีกับลำแสงไฟสำหรับเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป ผลการทดสอบการเปรียบเทียบผลการวัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีเอกซเรย์กับลำแสงไฟของเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไปที่มีลำแสงไฟชัดเจน พบว่าเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลมีค่าความแตกต่างจาก collimator test tool สูงสุดที่ 0.03 เซนติเมตร คิดเป็นร้อยละ 0.34 ในขณะที่เครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไปที่มีลำแสงไฟไม่ชัดเจน พบว่าค่าความแตกต่างระหว่างค่าความเหลื่อมล้ำของลำรังสีกับลำแสงไฟที่มากที่สุด คือ 0.09 เซนติเมตร คิดเป็นร้อยละ 1.41 สรุปได้ว่าเครื่องมือทั้งสองให้ผลการวัดที่ไม่แตกต่างกัน สามารถใช้เครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลแทน collimator test tool ได้

คำสำคัญ: เครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล, คอลลิเมเตอร์, อุปกรณ์วัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีกับแสงไฟ

Corresponding author E-mail: dao.rungtip@gmail.com

Received: 22 March 2023

Revised: 6 November 2023

Accepted: 7 November 2023

บทนำ

ปัจจุบันมีการใช้รังสีทางการแพทย์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากการประมาณการของ the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR) พบว่าทั่วโลกมีการถ่ายภาพรังสีเอกซเรย์ประมาณ 4 พันล้านภาพต่อปี⁽¹⁾ Willis CE และคณะ พบว่าการถ่ายภาพรังสีดิจิทัลจากการตรวจทางรังสีในปัจจุบันมีการใช้ปริมาณรังสีมากเกินไป⁽²⁾ ดังนั้นเพื่อป้องกันผู้ป่วยไม่ให้ได้รับรังสีมากเกินไปและได้รับความจำเป็นและได้รับบริการจากเครื่องเอกซเรย์ที่มีความปลอดภัย การควบคุมคุณภาพมาตรฐานและความปลอดภัยของเครื่องเอกซเรย์จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง⁽³⁻⁶⁾

โดยทั่วไปการตรวจสอบคุณภาพของเครื่องเอกซเรย์มีการทดสอบใน 2 มิติ คือการตรวจสอบเชิงกล (mechanical test) และการตรวจสอบเชิงปริมาณรังสี (radiation dose test)⁽⁷⁾ สำหรับการตรวจสอบความเหลื่อมล้ำของลำรังสีกับลำแสงไฟเป็นการตรวจสอบเชิงกล ซึ่งการกำหนดขอบเขตของลำรังสี (collimation) ที่ไม่ถูกต้องจะส่งผลต่อปริมาณรังสีที่ไปยังอวัยวะและคุณภาพของภาพด้วย นอกจากนี้การกำหนดขอบเขตของลำรังสีเป็นสิ่งสำคัญมากในการถ่ายภาพรังสีดิจิทัล เพราะตัวรับภาพมีความไวสูงต่อปริมาณรังสีที่ระดับต่ำ ดังนั้นการกำหนดขอบเขตของลำรังสีที่เพิ่มขึ้นทุกๆ เซนติเมตรจะสะท้อนถึงปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้น⁽⁸⁾

วิธีมาตรฐานสำหรับวัดการเหลื่อมล้ำของลำรังสีกับลำแสงไฟที่ใช้ในปัจจุบัน คือคอลลิเมเตอร์ (collimator test tool)⁽⁶⁾ ซึ่งเป็นการวัดความเหลื่อมล้ำระหว่างลำรังสีกับลำแสงไฟในแต่ละด้านของอุปกรณ์จำกัดลำรังสี โดยต้องมีค่าไม่เกิน $\pm 1\%$ ที่ระยะ 1 เมตร จากตำแหน่งอ้างอิงจุดโฟกัสของหลอดเอกซเรย์ถึงอุปกรณ์รับภาพ⁽⁷⁾ ต่อมาเมื่อเทคโนโลยีการตรวจสอบความเหลื่อมล้ำของลำรังสีที่ถูกพัฒนาขึ้นมาใหม่ คือการใช้เครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล (digital X-ray ruler) นอกจากใช้ตรวจสอบขนาดของลำรังสีเอกซเรย์แล้วยังสามารถใช้ตรวจสอบความเหลื่อมล้ำของลำรังสีกับลำแสงไฟ โดยมีค่าความแม่นยำและความละเอียดในการวัด ± 0.01 เซนติเมตร⁽⁹⁾ งานวิจัยนี้เปรียบเทียบผล

การวัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีเอกซเรย์กับลำแสงไฟในเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไปที่มีลำแสงไฟชัดเจนและเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไปที่มีลำแสงไฟไม่ชัดเจนระหว่างเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลและ collimator test tool

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือมาตรฐาน collimator test tool (Gammex, รุ่น 161B, สหรัฐอเมริกา) เป็นอุปกรณ์ที่ใช้วัดความเหลื่อมล้ำระหว่างลำรังสีกับลำแสงไฟจากอุปกรณ์จำกัดลำรังสี มีความละเอียดในการวัด 0.10 เซนติเมตร โดยตามมาตรฐานคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทางการแพทย์ต้องมีค่าไม่เกิน 1% SID หมายความว่า การเหลื่อมล้ำระหว่างลำรังสีกับลำแสงไฟในแต่ละด้านของอุปกรณ์จำกัดลำรังสีต้องมีค่าไม่เกิน 1% ของระยะจากตำแหน่งอ้างอิงจุดโฟกัสของหลอดเอกซเรย์ถึงตัวรับภาพ (source to image receptor distance; SID)⁽⁷⁾ ที่ระยะ 1 เมตร จากตำแหน่งอ้างอิงจุดโฟกัสของหลอดเอกซเรย์ถึงอุปกรณ์รับภาพ

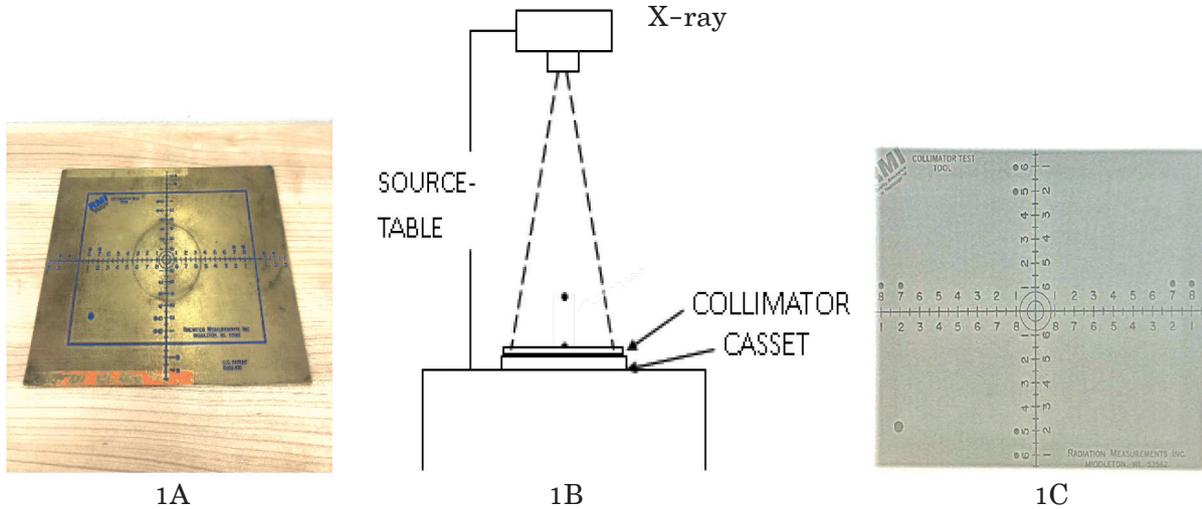
เครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล (quality assurance in radiological technologies; QUART, รุ่น nonius, เยอรมัน) ต่อเชื่อมกับคอมพิวเตอร์ผ่าน USB และติดตั้งซอฟต์แวร์ QUART nonius (version 2020 สำหรับ windows 8, 8.1, 10) เพื่อแสดงข้อมูลจากการวัดลำรังสีตามคู่มือการใช้งาน⁽⁹⁾ มีความแม่นยำและความละเอียดในการวัด ± 0.01 เซนติเมตร คุณสมบัติของเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล มีขนาดของตัวเครื่อง 50 × 72 × 13 มิลลิเมตร (กว้าง × ยาว × สูง) ใช้ปริมาณรังสีที่ $\geq 100 \mu\text{Gy}$ สำหรับวัดขนาดของลำรังสีวินิจฉัย และ $\geq 20 \text{ mGy}$ สำหรับวัดขนาดของลำรังสีรักษา ขนาดของเซนเซอร์ยาว 40 มิลลิเมตร น้ำหนัก 150 กรัม

การวัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีเอกซเรย์กับลำแสงไฟ อุปกรณ์วัดขนาดลำรังสีมาตรฐาน (collimator test tool)

การวัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีกับลำแสงไฟในเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป ทดสอบในเครื่อง

เอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไปที่มีลำแสงไฟชัดเจนและเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไปที่มีลำแสงไฟไม่ชัดเจน โดยระยะจากตำแหน่งอ้างอิงจุดโฟกัสของหลอดเอกซเรย์ถึงแผ่นรับภาพ 1 เมตร วาง collimator test tool บนแผ่น

รับภาพ ปรับขนาดลำรังสีของ collimator ให้ขอบของลำแสงไฟตรงกับแนวเส้นทั้ง 4 ด้านของกรอบสี่เหลี่ยมบน collimator test tool ตั้งเทคนิค 50 kV 4 mAs แล้วทำการถ่ายภาพเอกซเรย์ ดังแสดงในภาพที่ 1

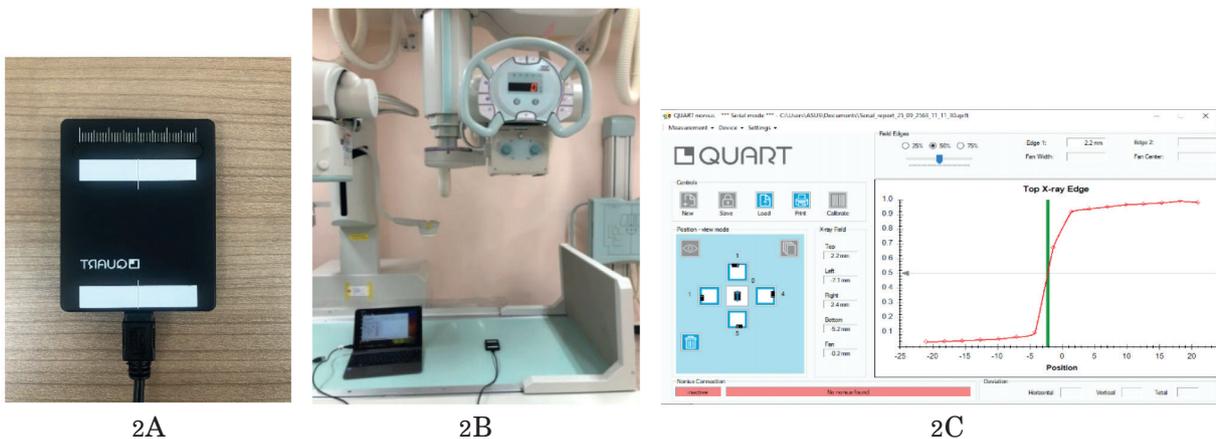


ภาพที่ 1 การติดตั้งอุปกรณ์วัดขนาดลำรังสีมาตรฐานสำหรับเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป 1A: collimator test tool 1B: แบบจำลองการจัดวาง collimator test tool และ 1C: ภาพถ่ายทางรังสี collimator test tool

เครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล

การวัดความเหลี่ยมล้ำของลำรังสีกับลำแสงไฟในเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป ทดสอบในเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไปที่มีลำแสงไฟชัดเจนและเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไปที่มีลำแสงไฟไม่ชัดเจน โดยวางเครื่องวัดขนาดของลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลให้หลอดเอกซเรย์อยู่ห่างจากเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล

1 เมตร เช่นเดียวกับวิธีทดสอบแบบมาตรฐาน และให้ตำแหน่งตรงกลางของตัวเครื่องที่เส้นสีขาวตรงกับขอบของลำแสงไฟแต่ละด้าน ดังแสดงในภาพที่ 2 ตั้งเทคนิค 70 kV 5 mAs ถ่ายภาพเอกซเรย์ทั้ง 4 ด้าน เลือกที่ตำแหน่ง full width at half maximum (FWHM)⁽¹⁰⁾ ที่ 50% ของกราฟ ทำการวัดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 2 การติดตั้งเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลสำหรับเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป 2A: เครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล 2B: การจัดวางเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล และ 2C: ซอฟต์แวร์ QUART nonius

การเปรียบเทียบผลการวัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีเอกซเรย์กับลำแสงไฟ

การเปรียบเทียบผลการวัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีเอกซเรย์กับลำแสงไฟ โดยใช้เครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลเปรียบเทียบกับ collimator test tool กำหนดให้ระยะจากตำแหน่งอ้างอิงจุดโฟกัสของหลอดเอกซเรย์ถึงอุปกรณ์รับภาพจาก collimator test tool และเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลเท่ากัน ซึ่งการวัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีเอกซเรย์กับลำแสงไฟเป็นมาตรฐานคุณภาพของเครื่องเอกซเรย์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องระหว่างขอบเขตพื้นที่ลำรังสีและพื้นที่แสงไฟจาก collimator⁽⁷⁾ เป็นการป้องกันอันตรายจากรังสีไม่ให้ผู้ป่วยได้รับรังสีในบริเวณที่ไม่จำเป็น ค่าการวัดด้วย collimator test tool ได้ทัศนียม 1 ตำแหน่ง จึงเติมเลข 0 เพื่อการคำนวณร้อยละความแตกต่าง โดยทั้ง 2 วิธี ทำการวัดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน การคำนวณค่าความแตกต่างใช้ค่าเฉลี่ยของแต่ละด้านลบกัน แล้วจึงนำมาหาค่าร้อยละความแตกต่าง ซึ่งค่าความแตกต่างที่สามารถยอมรับได้ต้องไม่เกิน 0.1 เซนติเมตร ตามความละเอียดของสเกล collimator test tool

ผล

การเปรียบเทียบผลการวัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีเอกซเรย์กับลำแสงไฟสำหรับเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป โดยทดสอบในเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไปที่มีลำแสงไฟชัดเจน พบว่าความแตกต่างระหว่างความเหลื่อมล้ำของลำรังสีที่ได้จากเครื่องมือ collimator test tool และเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลมากที่สุด คือร้อยละ 0.34 และน้อยที่สุด คือร้อยละ 0.12 ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความแตกต่างระหว่างความเหลื่อมล้ำของลำรังสีกับลำแสงไฟที่ได้จาก collimator test tool และเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล โดยทดสอบในเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไปที่มีลำแสงไฟชัดเจน

ตำแหน่ง	collimator test tool (cm)					เครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล (cm)					ความแตกต่าง (cm) ¹	ความแตกต่าง (%) ²
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean ₁	SD ₁	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean ₂	SD ₂		
บน	6.8	6.8	6.7	6.8	0.1	6.78	6.77	6.78	6.78	0.01	-0.02	0.30
ล่าง	6.5	6.6	6.5	6.5	0.1	6.48	6.48	6.49	6.48	0.01	-0.02	0.31
ขวา	8.8	8.7	8.8	8.8	0.1	8.76	8.77	8.77	8.77	0.01	-0.03	0.34
ซ้าย	8.2	8.3	8.3	8.3	0.1	8.29	8.28	8.29	8.29	0.01	-0.01	0.12

หมายเหตุ: 1 ความแตกต่าง (cm) = Mean₂ - Mean₁
 2 ความแตกต่าง (%) = $\frac{\text{ความแตกต่าง (cm)}}{\text{Mean}_1} \times 100$

การเปรียบเทียบผลการวัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีเอกซเรย์กับลำแสงไฟสำหรับเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป โดยทดสอบในเครื่องเอกซเรย์ทั่วไปที่มีลำแสงไฟไม่ชัดเจน พบว่าความแตกต่างระหว่าง

ความเหลื่อมล้ำของลำรังสีกับลำแสงไฟที่ได้จากเครื่องมือ collimator test tool และเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลมากที่สุด คือ 1.41 และน้อยที่สุด คือ 0.38% ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความแตกต่างระหว่างความเหลื่อมล้ำของลำรังสีกับลำแสงไฟที่ได้จาก collimator test tool และ เครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล โดยทดสอบในเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไปที่มีลำแสงไฟไม่ชัดเจน

ตำแหน่ง	collimator test tool (cm)					เครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล (cm)					ความแตกต่าง (cm) ¹	ความแตกต่าง (%) ²
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean ₁	SD ₁	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean ₂	SD ₂		
บน	6.3	6.4	6.4	6.4	0.1	6.31	6.30	6.31	6.31	0.01	-0.09	1.41
ล่าง	5.8	5.7	5.7	5.7	0.1	5.64	5.65	5.65	5.65	0.01	-0.05	0.87
ขวา	7.5	7.4	7.3	7.4	0.1	7.47	7.48	7.47	7.47	0.01	0.07	0.95
ซ้าย	7.8	7.9	7.9	7.9	0.1	7.93	7.93	7.92	7.93	0.01	0.03	0.38

หมายเหตุ: 1 ความแตกต่าง (cm) = Mean₂ - Mean₁
 2 ความแตกต่าง (%) = $\frac{\text{ความแตกต่าง (cm)}}{\text{Mean}_1} \times 100$

วิจารณ์

การเปรียบเทียบผลการวัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีเอกซเรย์กับลำแสงไฟสำหรับเครื่องเอกซเรย์ทั่วไปที่มีลำแสงไฟชัดเจน โดยใช้เครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล คิดที่ตำแหน่ง full width at half maximum (FWHM)⁽¹⁰⁾ ที่ 50% ของกราฟ พบว่าค่าความแตกต่างสูงสุดที่ 0.03 เซนติเมตร คิดเป็นร้อยละ 0.34 และน้อยที่สุด 0.01 เซนติเมตร คิดเป็นร้อยละ 0.12 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล สูงสุด เท่ากับ 0.01 และ collimator test tool สูงสุด เท่ากับ 0.1 จากผลการทดสอบ พบว่าเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลและ collimator test tool มีค่าไม่แตกต่างกัน เนื่องจากแสงไฟที่ชัดเจนทำให้การวางตำแหน่งของเครื่องมือและการกำหนดขอบเขตของลำรังสีมีความแม่นยำ

สำหรับการทดสอบการวัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีเอกซเรย์กับลำแสงไฟในเครื่องเอกซเรย์ที่มีลำแสงไฟไม่ชัดเจน พบว่าค่าความแตกต่างระหว่างค่าความเหลื่อมล้ำของลำรังสีกับลำแสงไฟมากที่สุด 0.09 เซนติเมตร คิดเป็นร้อยละ 1.41 และน้อยที่สุด 0.03 เซนติเมตร คิดเป็นร้อยละ 0.38 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลสูงสุด เท่ากับ 0.01 และ collimator test tool สูงสุด เท่ากับ 0.1 จาก

ผลการทดสอบข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเครื่องเอกซเรย์ที่มีลำแสงไฟไม่ชัดเจน อาจเกิดจากการสะท้อนหรือบดบังทำให้ขอบของลำแสงไฟไม่คมชัด หรือเกิดเส้นขอบของลำแสงไฟหลายเส้น โดยเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลจะวัดจากตำแหน่งที่วางและปริมาณรังสีที่ได้รับ⁽⁹⁾ ซึ่งมีผลต่อการวางเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลจึงมีค่าความคลาดเคลื่อนสูงกว่า การทดสอบทั้ง 2 วิธี ให้ค่าความแม่นยำแตกต่างกัน โดย collimator test tool มีค่าความละเอียด 0.1 เซนติเมตร และเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลมีค่าความละเอียด 0.01 เซนติเมตร⁽⁹⁾ เมื่อพิจารณาค่าความแตกต่างของค่าความเหลื่อมล้ำของลำรังสีกับลำแสงไฟจาก collimator test tool และเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล พบว่ามีค่าสูงสุด เท่ากับ 0.09 เซนติเมตร ซึ่งน้อยกว่าค่าที่ยอมรับได้ต้องไม่เกิน 0.1 เซนติเมตร

การเปรียบเทียบการใช้งานระหว่าง collimator test tool และเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลในการวัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีกับแสงไฟของเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป พบว่าการใช้ collimator test tool วางบนแผ่นรับภาพ แล้วการถ่ายภาพรังสี 1 ครั้ง สามารถอ่านภาพได้ครบทั้ง 4 ด้าน ส่วนเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลมีขนาดเล็ก น้ำหนักเบา เชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์แบบพกพา แล้วถ่ายภาพรังสีแต่ละด้าน

ให้ครบทั้ง 4 ด้าน โดยไม่ต้องใช้แผ่นรับภาพ ดังนั้น เครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลจึงเหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจสอบคุณภาพมาตรฐานเครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ที่อยู่ในจุดให้บริการที่ไม่มีแผ่นรับภาพ โดยไม่ต้องถือแผ่นรับภาพไปถ่ายภาพรังสีและนำกลับมาอ่านที่ห้องเอกซเรย์ การอ่านผลที่ได้จากการวัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีกับแสงไฟ collimator test tool จะอ่านผลเองจากภาพรังสีที่วัดได้ ส่วนเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลจะแสดงค่าที่ได้จากการวัดแบบอัตโนมัติ ข้อควรระวังในการแปลผลต้องพิจารณาลักษณะการวางเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลประกอบการแปลผล นอกจากนี้เครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลสามารถวัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีกับลำแสงไฟสำหรับเครื่องเอกซเรย์เต้านมได้ ซึ่งปัจจุบันการวัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีกับลำแสงไฟในเครื่องเอกซเรย์เต้านมใช้เหรียญบาทเป็นสเกลวัด โดยวางเหรียญบาท 2 เหรียญ ซิดกันในตำแหน่งตรงขอบของลำแสงไฟแต่ละด้าน การอ่านค่าใช้วิธีประมาณค่าจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเหรียญบาท คือ 2 เซนติเมตร ดังนั้นการใช้เครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลจึงให้ค่าที่แม่นยำมากกว่าการใช้เหรียญแทนสเกล⁽¹¹⁾ แต่มีข้อจำกัดที่จะต้องถ่ายภาพรังสี 4 ครั้ง เพื่อให้ครบทั้ง 4 ด้าน เมื่อเปรียบเทียบราคาเครื่องระหว่าง collimator test tool และเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล พบว่า collimator test tool ราคาประมาณ 50,000 บาท เครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล ราคาประมาณ 110,000 บาท ซึ่งมีราคาสูงกว่า collimator test tool ประมาณ 2 เท่า และเมื่อพิจารณาค่าใช้จ่ายในการวัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีกับลำแสงไฟระหว่าง 2 เครื่อง พบว่า collimator test tool ถ่ายภาพรังสี 1 ครั้ง บนแผ่นรับภาพ ราคาของแผ่นรับภาพประมาณ 800,000-2,500,000 บาท ในขณะที่เครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล ถ่ายภาพรังสี 4 ครั้ง โดยไม่ใช้แผ่นรับภาพ จึงสรุปในภาพรวมได้ว่าเครื่องมือทั้ง 2 เครื่องมีราคาและคุณสมบัติที่เหมาะสมกับการใช้งานแตกต่างกัน ดังนั้นในการพิจารณานำเครื่องมือมาใช้ต้องคำนึงถึงประโยชน์และความคุ้มค่าในการนำมาใช้งาน

สรุป

การวัดความเหลื่อมล้ำของลำรังสีเอกซเรย์กับลำแสงไฟพบว่าเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไปที่มีลำแสงไฟชัดเจนมีค่าความแตกต่างจาก collimator test tool สูงสุดที่ 0.03 เซนติเมตร คิดเป็นร้อยละ 0.34 และน้อยที่สุด คือ 0.01 เซนติเมตร คิดเป็นร้อยละ 0.12 เครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไปที่มีลำแสงไฟไม่ชัดเจน พบว่าค่าความแตกต่างระหว่างค่าความเหลื่อมล้ำของลำรังสีกับลำแสงไฟที่มากที่สุด คือ 0.09 เซนติเมตร คิดเป็นร้อยละ 1.41 และน้อยที่สุด คือ 0.03 เซนติเมตร คิดเป็นร้อยละ 0.38 ซึ่งค่าความแตกต่างของค่าความเหลื่อมล้ำของลำรังสีจาก collimator test tool และเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัล พบว่ามีค่าสูงสุด 0.09 เซนติเมตร ในเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไปที่มีลำแสงไฟไม่ชัดเจน ซึ่งน้อยกว่าค่าที่ยอมรับได้ต้องไม่เกิน 0.1 เซนติเมตร สรุปได้ว่าเครื่องมือทั้งสองให้ผลการวัดที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นเครื่องวัดขนาดลำรังสีเอกซเรย์แบบดิจิทัลสามารถใช้แทน collimator test tool ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ โรงพยาบาลและเจ้าหน้าที่รังสีของโรงพยาบาลมะเร็งอุดรธานี โรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชสว่างแดนดิน โรงพยาบาลนอร์ทอิสเทอร์น-วัฒนา และโรงพยาบาลเอกอุดร ที่ได้ช่วยเหลือและให้คำแนะนำในกระบวนการตรวจสอบคุณภาพเครื่องเอกซเรย์ ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สนับสนุนงบประมาณในการจัดหาเครื่องมือในงานวิจัย ขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์อุดรธานี ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยด้านรังสี และขอขอบคุณทุกท่านที่มีส่วนในการช่วยเหลือในการดำเนินการวิจัย ในครั้งนี้ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. UNSCEAR. Sources and effects of ionizing radiation volume 1 & 2: UNSCEAR 2008 report to the General Assembly with scientific annexes. New York: United Nations Publication; 2008.

2. Willis CE, Slovis TL. The ALARA concept in pediatric CR and DR: dose reduction in pediatric radiographic exams--a white paper conference executive summary. *Pediatr Radiol* 2004; 34(Suppl 3): S162-4.
3. Cook JV, Kyriou JC, Pettet A, Fitzgerald MC, Shah K, Pablot SM. Key factors in the optimization of paediatric X-ray practice. *Br J Radiol* 2001; 74(887): 1032-40.
4. Gallet JM, Reed MH, Hlady J. A novel quality assurance method in a university teaching paediatric radiology department. *Br J Radiol* 2000; 73(872): 843-6.
5. ICRP. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Ottawa: ICRP Publication 60 Ann ICRP 21: 1-3; 1991.
6. Faculty of Clinical Radiology. General X-ray QA and QC guideline. Sydney, Australia: The Royal Australian and New Zealand College of Radiologists; 2013.
7. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. มาตรฐานคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทางการแพทย์ (Quality standard of medical diagnostic X-ray machines). กรุงเทพฯ: บริษัท ปียอนด์ พับลิชชิง จำกัด; 2562. หน้า 3-19.
8. Stollfuss J, Schneider K, Krüger-Stollfuss I. A comparative study of collimation in bedside chest radiography for preterm infants in two teaching hospitals. *Eur J Radiol Open* 2015; 2: 118-22.
9. QUART Nonius. User guide electronic X-ray ruler for radiation field edges and fan-beam evaluation, version 07/18. Kirchenweg: Quart GmbH; 2019.
10. Vashista M, Paul S. Correlation between full width at half maximum (FWHM) of XRD peak with residual stress on ground surfaces. *Philosophical Magazine* 2012; 92(33): 4194-204.
11. International Atomic Energy Agency. Quality assurance programme for digital mammography. IAEA human health series no. 17. Vienna: IAEA; 2011. p. 3-24

Comparison of X-ray Beam Overlap Measurements between Digital X-ray Ruler and Collimator Test Tool

Rungtip Putburee and Khatayut Nigapruek

¹*Regional Medical Sciences Center 8 Udonthani, Muang Udonthani, Udonthani 41330, Thailand*

²*Regional Medical Sciences Center 9 Nakhon Ratchasima, Mueang Nakhon Ratchasima, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand*

ABSTRACT A newly developed tool, the Digital X-ray ruler, has been designed for evaluating X-ray beam and beam overlap. The objective of this study was to compare X-ray beam overlap measurements between the Digital X-ray ruler and the collimator test tool, which was the current standard device used for measuring beam overlap in general radiography X-ray machine. The test results comparing X-ray beam overlap with the light field revealed that in clear-beam general diagnostic X-ray machines, the digital X-ray ruler had a maximum difference from the collimator test tool at 0.03 centimeters, accounting for 0.34%. Meanwhile, in general diagnostic X-ray machines with unclear beams, the maximum difference between the beam overlap and the light field was 0.09 centimeters, calculated as 1.41%. Therefore, it could be summarized that there was no significant difference in measurement results between the two instruments. The Digital X-ray ruler can be used as a suitable alternative to the collimator test tool.

Keywords: Digital X-ray ruler, Collimator test tool, X-ray beam overlap measurements

การทดสอบความใช้ได้ของตั้บบรรจุแผ่นวัดรังสี ไอเอสแอล DMSc Holder

เตวิช ตุงคะเสรีรักษ์ สถาพร กล่อมแก้ว ประเชิญ เชษฐสิงห์ ศิริณา เกิดสีทอง และ อุดมทรัพย์ จันทพร
สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ ภาควิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ตั้บบรรจุแผ่นวัดรังสีไอเอสแอล InLight® holder มีความเปราะบาง ไม่คงทน และแตกหักง่าย คณะผู้วิจัยได้พัฒนาตั้บใหม่ชื่อ DMSc holder ซึ่งมีความแข็งแรงและใช้งานง่ายมากขึ้น โดยดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของ DMSc holder ตามมาตรฐานของคณะกรรมการมาตรฐานอุตสาหกรรมญี่ปุ่น (Japanese Industrial Standards Committee: JIS) 4339:2004 (R2016) ผลการทดสอบ พบว่าความคลาดเคลื่อนของค่าปริมาณรังสีมีค่าเท่ากับ 1.085 ความเป็นเชิงเส้นของค่าปริมาณรังสีที่ 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 และ 10.0 mSv มีค่าเท่ากับ 1.158 ± 0.074 , 1.023 ± 0.053 , 1.034 ± 0.050 , 1.000 ± 0.043 และ 0.968 ± 0.037 ตามลำดับ การตอบสนองต่อพลังงานโฟตอนที่เอกซเรย์ 24, 47, 83 และ 117 keV มีค่าเท่ากับ 1.090 ± 0.048 , 1.040 ± 0.108 , 1.010 ± 0.091 และ 0.987 ± 0.062 ตามลำดับ และแกมมา 662 keV เท่ากับ 1.000 ± 0.054 การตอบสนองต่อมุมในการประเมินค่าปริมาณรังสีตามแนวนอน ณ มุมเอียงซ้าย 60° , เอียงซ้าย 30° , ตรง 0° , เอียงขวา 30° และเอียงขวา 60° มีค่า 0.999 ± 0.066 , 0.988 ± 0.046 , 1.000 ± 0.050 , 0.988 ± 0.053 และ 0.985 ± 0.042 ตามลำดับ โดยผลการทดสอบทั้งหมดผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐาน ในการเปรียบเทียบกับตั้บ InLight® holder พบว่าความแตกต่างสำหรับการทดสอบความเป็นเชิงเส้นของค่าปริมาณรังสีและการทดสอบการตอบสนองต่อมุมในการประเมินค่าปริมาณรังสีสามารถยอมรับได้ ดังนั้น ตั้บบรรจุแผ่นวัดรังสีไอเอสแอลที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์แก่ผู้ปฏิบัติงานด้านรังสีของห้องปฏิบัติการรังสีบุคคลได้

คำสำคัญ: DMSc holder, แผ่นวัดรังสีไอเอสแอล, การทดสอบความใช้ได้

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

Received: 9 May 2023

Revised: 27 October 2023

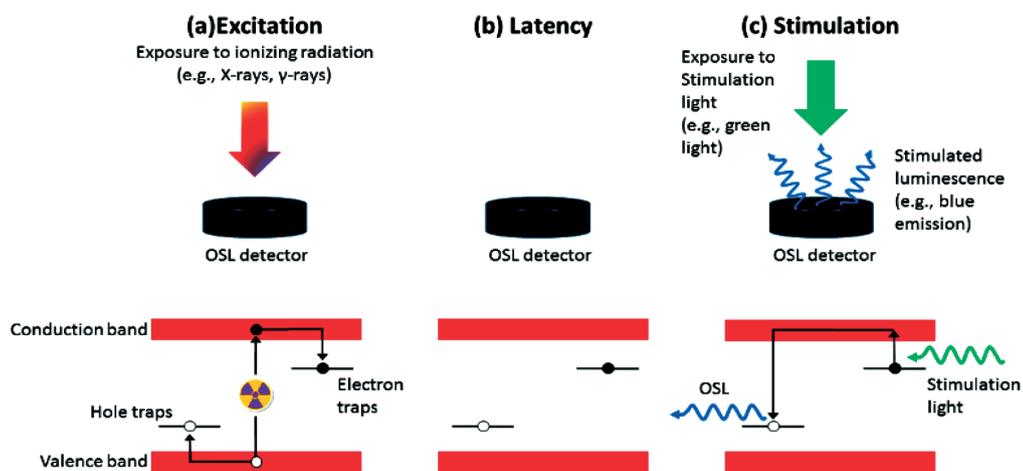
Accepted: 1 November 2023

บทนำ

ห้องปฏิบัติการรังสีบุคคล สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีหน้าที่ตรวจวิเคราะห์และประเมินปริมาณรังสีประจำบุคคล เพื่อความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงานทางรังสี และติดตามให้คำแนะนำในการแก้ไขการได้รับรังสีในปริมาณสูง รวมทั้งประเมินความเสี่ยงการได้รับรังสีให้แก่ประชาชนและผู้ให้บริการด้านรังสี⁽¹⁾ โดยได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบและห้องปฏิบัติการสอบเทียบ ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม เลขที่ มอก. 17025-2561 (ISO/IEC 17025:2017) ในการปฏิบัติงานที่มีการใช้เครื่องกำเนิดรังสีหรือวัสดุกัมมันตรังสี มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการประเมินและเฝ้าระวังการได้รับรังสีของเจ้าหน้าที่ในขณะที่ปฏิบัติงานไม่ให้เกินขีดจำกัดการได้รับรังสี เพื่อลดความเสี่ยงการเกิดโรคมะเร็งหรืออาการเจ็บป่วยอื่น ๆ ที่อาจเกิดจากการได้รับรังสี การตรวจวิเคราะห์และประเมินปริมาณรังสีประจำบุคคลต้องใช้อุปกรณ์สำหรับวัดค่าปริมาณรังสีบุคคล ซึ่งปัจจุบันห้องปฏิบัติการรังสีบุคคลให้บริการแผ่นวัดรังสีไอเอสแอล (optically stimulated luminescence

dosimeter: OSLD) สำหรับวัดค่าปริมาณรังสีที่เจ้าหน้าที่ได้รับจากการปฏิบัติงาน 3 ชนิด คือ ปริมาณรังสีทั่วลำตัว $H_p(10)$ ปริมาณรังสีที่ผิวหนัง มือและเท้า $H_p(0.07)$ และปริมาณรังสีที่เลนส์ของดวงตา $H_p(3)$

แผ่นวัดรังสีไอเอสแอลเป็นสารกึ่งตัวนำ (semiconductor) มีวัสดุหลัก คือ ผลึกของอลูมิเนียมออกไซด์เจือด้วยคาร์บอน ($Al_2O_3:C$) มีคุณสมบัติในการตอบสนองต่อรังสีเอกซ์ แกมมา บีตา และนิวตรอน เมื่อแผ่นวัดรังสีไอเอสแอลได้รับรังสีอิเล็กตรอนที่อยู่บนแถบวาเลนซ์ (valence band) จะถูกกระตุ้นไปยังแถบนำไฟฟ้า (conduction band) ดังแสดงในภาพที่ 1a ส่งผลให้แถบวาเลนซ์เกิดโฮล (hole traps) เมื่อไม่มีรังสีมากระทบ อิเล็กตรอนที่ถูกกระตุ้นจะถูกเก็บไว้ที่แถบนำไฟฟ้า ดังแสดงในภาพที่ 1b จากนั้นเมื่อแผ่นวัดรังสีไอเอสแอลถูกกระตุ้นด้วยแสง อิเล็กตรอนที่อยู่บนแถบนำไฟฟ้าจะกลับมายังโฮลบนแถบวาเลนซ์พร้อมคายพลังงานออกมาในรูปของแสง ดังแสดงในภาพที่ 1c แสงที่ได้จะถูกหลอดทวีคูณแสง (photomultiplier tubes) ตรวจจับเพื่อแปลงพลังงานแสงให้เป็นสัญญาณทางไฟฟ้า ก่อนเทียบเป็นค่าปริมาณรังสีต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 1⁽²⁾



ภาพที่ 1 หลักการทำงานของแผ่นวัดรังสีไอเอสแอล⁽²⁾

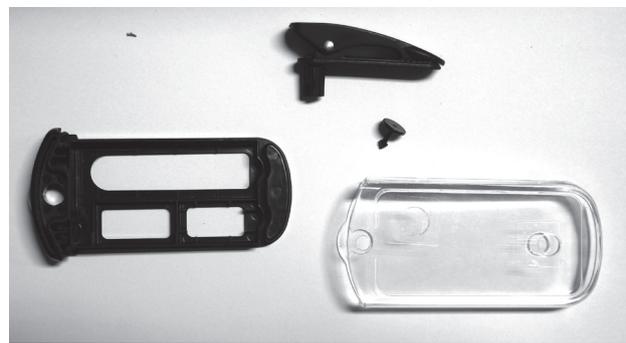
- a = เมื่อได้รับรังสี อิเล็กตรอนที่อยู่บนแถบวาเลนซ์ (valence band) จะถูกกระตุ้นไปยังแถบนำไฟฟ้า (conduction band)
- b = เมื่อไม่ถูกกระตุ้น อิเล็กตรอนจะถูกเก็บไว้ที่แถบนำไฟฟ้า
- c = เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง อิเล็กตรอนที่อยู่บนแถบนำไฟฟ้าจะกลับมายังโฮลบนแถบวาเลนซ์พร้อมคายพลังงานออกมาในรูปของแสง

แผ่นวัดรังสีไอเอสแอลที่สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ให้บริการเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Landauer ประเทศสหรัฐอเมริกา ชื่อ InLight® badge OSL dosimeter ประกอบด้วยแผ่นวัดรังสีไอเอสแอลชนิด InLight® และตั้บบรรจุแผ่นวัดรังสี InLight® holder ซึ่งตั้บบรรจุแผ่นวัดรังสีไอเอสแอลนี้ มีความเปราะบางแตกหักง่าย และชำรุดเป็นจำนวนมาก ทำให้ไม่เพียงพอต่อการให้บริการ ซึ่งผลิตภัณฑ์ใหม่ของบริษัท Landauer ชื่อ Quixel® badge OSL dosimeter ที่ประกอบด้วยแผ่นวัดรังสีไอเอสแอล ชนิด Quixel® และตั้บบรรจุแผ่นวัดรังสี Quixel® holder ผลิตขึ้นสำหรับการเปิดให้บริการประเมินค่าปริมาณรังสีบุคคลของทางบริษัท เท่านั้น ไม่จำหน่ายให้กับหน่วยงานอื่น ด้วยสาเหตุดังกล่าว

คณะผู้วิจัยจึงพัฒนาตั้บบรรจุแผ่นวัดรังสีไอเอสแอลขึ้นใหม่ชื่อ DMSc holder เพื่อใช้สำหรับบรรจุแผ่นวัดรังสีไอเอสแอลชนิด InLight® ประกอบด้วย 2 ชั้นส่วน คือด้านหน้าและด้านหลัง ดังแสดงในภาพที่ 2 ยึดติดกันด้วยแกนที่ทำหน้าที่เป็นบานพับและมีตัวล็อกสำหรับปิดตั้บ ดังแสดงในภาพที่ 2 (A) ทำให้ง่ายต่อการบรรจุแผ่นวัดรังสีไอเอสแอลมากกว่า InLight® holder ที่มีอุปสรรคในการประกอบหลายชั้น ดังแสดงในภาพที่ 2 (B) โดย DMSc holder ผลิตจากพลาสติก co-polyester ขณะที่ InLight® holder ผลิตจากพลาสติก polyvinyl chloride (PVC)⁽³⁾ คุณสมบัติของพลาสติกทั้งสอง ดังแสดงในตารางที่ 1



A



B

ภาพที่ 2 ส่วนประกอบของตั้บบรรจุแผ่นวัดรังสีไอเอสแอล

A = ตั้บบรรจุแผ่นวัดรังสีไอเอสแอล DMSc holder

B = ตั้บบรรจุแผ่นวัดรังสีไอเอสแอล InLight® holder

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของพลาสติกที่ใช้ในการผลิตตั้บบรรจุแผ่นวัดรังสีไอเอสแอล⁽⁴⁾

คุณสมบัติ	InLight® holder polyvinyl chloride (PVC)	DMSc holder co-polyester
ความหนาแน่น (density)	1.38 g/cm ³	1.40 g/cm ³
อุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature)	212 °C	265 °C
อุณหภูมิกลาส (glass transition temperature)	87 °C	69 °C
ความถ่วงจำเพาะ (specific gravity)	1.30-1.58	1.29-1.40
มอดูลัสแรงดึง (tensile modulus)	2.4-4.1 GPa	2.8-4.1 GPa
ความต้านทานแรงดึง (tensile strength)	40.7-51.7 MPa	48.3-72.4 MPa
ความแข็งแรง ณ จุดคราก (yield strength)	40.7-44.8 MPa	59.3 MPa
การยืดตัวที่จุดคราก (elongation at break)	40-80 %	30-300 %

จากงานวิจัยของ Croonenborghs B. et al.⁽⁵⁾ ได้ศึกษาผลกระทบทางรังสีต่อ polymers โดยใช้แหล่งกำเนิดรังสีเอกซ์พลังงาน 5 MeV และรังสีแกมมาจากสารกัมมันตรังสีโคบอลต์ (⁶⁰Co) ฉายรังสีใส่ PVC และ polymers อื่นๆ 4 ชนิด ได้แก่ polyethylene (PE), polypropylene (PP), polystyrene (PS) และ acrylonitrile-butadiene-styrene copolymer (ABS) ที่ค่าปริมาณรังสี 30, 60 และ 120 kGy พบว่า polymers ทั้ง 5 ชนิด ไม่ส่งผลต่อการทะลุทะลวงของรังสีดังกล่าว แต่รังสีจะส่งผลต่อความใสของพลาสติก นอกจากนี้ Moskala EJ.⁽⁶⁾ ได้ทดสอบผลกระทบของรังสีแกมมาต่อ thermoplastic co-polyester พบว่าพลาสติกไม่ส่งผลต่อการทะลุทะลวงของรังสี แต่รังสีจะส่งผลต่อความใสของพลาสติกเช่นเดียวกัน

ห้องปฏิบัติการรังสีบุคคล สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ ได้รับการขึ้นทะเบียนเป็นห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ตามข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบและห้องปฏิบัติการสอบเทียบ (ข้อ 6.4 เครื่องมือ)⁽⁷⁾ ตัล็บบรรจุแผ่นวัดรังสีไอเอสแอลที่ออกแบบใหม่จำเป็นต้องได้รับการทดสอบความใช้ได้ของตัล็บก่อนนำมาใช้งาน โดยใช้วิธีทดสอบตามมาตรฐาน Japanese Industrial Standards Committee (JIS) Z 4339:2004 (R2016) Optically stimulated

luminescence dosimetry systems⁽⁸⁾ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบแผ่นวัดรังสี InLight[®] ที่บรรจุใน DMSc holder ตามมาตรฐานและเปรียบเทียบผลการทดสอบกับ InLight[®] badge และ Quixel[®] badge ที่มีข้อมูลการทดสอบของบริษัทผู้ผลิตและผ่านการทดสอบตามมาตรฐานดังกล่าวแล้ว^(9,10) โดยดำเนินการทดสอบด้วยรังสีเอกซ์และแกมมาเท่านั้น ไม่รวมถึงรังสีบีตา แอลฟา และนิวตรอน เนื่องจากในสำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ไม่มีแหล่งกำเนิดรังสีที่ให้รังสีบีตา แอลฟา และนิวตรอนมาตรฐาน

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

การทดสอบใช้แผ่นวัดรังสีไอเอสแอล (ยี่ห้อ Landauer, รุ่น InLight[®] BasicXA, Landauer, USA) ใส่ใน DMSc holder ติดบน ISO water slab phantom ที่ผลิตจากวัสดุ polymethyl methacrylate (PMMA) ขนาดกว้าง 30 เซนติเมตร ยาว 30 เซนติเมตร และหนา 15 เซนติเมตร ดังแสดงในภาพที่ 3 จากนั้นนำไปฉายรังสีที่ระยะห่างจากแหล่งกำเนิด 1 เมตร⁽¹¹⁾ โดยใช้แหล่งกำเนิดรังสีแกมมาจาก Cs-137 (Buchler, England) และแหล่งกำเนิดรังสีเอกซ์มาตรฐาน (PTW, Germany) ณ ห้องปฏิบัติการรังสีมาตรฐานทุติยภูมิ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์



ภาพที่ 3 แผ่นวัดรังสีไอเอสแอล InLight[®] BasicXA บรรจุใน DMSc holder ติดบน ISO water slab phantom

หลังฉายรังสีนำแผ่นวัดรังสีโอเอสแอลมาอ่านค่าปริมาณรังสีด้วยเครื่องอ่านแผ่นวัดรังสีโอเอสแอลชนิดอัตโนมัติ รุ่น OSLR (Landauer, USA) ผ่านโปรแกรมประมวลผล Whole Body Dose Algorithm for the Landauer InLight® LDR Model 2 Dosimeter⁽¹²⁾ ซึ่งสอบเทียบด้วยแผ่นวัดรังสีโอเอสแอลชนิดสอบเทียบ รุ่น InLight® Basic CC (Landauer, USA) ที่ผ่านการฉายรังสีจากห้องปฏิบัติการรังสีมาตรฐานทุติยภูมิ ณ University of Wisconsin สหรัฐอเมริกา ซึ่งสอบย้อนกลับไปที่ห้องปฏิบัติการรังสีมาตรฐานปฐมภูมิ ณ the National Institute of Standards and Technology (NIST) Department of Commerce ประเทศสหรัฐอเมริกา

การทดสอบความใช้ได้ของ DMSc holder ที่บรรจุแผ่นวัดรังสี InLight®

ทดสอบความใช้ได้ตามมาตรฐาน JISZ4339:2004 (R2016) Optically stimulated luminescence dosimetry systems⁽⁸⁾ ดังนี้

ความคลาดเคลื่อนของค่าปริมาณรังสี นำตลับที่บรรจุแผ่นวัดรังสีโอเอสแอล จำนวน 10 ตลับ ฉายรังสีด้วย Cs-137 ที่ปริมาณรังสี $H_p(10)$ 2 mSv หลังการฉายรังสีทำการอ่านค่าปริมาณรังสีซ้ำ 3 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ยของค่าปริมาณรังสี จากนั้นหาอัตราส่วนของค่าสูงสุดและค่าต่ำสุด ซึ่งอัตราส่วนดังกล่าวตามมาตรฐานมีค่าที่ยอมรับได้ไม่เกิน 1.3⁽⁸⁾

ความเป็นเชิงเส้นของค่าปริมาณรังสี นำตลับที่บรรจุแผ่นวัดรังสีโอเอสแอลฉายรังสีด้วย Cs-137 ที่ปริมาณรังสี $H_p(10)$ 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 และ 10.0 mSv โดยใช้ตลับที่บรรจุแผ่นวัดรังสีโอเอสแอล จำนวน 8 ตลับ ต่อ 1 ค่าปริมาณรังสี หลังการฉายรังสีอ่านค่าปริมาณรังสีซ้ำ 3 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ยของค่าปริมาณรังสี จากนั้นหาค่าการตอบสนอง (response) ของแต่ละค่าปริมาณรังสี จากอัตราส่วนของค่าปริมาณรังสีที่อ่านได้กับค่าปริมาณรังสีที่ทำการฉายรังสี และหาอัตราส่วนการตอบสนอง (response ratio) ระหว่างค่าการตอบสนองของแต่ละค่าปริมาณรังสีกับค่าการตอบสนองของค่าปริมาณรังสีอ้างอิง ซึ่งอัตราส่วนการตอบสนองเมื่อรวมกับค่าความกว้างของความคลาดเคลื่อนเกณฑ์การยอมรับได้ที่

$\pm 30\%$ หรือน้อยกว่าที่ค่าปริมาณรังสี 0.1 mSv และ $\pm 10\%$ หรือน้อยกว่าที่ค่าปริมาณรังสี 0.3 mSv ขึ้นไป โดยใช้ค่าปริมาณรังสี 1 mSv เป็นค่าอ้างอิง⁽⁸⁾ ดังสมการที่ 1 และ 2

$$0.7 \leq \frac{\bar{R}_i}{\bar{R}_{Ref}} \pm l < 1.3 \quad \text{ที่ค่าปริมาณรังสี 0.1 mSv} \quad \text{สมการที่ 1}$$

$$0.9 \leq \frac{\bar{R}_i}{\bar{R}_{Ref}} \pm l < 1.1 \quad \text{ที่ค่าปริมาณรังสี 0.3 mSv ขึ้นไป} \quad \text{สมการที่ 2}$$

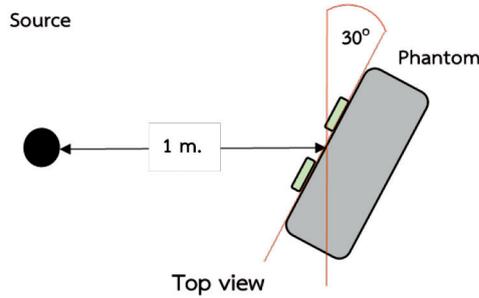
การตอบสนองต่อพลังงานโฟตอน (รังสีเอกซ์และแกมมา) นำตลับที่บรรจุแผ่นวัดรังสีโอเอสแอลฉายรังสีแกมมาจาก Cs-137 พลังงาน 662 keV และรังสีเอกซ์ลำรังสี N-series พลังงาน 24 keV (N 30), 42 keV (N 60), 87.5 keV (N100) และ 120 keV (N 150) ที่ปริมาณรังสี $H_p(10)$ 2 mSv โดยใช้ตลับที่บรรจุแผ่นวัดรังสีโอเอสแอล จำนวน 8 ตลับต่อ 1 พลังงาน หลังการฉายรังสีอ่านค่าปริมาณรังสีซ้ำ 3 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ยของค่าปริมาณรังสี จากนั้นหาค่าการตอบสนองต่อพลังงานโฟตอนของแต่ละพลังงานจากอัตราส่วนของค่าปริมาณรังสีที่อ่านได้กับค่าปริมาณรังสีที่ทำการฉายรังสี และหาอัตราส่วนการตอบสนองระหว่างค่าการตอบสนองของแต่ละพลังงานกับค่าการตอบสนองของพลังงานอ้างอิง ซึ่งอัตราส่วนการตอบสนองต่อพลังงานโฟตอนเมื่อรวมกับค่าความกว้างของความคลาดเคลื่อนมีเกณฑ์การยอมรับได้ที่ $\pm 30\%$ โดยใช้พลังงานของรังสี Cs-137 เป็นพลังงานอ้างอิง⁽⁸⁾ ดังสมการที่ 3

$$0.7 \leq \frac{\bar{E}_i}{\bar{E}_{Ref}} \pm l < 1.3 \quad \text{สมการที่ 3}$$

การตอบสนองต่อมุมในการประเมินค่าปริมาณรังสี นำตลับที่บรรจุแผ่นวัดรังสีโอเอสแอลฉายรังสีแกมมาด้วย Cs-137 ปริมาณรังสี $H_p(10)$ 2 mSv ที่มุมตามแนวนอน (horizontal direction) เอียงซ้าย 60° , เอียงซ้าย 30° , ตรง 0° , เอียงขวา 30° และเอียงขวา 60° ตัวอย่างการฉายรังสีเอียงขวา 30° ดังแสดงในภาพที่ 4 โดยใช้ตลับที่บรรจุแผ่นวัดรังสีโอเอสแอล จำนวน 8 ตลับต่อ 1 มุม หลังการฉายรังสีอ่านค่าปริมาณรังสีซ้ำ 3 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ยของค่าปริมาณรังสี จากนั้นหาค่า

การตอบสนองต่อมุมจากอัตราส่วนของค่าปริมาณรังสีที่อ่านได้กับค่าปริมาณรังสีที่ทำการฉาย และหาอัตราส่วนการตอบสนองระหว่างค่าการตอบสนองในแต่ละมุมกับค่าการตอบสนองอ้างอิง ซึ่งอัตราส่วนการตอบสนอง

เมื่อรวมกับค่าความกว้างของความคลาดเคลื่อนมีเกณฑ์การยอมรับได้ที่ $\pm 20\%$ โดยใช้มุม 0° เป็นมุมอ้างอิง⁽⁸⁾ ดังสมการที่ 4



ภาพที่ 4 การทดสอบการตอบสนองต่อมุมเอียงขวาตามแนวนอน 30° (มุมสูง)

$$0.8 \leq \frac{A_i}{A_{Ref}} \pm l < 1.2 \tag{สมการที่ 4}$$

การหาค่าความกว้างของความคลาดเคลื่อน (**width of error**) หาค่าความคลาดเคลื่อนของอัตราส่วนการตอบสนองที่คำนวณได้จากความคลาดเคลื่อนของค่าปริมาณรังสี การตอบสนองต่อ

พลังงานโฟตอน (รังสีเอกซ์และแกมมา) ความเป็นเชิงเส้นของค่าปริมาณรังสี และการตอบสนองต่อมุมในการประเมินค่าปริมาณรังสี โดยคำนวณจากสมการที่ 5

$$l = \frac{\bar{x}_i}{\bar{x}_{ref}} \sqrt{\left(\frac{t_{ni} SD_i}{\sqrt{n_i}} / \bar{x}_i\right)^2 + \left(\frac{t_{nref} SD_{ref}}{\sqrt{n_{ref}}} / \bar{x}_{ref}\right)^2} \tag{สมการที่ 5}$$

- เมื่อ l = ค่าความกว้างของความคลาดเคลื่อน (width of error)
- \bar{x}_i, \bar{x}_{ref} = ค่าเฉลี่ยการตอบสนองที่ตำแหน่ง i และตำแหน่งอ้างอิง
- SD_i, SD_{ref} = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ตำแหน่ง i และตำแหน่งอ้างอิง
- n = จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ
- t_n = ค่าคงที่สำหรับแต่ละ n
(ในการทดสอบนี้ $n = 8$ ใช้ค่า $t_n = 2.37$)

ผล

การทดสอบความใช้ได้ของตัลบบรรจุแผ่นวัดรังสีไอเอสแอลที่ออกแบบใหม่ตามมาตรฐาน JIS Z 4339:2004 (R2016)⁽⁸⁾ ได้ผลการทดสอบ ดังนี้

ความคลาดเคลื่อนของค่าปริมาณรังสี ค่าปริมาณรังสีเฉลี่ยจากการทดสอบมีค่า 2.05, 2.01, 2.03, 2.02, 2.04, 2.02, 2.04, 2.05, 2.03 และ 1.89 โดยมีค่าต่ำสุดคือ 1.89 และมีค่าสูงสุดคือ 2.05 คำนวนค่าความคลาดเคลื่อนของค่าปริมาณรังสีได้ 1.085

ความเป็นเชิงเส้นของค่าปริมาณรังสี พบว่าอัตราส่วนการตอบสนองที่ทำได้มีค่า 0.968-1.158 ดังแสดงในตารางที่ 2

การตอบสนองต่อพลังงานโฟตอน พบว่าอัตราส่วนการตอบสนองที่ทำได้มีค่า 0.987-1.090 ดังแสดงในตารางที่ 3

การทดสอบการตอบสนองต่อมุมในการประเมินค่าปริมาณรังสี พบว่าอัตราส่วนการตอบสนอง ณ มุมต่างๆ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.985-1.000 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 2 การทดสอบความเป็นเชิงเส้นของค่าปริมาณรังสี

Field	Energy (keV)	Test Dose $H_p(10)$ (mSv)	Response ratio	Width of error
Cs-137	662	0.1	1.158	0.074
		0.3	1.023	0.053
		0.5	1.034	0.050
		1.0	1.000	0.043
		10.0	0.968	0.037

ตารางที่ 3 การทดสอบการตอบสนองต่อพลังงานโฟตอน

Field	Energy (keV)	Test Dose $H_p(10)$ (mSv)	Response ratio	Width of error
N 30	24	2	1.090	0.048
N 60	47		1.040	0.108
N 100	83		1.010	0.091
N 150	117		0.987	0.062
Cs-137	662		1.000	0.054

ตารางที่ 4 การทดสอบการตอบสนองต่อมุมในการประเมินค่าปริมาณรังสี

Field	Energy (keV)	Test Dose $H_p(10)$ (mSv)	Angular (horizontal)	Response ratio	Width of error
Cs -137	662	2	Left 60°	0.999	0.066
			Left 30°	0.988	0.046
			Center 0°	1.000	0.050
			Right 30°	0.988	0.053
			Right 60°	0.985	0.042

การเปรียบเทียบผลการทดสอบกับ InLight® badge และ Quixel® badge

จากข้อมูลผลการทดสอบทั้ง 4 หัวข้อ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลการทดสอบของ InLight® badge ที่มีการทดสอบตรงกัน 2 หัวข้อ คือ ความเป็นเชิงเส้นของ

ค่าปริมาณรังสี และการตอบสนองต่อมุมในการประเมินค่าปริมาณรังสีและ Quixel® badge ซึ่งเป็นข้อมูลตามเอกสารกำกับของบริษัทผู้ผลิตที่มีผลการทดสอบตรงกันทั้ง 4 หัวข้อ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบระหว่าง DMSc holder ที่บรรจุแผ่นวัดรังสี InLight®, InLight® badge และ Quixel® badge

รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ				
	DMSc	InLight®*	ร้อยละความแตกต่าง	Quixel®*	ร้อยละความแตกต่าง
ความคลาดเคลื่อนของค่าปริมาณรังสี	1.085	-	-	1.080	0.463
ความเป็นเชิงเส้นของค่าปริมาณรังสี					
0.1 mSv	1.158	1.018	13.752	0.967	19.752
0.3 mSv	1.023	1.018	0.491	1.004	1.892
0.5 mSv	1.034	0.996	3.815	1.017	1.672
1.0 mSv	1.000	1.000	0.000	1.000	0.000
10.0 mSv	0.968	1.006	3.777	1.025	5.561
การตอบสนองต่อพลังงานโฟตอน					
24 keV	1.090	-	-	1.003	8.674
47 keV	1.040	-	-	1.069	2.713
83 keV	1.010	-	-	1.046	3.442
117 keV	0.987	-	-	1.029	4.082
662 keV	1.000	-	-	1.000	0.000
การตอบสนองต่อมุมในการประเมินค่าปริมาณรังสี					
Left 60°	0.999	0.940	6.277	0.953	4.827
Left 30°	0.988	0.970	1.856	1.007	1.887
Center 0°	1.000	1.000	0.000	1.000	0.000
Right 30°	0.988	0.985	0.305	0.993	0.504
Right 60°	0.985	0.990	0.505	0.990	0.505

หมายเหตุ: * ผลจากรายงานผลการทดสอบของบริษัทผู้ผลิต^(9,10)

วิจารณ์

ปัญหาจากการใช้งาน InLight® holder ที่มีความบางและแตกหักง่าย ส่งผลให้ตัลั้บไม่เพียงพอต่อการให้บริการของห้องปฏิบัติการรังสีบุคคล สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่มีผู้ใช้บริการประมาณ 30,000 ราย คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาตัลั้บที่ใช้สำหรับบรรจุแผ่นวัดรังสีไอเอสแอล ชนิด InLight® โดยให้ชื่อว่า DMSc holder ซึ่งมีความแข็งแรงมากกว่าตัลั้บแบบเดิมและสามารถลดค่าใช้จ่ายในส่วนของการซื้อ

ตัลั้บจากบริษัทผู้ผลิตลงถึง 70% และตัลั้บ DMSc holder ที่ออกแบบง่ายต่อการบรรจุแผ่นวัดรังสี เนื่องจากมีอุปกรณ์ที่น้อยชิ้นกว่าตัลั้บแบบเดิมทำให้สามารถลดระยะเวลาในการปฏิบัติงาน แต่ตัลั้บที่ออกแบบใหม่ต้องทำการทดสอบความใช้ได้ก่อนนำไปใช้งาน ซึ่งทางคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการทดสอบโดยอ้างอิงมาตรฐาน JIS Z 4339:2004 (R2016) ใน 4 หัวข้อ ที่สอดคล้องกับการให้บริการของห้องปฏิบัติการรังสีบุคคล ที่ให้บริการผู้ปฏิบัติงานกับรังสีโฟตอนเป็นหลัก

การทดสอบ DMSc holder ที่บรรจุแผ่นวัดรังสีโอเอสแอล ชนิด InLight® พบว่าผลการทดสอบทั้งหมดผ่านเกณฑ์มาตรฐาน เมื่อนำผลการทดสอบระหว่าง DMSc holder ที่บรรจุแผ่นวัดรังสีโอเอสแอลชนิด InLight® เปรียบเทียบกับ InLight® badge และ Quixel® badge พบว่าข้อมูลที่ได้มีความสอดคล้องกัน โดยการทดสอบความเป็นเชิงเส้นของค่าปริมาณรังสีที่ 0.1 mSv มีค่าร้อยละความแตกต่างสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับ InLight® badge และ Quixel® badge คือ 13.752 และ 19.752 ตามลำดับ โดยค่าร้อยละความแตกต่างมีค่ามากเมื่อทดสอบที่ค่าปริมาณรังสีต่ำหรือทดสอบที่พลังงานรังสีต่ำ เนื่องจากค่าปริมาณรังสีช่วงดังกล่าวมีค่าไม่คงที่ในการอ่านค่าปริมาณรังสีแต่ละครั้ง

จากผลการทดสอบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า DMSc holder ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้สามารถนำไปใช้ในการให้บริการแก่ผู้ปฏิบัติงานด้านรังสีได้ในส่วนของการทดสอบในหัวข้ออื่นๆ ยังไม่สามารถทำการทดสอบได้ ได้แก่ การทดสอบกับรังสีบีตาหรือแม้แต่การทดสอบการตอบสนองต่อมุมในการประเมินค่าปริมาณรังสีที่มุมตามแนวตั้ง (vertical direction) เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องของเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบ โดยการทดสอบในหัวข้อที่ยังไม่ได้ทำการทดสอบต่อไปในอนาคตจะช่วยให้เกิดความสมบูรณ์ในการตรวจสอบความใช้ได้ของ DMSc holder

สรุป

การทดสอบ DMSc holder ที่บรรจุแผ่นวัดรังสีโอเอสแอล ชนิด InLight® มีผลผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐาน JIS Z 4339:2004 (R2016) ใน 4 หัวข้อ ได้แก่ ความคลาดเคลื่อนของค่าปริมาณรังสี ความเป็นเชิงเส้นของค่าปริมาณรังสีการตอบสนองต่อพลังงานโฟตอน และการทดสอบการตอบสนองต่อมุมในการประเมินค่าปริมาณรังสี และสอดคล้องกับตลับ InLight® badge สำหรับการทดสอบความเป็นเชิงเส้นของค่าปริมาณรังสีและการทดสอบการตอบสนองต่อมุมในการประเมินค่าปริมาณรังสี ดังนั้นตลับบรรจุแผ่นวัดรังสีโอเอสแอลที่ได้พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้สามารถนำไปให้บริการแก่ผู้ปฏิบัติงานด้านรังสีของห้องปฏิบัติการรังสีบุคคลได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการรังสีมาตรฐาน ทักษิณภูมิ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในความอนุเคราะห์ การฉายรังสีแกมมาและรังสีเอกซ์ ขอขอบคุณ นักฟิสิกส์รังสี ห้องปฏิบัติการรังสีบุคคล สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ทุกท่าน ที่กรุณาให้คำปรึกษาในการทำงานวิจัย และขอขอบคุณ นางสาวนลัทพร แซ่ลี ที่กรุณาให้คำปรึกษาในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. พระราชบัญญัติระเบียบบริหารราชการแผ่นดิน พ.ศ. 2534 กฎกระทรวงแบ่งส่วนราชการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2552. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 126 ตอนที่ 98 ก (วันที่ 28 ธันวาคม 2552). หน้า 70.
2. Yukihiro EG, McKeever SW. Optically stimulated luminescence: fundamentals and applications. Oklahoma, USA: John Wiley & Sons; 2011. p. 13-14.
3. Landauer InLight model 2 dosimeter characterization and uncertainty analysis for National Dosimetry Services (NDS), Health Canada Rev 004. Illinois, USA: Landauer, Inc; 2009.
4. Callister WD. Materials science and engineering: an introduction. 4th ed. New York: John Wiley & Sons; 1997.
5. Croonenborghs B, Smith MA, Strain P. X-ray versus gamma irradiation effects on polymers. Radiat Phys Chem 2007; 76(11-12): 1676-8.
6. Moskala EJ. The effect of gamma irradiation on thermoplastic copolyesters. Med Device Technol 2003; 14(3): 12-6.
7. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: International Organization for Standardization; 2017.

8. JIS Z 4339:2004 (R2016). Optically stimulated luminescence dosimetry systems. Tokyo: The Japanese Standards Association; 2016.
 9. Nagase Landauer. InLight badge (LDR holder) type test report Ver. 1.1. Ibaraki: Nagase Landauer Ltd; 2012.
 10. Nagase Landauer. Quixel dosimeter type test report Ver. 2.0. Ibaraki: Nagase Landauer Ltd; 2014.
 11. International Atomic Energy Agency. Calibration of radiation protection monitoring instruments. (Safety reports series no.16). Vienna: IAEA; 2000.
 12. Stanford Dosimetry. Whole body dose algorithm for the Landauer InLight LDR model 2 dosimeter, Revision InLight N 2003. Washington: Stanford Dosimetry; 2003.
-

Performance Verification of the OSL DMSc Holder

**Tewit Tungkasereeruk, Sataporn Klomkaew, Prachern Chethasingha,
Sirina Kurdsithong, and Udomsap Chanthason**

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

ABSTRACT The InLight[®] holder, previously used to contain an optically stimulated luminescence (OSL) dosimeter, due to its fragility and insufficient durability. To address these shortcomings, we developed the Department of Medical Sciences (DMSc) holder, a more robust and user-friendly cartridge holder. This study aimed to verify the performance of DMSc holder in compliance with the Japanese Industrial Standards Committee (JIS) 4339:2004 (R2016). As a result, it was indicated a 1.085 deviation in radiation quantity measurements. The dose linearity of radiation quantities at 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 and 10.0 mSv yielded values of 1.158 ± 0.074 , 1.023 ± 0.053 , 1.034 ± 0.050 , 1.000 ± 0.043 and 0.968 ± 0.037 , respectively. The photon energy responses at X-ray 24, 47, 83, and 117 keV, the values were measured at 1.090 ± 0.048 , 1.040 ± 0.108 , 1.010 ± 0.091 , and 0.987 ± 0.062 , while at 662 keV, it was 1.000 ± 0.054 . Regarding angular dependence in horizontal radiation quantity assessment at angles of 60° left, 30° left, 0° center, 30° right, and 60° right, the values were measured at 0.999 ± 0.066 , 0.988 ± 0.046 , 1.000 ± 0.050 , 0.988 ± 0.053 , and 0.985 ± 0.042 , respectively. In comparison with the InLight[®] holder, the DMSc holder displayed acceptable differences in dose linearity and angular response tests for horizontal radiation quantity assessment. All test results affirm that the newly developed DMSc holder is well-suited for use in personal radiation exposure risk assessment.

Keywords: DMSc holder, OSL dosimeter, Performance verification

การสังเคราะห์และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ของสารกลุ่มคูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต

พิราภรณ์ บุญอ่ำพล และ วันชัย ปลื้มภาณุภัทร

ภาควิชาเคมีและศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900

บทคัดย่อ สารยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสแสดงบทบาทสำคัญในการช่วยรักษาโรคเบาหวานได้เป็นอย่างดี ถึงแม้ว่าการรายงานการสังเคราะห์เหล่านี้ออกมาอย่างต่อเนื่อง แต่การค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์มากขึ้นกว่าเดิมยังคงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งสารกลุ่มคูมารินเป็นสารอะโรมาติกที่ประกอบด้วยวงเบนซีนและวงแหวนแอลฟาไพโรนที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของกรดคูมาริน-3-คาร์บอกซิลิกเป็นคูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โดยผลการสังเคราะห์สารกลุ่มคูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต จำนวน 8 สาร จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดคูมาริน-3-คาร์บอกซิลิกกับแอลกอฮอล์ พบว่าได้ผลผลิตของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง 17-65% เมื่อนำสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส พบว่า (-)-เมนทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต เป็นสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งต่อเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.16 ± 1.87 ไมโครโมลาร์ ตามด้วย 2-เฟนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.70 ± 2.66 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นการค้นพบครั้งแรกว่าสารทั้งสองตัวนี้มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ที่ดีกว่าอะคาร์โบส 30-49 เท่า และสามารถพัฒนาต่อยอดเป็นยาสำหรับการรักษาโรคเบาหวานที่มีประสิทธิภาพได้

คำสำคัญ: ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส, คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต, กรดคูมาริน-3-คาร์บอกซิลิก, ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

Corresponding author E-mail: fsciwcp@ku.ac.th

Received: 21 July 2023

Revised: 7 November 2023

Accepted: 15 November 2023

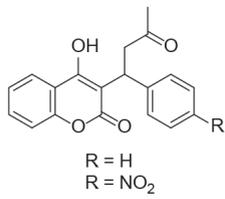
บทนำ

โรคเบาหวาน (diabetes) เป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของการหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน (insulin) ส่งผลให้เกิดภาวะน้ำตาลในกระแสเลือดสูงและถูกขับออกทางปัสสาวะ ซึ่งภาวะน้ำตาลในกระแสเลือดสูง คือสภาวะที่เกิดจากความผิดปกติของร่างกายไม่สามารถนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์ต่าง ๆ ในร่างกายได้ ปัจจุบันจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดปัญหาต่อวงการสาธารณสุขทั่วโลกและนำไปสู่การเกิดโรคแทรกซ้อนตามมามากมาย การใช้ยา เช่น อะคาร์โบส (acarbose) และ วอกลีโบส (voglibose) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากสำหรับการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน โดยยาเหล่านี้ช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (α-glucosidase) และ แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของแป้งไปเป็นน้ำตาลกลูโคส⁽¹⁾ ทำให้การดูดซึมน้ำตาลกลูโคสจากลำไส้เล็กเข้าสู่กระแสเลือดลดลง จึงสามารถลดภาวะการมีน้ำตาลในเลือดสูงได้⁽²⁾ อย่างไรก็ตาม การศึกษาและพัฒนาการรักษาโรคเบาหวานชนิดใหม่ยังคงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากการค้นพบยาชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่ายาที่ใช้ในปัจจุบันจะช่วยให้ผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น

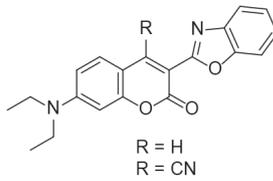
สารกลุ่มคูมาริน (coumarins) เป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic) ที่มีโครงสร้างแบบไบไซคลิก (bicyclic) ของวงเบนซีนและวงแหวนแอลฟาไพโรน (α-pyrone) พบการรายงานว่ามีสารกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ทางชีวภาพทางยา เช่น ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย⁽³⁾ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ⁽⁴⁾ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง⁽⁵⁾ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (acetylcholinesterase)⁽⁶⁾ นอกจากนี้มีการนำสารกลุ่ม coumarins ไปใช้ทางด้านเคมีทางการเกษตร อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และน้ำหอม⁽⁷⁾ โดยสารกลุ่ม coumarins เหล่านี้พบจากพืชหลายชนิด⁽⁸⁾ หรือจากการสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี⁽⁹⁾ ซึ่งโครงสร้างและหมู่แทนที่ของสารกลุ่ม coumarins ที่มีความแตกต่างกันจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ชีวภาพ⁽¹⁰⁾ มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์

สารกลุ่ม coumarins เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวนมาก เช่น สารกลุ่มคูมาริน-1,2,4-ไตรเอโซล (coumarin-1,2,4-triazole) ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ รวมถึงยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งต่างๆ ได้ เช่น มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม และมะเร็งผิวหนัง⁽¹¹⁾ ในส่วนสารกลุ่มคูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (coumarin-3-carboxylate) และคูมาริน-3-คาร์บอกซาไมด์ (coumarin-3-carboxamide) มีการรายงานว่าสามารถยับยั้งเอนไซม์ PTP 1B ที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณผ่านตัวรับอินซูลินได้⁽¹²⁾ นอกจากนี้สารกลุ่ม coumarin-3-carboxamide ยังมีฤทธิ์ในการควบคุมและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้⁽¹³⁾ ซึ่งโครงสร้างของสารสังเคราะห์กลุ่ม coumarins ดังแสดงในภาพที่ 1

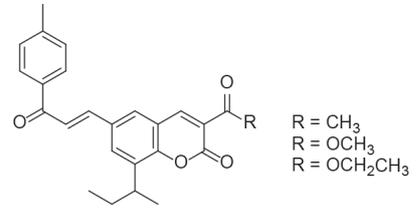
ในส่วนของสารกลุ่ม coumarins ต่อการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α-glucosidase พบว่ามีรายงานอย่างต่อเนื่อง เช่น อนุพันธ์ของไพรินโดคูมาริน (pyrindocoumarin derivative), 3-คูมารินคาร์โบไฮไดรไซด์ (3-coumarin carbohydrazide) และ 3-คูมารินคาร์โบไฮไดรโซน (3-coumarin carbohydrazone)⁽¹⁴⁾ (ภาพที่ 1) ซึ่งผลการศึกษาชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ α-glucosidase ของสารกลุ่มนี้ แต่ยังไม่พบรายงานการนำสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย⁽¹⁵⁾ ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α-glucosidase ด้วยโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ที่ไม่ได้มีความซับซ้อน จึงสามารถสังเคราะห์ได้ง่ายเพียงขั้นเดียว จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) โดยใช้กรดคูมาริน-3-คาร์บอกซิลิก (coumarin-3-carboxylic acid) และสารประกอบแอลกอฮอล์ (alcohol) เป็นสารตั้งต้น งานวิจัยที่น่าสนใจที่จะสังเคราะห์อนุพันธ์ของ coumarin-3-carboxylic acid เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α-glucosidase โดยผลการศึกษาที่ได้จะเป็นองค์ความรู้ใหม่ สามารถพัฒนาต่อยอดสารกลุ่มนี้ไปเป็นยาสำหรับการรักษาโรคเบาหวานได้ในอนาคต



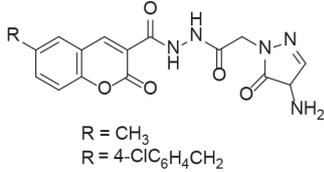
4-hydroxycoumarin derivative⁽⁵⁾



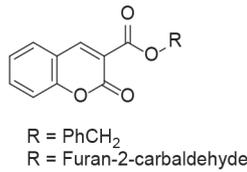
7-aminocoumarin⁽⁵⁾



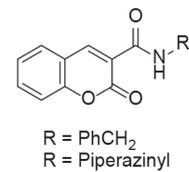
coumarin-chalcone hybrid⁽⁵⁾



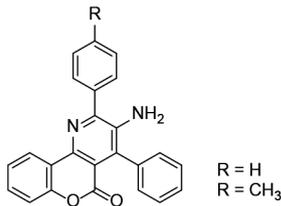
coumarin-1,2,4-triazole⁽¹¹⁾



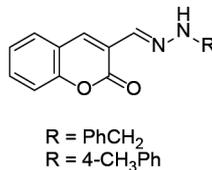
coumarin-3-carboxylate⁽¹²⁾



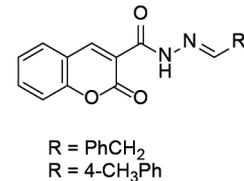
coumarin-3-carboxamide⁽¹³⁾



pyrindocoumarin⁽¹⁴⁾



3-coumarin carbohydrazide⁽¹⁴⁾



3-coumarin carbohydrazone⁽¹⁴⁾

ภาพที่ 1 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มคูมาริน (coumarins)

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

ยืนยันโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ที่สังเคราะห์ได้ โดยใช้เทคนิค ¹H และ ¹³C นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (nuclear magnetic resonance; NMR) ซึ่งละลายสารตัวอย่างในคลอโรฟอร์มดิฟทอเรต (chloroform-*d*; CDCl₃) ไดมethylซัลฟอกไซด์ดิฟทอเรต (dimethyl sulfoxide-*d*₆; DMSO-*d*₆) หรืออะซิโตนดิฟทอเรต (acetone-*d*₆) โดยสเปกตรัมที่ได้ถูกบันทึกบนเครื่อง Bruker 400 MHz AVANCE III HD spectrometer (Karlsruhe, Germany) ที่ความถี่ 400 MHz สำหรับ ¹H NMR และ 100 MHz สำหรับ ¹³C NMR โดยสัญญาณที่ได้จะแสดงในรูปค่าการเลื่อนทางเคมี (chemical shifts; δ) ที่มีหน่วยเป็น ppm ทำการวิเคราะห์มวลสารชนิดความละเอียดสูง

(high-resolution mass spectrometry; HRMS) ของสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ที่สังเคราะห์ได้ ด้วยเครื่อง Bruker microtof-Q III (Karlsruhe, Germany) โดยใช้โหมด ESI positive ค่าที่ได้จะแสดงในรูปมวลต่อประจุ (m/z) ทำการวัดค่าการหมุนระนาบแสงของสารด้วยเครื่องโพลาริมิเตอร์ (polarimeter) รุ่น ATAGO™ POLAX-2L (Tokyo, Japan) วัดค่าจุดหลอมเหลวของสารด้วยเครื่องวัดจุดหลอมเหลว (melting point apparatus SMP10) รุ่น Stuart Scientific (Staffordshire, United Kingdom) และระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) (Heidolph, Schwabach, Germany) จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader) (Spark™ 10M, Tecan, Switzerland)

สารเคมีและวัสดุ

ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ hexane และ ethyl acetate (Zenith Science, Thailand) ที่เป็นเกรดทางการค้า (commercial grade) ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการกลั่นที่จุดเดือดของตัวทำละลายอินทรีย์ก่อนนำมาใช้งานทุกครั้ง เพื่อป้องกันไม่ให้มีสารปนเปื้อนในขั้นตอนการแยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ ส่วนตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นเกรดวิเคราะห์ (analytical reagent grade) ได้แก่ dichloromethane และ dimethyl sulfoxide (Merck, Germany)

สารเคมีสำหรับการสังเคราะห์และการทดสอบฤทธิ์ ได้แก่ coumarin-3-carboxylic acid (Acros, Belgium), methanol (Kemaus, Australia), ethanol (Kemaus, Australia), butanol (Kemaus, Australia), (\pm)-*s*-butanol (Kemaus, Australia), cyclohexanol (Acros, Belgium), (-)-menthol (Fluka, Germany), benzyl alcohol (TCI, Japan), 2-phenylethanol (TCI, Japan), concentrated sulfuric acid (Merck, Germany), triphenylphosphine (TCI, Japan), tribromomethyl phenyl sulfone (TCI, Japan), triethylamine (Sigma-Aldrich, USA), anhydrous sodium sulfate (Qrec, Newzealand) sodium hydrogen carbonate (Kemaus, Australia), เอนไซม์ α -glucosidase (Sigma-Aldrich, USA), 4-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (TCI, Japan), sodium carbonate (Kemaus, Australia) และ acarbose (TCI, Japan)

การวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC) ใช้แบบแผ่นอะลูมิเนียมที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล (silica gel) 60 F₂₅₄ (Merck, Germany) แยกสารด้วยเทคนิค preparative thin layer chromatography (PTLC) ใช้แบบแผ่นกระจกใส ขนาด ขนาด 20 × 20 เซนติเมตร ที่เคลือบด้วย silica gel 60 F₂₅₄

วิธีการสังเคราะห์สารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate

วิธีที่ 1: ชั่งสาร coumarin-3-carboxylic acid ปริมาณ 95.10 มิลลิกรัม (0.5 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม ขนาด 25 มิลลิลิตร ทำการปิเปตแอลกอฮอล์ 3 มิลลิลิตร และ concentrated sulfuric acid ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา 3 หยด ใส่ลงในขวดก้นกลมตามลำดับ ทำการกวนของผสมที่อุณหภูมิรีฟลักซ์ (reflux) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อเสร็จสิ้นการทำปฏิกิริยานำของผสมมาสกัดด้วย dichloromethane และสารละลายอิ่มตัวของโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (saturated sodium hydrogen carbonate) อัตราส่วน 1:1 นำชั้น dichloromethane มาสกัดด้วยน้ำ อัตราส่วน 1:1 เติมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous sodium sulfate) ลงไปในชั้น dichloromethane เพื่อกำจัดน้ำที่ปนเปื้อนออก กรองเพื่อเอาโซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate) ที่ใช้แล้วออก และระเหย dichloromethane ออกจากของผสมด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จากนั้นตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารผลิตภัณฑ์ด้วย TLC และแยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิค PTLC ที่มีเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นตัวสารละลายอินทรีย์ผสมระหว่าง hexane ต่อ ethyl acetate (3:1) ได้ coumarin-3-carboxylate ที่ต้องการ

วิธีที่ 2: ชั่ง coumarin-3-carboxylic acid ปริมาณ 95.10 มิลลิกรัม (0.5 มิลลิโมล) และ triphenylphosphine (PPh₃) ปริมาณ 196.7 มิลลิกรัม (0.75 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลม ขนาด 5 มิลลิลิตร ปิเปตตัวทำละลาย dichloromethane ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ลงในของผสม เติม tribromomethyl phenyl sulfone (Br₃CSO₂Ph) ปริมาณ 196.4 มิลลิกรัม (0.5 มิลลิโมล) ทำการกวนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ภายใต้บรรยากาศเฉื่อยของ argon (Ar) จากนั้นปิเปตแอลกอฮอล์ (0.5 มิลลิโมล) และ triethylamine (Et₃N) ปริมาตร 140 ไมโครลิตร (1.0 มิลลิโมล) ลงในของผสมตามลำดับ ทำการกวนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อเสร็จสิ้นการทำปฏิกิริยานำของผสมที่ได้มาสกัดด้วย dichloromethane ต่อน้ำ อัตราส่วน 1:1 นำชั้น

dichloromethane มาสกัดด้วยน้ำเกลืออิ่มตัว (brine) อีกหนึ่งครั้ง เติมน้ำไฮดรอกไซด์โซเดียมซัลเฟต (anhydrous sodium sulfate) ลงในชั้น dichloromethane เพื่อกำจัดน้ำที่ปนเปื้อนออก กรองเพื่อเอา sodium sulfate ที่ใช้แล้วออก ทำการระเหย dichloromethane ออกจากของผสม ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารผลิตภัณฑ์ด้วย TLC และแยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค PTLC ที่มีเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวสารละลายอินทรีย์ผสมระหว่าง hexane ต่อ ethyl acetate (3:1) ได้ coumarin-3-carboxylate ที่ต้องการ

วิธีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ในหลอดทดลอง (*in vitro*)

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase⁽¹⁶⁾ ของสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 8 สาร และเปรียบเทียบกับ coumarin-3-carboxylic acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ โดยใช้ acarbose เป็นสารมาตรฐาน (positive control) วิธีทดสอบดังนี้ ปิเปตสารมาตรฐาน acarbose หรือสารตัวอย่าง coumarin-3-carboxylate หรือ coumarin-3-carboxylic acid ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1,500 ไมโครโมลาร์ ในสารละลาย 15% dimethylsulfoxide (DMSO) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer solution) 0.1 โมลาร์ ที่ pH 6.8 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate จากนั้นเติมเอนไซม์ α -glucosidase (0.2 ยูนิต/มิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เขย่าให้ของผสมเข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ทำการเติม 1 โมลาร์ 4-ไนโตรเฟนิล α -D-กลูโคไพราโนไซด์ (4-nitrophenyl α -D-glucopyranoside; PNPG) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เขย่าให้ของผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.4 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate; Na_2CO_3) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านไมโครเพลท ทดสอบซ้ำทั้งหมด

5 ครั้ง/สารตัวอย่าง คำนวณหาค่าการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ด้วยสูตร

$$\%I = [((\text{Blank} - \text{Blank control}) - (\text{Test} - \text{Test control})) / (\text{Blank} - \text{Blank control})] \times 100\%$$

I คือ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase

Blank คือ การทดสอบที่ใช้ 15% DMSO ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนสารตัวอย่าง

Blank control คือ การทดสอบที่ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนเอนไซม์ α -glucosidase และใช้ 15% DMSO ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนสารตัวอย่าง

Test คือ การทดสอบตามปกติ

Test control คือ การทดสอบที่ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนเอนไซม์ α -glucosidase

นำสาร coumarin-3-carboxylate ที่มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase มากกว่า 65% (ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์) ทดสอบหา IC_{50} ของการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase โดยทำการศึกษาที่ 9 ความเข้มข้นต่อสารตัวอย่าง (ช่วงของความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้ศึกษาอยู่ที่ 0.625 ถึง 160 ไมโครโมลาร์) และใช้โปรแกรม GraphPad Prism 6 ในการคำนวณ⁽¹⁷⁾

ผล

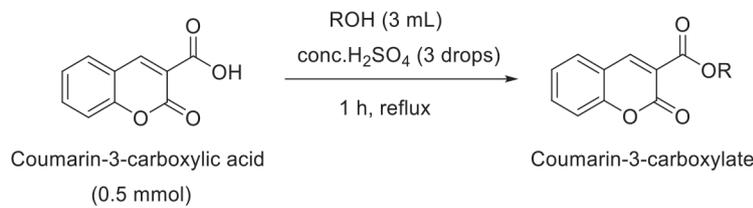
การสังเคราะห์สารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate

จากปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) ของ coumarin-3-carboxylic acid และแอลกอฮอล์ มี 2 วิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ หากเป็นแอลกอฮอล์ที่มีจำนวนคาร์บอนในโครงสร้างไม่เกิน 6 อะตอม เลือกใช้วิธีการสังเคราะห์ที่ 1 ดังแสดงในภาพที่ 2 เนื่องจากแอลกอฮอล์นี้สามารถใช้เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ในปฏิกิริยาได้ มีจุดเดือดไม่สูงมาก และกำจัดออกได้ง่ายในขั้นตอนการระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน แต่ถ้าจำนวนคาร์บอนในโครงสร้างเกิน 6 อะตอม เลือกใช้วิธีการสังเคราะห์ที่ 2 ดังแสดงในภาพที่ 3 โดยผลการสังเคราะห์ coumarin-3-carboxylate ทั้งหมด 8 สาร ที่มีความแตกต่างของโครงสร้างในส่วนแอลกอฮอล์ เช่น คาร์บอนสายโซ่ตรง โซ่กิ่ง และวง จาก

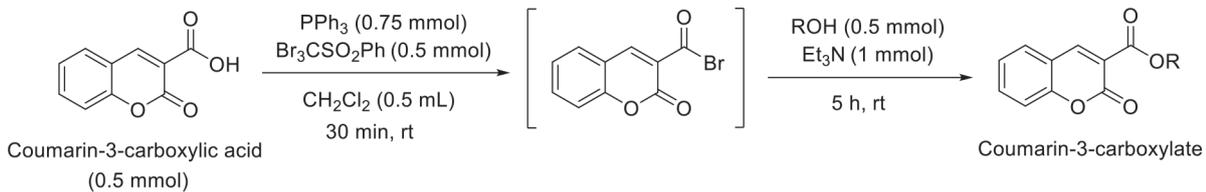
ทั้งสองวิธี พบว่าผลผลิตของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง 17-65% ดังแสดงในตารางที่ 1

ผลการสังเคราะห์สารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ด้วยวิธีที่ 1 พบว่าการสังเคราะห์ไฮโดรเจนคูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (5) ได้ผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 65% ส่วนการสังเคราะห์เมทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (1), บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (3) และ (\pm)-เอส-บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (4)

ได้ผลผลิตในช่วง 38-46% ในขณะที่การสังเคราะห์เอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (2) ได้ผลผลิตต่ำที่สุดเท่ากับ 17% ส่วนผลการสังเคราะห์สารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ด้วยวิธีที่ 2 พบว่าได้ผลผลิตของสาร (-)-เมนทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (6), เบนซิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (7) และ 2-ฟีนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (8) เท่ากับ 54% 43% และ 29% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 2 การสังเคราะห์สารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate วิธีที่ 1

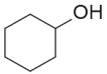
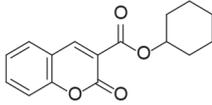
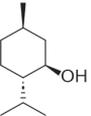
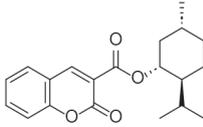
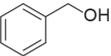
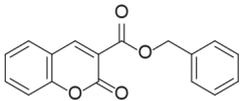
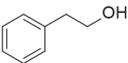
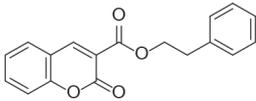


ภาพที่ 3 การสังเคราะห์สารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate วิธีที่ 2

ตารางที่ 1 การสังเคราะห์สารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate

แอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยา	คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต		วิธีการสังเคราะห์	ผลผลิต (%)
	ชื่อสาร	โครงสร้างทางเคมี		
CH ₃ OH	เมทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (1)		1	46
	เอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (2)		1	17
	บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (3)		1	43
	(\pm)-เอส-บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (4)		1	38

ตารางที่ 1 การสังเคราะห์สารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate (ต่อ)

แอลกอฮอล์ ที่ใช้ในปฏิกิริยา	คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต		วิธีการ สังเคราะห์	ผลผลิต (%)
	ชื่อสาร	โครงสร้างทางเคมี		
	ไซโคลเฮกซิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (5)		1	65
	(-)-เมนทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (6)		2	54
	เบนซิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (7)		2	43
	2-ฟีนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (8)		2	29

จากการวิเคราะห์และยืนยันโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 8 สาร ด้วยเทคนิค ^1H และ ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) ค่าการตรวจวัดมวลสารชนิดความละเอียดสูง ค่าจุดหลอมเหลว และค่าออปติคัลโรเทชัน (optical rotation) โดยผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความสอดคล้องกับโครงสร้างของสารและข้อมูลจากเอกสารอ้างอิง ซึ่งมีเพียง (\pm)-เอส-บิวทิลคูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (4) และ 2-ฟีนิลเอทิลคูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (8) เท่านั้น ที่ไม่สามารถเปรียบเทียบกับข้อมูลจากเอกสารอ้างอิงได้ เนื่องจากเป็นสารใหม่ที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน

เมทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (methyl coumarin-3-carboxylate) (1): ของแข็งสีขาว; m.p. 115-116°C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.54 (s, 1H, Ar-CH=C-C=O), 7.60-7.55 (m, 2H, Ar-H), 7.29-7.23 (m, 2H, Ar-H), 3.86 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 163.5 (C=O), 156.6 (C=O), 155.1 (Ar-C), 149.1 (Ar-C), 134.5 (Ar-C), 129.6 (Ar-C), 124.9 (Ar-C), 117.8 (Ar-C), 117.8 (Ar-C), 116.6 (Ar-C), 52.8 (OCH_3). HRMS (ESI) m/z: calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{NaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 227.0320, found 227.0321.⁽¹⁸⁾

เอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (ethyl coumarin-3-carboxylate) (2): ของแข็งสีขาว; m.p. 138-140°C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.52 (s, 1H, Ar-CH=C-C=O), 7.57-7.52 (m, 2H, Ar-H), 7.26-7.19 (m, 2H, Ar-H), 4.29 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H, OCH_2), 1.31 (t, $J = 7.8$ Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 162.8 (C=O), 156.6 (C=O), 155.0 (Ar-C), 148.5 (Ar-C), 134.3 (Ar-C), 129.6 (Ar-C), 124.9 (Ar-C), 118.0 (Ar-C), 117.8 (Ar-C), 116.5 (Ar-C), 61.8 (OCH_2), 14.2 (CH_3). HRMS (ESI) m/z: calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{NaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 241.0477, found 241.0487.⁽¹⁸⁾

บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (butyl coumarin-3-carboxylate) (3): ของแข็งไม่มีสี; m.p. 65-66°C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.49 (s, 1H, Ar-CH=C-C=O), 7.66-7.52 (m, 2H, Ar-H), 7.35-7.31 (m, 2H, Ar-H), 4.34 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, OCH_2), 1.75 (qui, $J = 6.6$ Hz, 2H, OCH_2CH_2), 1.53-1.39 (m, 2H, CH_2CH_3), 0.96 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 163.1 (C=O), 156.6 (C=O), 155.1 (Ar-C), 148.4 (Ar-C), 134.3 (Ar-C), 129.5 (Ar-C), 124.8 (Ar-C), 118.4 (Ar-C), 117.9 (Ar-C), 116.7 (Ar-C),

65.8 (OCH₂), 30.6 (CH₂), 19.1 (CH₂), 13.7 (CH₃). HRMS (ESI) m/z: calcd for C₁₄H₁₄NaO₄ [M+Na]⁺: 269.0790, found 269.0822.⁽¹⁹⁾

(±)-เอส-บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต ((±)-*S*-butyl coumarin-3-carboxylate) (4): ของแข็งสีเหลืองอ่อน; m.p. 73–74°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.43 (s, 1H, Ar-CH=C-C=O), 7.64–7.59 (m, 2H, Ar-H), 7.35–7.30 (m, 2H, Ar-H), 5.10 (m, 1H, OCH), 1.81–1.61 (m, 2H, CH₂), 1.34 (d, *J* = 6.24 Hz, 3H, CHCH₃), 0.98 (t, *J* = 7.52 Hz, 3H, CH₂CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 162.6 (C=O), 156.7 (C=O), 155.1 (Ar-C), 147.9 (Ar-C), 134.2 (Ar-C), 129.4 (Ar-C), 124.8 (Ar-C), 118.8 (Ar-C), 117.9 (Ar-C), 116.8 (Ar-C), 74.2 (OCH), 28.8 (CH₂), 19.4 (CH₃), 9.8 (CH₃). HRMS (ESI) m/z: calcd for C₁₄H₁₄NaO₄ [M+Na]⁺: 269.0790, found 269.0808.

ไซโคลเฮกซิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (cyclohexyl coumarin-3-carboxylate) (5): ของแข็งสีขาว; m.p. 106–107°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.45 (s, 1H, Ar-CH=C-C=O), 7.64–7.60 (m, 2H, Ar-H), 7.34–7.30 (m, 2H, Ar-H), 5.02 (m, 1H, OCH), 1.95 (m, 2H, CH₂), 1.79 (m, 2H, CH₂), 1.59 (m, 2H, CH₂), 1.49–1.24 (m, 4H, CH₂ × 2). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 162.4 (C=O), 155.1 (C=O), 148.0 (Ar-C), 134.2 (Ar-C), 129.4 (Ar-C), 124.8 (Ar-C), 118.8 (Ar-C), 117.9 (Ar-C), 116.7 (Ar-C), 111.2 (Ar-C), 74.3 (OCH), 31.4 (CH₂ × 2), 25.4 (CH₂ × 2), 23.6 (CH₂). HRMS (ESI) m/z: calcd for C₁₆H₁₆NaO₄ [M+Na]⁺: 295.0946, found 295.0950.⁽¹⁸⁾

(-)-เมนทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต ((-)-menthyl coumarin-3-carboxylate) (6): ของแข็งสีเหลือง m.p. 139–140°C; [α]_D^{23.7} = -1.20° (*c* = 0.0002, MeOH) ([α]_D³² = -62° (*c* = 0.23, CHCl₃))⁽²⁰⁾, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)

δ 8.47 (s, 1H, Ar-CH=C-C=O), 7.67–7.61 (m, 2H, Ar-H), 7.37–7.28 (m, 2H, Ar-H), 4.96 (m, 1H, OCH), 2.15 (m, 1H, CH), 2.01 (m, 1H, CH), 1.74 (m, 2H, CH₂), 1.57 (m, 2H, CH₂), 1.14 (m, 2H, CH₂), 0.83 (m, 6H, CH₃ × 2), 0.81 (d, *J* = 7.0, 3H, CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 162.6 (C=O), 156.6 (C=O), 155.8 (Ar-C), 148.0 (Ar-C), 134.1 (Ar-C), 129.4 (Ar-C), 124.7 (Ar-C), 118.9 (Ar-C), 118.0 (Ar-C), 116.8 (Ar-C), 76.1 (OCH), 47.0 (CH), 40.7 (CH₂), 34.2 (CH₂), 31.5 (CH), 26.2 (CH), 23.3 (CH₂), 22.0 (CH₃), 20.9 (CH₃), 16.2 (CH₃). HRMS (ESI) m/z: calcd for C₂₀H₂₄NaO₄ [M+Na]⁺: 351.1572, found 351.1589.⁽²⁰⁾

เบนซิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (benzyl coumarin-3-carboxylate) (7): ของแข็งไม่มีสี; m.p. 79–81°C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.56 (s, 1H, Ar-CH=C-C=O), 7.67–7.58 (m, 2H, Ar-H), 7.50–7.47 (m, 2H, Ar-H), 7.42–7.31 (m, 5H, Ar-H), 5.40 (s, 2H, OCH₂), ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 162.7 (C=O), 156.5 (C=O), 155.3 (Ar-C), 148.9 (Ar-C), 135.4 (Ar-C), 134.5 (Ar-C), 129.6 (Ar-C), 128.7 (Ar-C × 2), 128.5 (Ar-C), 128.4 (Ar-C × 2), 124.9 (Ar-C), 118.0 (Ar-C), 117.8 (Ar-C), 116.9 (Ar-C), 67.5 (OCH₂). HRMS (ESI) m/z: calcd for C₁₇H₁₂NaO₄ [M+Na]⁺: 303.0633, found 303.0645.⁽¹⁸⁾

2-เฟนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (phenylethyl coumarin-3-carboxylate) (8): ของแข็งสีเหลือง; m.p. 155–156 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.46 (s, 1H, Ar-CH=C-C=O), 7.69–7.59 (m, 2H, Ar-H), 7.39–7.25 (m, 7H, Ar-H), 4.58 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂), 3.12 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 163.0 (C=O), 156.7 (C=O), 155.2 (Ar-C), 148.8 (Ar-C), 137.5 (Ar-C), 134.4 (Ar-C), 129.5 (Ar-C), 129.1 (Ar-C × 2), 128.6 (Ar-C × 2), 126.7 (Ar-C), 124.9 (Ar-C), 118.1 (Ar-C),

117.9 (Ar-C), 116.8 (Ar-C), 65.4 (OCH₂), 35.0 (CH₂). HRMS (ESI) m/z: calcd for C₁₈H₁₄NaO₄ [M+Na]⁺: 317.0790, found 317.0805.

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ในหลอดทดลองของสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate

เมื่อนำสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 8 สาร ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase เบื้องต้นที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ พบว่ามีสาร จำนวน 5 สาร ที่มีการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase โดยมีค่าการยับยั้งอยู่ในช่วง 40.6-84.4% ซึ่งมีค่าสูงกว่า coumarin-3-carboxylic acid ที่เป็นสารตั้งต้น ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยสาร coumarin-3-carboxylate ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase สูงที่สุด คือ (-)-เมนทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (6) โดยมีค่าการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase เท่ากับ 84.4±4.3% ถัดมาคือ 2-เฟนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (8) จะมีค่า

การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase เท่ากับ 68.1±4.4% ในส่วนของสาร เมทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (1), เบนซิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (7) และ เอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (2) มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase เท่ากับ 55.4±6.9%, 53.6±9.2% และ 40.6±6.6% ตามลำดับ ในขณะที่ บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (3), (±)-เอส-บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (4) และ ไฮโคเฮกซิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (5) ไม่แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ที่ความเข้มข้นนี้

จากการนำสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ที่มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ มากกว่า 65.0% จำนวน 2 สาร หาค่า IC₅₀ พบว่า (-)-เมนทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (6) และ 2-เฟนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (8) มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 7.16±1.87 และ 11.70±2.66 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ดีกว่าสารมาตรฐาน acarbose ที่มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 350.50±40.37 ไมโครโมลาร์ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ในหลอดทดลองของสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate

สารกลุ่มคูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต	การยับยั้ง \pm SD (%) ¹	IC ₅₀ \pm SD (ไมโครโมลาร์)
กรดคูมาริน-3-คาร์บอกซิลิก	4.7±1.7	-
เมทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (1)	55.4±6.9	-
เอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (2)	40.6±6.6	-
บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (3)	0	-
(±)-เอส-บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (4)	0	-
ไฮโคเฮกซิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (5)	0	-
(-)-เมนทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (6)	84.4±4.3	7.16±1.87
เบนซิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (7)	53.6±9.2	-
2-เฟนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (8)	68.1±4.4	11.70±2.66
อะคาร์โบส (acarbose)	15.7±1.2	350.50±40.37

หมายเหตุ: ¹ความเข้มข้นสุดท้ายของ coumarin-3-carboxylate เท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์

วิจารณ์

จากผลการสังเคราะห์สารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate พบว่าผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ได้ อยู่ในช่วงปานกลางถึงต่ำ โดยเฉพาะวิธีการสังเคราะห์ที่ 1 การทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้กรดเป็นตัวเร่ง ปฏิกิริยานั้นสามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับได้⁽²¹⁾ ส่งผลให้ปฏิกิริยานี้ไม่สามารถเกิดได้อย่างสมบูรณ์ จึงยังคงเห็นสารตั้งต้นเหลือจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ซึ่งหากต้องการเพิ่มผลผลิตของผลิตภัณฑ์ให้สูงขึ้น อาจทำการศึกษาปัจจัยของภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาต่อไป เช่น ผลของปริมาณตัวทำละลาย ผลของเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา หรือผลของชนิดของสารที่ช่วยดูดน้ำในปฏิกิริยา เป็นต้น แต่ข้อดีของการสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้ คือไม่ต้องใช้วิธีการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี เช่น PTLC เพราะสารที่ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์สามารถกำจัดออกได้โดยวิธีการสกัดด้วยเบสหรือระเหยออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ส่วนวิธีการสังเคราะห์ที่ 2 ทำการศึกษาและรายงานเพื่อใช้สังเคราะห์สารกลุ่มไทมิลเอสเทอร์ (thymyl esters)⁽²²⁾ ยังคงให้ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ไม่สูงเช่นกัน อาจเป็นเพราะอุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาไม่สูงพอหรือเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาน้อยเกินไป ซึ่งการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นและเวลาที่มากขึ้น อาจทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้นได้⁽²³⁾

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α-glucosidase ของสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ทั้ง 8 สาร พบว่าสารมีเพียง 5 สาร (สาร 1, 2 และ 6-8) เท่านั้น ที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ α-glucosidase ที่ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 100 ไมโครโมลาร์ และแสดงฤทธิ์การยับยั้งที่ดีกว่า coumarin-3-carboxylic acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้น แสดงให้เห็นว่าการปรับเปลี่ยนโครงสร้างในส่วน carboxyl group ไปเป็น ester group จะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ α-glucosidase ให้ดีขึ้นได้ โดยสารที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดคือ (-)-เมนทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (6) ซึ่งผลการศึกษานี้เป็นองค์ความรู้ใหม่ทางด้านการค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α-glucosidase ชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า acarbose

ที่เป็นสารมาตรฐานถึง 49 เท่า เมื่อพิจารณาของโครงสร้างทางเคมีของสารนี้ พบว่าส่วนแอลกอฮอล์ คือ menthol ซึ่งเป็นสารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์ (monoterpenoids) ที่มีโครงสร้างหลักเป็นวงไซโคลเฮกซานอล (cyclohexanol) และมีหมู่แทนที่บนวงจำนวนสองหมู่ คือ methyl group และ isopropyl group ซึ่งการที่มีสองหมู่นี้บนวงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้ง α-glucosidase ให้ดีขึ้น เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับสารไซโคลเฮกซิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (5) ที่ไม่มีสองหมู่นี้บนวง และการออกฤทธิ์ยับยั้งดีกว่าแอลกอฮอล์ที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นคาร์บอนโซ่ตรงหรือโซ่กิ่ง นอกจากนี้พบว่าหากใส่ phenyl group เข้าไปในโครงสร้างของส่วนแอลกอฮอล์ตรงตำแหน่งปลายของสายโซ่คาร์บอนจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้ง α-glucosidase ให้สูงขึ้น เมื่อพิจารณาจากค่าการยับยั้งระหว่างสาร 2-เฟนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (8) กับเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (2) ที่มีค่าเท่ากับ 68.1±4.4% และ 40.6±6.6% ตามลำดับ ซึ่งชี้ให้เห็นถึงบทบาทที่สำคัญของ phenyl group สำหรับการเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมี

เมื่อนำสาร (-)-เมนทิล คูมาริน 3-คาร์บอกซิเลต- (6) ที่มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 7.16±1.87 ไมโครโมลาร์ และ 2-เฟนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (8) ที่มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 11.70±2.66 ไมโครโมลาร์ ไปเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ α-glucosidase กับสารกลุ่ม coumarins ที่เคยมีการรายงานก่อนหน้านี้ พบว่าสารทั้งสองชนิดที่งานวิจัยนี้ได้พัฒนาขึ้นนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ α-glucosidase ที่สูงกว่า เช่น สารคูมาริน ออกซิเมเอสเทอร์ (coumarin oxime esters) ที่มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 15.91±0.25 ไมโครโมลาร์⁽²⁴⁾ สาร 3,7'-บิสคูมารินิลอีเธอร์ (3,7'-biscumarinil ether) ที่มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 18.70±0.80 ไมโครโมลาร์⁽²⁵⁾ และอนุพันธ์ของไพรินโดคูมาริน (pyrindocoumarin derivatives) ที่มีค่า IC₅₀ มากกว่า 100 ไมโครโมลาร์⁽¹⁵⁾ เมื่อนำสารดังกล่าวทั้งสองชนิดไปเปรียบเทียบกับสารกลุ่มอื่น ๆ ที่มีการรายงานฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α-glucosidase

ก่อนหน้านี เช่น สาร 2,4-ไดอะริลเบนโซ[4,5]อิมิดาโซล[1,2- α]ไพริมิดีน (2,4-diarylbenzo[4,5]imidazole[1,2- α]pyrimidine) ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 53.8 ± 0.04 ไมโครโมลาร์⁽²⁶⁾ สารคาร์โบไฮไดรไรด์-เบนซิมิดาโซล (carbohydrazide-benzimidazole) ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 70.6 ± 6.8 ไมโครโมลาร์⁽²⁷⁾ และสารกลุ่ม alkaloid 1,2-ไดเมทอกซีพิเพอรัมเบลแลคแทมซี (1,2-dimethoxy piperumbellactam C) ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 98.07 ± 0.44 ไมโครโมลาร์⁽²⁾ พบว่าสารกลุ่ม coumarin-3-carboxylate ที่งานวิจัยนี้ทำการศึกษาและพัฒนาโครงสร้างทางเคมีนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ดีกว่าสารเหล่านี้หลายเท่า

สรุป

จากการศึกษาและปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของ coumarin-3-carboxylic acid ไปเป็น coumarin-3-carboxylate ทั้งหมด 8 สาร โดยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน โครงสร้างทางเคมีของสารที่สังเคราะห์ได้มีความสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 1H และ ^{13}C นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ค่าการตรวจวัดมวลสารชนิดความละเอียดสูง และข้อมูลจากเอกสารอ้างอิง โดยที่ (\pm)-เอส-บิวทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (4) และ 2-เฟนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (8) เป็นสารใหม่ที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน เมื่อนำสารทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase พบเป็นครั้งแรกว่า (-)-เมนทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (6) และ 2-เฟนิลเอทิล คูมาริน-3-คาร์บอกซิเลต (8) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ที่ดีกว่าสารมาตรฐาน acarbose ถึง 49 และ 30 เท่าตามลำดับ รวมถึงสารอื่นๆ อีกหลายชนิดที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ โดยผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้เป็นองค์ความรู้ใหม่ในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของ coumarin-3-carboxylic acid ที่ทำให้ค้นพบสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นและสามารถพัฒนาต่อยอดสารออกฤทธิ์สำคัญเหล่านี้ ไปเป็นยาสำหรับการรักษาโรคเบาหวานได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยนี้สำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem* 2003; 38(11): 1599-616.
- Yin Z, Zhang W, Feng F, Zhang Y, Kang W. α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Sci Hum Wellness* 2014; 3(3-4): 136-74.
- Zou J, Liu Y, Guo R, Tang Y, Shi Z, Zhang M, et al. An in vitro coumarin-antibiotic combination treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nat Prod Commun* 2021; 16(1): 1-7.
- Lee BC, Lee SY, Lee HJ, Sim GS, Kim JH, Kim JH, et al. Anti-oxidative and photo-protective effects of coumarins isolated from *Fraxinus chinensis*. *Arch Pharm Res* 2007; 30(10): 1293-301.
- Emami S, Dadashpour S. Current developments of coumarin-based anti-cancer agents in medicinal chemistry. *Eur J Med Chem* 2015; 102: 611-30.
- de Souza LG, Rennã MN, Figueroa-Villar JD. Coumarins as cholinesterase inhibitors: a review. *Chem Biol Interact* 2016; 254: 11-23.
- Kotthireddy K, Pasula A. Comprehensive review on the applications of coumarin fused with five membered heterocyclics in the field of material chemistry, agrochemistry and pharmacology. *Res J Life Sci Bioinform Pharm Chem Sci* 2018; 4(2): 203-24.

- Fylaktakidou KC, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas KE, Nicolaides DN. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. *Curr Pharm Des* 2004; 10(30): 3813-33.
- Qian H, Sun J. Synthesis of coumarins via [4+2] cyclization of siloxy alkynes and salicylaldehydes. *Synlett* 2021; 32: 207-10.
- Luchini AC, Rodrigues-Orsi P, Cestari SH, Seito LN, Witacenis A, Pellizzon CH, et al. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Biol Pharm Bull* 2008; 31(7): 1343-50.
- Kahveci B, Yilmaz F, Mentese E, Ülker S. Microwave-assisted synthesis of some new coumarin derivatives including 1,2,4-triazol-3-one and investigation of their biological activities. *Chem Heterocycl Compd* 2015; 51(5): 447-56.
- Sun C, Peng C, Wang J, Wang Q, Liu W, Zhou H, et al. Synthesis of novel coumarin derivatives and in vitro biological evaluation as potential PTP 1B inhibitors. *Heterocycles* 2013; 87(8): 1711-26.
- Yu X, Teng P, Zhang YL, Xu ZJ, Zhang MZ, Zhang WH. Design, synthesis and antifungal activity evaluation of coumarin-3-carboxamide derivatives. *Fitoterapia* 2018; 127: 387-95.
- Randelović S, Bipat R. A review of coumarins and coumarin-related compounds for their potential antidiabetic effect. *Clin Med Insights: Endocrinol Diabetes* 2021; 14: 1-9.
- Adib M, Peytam F, Rahmanian-Jazi M, Mohammadi-Khanaposhtanib M, Mahernia S, Bijanzadeh HR, et al. Design, synthesis, *in vitro* α -glucosidase inhibition, molecular modeling, and kinetic study of novel coumarin fused pyridine derivatives as potent antidiabetic agents. *New J Chem* 2018; 42: 17268-78.
- Bhatia A, Singh B, Arora R, Arora S. In vitro evaluation of the α -glucosidase inhibitory potential of methanolic extracts of traditionally used antidiabetic plants. *BMC Complement Altern Med* 2019; 19: 74. (9 pages).
- Devaraj S, Yip YM, Panda P, Ong LL, Wong PWK, Zhang D, et al. Cinnamoyl sucrose esters as alpha glucosidase inhibitors for the treatment of diabetes. *Molecules* 2021; 26(2): 469. (12 pages).
- Kuang Y, Liu X, Chang L, Wang M, Lin L, Feng X. Catalytic asymmetric conjugate allylation of coumarins. *Org Lett* 2011; 13(15): 3814-7.
- Singh S, Tripathi KN, Singh RP. Redox activated amines in the organophotoinduced alkylation of coumarins. *Org Biomol Chem* 2022; 20(29): 5716-20.
- Ichikawa A, Ono H, Harada N. Stereochemical studies of chiral resolving agents, M9PP and H9PP acids. *Chirality* 2004; 16(8): 559-67.
- Fischer E, Speier A. Darstellung der Ester. *Ber Dtsch Chem Ges* 1895; 28(3): 3252-8.
- Tharamak S, Yooboon T, Pengsook A, Ratwatthananon A, Kumrungsee N, Bullangpoti V, et al. Synthesis of thymyl esters and their insecticidal activity against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag Sci* 2020; 76(3): 928-35.
- Chaysripongkul S, Pluempanupat W, Jang DO, Chavasiri W. Application of $\text{Cl}_3\text{CCONH}_2/\text{PPh}_3$ towards the synthesis of bioactive amides. *Bull Korean Chem Soc* 2009; 30(9): 2066-70.
- Zhang X, Zheng YY, Hu CM, Wu XZ, Lin J, Xiong Z, et al. Synthesis and biological evaluation of coumarin derivatives containing oxime ester as α -glucosidase inhibitors. *Arab J Chem* 2022; 15(9): 104072. (11 pages).
- Zhao DG, Zhou AY, Du Z, Zhang Y, Zhang K, Ma YY. Coumarins with α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities from the flower of *Edgeworthia gardneri*. *Fitoterapia* 2015; 107: 122-7.



26. Peytam F, Takalloobanafshi G, Saadattalab T, Norouzbahari M, Emamgholipour Z, Moghimi S, et al. Design, synthesis, molecular docking, and *in vitro* α -glucosidase inhibitory activities of novel 3-amino-2,4-diarylbenzo [4,5]imidazo [1,2-a] pyrimidines against yeast and rat α -glucosidase. *Sci Rep* 2021; 11: 11911. (18 pages).
27. Azizian H, Pedrood K, Moazzam A, Valizadeh Y, Khavaninzadeh K, Zamani A, et al. Docking study, molecular dynamic, synthesis, anti- α -glucosidase assessment, and ADMET prediction of new benzimidazole-Schiff base derivatives. *Sci Rep* 2022; 12: 14870. (12 pages).
-

Synthesis and α -Glucosidase Inhibitory Activity of Coumarin-3-Carboxylates

Piraporn Boonumpol and Wanchai Pluempanupat

Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

ABSTRACT α -Glucosidase inhibitors represent an important role in the treatment of diabetes. Although many synthetic inhibitors have been reported, novel and more efficient compounds are still necessary to exhibit this activity. Coumarins are aromatic substances composed of fused benzene and α -pyrone rings and display a wide variety of biological activities, especially α -glucosidase inhibitory activity. This research aimed to study the structural modification of coumarin-3-carboxylic acid into coumarin-3-carboxylates to enhance their α -glucosidase inhibitory activity. Eight coumarin-3-carboxylates were successfully synthesized by esterification using coumarin-3-carboxylic acid and alcohols as starting materials. The desired products were obtained in 17–65% yields. All synthesized compounds were examined for their α -glucosidase inhibitory activity. The results found that (-)-menthyl coumarin-3-carboxylate was the most potent inhibitor against α -glucosidase with an IC_{50} of $7.16 \pm 1.87 \mu\text{M}$, followed by 2-phenylethyl coumarin-3-carboxylate with an IC_{50} of $11.70 \pm 2.66 \mu\text{M}$. Both compounds were first reported to exhibit 30–49 folds activity more efficiently than acarbose and could be further developed into a new potential antidiabetic drug.

Keywords: α -Glucosidase inhibitory activity, Coumarin-3-carboxylates, Coumarin-3-carboxylic acid, Esterification

การสังเคราะห์และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ สารกลุ่มโมนิเทอร์ฟีนอยด์เอสเทอร์

ศศิธร บุปผาทาโน และ วันชัย ปลื้มภาณุภัทร

ภาควิชาเคมีและศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900

บทคัดย่อ โโมนิเทอร์ฟีนอยด์เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีประสิทธิภาพในการช่วยลดการสร้างเม็ดสีเมลานิน โดยหนึ่งในแนวทางการพัฒนาสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์เพิ่มขึ้นจากสารกลุ่มนี้ คือการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของโมนิเทอร์ฟีนอยด์เป็นโมนิเทอร์ฟีนอยด์เอสเทอร์ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของโมนิเทอร์ฟีนอยด์เอสเทอร์ โดยมีกรดโคจิกเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวกด้วยวิธีโดปาโครม เริ่มจากทำการสังเคราะห์โมนิเทอร์ฟีนอยด์เอสเทอร์ ทั้งหมด 10 ชนิด จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดทรานส์-ซินนามิกกับ โโมนิเทอร์ฟีนอยด์ที่แตกต่างกัน โดยใช้ไตรเฟนิลฟอสฟีนและคาร์บอนเตตระโบรไมด์เป็นรีเอเจนต์ พบว่าได้ผลผลิตของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง 5-64% นำโมนิเทอร์ฟีนอยด์เอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าฮิโนกิไทออลซินนามेटเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.58 ± 0.09 ไมโครโมลาร์ ซึ่งผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าฮิโนกิไทออลซินนามेटเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีประสิทธิภาพมากกว่า กรดโคจิก 9 เท่า สารนี้จึงมีศักยภาพต่อการพัฒนาไปเป็นสารทำให้ผิวกระจ่างใสชนิดใหม่สำหรับใช้เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางได้

คำสำคัญ: ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, โโมนิเทอร์ฟีนอยด์เอสเทอร์, กรดทรานส์-ซินนามิก, โโมนิเทอร์ฟีนอยด์, ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

Corresponding author E-mail: fsciwcp@ku.ac.th

Received: 11 July 2023

Revised: 7 November 2023

Accepted: 16 November 2023

บทนำ

เมลานิน (melanin) หรือเม็ดสีผิวเป็นรงควัตถุทางธรรมชาติที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งสีดำ สีน้ำตาล และสีเหลือง ซึ่งมีหน้าที่ช่วยป้องกันรังสีจากแสงแดด โดยเมลานินอยู่ในเมลานोไซมขนาดใหญ่และสามารถดูดซับแสงแดดที่มีความเข้มในระดับรังสี UV ได้ เมลาโนมีชีวสังเคราะห์มาจากไทโรซีน (tyrosine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นในร่างกาย โดยเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) จะเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) เปลี่ยนไทโรซีนเป็นแอล-โดปา (L-Dopa) จากนั้นโดปาจะถูกออกซิไดส์เป็นโดปาคิวโนน (dopaquinone) ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) เกิดการสังเคราะห์ต่อกลายเป็นเมลานินและส่งผ่านไปยังเซลล์เคราตินไซต์ (keratinocytes) ก่อนเคลื่อนสู่ผิวชั้นบนของหนังกำพร้าทำให้ผิวมีสีที่เข้มขึ้น ดังนั้นหากเอนไซม์ไทโรซิเนสทำงานมากเกินไปจะส่งผลให้เกิดการสร้างเม็ดสีเมลานินมากขึ้น ทำให้สีผิวหมองคล้ำขึ้น หรือเกิดความผิดปกติของสีผิวได้⁽¹⁾ ด้วยเหตุนี้อุตสาหกรรมเครื่องสำอางในปัจจุบันจึงมีการนำสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมาใช้เพื่อช่วยเพิ่มความกระจ่างใสให้แก่ผิว เช่น กรดโคจิก (kojic acid) และอาร์บูติน (arbutin)⁽²⁾

ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน^(1,3) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 60-70 กิโลดาลตัน ภายในโครงสร้างประกอบด้วยคอปเปอร์ (copper) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ให้แก่ไทโรซีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนในร่างกายเพื่อสังเคราะห์เป็นแอล-โดปา และเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยนไปเป็นโดปาคิวโนน⁽¹⁾ ปัจจัยสำคัญเกี่ยวกับการสร้างเม็ดสีเมลานิน คือเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ใช้ทดลองสกัดได้จากเห็ดแชมปิยอง (*Agaricus bisporus*)⁽⁴⁾ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเอนไซม์ในมนุษย์ ทำให้ปัจจุบันตลาดยาอาหารเสริม และเครื่องสำอางให้ความสำคัญกับสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้เป็นอย่างมาก เนื่องจากส่งผลต่อการสร้างเม็ดสีเมลานินที่ลดลง ทั้งนี้กลไกการควบคุมให้ร่างกายมีการสร้างเม็ดสีเมลานินที่ลดลง ได้แก่ 1) การยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ไทโรซิเนส

ซึ่งมีผลต่อการถอดรหัส mRNA 2) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส TRP-1, TRP-2 และ/หรือเพอรอกซิเดส (peroxidase) 3) การเร่งการผลิตเซลล์ผิวหนัง 4) การยับยั้งการขนส่งเมลานินไซม 5) การยับยั้งกระบวนการออกซิเดชัน และ 6) การดักจับอนุมูลอิสระ⁽⁵⁾ ทำให้ตลาดเครื่องสำอางมุ่งเน้นการนำสารที่มีคุณสมบัติเหล่านี้ไปใช้กับผลิตภัณฑ์เพื่อผิวกระจ่างใสหรือผลิตภัณฑ์ลดฝ้ากระทำให้สีผิวสม่ำเสมอ เนื่องจากเห็นผลได้เร็วและมีประสิทธิภาพในลดการสร้างเม็ดสีที่ผิวหนัง

กระบวนการผลิตเม็ดสีเมลานินในผิวหนัง เกิดจากเอนไซม์ไทโรซิเนสกระตุ้นให้ไทโรซีนเปลี่ยนเป็นโดปาและโดปาคิวโนน ตามลำดับ จากนั้นสารโดปาคิวโนนจะเปลี่ยนเป็นโดปาโครม (dopachrome) โดยกระบวนการออกซิเดชัน (autoxidation) ในกระบวนการผลิตยูเมลานิน (eumelanin) โดปาโครมจะเปลี่ยนเป็น 5,6-ไดไฮดรอกซีอินโดล (5,6-dihydroxyindole) หรือ 5,6-ไดไฮดรอกซีอินโดล-2-คาร์บอกซิลิกแอซิด (5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid; DHICA) โดยเอนไซม์โดปาโครมเทาโทเมอเรส (dopachrome tautomerase) หรือ TRP-2 จากนั้น DHICA ที่ได้จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ DHICA oxidase หรือ TRP-1 ได้อินโดล-5,6-ควิโนนคาร์บอกซิลิกแอซิด (indole 5,6-quinone carboxylic acid) ซึ่งทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) ได้เป็นยูเมลานิน ซึ่งมีสีน้ำตาล-ดำ ส่วนการผลิตฟีโอเมลานิน (pheomelanin) กรดอะมิโน (amino acid) กลูตาไธโอน (glutathione) หรือ ซีสเตอีน (cysteine) จะทำปฏิกิริยากับโดปาคิวโนนได้เป็นกลูตาไธโอนโดปา (glutathione-dopa) หรือ ซีสเตอีนโดปา (cysteinyl-dopa) ทำให้เกิดเม็ดสีฟีโอเมลานิน ซึ่งมีสีแดง-เหลือง ดังนั้นการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เพื่อควบคุมการสร้างเม็ดสีเมลานินนิยมใช้วิธีโดปาโครม เนื่องจากเป็นวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี (spectrophotometry)⁽⁶⁾ ที่มีความสะดวกและรวดเร็ว วิธีการนี้ใช้แอล-โดปาเป็นสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไทโรซิเนสเปลี่ยนเป็นโดปาโครม

(ผ่านโดปาคิวโนน) ซึ่งเป็นสารที่มีสีและมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด ที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร หากสารที่ศึกษามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจะส่งผลให้แอล-โดปาไม่ถูกเปลี่ยนเป็นโดปาคิวโรน

ปัจจุบันมีการพบสารประกอบหลายชนิดจากแหล่งธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เช่น กรดทรานส์-ซินนามิก (*trans*-cinnamic acid) เป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่ได้จากน้ำมันของอบเชย พบว่ามีความสามารถในการลดการสร้างเม็ดสีเมลานินและส่งผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลานิน^(4,7) โมโนเทอร์พีนอยด์ (monoterpenoid) เช่น ไทมอล (thymol) เป็นส่วนประกอบหลักของต้นไทม์ และคาร์วาครอล (carvacrol) เป็นส่วนประกอบหลักในน้ำมันออริกานู พบการรายงานว่าที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 500 ไมโครโมลาร์ ไทมอลและคาร์วาครอลสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้เท่ากับ 29.4% และ 35.7% ตามลำดับ⁽⁸⁾ ในปี ค.ศ. 2002 มีการนำสารฮิโนกิไทออลซินนามेट (hinokitiol cinnamate) ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากการรวมกันระหว่างกรดทรานส์-ซินนามิก และฮิโนกิไทออล (hinokitiol) โดยใช้ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) มาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเบื้องต้นที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ พบว่าสารนี้มีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 57.5%⁽⁹⁾ และในปี ค.ศ. 2018 มีการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของไทมิลซินนามेट (thymyl cinnamate) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ พบว่ามีการยับยั้งไทโรซิเนส 40%⁽¹⁰⁾ ซึ่งผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่มาจาก การสังเคราะห์ระหว่างกรดทรานส์-ซินนามิก และโมโนเทอร์พีนอยด์มีความน่าสนใจที่จะศึกษาและพัฒนาต่อ เพื่อค้นหาโครงสร้างโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์อื่นๆ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพิ่มมากขึ้น

สารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์สามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดคาร์บอกซิลิกและโมโนเทอร์พีนอยด์ โดยใช้รีเอเจนต์ (reagent) ผสมระหว่างไตรเฟนิลฟอสฟีน

(triphenylphosphine; PPh₃) และฮาโลจีนิงเอเจนต์ (halogenating agent) เช่น ไตรคลอโรอะเซตามิด (trichloroacetamide; Cl₃CCONH₂)⁽¹¹⁾ หรือ ไตรคลอโรอะซิโทไนไตรล์ (trichloroacetonitrile; Cl₃CCN)⁽¹²⁾ ซึ่งผลิตภัณฑ์เอสเทอร์ที่ได้จะมีผลผลิตที่สูง และปฏิกิริยาเกิดได้ภายใต้ภาวะที่ไม่รุนแรงและเป็นกลาง การเปลี่ยนฮาโลจีนิงเอเจนต์ที่มีองค์ประกอบของคลอรีน (chlorine) เป็นโบรมีน (bromine) จะช่วยทำให้รีเอเจนต์มีประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มมากขึ้น⁽¹³⁾ เนื่องจากโบรมีนเป็นอะตอมที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยามากกว่าคลอรีน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสังเคราะห์โมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดทรานส์-ซินนามิกและโมโนเทอร์พีนอยด์ที่มีโครงสร้างที่หลากหลาย โดยใช้รีเอเจนต์ผสมระหว่างไตรเฟนิลฟอสฟีนและฮาโลจีนิงเอเจนต์ที่มีโบรมีนเป็นองค์ประกอบ นำสารที่สังเคราะห์ได้ไปศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพื่อเป็นองค์ความรู้ใหม่ และเป็นแนวทางการพัฒนาสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ที่สามารถใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางได้ต่อไปในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

สารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทั้งหมด วิเคราะห์และยืนยันโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค ¹H และ ¹³C นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (nuclear magnetic resonance; NMR) ด้วยเครื่อง Bruker 400 MHz AVANCE III HD spectrometer (Bruker, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) ที่ความถี่ 400 MHz สำหรับ ¹H และ 100 MHz สำหรับ ¹³C ค่าการเลื่อนทางเคมี (chemical shifts; δ) ที่ได้จะถูกแสดงในหน่วย ppm ค่าคงตัวการคู่ควบ (coupling constants; J) ที่ได้จะถูกแสดงในหน่วย Hz และใช้ CDCl₃ เป็นตัวทำละลายสารที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมด การตรวจวัดมวลสารชนิดความละเอียดสูง (high-resolution mass spectrometry; HRMS) มาจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Bruker microtof-Q III

(Karlsruhe, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) โดยใช้ ESI positive mode ค่าที่ได้แสดงในรูปมวลต่อประจุ (mass/charge: m/z) ค่าจุดหลอมเหลวถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดจุดหลอมเหลว (melting point apparatus SMP10, Stuart Scientific, สหราชอาณาจักร) ค่าออปติคอลโรเทชัน (optical rotation) ถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่องโพลาริมิเตอร์ (polarimeter) (ATGO™ POLAX-2L, ATAGO, ญี่ปุ่น) โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายและข้อมูลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader, Spark™ 10M, Tecan, สวิตเซอร์แลนด์)

สารเคมี

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นเกรดทางการค้า ได้แก่ เฮกเซน (hexane) และเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) (Zenith science CO., LTD., ประเทศไทย) ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการกลั่นก่อนนำมาใช้งาน ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นเกรดวิเคราะห์ ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) (Merck, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) (Merck, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ ได้แก่ กรดทรานส์-ซินนามิก (*trans*-cinnamic acid) (Fluka, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), ไตรเฟนิลฟอสฟีน (triphenylphosphine) (Merck, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), คาร์บอนเตตระโบรไมด์ (carbontetra-bromide) (Acros, เบลเยียม), ไตรเอทิลามีน (triethylamine) (Acros, เบลเยียม), ไทมอล (thymol) (TCI, ญี่ปุ่น), คาร์วาครอล (carvacrol) (TCI, ญี่ปุ่น), ยูจีนอล (eugenol) (TCI, ญี่ปุ่น), ฮิโนกิติล (hinokitiol) (TCI, ญี่ปุ่น), (-)-เมนทอล ((-)-menthol) (Fluka, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), (-)-คาร์วีโอล ((-)-carveol) (Aldrich, สหรัฐอเมริกา), (S)-(-)-เพอริลลิล แอลกอฮอล์ ((S)-(-)-perillyl alcohol) (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา), (±)-เมอทีนอล (myrtenol)

(Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา), (-)-บอร์นีโอล ((-)-borneol) (TCI, ญี่ปุ่น), เจอรานีโอล (geraneol) (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา), กรดโคจิก (kojic acid) (TCI, ญี่ปุ่น), แอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate anhydrous; anhydrous Na₂SO₄) (Merck, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไตรไฮเดรต (di-potassium hydrogen phosphate trihydrate, K₂HPO₄•3H₂O) (Sigma-Aldrich, แคนาดา), โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate; KH₂PO₄) (Merck, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), แอล-โดปา (L-Dopa) (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา) และเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase, EC 1.14.18.1 from mushroom) (TCI, ญี่ปุ่น)

โครมาโทกราฟี

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ได้แก่ thin layer chromatography (TLC) ใช้ silica gel F254 บนแผ่นอะลูมิเนียม (Merck, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) และ preparative thin layer chromatography (PTLC) ใช้ silica gel 60 PF₂₅₄ บนแผ่นแก้ว ขนาด 20 ซม. × 20 ซม. (Merck, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

การสังเคราะห์สารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์

นำกรดทรานส์-ซินนามิก 0.5 มิลลิโมล และ ไตรเฟนิลฟอสฟีน (PPh₃) 1.0 มิลลิโมล เทใส่ลงในขวดก้นกลม ขนาด 5 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนแบบปราศจากน้ำ (dry dichloromethane; CH₂Cl₂) ลงไป 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมคาร์บอนเตตระโบรไมด์ (CBr₄) 1.0 มิลลิโมล ลงไปในของผสม ทำการกวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศเฉื่อยของอาร์กอน (argon; Ar) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมโมโนเทอร์พีนอยด์ 0.5 มิลลิโมล และไตรเอทิลามีน (Et₃N) 1.0 มิลลิโมล ลงในของผสม กวนปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อเสร็จสิ้นการทำปฏิกิริยา นำของผสมที่ได้มา

สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนต่อน้ำ ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้น นำชั้นไดคลอโรมีเทนมาสกัดด้วยน้ำเกลืออิ่มตัว (brine) อีกหนึ่งครั้ง แล้วกำจัดน้ำที่ปนเปื้อนในไดคลอโรมีเทน ออกโดยการเติมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต ทำการกรอง เพื่อเอาโซเดียมซัลเฟตออก นำสารละลายที่เหลือไป ระเหยไดคลอโรมีเทนออกด้วยวิธีลดความดันแบบระบบ สูญญากาศจนของผสมที่ได้ปราศจากไดคลอโรมีเทน นำ ของผสมนี้วิเคราะห์สารที่มีอยู่ โดยใช้เทคนิค TLC และ แยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค PTLC จะได้ สารโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่ต้องการ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

นำสารโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่สังเคราะห์ ได้มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเบื้องต้นที่ ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ (เนื่องจาก มีข้อจำกัดของปริมาณสารที่มีอยู่) โดยใช้วิธีโดปาโครม (dopachrome method) เปรียบเทียบกับกรดโคจิก ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) โดยผสม สารตัวอย่างโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ (ละลายใน 5% ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ในสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ ที่ pH 6.8) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ ที่ pH 6.8 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงในไมโครเวลเพลท 96 หลุม (96-well plate) จากนั้นเติมเอนไซม์ไทโรซิเนส (100 units/มิลลิลิตร) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น เติมสารละลาย 0.3 มิลลิโมลาร์ แอล-โดปา ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นสารตั้งต้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่าน ไมโครเพลทและทำการทดสอบซ้ำทั้งหมด 5 ครั้ง/สาร ตัวอย่าง ค่าความหาค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ด้วยสูตร

$$I (\%) = \frac{[(\text{Blank} - \text{Blank control}) - (\text{Test} - \text{Test control})]}{(\text{Blank} - \text{Blank control})} \times 100\%$$

I คือ การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

Blank คือ การทดสอบที่ใช้ 5% DMSO ใน สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนสารตัวอย่าง

Blank control คือ การทดสอบที่ใช้สารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนเอนไซม์ไทโรซิเนส และใช้ 5% DMSO ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนสารตัวอย่าง Test คือ การทดสอบตามปกติ

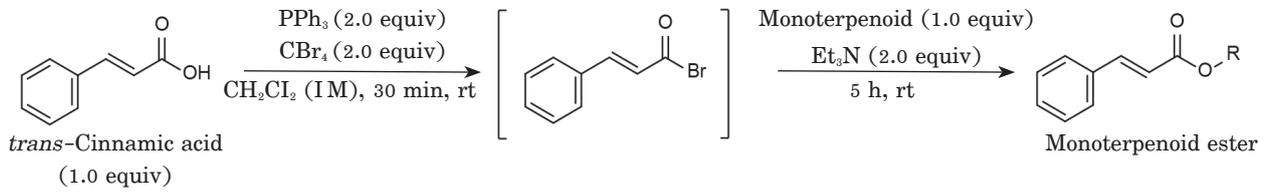
Test control คือ การทดสอบที่ใช้สารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนเอนไซม์ไทโรซิเนส

นำโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่มีค่าการยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่า 70% (ที่ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์) ทดสอบหาค่าการยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนส (IC_{50}) โดยทำการศึกษาที่ 9 ความ เข้มข้น/สาร และใช้โปรแกรม GraphPad Prism 6 ใน การคำนวณ⁽¹⁴⁾ หากโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ชนิดใด มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสน้อยกว่า 50% (ที่ความ เข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์) จะระบุว่าค่า IC_{50} มากกว่า 100 ไมโครโมลาร์

ผล

การสังเคราะห์โมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์

จากการสังเคราะห์โมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ โดยเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างโมโนเทอร์พีนอยด์และ กรดทรานส์-ซินนามิก โดยใช้ไตรเฟนิลฟอสฟีน (PPH_3) และคาร์บอนเตตระโบรไมด์ (CBr_4) เป็นรีเอเจนต์ ดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่าผลผลิตของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง 5-64% ซึ่ง (-)-คาร์วิลซินนามेट (6) มีผลผลิตต่ำสุด และคาร์วาคริลซินนามेट (2) มีผลผลิตสูงสุด ดังแสดงใน ตารางที่ 1 โดยกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่มีผลผลิต ในช่วงสูง ได้แก่ คาร์วาคริลซินนามेट (2), ฮิโนกิไท- ออลซินนามेट (4), ไทมิลซินนามेट (1), (-)-เมนทิลซิน- นามेट (5), ยูจีนิลซินนามेट (3) และ (-)-บอร์นิล ซินนามेट (9) โดยมีค่าผลผลิตเท่ากับ 64%, 61%, 57%, 54%, 51% และ 50% ตามลำดับ กลุ่มอนุพันธ์ โมโนเทอร์พีนอยด์ที่มีผลผลิตในช่วงปานกลาง ได้แก่ (±)-เมอทีนิลซินนามेट (8) และเจอร์วานิลซินนามेट (10) โดยมีค่าผลผลิตเท่ากับ 26% และ 25% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มอนุพันธ์โมโนเทอร์พีนอยด์ที่มีผลผลิตในช่วงต่ำ ได้แก่ (S)-(-)-เพอร์ลิลซินนามेट (7) และ (-)-คาร์- วิลซินนามेट (6) โดยมีค่าผลผลิต เท่ากับ 15% และ 5% ตามลำดับ



ภาพที่ 1 การสังเคราะห์โมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ โดยใช้กรดทรานส์-ซินนามิกและโมโนเทอร์พีนอยด์เป็นสารตั้งต้น

ตารางที่ 1 ผลการสังเคราะห์โมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์

โมโนเทอร์พีนอยด์		โมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์		ผลผลิต (%)
ชื่อสาร	โครงสร้างทางเคมี	ชื่อสาร	โครงสร้างทางเคมี	
โทมอล		โทมิลซินนามเมต (1)		57
คาร์วาครอล		คาร์วาคริลซินนามเมต (2)		64
ยูจีนอล		ยูจีนิลซินนามเมต (3)		51
อีโนกิไทออล		อีโนกิไทออลซินนามเมต (4)		61
(-)-เมนทอล		(-)-เมนทิลซินนามเมต (5)		54
(-)-คาร์วีวอล		(-)-คาร์วีลซินนามเมต (6)		5
(S)-(-)-เพอร์ลิลแอลกอฮอล์		(S)-(-)-เพอร์ลิลซินนามเมต (7)		15
(±)-เมอทีนอล		(±)-เมอทีนิลซินนามเมต (8)		26
(-)-บอร์นียอล		(-)-บอร์นียิลซินนามเมต (9)		50
เจอร์ยานียอล		เจอร์ยานิลซินนามเมต (10)		25

ผลการวิเคราะห์โครงสร้างสารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทั้งหมด วิเคราะห์และยืนยันโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค ^1H และ ^{13}C นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ค่าจุดหลอมเหลว ค่าออกบิตคอลลโรเทชัน และค่าการตรวจวัดมวลสารชนิดความละเอียดสูงได้ผลการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

ไทมิลซินนามेट (thymyl cinnamate) (1): ผลึกสีขาว; mp 71–72 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.93 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 7.69–7.60 (m, 2H, Ar-H), 7.51–7.43 (m, 2H, Ar-H), 7.29 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H, Ar-H), 7.09 (dd, $J = 7.9, 1.8$ Hz, 1H, Ar-H), 6.96–6.91 (m, 1H, Ar-H), 6.71 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 3.08 (q, $J = 6.9$ Hz, 1H, CH), 2.38 (s, 3H, CH_3), 1.26 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H, $\text{CH}_3 \times 2$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 165.7 (C=O), 148.0 (C=C), 146.5 (Ar-C), 137.2 (Ar-C), 136.6 (Ar-C), 134.2 (Ar-C), 130.7 (Ar-C), 129.0 (Ar-C $\times 2$), 128.3 (Ar-C $\times 2$), 127.2 (Ar-C), 126.5 (Ar-C), 122.8 (Ar-C), 117.3 (C=C), 27.2 (CH), 23.1 ($\text{CH}_3 \times 2$), 20.9 (CH_3). HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NaO}_2$ 303.1361 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), found 303.1356.⁽¹³⁾

คาร์วาคริลซินนามेट (carvacryl cinnamate) (2): ผลึกสีขาว; mp 60–62 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.92 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 7.69–7.58 (m, 2H, Ar-H), 7.50–7.39 (m, 2H, Ar-H), 7.20 (dd, $J = 7.8, 0.8$ Hz, 1H, Ar-H), 7.07 (dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz, 1H, Ar-H), 6.98 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, Ar-H), 6.70 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 2.92 (sept, $J = 6.9$ Hz, 1H, CH), 2.21 (s, 3H, CH_3), 1.28 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H, $\text{CH}_3 \times 2$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 165.3 (C=O), 149.4 (Ar-C), 148.1 (C=C), 146.5 (Ar-C), 134.3 (Ar-C), 131.0 (Ar-C), 130.7 (Ar-C), 129.1 (Ar-C $\times 2$), 128.4 (Ar-C $\times 2$), 127.4 (Ar-C), 124.2 (Ar-C), 119.9 (Ar-C), 117.3 (C=C), 33.7 (CH), 24.0 ($\text{CH}_3 \times 2$), 15.9 (CH_3). HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{NaO}_2$ 303.1361 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), found 303.1359.

ยูจีนิลซินนามेट (eugenyl cinnamate) (3): ผลึกสีเหลืองอ่อน; mp 86–87 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.89 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 7.66–7.55 (m, 2H, Ar-H), 7.48–7.38 (m, 3H, Ar-H), 7.05 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, Ar-H), 6.87–6.78 (m, 2H, Ar-H), 6.69 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 6.00 (ddt, $J = 16.8, 10.0, 6.7$ Hz, 1H, CH=CH $_2$), 5.19–5.06 (m, 2H, CH=CH $_2$), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 3.41 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 165.2 (C=O), 151.1 (Ar-C), 146.5 (C=C), 139.0 (Ar-C), 138.1 (C=C), 137.1 (Ar-C), 134.3 (Ar-C), 130.6 (Ar-C), 129.0 (Ar-C $\times 2$), 128.3 (Ar-C $\times 2$), 122.7 (Ar-C), 120.8 (Ar-C), 117.1 (C=C), 116.2 (C=C), 112.8 (Ar-C), 55.9 (OCH_3), 40.2 (CH_2). HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{NaO}_3$ 317.1154 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), found 317.1142.⁽¹⁵⁾

ฮิโนกิตอลซินนามेट (hinokitiol cinnamate) (4): ผลึกสีน้ำตาล; mp 70–72 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.87 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 7.56 (dd, $J = 6.7, 2.9$ Hz, 2H, Ar-H), 7.40 (p, $J = 3.7$ Hz, 3H, Ar-H), 7.21 (s, 1H, Ar-H), 7.17 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H, Ar-H), 7.07 (t, $J = 10.4$ Hz, 1H, Ar-H), 6.96 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, Ar-H), 6.66 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 2.80 (sept, $J = 6.9$ Hz, 1H, CH), 1.24 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, $\text{CH}_3 \times 2$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 164.1 (C=O), 160.2 (C=O), 147.3 (C=C), 145.9 (Ar-C), 137.4 (Ar-C), 134.4 (Ar-C), 134.2 (Ar-C), 130.8 (Ar-C), 130.8 (Ar-C), 129.0 (Ar-C $\times 2$), 128.9 (Ar-C), 128.4 (Ar-C $\times 2$), 128.2 (Ar-C), 116.6 (C=C), 38.4 (CH), 22.9 ($\text{CH}_3 \times 2$). HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{NaO}_3$ 317.1154 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), found 317.1167.⁽⁹⁾

(-)-เมนทิลซินนามेट ((-)-menthyl cinnamate) (5): ของเหลวหนืดใสไม่มีสี; $[\alpha]_{\text{D}}^{32.0} = -124.91^\circ$ (c = 0.0002, MeOH) ($[\alpha]_{\text{D}}^{200} = -59.29^\circ$; (c = 1.06,

CHCl₃)⁽¹⁶⁾, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.67 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, Ar-CH=CH), 7.58–7.48 (m, 2H, Ar-H), 7.43–7.32 (m, 3H, Ar-H), 6.44 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, Ar-CH=CH), 4.83 (m, 1H, OCH), 2.12–2.02 (m, 1H, CH), 2.01–1.85 (m, 1H, CH), 1.77–1.66 (m, 2H, CH₂), 1.61–1.40 (m, 2H, CH₂), 1.08 (m, 2H, CH₂), 0.98–0.83 (m, 6H, CH₃ × 2), 0.80 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 166.6 (C=O), 144.4 (C=C), 134.6 (Ar-C), 130.2 (Ar-C), 128.9 (Ar-C × 2), 128.0 (Ar-C × 2), 118.8 (C=C), 74.3 (CH), 47.2 (CH), 41.1 (CH₂), 34.3 (CH₂), 31.4 (CH), 26.4 (CH), 23.6 (CH₂), 22.1 (CH₃), 20.8 (CH₃), 16.5 (CH₃). HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₂₆NaO₂ 309.1830 ([M+Na]⁺), found 309.1860.⁽¹⁷⁾

(-)-คาร์วิลซินนามาต ((-)-carvyl cinnamate) (6): ของเหลวหนืดใสไม่มีสี; [α]_D^{26.7} = -159.89° (*c* = 0.0002, MeOH), ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.71 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, Ar-CH=CH), 7.57–7.50 (m, 2H, Ar-H), 7.38 (m, 3H, Ar-H), 6.47 (dd, *J* = 16.0, 4.5 Hz, 1H, Ar-CH=CH), 5.68–5.55 (m, 2H, C=CH, OCH), 4.74 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H, C=CH₂), 2.38–2.22 (m, 1H, CH), 2.19–2.08 (m, 1H, CH), 2.08–1.94 (m, 1H, CH), 1.77–1.58 (m, 6H, CH₃ × 2), 1.62–1.50 (m, 1H, CH). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 166.9 (C=O), 148.3 (C=C), 144.8 (C=C), 134.0 (Ar-C), 133.1 (C=C), 130.3 (Ar-C), 128.9 (Ar-C × 2), 128.1 (Ar-C × 2), 126.0 (C=C), 118.4 (C=C), 109.4 (C=C), 73.3 (OCH), 40.3 (CH), 34.1 (CH₂), 30.8 (CH₂), 20.5 (CH₃), 18.9 (CH₃). HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₂₂NaO₂ 305.1517 ([M+Na]⁺), found 305.1509.

(S)-(-)-เพอริลลิลซินนามาต ((S)-(-)-perillylcinnamate)(7): ของเหลวหนืดใสไม่มีสี; [α]_D^{25.4} = -89.94° (*c* = 0.0002, MeOH), ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.70 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, Ar-CH=CH), 7.59–7.48 (m, 2H, Ar-H), 7.48–7.29 (m, 3H, Ar-H), 6.47 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, Ar-CH=CH), 5.82 (dp, *J* = 4.4, 1.6 Hz, 1H, C=CH),

4.73 (dt, *J* = 4.1, 1.3 Hz, 2H, C=CH₂), 2.24–2.16 (m, 4H, CH₂ × 2), 2.00 (m, 1H, CH), 1.87 (m, 1H, CH), 1.75 (s, 3H, CH₃), 1.60–1.45 (m, 1H, CH). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 166.9 (C=O), 149.6 (C=C), 144.8 (C=C), 134.5 (Ar-C), 132.7 (C=C), 130.3 (Ar-C), 128.9 (Ar-C × 2), 128.1 (Ar-C × 2), 125.9 (C=C), 118.1 (C=C), 108.8 (C=C), 68.5 (OCH₂), 40.9 (CH), 30.5 (CH₂), 27.4 (CH₂), 26.5 (CH₂), 20.8 (CH₃). HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₂₂NaO₂ 305.1517 ([M+Na]⁺), found 305.1513.⁽¹⁸⁾

(±)-เมอทีนิลซินนามาต ((±)-myrtenyl cinnamate)(8): ของเหลวหนืดใสไม่มีสี; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.69 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, Ar-CH=CH), 7.57–7.48 (m, 2H, Ar-H), 7.44–7.34 (m, 3H, Ar-H), 6.45 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, Ar-C=CH), 5.62 (m, 1H, C=CH), 4.66–4.51 (m, 2H, OCH₂), 2.47–2.21 (m, 3H, CH, CH₂), 2.26–2.07 (m, 2H, CH₂), 1.30 (s, 3H, CH₃), 1.22 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH), 0.86 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 166.9 (C=O), 144.7 (C=C), 143.1 (C=C), 134.5 (Ar-C), 130.3 (Ar-C), 128.9 (Ar-C × 2), 128.1 (Ar-C × 2), 121.5 (C=C), 118.2 (C=C), 67.1 (OCH₂), 43.6 (CH), 40.8 (CH), 38.1 (C), 31.5 (CH₂), 31.3 (CH₂), 26.2 (CH₃), 21.1 (CH₃). HRMS (ESI) calcd for C₁₉H₂₂NaO₂ 305.1517 ([M+Na]⁺), found 305.1504.⁽¹⁹⁾

(-)-บอร์นิลซินนามาต ((-)-bornyl cinnamate)(9): ของเหลวหนืดใสไม่มีสี; [α]_D^{24.3} = -154.89° (*c* = 0.0002, MeOH), ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.67 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, Ar-CH=CH), 7.59–7.50 (m, 2H, Ar-H), 7.38 (m, 3H, Ar-H), 6.48 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, Ar-CH=CH), 5.02 (ddd, *J* = 10.0, 3.5, 2.1 Hz, 1H, OCH), 2.42 (dddd, *J* = 13.6, 9.9, 4.7, 3.3 Hz, 1H, CH), 2.05 (ddd, *J* = 12.1, 9.1, 4.4 Hz, 1H, CH), 1.78 (tt, *J* = 12.1, 4.3 Hz, 1H, CH), 1.71 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H, CH), 1.42–1.23 (m, 2H, CH₂), 1.07 (dd, *J* = 13.8, 3.5 Hz, 1H, CH), 0.95 (s, 3H, CH₃),

0.89 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, $\text{CH}_3 \times 2$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 167.4 (C=O), 144.2 (C=C), 134.6 (Ar-C), 130.2 (Ar-C), 128.9 (Ar-C $\times 2$), 128.1 (Ar-C $\times 2$), 118.8 (C=C), 80.0 (OCH), 49.0 (C), 47.9 (C), 45.0 (CH), 36.9 (CH_2), 28.1 (CH_2), 27.3 (CH_2), 19.8 (CH_3), 18.9 (CH_3), 13.6 (CH_3). HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NaO}_2$ 307.1674 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), found 307.1661.⁽²⁰⁾

เจอร์รานิลซินนามेट (geranyl cinnamate) (10): ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.70 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 7.57–7.47 (m, 2H, Ar-H), 7.38 (m, 3H, Ar-H), 6.46 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 5.43 (td, $J = 7.1, 1.3$ Hz, 1H, C=CH), 5.10 (tt, $J = 6.8, 1.4$ Hz, 1H, C=CH), 4.74 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, OCH_2), 2.19–2.01 (m, 4H, $\text{CH}_2 \times 2$), 1.75 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.69 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.61 (d, $J = 1.3$ Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 167.0 (C=O), 144.7 (C=C), 142.4 (C=C), 134.5 (Ar-C), 131.9 (C=C), 130.2 (Ar-C), 128.9 (Ar-C $\times 2$), 128.1 (Ar-C $\times 2$), 123.8 (C=C), 118.4 (C=C), 118.3 (C=C), 61.5 (OCH_2), 39.6 (CH_2), 26.3 (CH_2), 25.7 (CH_3), 17.7 (CH_3), 16.5 (CH_3). HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NaO}_2$ 307.1674 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), found 307.1661.⁽²¹⁾

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเบื้องต้นที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ของสารโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ จำนวน 10 สาร พบว่าค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ในช่วง 29.60–97.34% โดยสารโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่า 70% มีดังนี้ (-)-คาร์วิลซินนามेट (6), ไทมิลซินนามेट (1), (S)-(-)-เพอร์ลิลซินนามेट (7), คาร์วาคริลซินนามेट (2), (-)-บอร์นิลซินนามेट (9), (\pm)-เมอทีนิลซินนามेट (8), ยูจีนิลซินนามेट (3) และอีโนกิไทออลซินนามेट (4) โดยมีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 70.51%, 74.50%, 75.93%, 81.92%, 85.42%, 88.16%, 90.05% และ 97.34% ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 2

เมื่อนำสารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงมากกว่า 70% ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ จำนวน 8 สารหาค่า IC_{50} ดังแสดงในตารางที่ 2 ผลการทดสอบพบว่าอีโนกิไทออลซินนามेट (4) เป็นสารที่มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด (1.58 ± 0.09 ไมโครโมลาร์) และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีกว่ากลุ่มควบคุมเชิงบวกกรดโคจิก (14.06 ± 0.91 ไมโครโมลาร์) ในขณะที่สารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์อีก จำนวน 7 สารมีค่า IC_{50} สูงกว่ากรดโคจิก

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์

โมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์	การยับยั้ง \pm SD (%) ¹	$\text{IC}_{50} \pm$ SD (μM)
ไทมิลซินนามेट (1)	74.50 \pm 5.68	56.50 \pm 8.95
คาร์วาคริลซินนามेट (2)	81.92 \pm 8.52	44.88 \pm 6.05
ยูจีนิลซินนามेट (3)	90.05 \pm 4.51	28.02 \pm 9.53
อีโนกิไทออลซินนามेट (4)	97.34 \pm 0.14	1.58 \pm 0.09
(-)-เมนทิลซินนามेट (5)	45.15 \pm 2.44	> 100
(-)-คาร์วิลซินนามेट (6)	70.51 \pm 0.33	40.76 \pm 4.12
(S)-(-)-เพอร์ลิลซินนามेट (7)	75.93 \pm 1.99	44.82 \pm 18.3
(\pm)-เมอทีนิลซินนามेट (8)	88.16 \pm 5.66	37.15 \pm 7.37
(-)-บอร์นิลซินนามेट (9)	85.42 \pm 5.45	25.22 \pm 5.68
เจอร์รานิลซินนามेट (10)	29.60 \pm 1.20	> 100
กรดโคจิก	85.74 \pm 0.40	14.06 \pm 0.91

หมายเหตุ: ¹ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์

วิจารณ์

จากผลการสังเคราะห์สารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ผ่านปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างโมโนเทอร์พีนอยด์และกรดทรานส์-ซินนามิก พบว่าเมื่อชนิดของโมโนเทอร์พีนอยด์เป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compounds) ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการจะมีค่าผลผลิตสูงไปจนถึงปานกลาง เช่น ยูจีนิลซินนามเมต (3), ไทมิลซินนามเมต (1), ฮิโนกิไทออลซินนามเมต (4) และ คาร์วาคริลซินนามเมต (2) โดยมีค่าผลผลิตเท่ากับ 51%, 57%, 61% และ 64% ตามลำดับ ซึ่งโมโนเทอร์พีนอยด์เป็นสารประกอบอะโรมาติกจะเป็นกลุ่มสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) จึงมีความเป็นนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) ที่ไม่ดี มีผลมาจากความสามารถในการเกิดเรโซแนนซ์ (resonance) ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลและวงอะโรมาติกได้⁽¹³⁾ ในขณะที่ชนิดของโมโนเทอร์พีนอยด์เป็นสารประกอบอะลิฟาติก (aliphatic compounds) มีค่าผลผลิตปานกลางถึงค่อนข้างต่ำ เช่น (±)-เมอทีนิลซินนามเมต (8), เจอรานิลซินนามเมต (10), (S)-(-)-เพอร์ลิลซินนามเมต (7) และ (-)-คาร์วิลซินนามเมต (6) โดยมีค่าผลผลิตเท่ากับ 26%, 25%, 15% และ 5% ตามลำดับ อาจเป็นไปได้ว่าโมโนเทอร์พีนอยด์เหล่านี้มีความเสถียรต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่เป็นอะโรมาติกจึงสามารถสลายตัวได้ง่าย รวมถึงมีความว่องไวต่อรีเอเจนต์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาจนเกิดปฏิกิริยาข้างเคียง (side reactions) และเกิดสารชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการ เช่น เกิดปฏิกิริยาโบรมิเนชัน (bromination) หรือปฏิกิริยาการขจัด (elimination) โดยเปลี่ยนโมโนเทอร์พีนอยด์เป็นแอลคิล โบรมไนด์ (alkyl bromides) หรือแอลคีน (alkenes) ตามลำดับ⁽¹¹⁾ ส่งผลให้ผลผลิตมีค่าต่ำ อย่างไรก็ตามมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์สารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์เพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้นต่อไปในอนาคต

ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ ด้วยวิธีโดปาโครมเปรียบเทียบกับกรดโคจิกซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวกพบว่าฮิโนกิไทออลซินนามเมต (4) มีประสิทธิภาพ

ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ชนิดอื่น ๆ เมื่อพิจารณาโครงสร้างของฮิโนกิไทออลซินนามเมต (4) พบว่ามีส่วนที่คล้ายกับส่วนแอลฟา-ไฮดรอกซีคาร์บอนิล (α -hydroxy carbonyl) ของกรดโคจิก ในขณะที่โมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์อื่น ๆ ไม่มีส่วนนี้ อาจเป็นส่วนสำคัญในการช่วยออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ถึงแม้ว่าจะมีผลงานวิจัยก่อนหน้านี้กล่าวถึงสารชนิดนี้⁽⁹⁾ แต่งานวิจัยดังกล่าวเป็นการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเบื้องต้นที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์เท่านั้น ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยครั้งนี้ที่มีการศึกษาเปรียบเทียบกับโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่มีความหลากหลาย รวมถึงการรายงานค่า IC_{50} ของฮิโนกิไทออลซินนามเมต (4) ที่ชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารชนิดนี้ดีกว่ากรดโคจิกประมาณ 9 เท่า

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ พบว่าการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีจากกรดทรานส์-ซินนามิกเป็นเอสเทอร์ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Sheng Z. และคณะ⁽¹⁰⁾ ที่ได้รายงานการสังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดทรานส์-ซินนามิก เพื่อทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าผลิตภัณฑ์เอสเทอร์เป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งดีกว่ากรดทรานส์-ซินนามิก เช่น กรดทรานส์-ซินนามิก มีค่า IC_{50} เท่ากับ 209.5 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่โทมอล มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5,925.0 ไมโครโมลาร์ แต่เมื่อทำการสังเคราะห์เป็นไทมิลซินนามเมต พบว่ามีค่า IC_{50} ที่ต่ำลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการปรับเปลี่ยนโครงสร้างในงานวิจัยนี้มีแนวโน้มช่วยให้การออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสดีขึ้น ซึ่งอาจมีเหตุผลจากการที่อะตอมออกซิเจน จากส่วนของโมโนเทอร์พีนอยด์สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) กับบริเวณเร่งของเอนไซม์ ส่งผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสลดลง หรือสามารถจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ไทโรซิเนส ส่งผลให้โครงสร้างเกิดความไม่เป็นระเบียบ จึงทำให้เอนไซม์ไทโรซิเนสมี

ความสามารถในการทำงานลดลง⁽²²⁾ นอกจากนี้ ผลการศึกษาของ Takahashi T. และคณะ⁽²³⁾ ช่วยสนับสนุนผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เพิ่มขึ้นของสารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่มาจากกรดทรานส์-ซินนามิก เนื่องจากผลการทดลองชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของตำแหน่งพันธะคู่ C=C ที่ต่อกับหมู่คาร์บอนิลของสารอนุพันธ์ของกรดทรานส์-ซินนามิก โดยสารที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่งนี้จะออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีกว่าสารที่ไม่มีพันธะคู่

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์กับสารกลุ่มอื่นๆ ที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ เช่น ผลการวิจัยของ Uchida R. และคณะ⁽²⁴⁾ พบว่า 2-ไฮดรอกซีไทโรซอล (2-hydroxytyrosol; 2-HT) ที่แยกได้จากเชื้อราสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 13.0 ไมโครโมลาร์ และผลการวิจัยของ Song S. และคณะ⁽²⁵⁾ รายงานว่าสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นไอโซสเตอร์ (isostere) ในสารเรสเวราทรอล (resveratrol) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 16.52 ไมโครโมลาร์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารกลุ่มโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ โดยเฉพาะฮิโนกิโทอลซินนามेट (4) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีกว่า

สรุป

จากการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของโมโนเทอร์พีนอยด์เอสเทอร์จำนวน 10 สาร โดยมีกรดโคจิกเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก พบว่าฮิโนกิโทอลซินนามेट (4) มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.58±0.09 ไมโครโมลาร์ ทั้งนี้ความคงตัวของสารนี้ต่อการนำไปใช้งานเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องทำการศึกษาต่อไป เพื่อสนับสนุนให้เห็นว่าสารนี้เป็นสารทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจในการพัฒนาต่อยอด สำหรับใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางหรือผลิตภัณฑ์บำรุงผิวเพื่อช่วยเพิ่มความกระจ่างใสให้แก่ผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม; ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนสำหรับการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Bae-Harboe YS, Park HY. Tyrosinase: a central regulatory protein for cutaneous pigmentation. *J Invest Dermatol* 2012; 132(12): 2678-80.
2. Wang W, Gao Y, Wang W, Zhang J, Yin J, Le T, et al. Kojic acid showed consistent inhibitory activity on tyrosinase from mushroom and in cultured B16F10 cells compared with arbutins. *Antioxidants* 2022; 11(3): 502. (14 pages).
3. Zolghadri S, Bahrami A, Hassan Khan MT, Munoz-Munoz J, Garcia-Molina F, Garcia-Canovas F, et al. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2019; 34(1): 279-309.
4. Shi Y, Chen QX, Wang Q, Song KK, Qiu L. Inhibitory effects of cinnamic acid and its derivatives on the diphenolase activity of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *Food Chem* 2005; 92(4): 707-12.
5. Sarkar R, Chugh S, Garg VK. Newer and upcoming therapies for melasma. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2012; 78(4): 417-28.
6. Manosroi A, Manosroi J. Free radical scavenging and tyrosinase inhibition activity of aromatic volatile oil from Thai medicinal plants for cosmetic uses. *Acta Hort* 2005; 680: 97-100.
7. Cui Y, Hu YH, Yu F, Zheng J, Chen LS, Chen QX, et al. Inhibition kinetics and molecular simulation of p-substituted cinnamic acid derivatives on tyrosinase. *Int J Biol Macromol* 2017; 95: 1289-97.

8. Brotzman N, Xu Y, Graybill A, Cocolas A, Ressler A, Seeram NP, et al. Synthesis and tyrosinase inhibitory activities of 4-oxobutanoate derivatives of carvacrol and thymol. *Bioorg Med Chem Lett* 2019; 29(1):56-8.
9. Furuya T, Matsuura Y, Takahara S. New hinokitiol derivative and skin care preparation containing the same. Application No. JP2002371039A. Osaka, Japan: Patent Application Publication; 2002.
10. Sheng Z, Ge S, Xu X, Zhang Y, Wu P, Zhang K, et al. Design, synthesis and evaluation of cinnamic acid ester derivatives as mushroom tyrosinase inhibitors. *Med Chem Commun* 2018; 9(5): 853-61.
11. Pluempanupat W, Chavasiri W. An efficient method for chlorination of alcohols using $\text{PPh}_3/\text{Cl}_3\text{CCONH}_2$. *Tetrahedron Lett* 2006; 47(38): 6821-3.
12. Chaysripongkul S, Pluempanupat W, Jang DO, Chavasiri W. Application of $\text{Cl}_3\text{CCONH}_2/\text{PPh}_3$ towards the synthesis of bioactive amides. *Bull Korean Chem Soc* 2009; 30(9): 2066-70.
13. Tharamak S, Yooboon T, Pengsook A, Ratwatthananon A, Kumrungsee N, Bullangpoti V, et al. Synthesis of thymyl esters and their insecticidal activity against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag Sci* 2020; 76(3): 928-35.
14. Mutschlechner B, Rainer B, Schwaiger S, Stuppner H. Tyrosinase inhibitors from the aerial parts of *Wulfenia carinthiaca* Jacq. *Chem Biodivers* 2018; 15(4): e1800014. (8 pages).
15. Alni A, Fauzia SE, Mujahidin D. Synthesis of eugenyl cinnamate from clove oil (*Syzygium aromaticum*) via bromination-dehydrobromination methods. *Pure App Chem Res* 2019; 8(2): 140-6.
16. Huang C, Li J, Wang J, Zheng Q, Li Z, Tu T. Hydrogen-bond-assisted transition-metal-free catalytic transformation of amides to esters. *Sci China Chem* 2021; 64(1): 66-71.
17. Kumar A, Singh SP, Chhokar SS. Antimicrobial activity of the major isolates of mentha oil and derivatives of menthol. *Anal Chem Lett* 2011; 1(1): 70-85.
18. Gonçalves RO, Farias IF, Silva MF, Pessoa CÓ, Zocolo GJ, Zampieri D, et al. Preparation, spectral characterization and anticancer potential of cinnamic esters. *J Braz Chem Soc* 2021; 32: 1931-42.
19. Chen W, Jie W, Jin-Hua G, Lian-Bao Y. Alpha-pinene derivative and preparation method and application thereof. Application No. CN105481857A. Guangdong, China: Guangdong Pharmaceutical University; 2016.
20. Wu D, Nair MG, DeWitt DL. Novel compounds from *Piper methysticum* Forst (Kava Kava) roots and their effect on cyclooxygenase enzyme. *J Agric Food Chem* 2002; 50(4): 701-5.
21. Zanetti M, Carniel TK, Valério A, Oliveira JV, Oliveira DD, Araújo PH, et al. Synthesis of geranyl cinnamate by lipase-catalyzed reaction and its evaluation as an antimicrobial agent. *J Chem Technol Biotechnol* 2017; 92(1): 115-21.
22. Alam N, Yoon KN, Cha YJ, Kim JH, Lee KR, Lee TS. Appraisal of the antioxidant, phenolic compounds concentration, xanthine oxidase and tyrosinase inhibitory activities of *Pleurotus salmoneostramineus*. *Afr J Agric Res* 2011; 6(6): 1555-63.
23. Takahashi T, Miyazawa M. Tyrosinase inhibitory activities of cinnamic acid analogues. *Pharmazie* 2010; 65(12): 913-8.
24. Uchida R, Ishikawa S, Tomoda H. Inhibition of tyrosinase activity and melanine pigmentation by 2-hydroxytyrosol. *Acta Pharm Sin B* 2014; 4(2): 141-5.
25. Song S, Lee H, Jin Y, Ha YM, Bae S, Chung HY, et al. Syntheses of hydroxy substituted 2-phenyl-naphthalenes as inhibitors of tyrosinase. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17(2): 461-4.



Synthesis and Tyrosinase Inhibitory Activity of Monoterpenoid Esters

Sasithorn Buppatano and Wanchai Pluempanupat

Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

ABSTRACT Monoterpenoids are recognized as potent tyrosinase inhibitors to reduce the production of melanin. The structural modification of monoterpenoids into monoterpenoid esters is a potential approach for developing novel tyrosinase inhibitors that enhance the activity more effectively. This study aimed at assessing the potential tyrosinase inhibitory activity of monoterpenoid esters compared to kojic acid as a positive control using the dopachrome method. Ten monoterpenoid esters were synthesized by esterification of *trans*-cinnamic acid with monoterpenoids using triphenylphosphine and carbontetra-bromide as reagents. The desired products were obtained in 5–64% yields. All synthesized monoterpenoid esters were further examined for their tyrosinase inhibitory activity. The results found that hinokitiol cinnamate was the most potent inhibitor of tyrosinase, with an IC_{50} value of $1.58 \pm 0.09 \mu\text{M}$. These results indicated that hinokitiol cinnamate could represent tyrosinase inhibitor 9-fold more efficiently than kojic acid. Notably, this compound has the potential for the development of a new skin whitening agent for use in cosmetic ingredients.

Keywords: Tyrosinase inhibitory activity, Monoterpenoid esters, *trans*-Cinnamic acid, Monoterpenoids, Esterification

การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้วิธีวิเคราะห์ สารปนเปื้อนตัวแทนกลุ่มสารอินทรีย์ในการประเมิน ประสิทธิภาพการผลิตพลาสติกแปรใช้ใหม่ ชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลต (rPET) โดยเทคนิค GC-MS

ชลาธาร แสงเรืองฤทธิ์ ศศิธร ไข่มุกแก้ว ภัสสริน สายสุวรรณ พิมพ์ตา ชาวบน ศศิธร หอมดำรงวงศ์ และ
อุมา บริบูรณ์

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ พลาสติกแปรใช้ใหม่ชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลต (recycled polyethylene terephthalate; rPET) ที่จะนำมาใช้บรรจุอาหารต้องผ่านกระบวนการกำจัดสิ่งปนเปื้อนอย่างมีประสิทธิภาพ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 435) พ.ศ. 2565 โดยการทดสอบด้วยสารปนเปื้อนตัวแทน (surrogate contaminant testing) และแสดงการกำจัดสารปนเปื้อนแต่ละขั้นตอนในกระบวนการรีไซเคิล การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทนกลุ่มสารอินทรีย์ใน PET ตามข้อกำหนดในการกำจัดสิ่งปนเปื้อนจากภาชนะพลาสติกที่ใช้แล้ว โดยนำเกล็ดพลาสติกมาแช่ในสารตัวแทนกลุ่มสารอินทรีย์ 4 กลุ่ม ได้แก่ สารระเหยง่ายแบบมีขี้ผึ้ง (chlorobenzene) สารระเหยง่ายแบบไม่มีขี้ผึ้ง (toluene) สารไม่ระเหยแบบมีขี้ผึ้ง (benzophenone และ methyl salicylate) และสารไม่ระเหยแบบไม่มีขี้ผึ้ง (lindane) สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่าวิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจง กราฟมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรง โดยมีค่า $R^2 > 0.995$ สารกลุ่มที่ 1-3 และกลุ่มที่ 4 มีค่า LOD เท่ากับ 0.010 และ 0.020 mg/kg ตามลำดับ ค่า LOQ เท่ากับ 0.020 และ 0.040 mg/kg ตามลำดับ ความแม่นยำและความเที่ยงวิเคราะห์ความเข้มข้น 3 ระดับ พบว่า %recovery, %RSD_r และ HORRAT อยู่ในช่วง 86-102, 5.3-7.9 และ 0.3-0.4 ตามลำดับ ผลการตรวจวิเคราะห์พลาสติก PET ที่ปนเปื้อนสารตัวแทนกลุ่มสารอินทรีย์ทั้ง 4 โดยจำลองการปนเปื้อนก่อนและหลังทำความสะอาดด้วยสถานะต่างๆ พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทนกลุ่มสารอินทรีย์ทั้ง 4 กลุ่ม สามารถนำไปใช้เพื่อประเมินประสิทธิภาพการกำจัดสารปนเปื้อนในการผลิตพลาสติก rPET ได้สอดคล้องตามกฎหมาย

คำสำคัญ: สารปนเปื้อนตัวแทนกลุ่มสารอินทรีย์, พลาสติก PET แปรใช้ใหม่, การพัฒนาวิธี, การทดสอบความใช้ได้ของวิธี, GC-MS

Corresponding author E-mail: chalathan.s@dmsc.mail.go.th

Received: 23 May 2023

Revised: 15 November 2023

Accepted: 27 November 2023

บทนำ

พลาสติกนำมาใช้อย่างแพร่หลายทั้งเป็นอุปกรณ์ของใช้ต่างๆ และบรรจุภัณฑ์อาหาร พลาสติกส่วนใหญ่สังเคราะห์ขึ้นจากน้ำมันดิบ ในปี ค.ศ. 2021 ทั่วโลกผลิตพลาสติกถึง 390 ล้านตัน⁽¹⁾ ทำให้ปัจจุบันขยะพลาสติกเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วและก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก หลายประเทศให้ความสำคัญและส่งเสริมการนำพลาสติกมาแปรใช้ใหม่ (รีไซเคิล; recycle) เพื่อลดปัญหาขยะพลาสติกที่เพิ่มมากขึ้นจนกลายเป็นมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์^(2,3) อย่างไรก็ตามขยะพลาสติกทั่วโลกได้ถูกนำไปรีไซเคิลเพียง 9% เท่านั้น อีกประมาณ 70% ถูกเผาหรือฝังกลบ และเหลือกว่า 20% ที่ไม่ได้รับการจัดการ⁽⁴⁾ เนื่องจากยากต่อการระบุแหล่งที่มาของสิ่งปนเปื้อนในพลาสติกที่ผ่านการใช้งานแล้วหรือคุณสมบัติที่อาจเปลี่ยนแปลงไปของพลาสติก ทำให้มีความกังวลเกี่ยวกับคุณภาพของพลาสติกรีไซเคิล โดยเฉพาะเมื่อนำพลาสติกเหล่านี้มาใช้เป็นบรรจุภัณฑ์อาหาร^(5,6)

พลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรต (polyethylene terephthalate; PET) เป็นพลาสติกชนิดหนึ่งที่ยิยมใช้ในการผลิตขวดใส่เครื่องดื่มและบรรจุภัณฑ์อาหารแบบต่างๆ เนื่องจากคุณสมบัติที่มีความทนทาน น้ำหนักเบา มีความใส ป้องกันความชื้น และออกซิเจนได้ดี นอกจากนี้พลาสติก PET ที่ใช้บรรจุอาหารยังนิยมในการนำมารีไซเคิลมากที่สุด^(7,8) โดยผ่านการรีไซเคิลแบบทุติยภูมิหรือเชิงกล ขั้นตอนของการเตรียมพลาสติกก่อนเข้าสู่กระบวนการรีไซเคิลเริ่มจากกำจัดฉลากและวัสดุชนิดอื่นออกไป แล้วนำมาบดเป็นเกล็ดชิ้นเล็กๆ (flake) นำเกล็ดที่ได้มาทำความสะอาดขั้นต้นด้วยวิธีต่างๆ เช่น น้ำร้อน เบส น้ำยาฆ่าเชื้อ หรือน้ำยาทำความสะอาด จากนั้นทำให้แห้งและทำความสะอาดโดยเทคโนโลยีขั้นสูง ก่อนนำไปหลอมและอัดขึ้นรูปเป็นเม็ด^(9,10)

การกำจัดสิ่งปนเปื้อนในพลาสติกที่ใช้แล้วก่อนนำไปรีไซเคิล ถือว่ามีความสำคัญอย่างมากสำหรับการนำไปใช้เป็นบรรจุภัณฑ์อาหาร ทำให้ประเทศต่างๆ ทั้งในยุโรปและสหรัฐอเมริกามีกฎหมายที่เกี่ยวกับการกำจัดสารเคมีปนเปื้อนในพลาสติกที่ใช้แล้วก่อนรีไซเคิล^(11,12) รวมถึง

ประเทศไทยมีประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 435) พ.ศ. 2565⁽¹³⁾ หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และแนวทางในการประเมินประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตแปรใช้ใหม่และความปลอดภัยของเม็ดพลาสติกแปรใช้ใหม่ ผู้ผลิตต้องจำลองสถานการณ์การปนเปื้อนและกำจัดสารปนเปื้อนก่อนผลิตภาชนะบรรจุที่ทำจากพลาสติกแปรใช้ใหม่แบบทุติยภูมิ โดยการทดสอบด้วยสารปนเปื้อนตัวแทน (surrogate contaminants testing) ซึ่งกำหนดให้สารปนเปื้อนตัวแทนที่ตกค้างในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการแปรใช้ใหม่ใน rPET ไม่เกิน 210 µg/kg_{PET}⁽¹⁴⁾

การทดสอบด้วยสารปนเปื้อนตัวแทนกลุ่มสารอินทรีย์ตามแนวทางของประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา⁽¹⁴⁾ โดยนำเกล็ดพลาสติกบริสุทธิ์ที่ยังไม่ผ่านการใช้งานมาแช่สารปนเปื้อนตัวแทน (surrogates) ซึ่งได้กำหนดสารตัวแทนที่เป็นสารอินทรีย์ไว้ 4 กลุ่ม คือ 1) สารระเหยง่ายแบบมีขี้ผึ้ง 2) สารระเหยง่ายแบบไม่มีขี้ผึ้ง 3) สารไม่ระเหยแบบมีขี้ผึ้ง และ 4) สารไม่ระเหยแบบไม่มีขี้ผึ้ง แต่ละกลุ่มให้เลือกอย่างน้อย 1 ชนิด เดิมตัวทำลายและแช่เกล็ดพลาสติกในภาชนะปิดที่สภาวะอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม เพื่อให้พลาสติกดูดซับสารตัวแทน จากนั้นนำไปทำพลาสติกที่ผ่านกระบวนการกำจัดสิ่งปนเปื้อนในระดับห้องปฏิบัติการหรือระดับต้นแบบ ซึ่งสามารถเป็นตัวแทนสภาวะของกระบวนการผลิตจริงได้ และตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นที่เหลือของสารปนเปื้อนตัวแทนในแต่ละกระบวนการ งานวิจัยในต่างประเทศส่วนใหญ่วิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทนกลุ่มสารอินทรีย์ โดยจำลองสถานการณ์การปนเปื้อนด้วยสารเคมี เช่น chlorobenzene toluene phenol และ benzophenone เป็นต้น สกัดพลาสติกโดยตัวทำลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) ได้แก่ GC-ECD, GC-FID และ HS-GC-MS เป็นต้น^(15,16) ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ศึกษาพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทนในพลาสติก PET โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไวในการวิเคราะห์ สามารถวิเคราะห์สารอินทรีย์ได้หลายชนิดพร้อมกัน มีความจำเพาะ สามารถวิเคราะห์สารในปริมาณที่ต่ำได้ และมีอยู่ในห้องปฏิบัติการ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทนสารอินทรีย์ 4 กลุ่ม ที่ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพการกำจัดสิ่งปนเปื้อนในกระบวนการผลิต rPET ได้แก่ กลุ่มที่ 1 chlorobenzene กลุ่มที่ 2 toluene กลุ่มที่ 3 benzophenone และ methyl salicylate และกลุ่มที่ 4 lindane ในพลาสติกชนิด PET โดยเติมสาร 4 กลุ่มข้างต้น ในเกล็ดพลาสติก PET สกัดด้วยตัวทำละลาย และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS จำลองสถานการณ์การปนเปื้อนโดยแช่เกล็ดพลาสติก PET กับสารปนเปื้อนตัวแทนทั้ง 4 กลุ่ม นำไปผ่านกระบวนการกำจัดสิ่งปนเปื้อนจากนั้นวิเคราะห์ปริมาณสารปนเปื้อนตัวแทนที่เหลืออยู่ในแต่ละขั้นตอนการกำจัดสารปนเปื้อนระหว่างกระบวนการรีไซเคิล เพื่อเป็นการยืนยันว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา สามารถวิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทนที่ใช้ประเมินประสิทธิภาพการกำจัดสิ่งปนเปื้อนในกระบวนการผลิต rPET ได้

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐาน

benzophenone และ methyl salicylate ความบริสุทธิ์ > 99% (Sigma Aldrich, USA), toluene ความบริสุทธิ์ 99.8% (Alfa Aesar, Korea), chlorobenzene GC grade (Merck, Germany) และ lindane (gamma-HCH) ความบริสุทธิ์ 99.45 ± 0.30% (Dr. Ehrenstorfer, Germany)

สารเคมี

1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) ความบริสุทธิ์ 99.5% (Acros Organics, Belgium), isopropanol (AR grade), sodium hydroxide (NaOH) pellets 98% และ Triton-X100 (ultra-pure), ethanol (AR grade)

การเตรียมสารมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐาน stock solution ความเข้มข้น 2000 mg/L เตรียมโดยชั่งสารมาตรฐานแต่ละชนิด 50 mg แยกกัน ละลายและปรับปริมาตรด้วย isopropanol ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL

สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1 mg/L เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม (chlorobenzene, toluene, methyl salicylate และ benzophenone) และสารละลายมาตรฐาน lindane แยกจากชนิดอื่น โดยดูด stock solution สารละลายมาตรฐานแต่ละชนิด 25 µL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 mL ปรับปริมาตรด้วย isopropanol

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง GC-MS (Agilent 7890B, United States) พร้อมเครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติสำหรับ GC รุ่น G4513A Column HP-5MS เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.32 mm ยาว 30 m ความหนาฟิล์ม 25 µm (Agilent, United States), เครื่องบดละเอียด (POWTEQ LM200, China), เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Sartorius ED224S, Thailand), ตู้อบร้อน (Memmert UF160, Germany) และเครื่องแก้ว class A

การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ โดยใช้ขวดพลาสติก PET บริสุทธิ์ (vPET) ตัดตัวอย่างขวด PET ให้เป็นเกล็ดพลาสติกโดยใช้กรรไกร จากนั้นและบดด้วยเครื่องบดละเอียด

การสกัดตัวอย่างพลาสติก

ชั่งตัวอย่างพลาสติกที่บด 0.5 กรัม ใส่ในขวดแก้วสกัดสารปนเปื้อนตัวแทนโดยเติมตัวทำละลาย HFIP ลงในตัวอย่าง นำเข้าตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม isopropanol นำเข้าตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอนพลาสติก⁽¹⁵⁾ นำสารละลายที่ได้วิเคราะห์หาปริมาณสารปนเปื้อนตัวแทนด้วยเครื่อง GC-MS

การตรวจวัดชนิดและปริมาณสารปนเปื้อนตัวแทน

พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทนกลุ่มสารอินทรีย์ด้วยเครื่อง GC-MS กำหนดค่า m/z ของ scan

mode ช่วง 45–350 และนำ m/z ที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณด้วย SIM mode โดยใช้สภาวะเครื่อง คือ Inlet: Split mode ที่ Split ratio: 2:1 และ 10:1 ที่อุณหภูมิ 250°C อุณหภูมิ oven เริ่มต้น 50°C และเพิ่มอุณหภูมิเป็นลำดับจนถึง 300°C Flow 1.0–1.2 mL/min อุณหภูมิ MS Source: 230°C และ MS Quad: 150°C ทาปริมาณสารปนเปื้อนตัวแทนโดยการอ่านค่าเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับ peak area ของสารมาตรฐาน

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity)

เตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร วิเคราะห์ค่า m/z ของแต่ละสารมาตรฐาน โดยใช้ scan mode และตรวจสอบการแยกของสารทั้ง 5 ชนิด สารทั้งหมดต้องมีค่า retention time แยกกันชัดเจน

การทดสอบความเป็นเส้นตรง ช่วงการวิเคราะห์ (linearity, working range) และ matrix effect

เตรียมสารละลายมาตรฐาน chlorobenzene, toluene, methyl salicylate และ benzophenone ให้แต่ละสารมีความเข้มข้นที่ 5, 10, 35, 60, 85, 110 และ 135 $\mu\text{g/L}$ และ lindane ที่ความเข้มข้น 10, 35, 60, 85, 110, 135 และ 160 $\mu\text{g/L}$ ใน isopropanol (reagent blank) จากนั้นวัด peak area ของสารและสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับ peak area พิจารณาสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination; R^2) ของทุกกราฟมาตรฐานต้องไม่น้อยกว่า 0.995 และทำ residue plot เพื่อยืนยันความเป็นเส้นตรง

เตรียม spiked sample โดยเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่าง vPET (matrix blank) ให้ได้ความเข้มข้นเหมือนการทดสอบความเป็นเส้นตรง ก่อนทำการสกัดโดยวิเคราะห์ความเข้มข้นระดับละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นที่เติมกับความเข้มข้นที่พบทดสอบความเป็นเส้นตรง และทดสอบช่วงความเชื่อมั่น (confidential interval; CI) ของ slope ครอบคลุม 1

และ CI ของ intercept ครอบคลุม 0 หรือไม่ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถ้าครอบคลุมแสดงว่าไม่มี matrix effect

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection; LOD)

ทดสอบค่า LOD ของสารตัวแทนกลุ่มสารอินทรีย์โดยประเมินจากการคำนวณค่า SD ที่ได้จากการเติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 $\mu\text{g/L}$ สำหรับสารกลุ่มที่ 1–3 และกลุ่มที่ 4 ตามลำดับ ซึ่งเป็นความเข้มข้นระดับต่ำสุดของกราฟมาตรฐานทำการทดสอบ 10 ซ้ำ ประเมินค่า $\text{LOD} = 3\text{SD}$

ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation; LOQ)

กำหนดค่า LOQ ของสารกลุ่มที่ 1–3 และกลุ่มที่ 4 ที่ความเข้มข้น 0.020 และ 0.040 mg/kg ยืนยันค่า LOQ โดยเติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.005 และ 0.010 mg/L ตามลำดับ ลงใน matrix blank วิเคราะห์ 10 ซ้ำ คำนวณ %recovery อยู่ในช่วง 60–115 กำหนดเกณฑ์การยอมรับ $\%RSD_r$ เทียบกับค่า predicted RSD_R จาก Horwitz formula และคำนวณค่า HORRAT(r) กำหนดเกณฑ์ยอมรับตาม AOAC⁽¹⁷⁾ มีค่า 0.3–1.3 ดังสมการที่ 1

การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 4 กลุ่ม ลงใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ วิเคราะห์ระดับละ 7 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับกราฟมาตรฐานแล้วคำนวณค่า %recovery, $\%RSD_r$ โดยเกณฑ์ยอมรับความแม่นยำ: recovery 80–110% และเกณฑ์ยอมรับความเที่ยง: $\text{HORRAT}(r) = 0.3\text{--}1.3^{(17)}$ ดังสมการที่ 1

$$\text{HORRAT}(r) = \frac{\text{RSD}_r}{\text{predicted RSD}_R} \quad \text{สมการที่ 1}$$

ความเที่ยงระหว่างกลาง (intermediate precision) ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 4 กลุ่มลงใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ วิเคราะห์แยกกัน 3 วัน วันละ 8 ซ้ำ⁽¹⁸⁾ แล้วคำนวณค่า %relative intermediate standard deviation (%RSD_i) โดยใช้สถิติ one-way ANOVA เทียบกับค่า predicted RSD_R⁽¹⁷⁾ (interlaboratory reproducibility standard deviation) โดย %RSD_i จะต้องน้อยกว่า predicted RSD_R ดังสมการที่ 2

$$\text{HORRAT}(R) = \frac{\text{RSD}_R}{\text{predicted RSD}_R} \quad \text{สมการที่ 2}$$

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (uncertainty)

คำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนทุกแหล่ง โดยรวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมดและคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95%⁽¹⁹⁾

การวิเคราะห์พลาสติก PET ที่ปนเปื้อนสารตัวแทน

นำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการทดสอบความใช้ได้มาวิเคราะห์พลาสติก PET ที่จำลองสถานการณ์การปนเปื้อนสารตัวแทน เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธี

การจำลองสถานการณ์การปนเปื้อน และวิเคราะห์ปริมาณสารตัวแทนที่ปนเปื้อนใน PET

ตัดพลาสติก vPET ที่มีความหนา 0.3 และ 0.6 mm ให้เป็นเกล็ดขนาดเล็ก ชั่ง 30 กรัม ในขวดแก้วที่มีฝาปิด เติมสารละลายสารปนเปื้อนตัวแทน กลุ่มที่ 1 และ 2 (chlorobenzene และ toluene) ความเข้มข้น 10% v/v กลุ่มที่ 3 (benzophenone และ methyl salicylate) ความเข้มข้น 1% v/v และกลุ่มที่ 4 (lindane) ความเข้มข้น 1 %w/w ละลายและปรับปริมาตรเป็น 150 mL ด้วยตัวทำละลาย isopropanol และ hexane แช่เกล็ดพลาสติกให้ดูดซับสารที่สถานะที่แตกต่างกัน 2 สถานะ คือ 1) อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 14 วัน⁽¹¹⁾ 2) อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 7 วัน⁽¹⁵⁾ เตรียมตัวอย่างละ 3 batches

วิเคราะห์ batch ละ 3 ซ้ำ จากนั้นแยกตัวอย่างเกล็ดพลาสติกออกจากสารปนเปื้อน ล้างพื้นผิวด้วย 10% v/v ethanol⁽¹⁵⁾ วิเคราะห์ปริมาณเริ่มต้นของสารปนเปื้อนตัวแทนในเกล็ดพลาสติก (C₀) และทำการกำจัดสิ่งปนเปื้อนในเกล็ดพลาสติกด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ดังนี้ 1) ล้างด้วย 1% v/v Triton-X100 ที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 15 นาที และอบแห้งที่อุณหภูมิ 160°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง⁽²⁰⁾ 2) ล้างด้วย 2% w/v NaOH ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 30 นาที และอบแห้งที่อุณหภูมิ 130°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อไล่ความชื้น จากนั้นให้ความร้อน 220°C เป็นเวลา 30 นาที⁽²¹⁾ และ 3) บดเกล็ดพลาสติกให้เล็กลงและล้างด้วย 2% w/v NaOH ผสมกับ 2% v/v Triton-X100 ที่สภาวะเดียวกับวิธีที่ 2 กรณีกำจัดสิ่งปนเปื้อนตามวิธีที่ 2 และ 3 เลือกเฉพาะความหนา 0.6 mm ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 7 วัน เป็นตัวแทนในการวิเคราะห์

จากนั้นบดพลาสติกและสกัดสารปนเปื้อน นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS วัดปริมาณสารปนเปื้อนที่คงเหลือหลังทำการล้าง (C₁; ปริมาณที่ได้จากสถานะที่ 1-3 กำหนดเป็น C₁₋₁-C₁₋₃) คำนวณหาประสิทธิภาพการกำจัดสารปนเปื้อน (% decontamination efficiency) ดังสมการที่ 3

$$\text{ค่าประสิทธิภาพการกำจัดสารปนเปื้อน} = \frac{(C_0 - C_{1-x})}{C_0} \times 100 \quad \text{สมการที่ 3}$$

หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และแนวทางในการประเมินประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตแปรใช้ใหม่⁽¹⁴⁾ กำหนดว่า หากปริมาณ C₀ ต่ำกว่าค่าการดูดซับ (sorption value) ของสารปนเปื้อนตัวแทน ดังแสดงในตารางที่ 1 ต้องทำการแก้ไขปริมาณที่หายไปโดยคูณแฟคเตอร์ (simple factor) ของสารตัวแทนแต่ละชนิด ดังสมการที่ 4

$$\text{Simple factor} = \frac{(\text{Sorption Value})}{C_0} \quad \text{สมการที่ 4}$$

ตารางที่ 1 ค่าการดูดซับ (sorption value) ของสารปนเปื้อนตัวแทนในพลาสติก PET ที่ระยะเวลา 365 วัน อุณหภูมิ 25°C⁽¹¹⁾

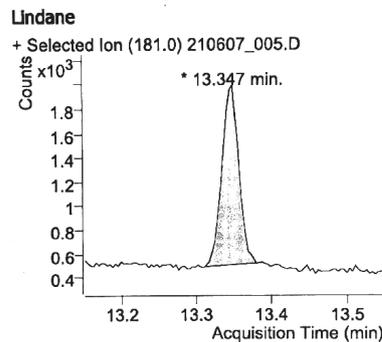
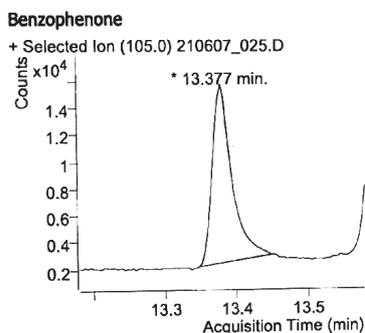
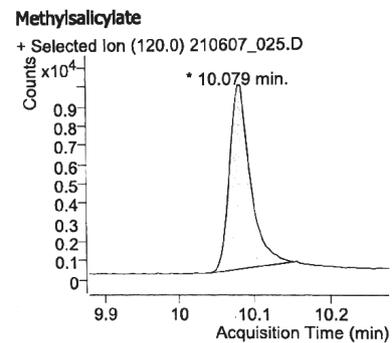
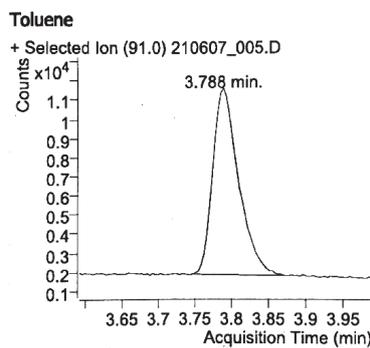
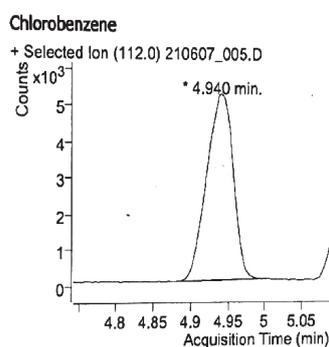
กลุ่มสารปนเปื้อนตัวแทน	ชนิดสารปนเปื้อนตัวแทน	Sorption Value (mg/kg)
สารระเหยง่ายแบบมีขี้	Chlorobenzene	1,080
สารระเหยง่ายแบบไม่มีขี้	Toluene	780
สารไม่ระเหยแบบมีขี้	Methyl salicylate	200
	Benzophenone	49
สารไม่ระเหยแบบไม่มีขี้	Lindane	750

ผล

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์
ความจำเพาะเจาะจง

ผลการทดสอบความจำเพาะของสารปนเปื้อน
ตัวแทน chlorobenzene, toluene, methyl salicylate,
benzophenone และ lindane ด้วยเทคนิค GC-MS

พบว่าค่า m/z หลักของสารตัวแทน คือ 112, 91, 120, 105
และ 181 ตามลำดับ และ retention time ของสาร
ตัวแทนดังกล่าว คือ 4.94, 3.78, 10.08, 13.38 และ
13.35 นาที ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่าวิธี
วิเคราะห์โดย GC-MS มีความจำเพาะต่อสารปนเปื้อน
ตัวแทนแต่ละชนิด



ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานสารปนเปื้อนตัวแทน 5 ชนิด: chlorobenzene; m/z = 112/77, toluene; m/z = 91/92, methyl salicylate; m/z = 120/152, benzophenone; m/z = 105/182 และ lindane; m/z = 181/219

ความเป็นเส้นตรง ช่วงการวิเคราะห์ และ matrix effect

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์สารมาตรฐานสารปนเปื้อนตัวแทน พบว่ากราฟมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรงตลอดช่วงการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยมีค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.9986–0.9997 (เกณฑ์ยอมรับ ≥ 0.995) และจาก residual plot พบว่าข้อมูลมีการกระจายตัวรอบเส้น 0 ดังแสดงในภาพที่ 2

การทดสอบ matrix effect พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานสารปนเปื้อนตัวแทนที่เติมใน matrix blank (แกน x) กับความเข้มข้นที่พบ ซึ่งอ่านได้จากกราฟ (แกน y) เป็นเส้นตรงตลอดช่วงที่ทดสอบ โดยมีค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.9950–0.9981 ดังแสดงในภาพที่ 3

ผลการทดสอบช่วงความเชื่อมั่น (confidential interval; CI) ของ slope ที่ความเชื่อมั่น 95% ของแต่ละสารปนเปื้อนตัวแทน ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าค่า CI ของ slope ครอบคลุม 1 และค่า CI ของ intercept ครอบคลุม 0 แสดงว่าไม่มีผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

ผลการทดสอบค่า LOD ของสารปนเปื้อนตัวแทนกลุ่มสารอินทรีย์ ได้จากการคำนวณโดย $LOD=3SD$ สำหรับสารกลุ่มที่ 1–3 และกลุ่มที่ 4 มีค่าเท่ากับ 0.010 และ 0.020 mg/kg ตามลำดับ และค่า LOQ เท่ากับ 0.020 และ 0.040 mg/kg ตามลำดับ พบค่า %recovery เฉลี่ย ในช่วง 76.9–100.4, %RSD ในช่วง 8.2–12.3 และ HORRAT(r) ในช่วง 0.3–0.4 ซึ่งอยู่เกณฑ์การยอมรับ⁽¹⁷⁾ ดังแสดงในตารางที่ 4

ความแม่นยำและความเที่ยง

การทดสอบค่าความแม่นยำและความเที่ยงภายใต้เงื่อนไขการทวนซ้ำได้ (repeatability condition) พบว่าความแม่นยำที่ประเมินจากค่า %recovery เฉลี่ยของสารปนเปื้อนตัวแทนทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น อยู่ในช่วง 85.8–101.5 ความเที่ยงที่ประเมินจากค่า %RSD ของสารปนเปื้อนตัวแทนอยู่ในช่วง 5.3–7.9 และ HORRAT(r) อยู่ในช่วง 0.3–0.4 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับ⁽¹⁷⁾ ดังแสดงในตารางที่ 5

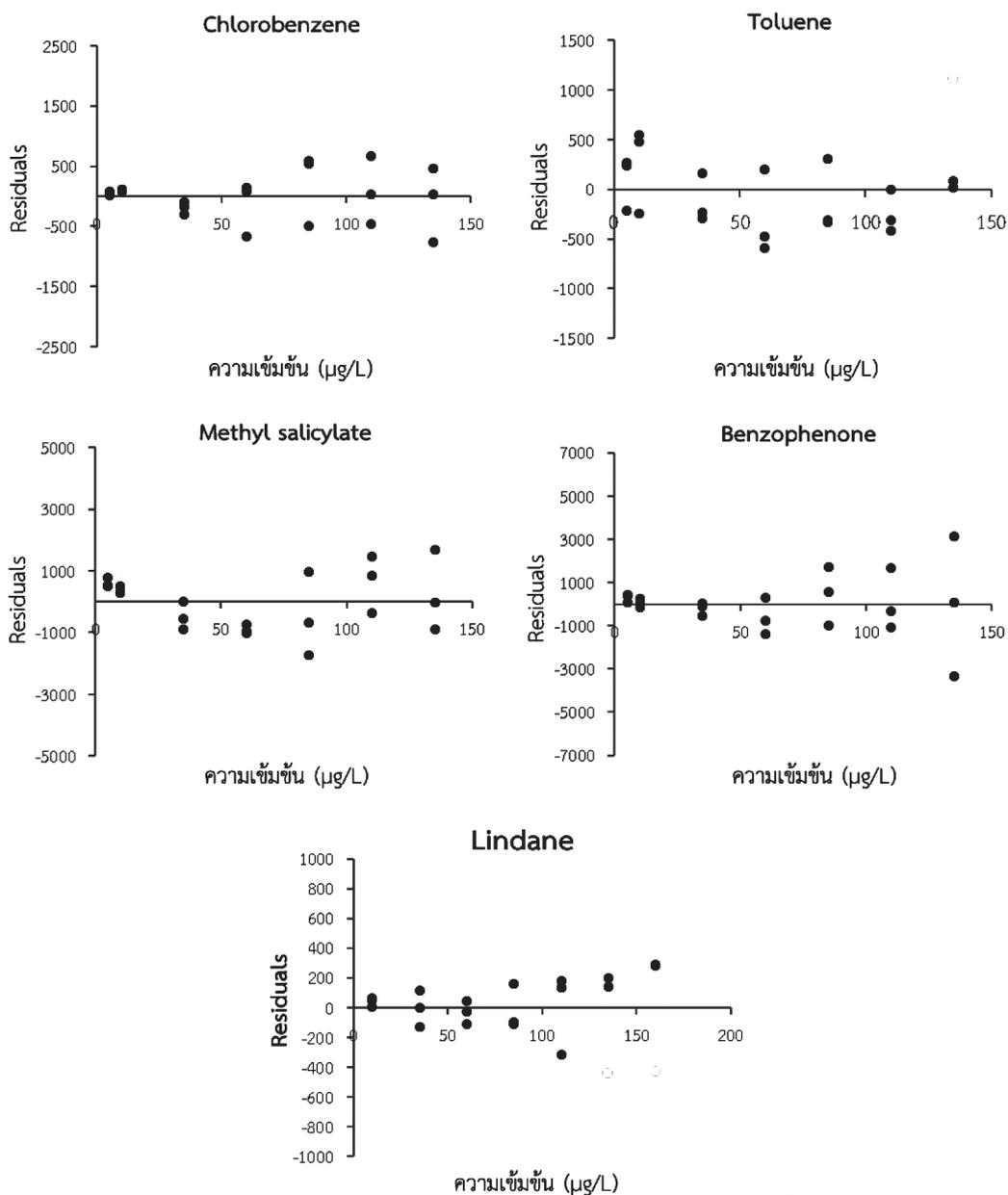
ผลการทดสอบภายใต้ intermediate condition จากการวิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทน พบว่าความแม่นยำที่ประเมินจากค่า %recovery เฉลี่ยของสารปนเปื้อนตัวแทนอยู่ในช่วง 82.6–96.1 ความเที่ยงที่ประเมินจากค่า %RSD อยู่ในช่วง 9.8–17.1 ดังแสดงในตารางที่ 6

ความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์

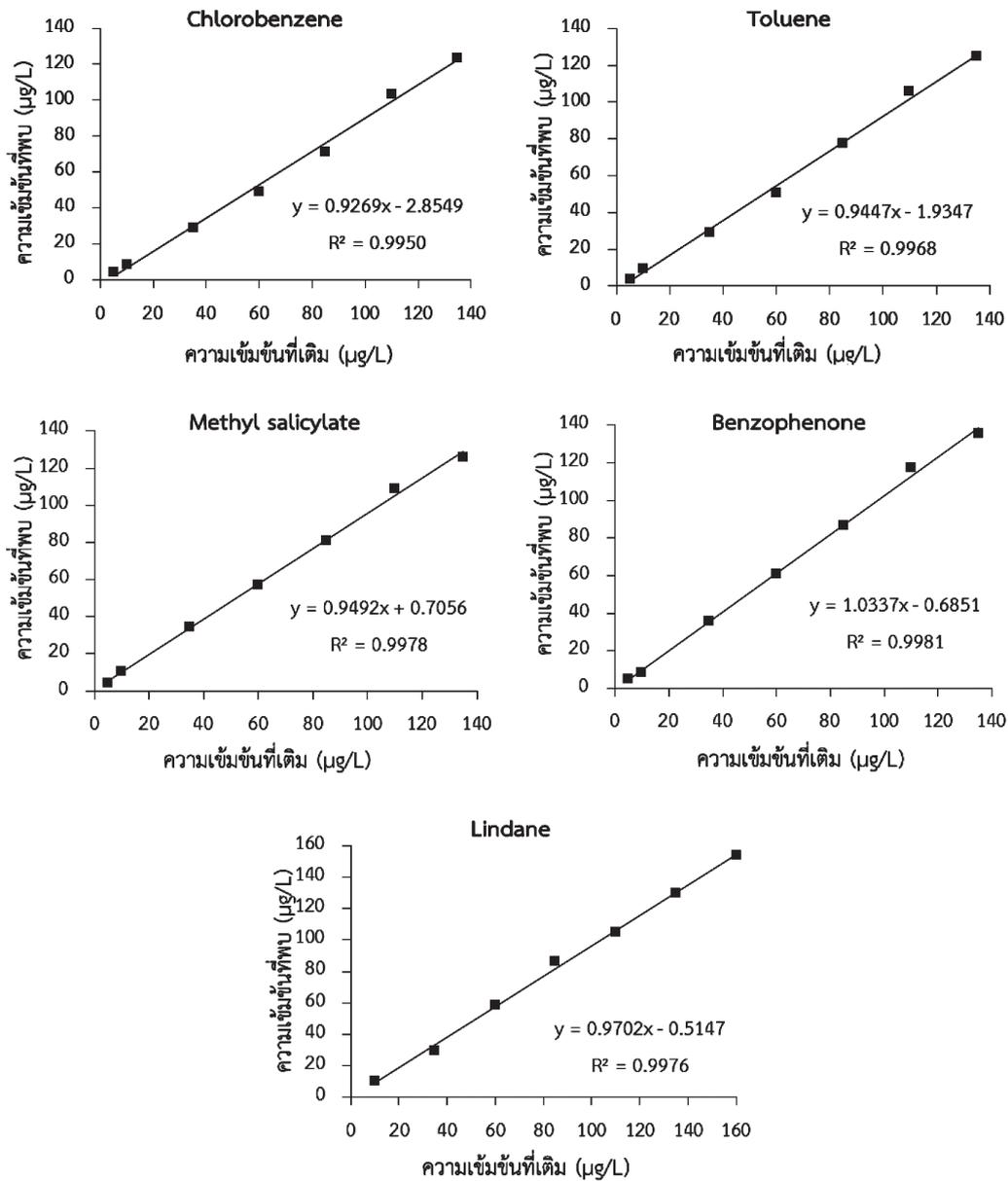
จากการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทนกลุ่มสารอินทรีย์ พบแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน ได้แก่ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน การชั่งน้ำหนักตัวอย่าง (sample weight) เครื่องแก้วที่ใช้วัดปริมาตร (sample volume) การเตรียมกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ความเข้มข้นของตัวอย่างที่อ่านได้จาก calibration curve (concentration of sample) ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (precision) และความเบี่ยงเบนจากค่าจริง recovery (bias) โดยเลือกใช้ระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดในการทดสอบเป็นเวลา 3 วัน วันละ 8 ซ้ำ พบว่าจากการคำนวณความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของสารตัวแทน chlorobenzene, toluene, methyl salicylate, benzophenone และ lindane เท่ากับ 17.92%, 20.60%, 12.31%, 20.13% และ 11.13% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7 สัดส่วนค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งความไม่แน่นอนที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทนมากที่สุด คือความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ เท่ากับ 68.05, 59.79, 55.18, 70.42 และ 61.47% ตามลำดับ ซึ่งความไม่แน่นอนจากแหล่งอื่นๆ มีค่าไม่เกิน 45% ดังแสดงในภาพที่ 4

ตารางที่ 2 ความเป็นเส้นตรง ช่วงของการวิเคราะห์สารมาตรฐานสารปนเปื้อนตัวแทน และค่า R²

ชนิดสารปนเปื้อนตัวแทน	Linearity (mg/L)	Working range (mg/kg)	R ²
Chlorobenzene	0.005–0.135	0.020–0.540	0.9997
Toluene	0.005–0.135	0.020–0.540	0.9990
Methyl salicylate	0.005–0.135	0.020–0.540	0.9986
Benzophenone	0.005–0.135	0.020–0.540	0.9996
Lindane	0.010–0.160	0.040–0.640	0.9995



ภาพที่ 2 การกระจายตัวของ y-residuals ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ของสารมาตรฐานสารปนเปื้อนตัวแทน



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารปนเปื้อนตัวแทนที่พบ กับความเข้มข้นของสารที่เติมในตัวอย่างพลาสติก PET

ตารางที่ 3 ค่าความเป็นเส้นตรง (R^2) ของการทดสอบ matrix effect ช่วงความเชื่อมั่น (CI) ของ slope ที่ 95% และช่วง slope และ intercept ของสารปนเปื้อนตัวแทน

ชนิดสารปนเปื้อนตัวแทน	R^2	CI ของ Slope	ช่วง Slope	CI ของ Intercept	ช่วง Intercept
Chlorobenzene	0.9950	0.927 ± 0.075	0.852–1.002	-2.855 ± 5.859	-8.714–3.004
Toluene	0.9968	0.945 ± 0.061	0.884–1.006	-1.935 ± 4.766	-6.701–2.831
Methyl salicylate	0.9978	0.949 ± 0.052	0.897–1.001	0.706 ± 4.016	-3.310–4.722
Benzophenone	0.9981	1.034 ± 0.052	0.982–1.085	-0.685 ± 4.010	-4.695–3.325
Lindane	0.9976	0.970 ± 0.055	0.915–1.025	-0.515 ± 5.439	-5.954–4.924

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ %Recovery, %RSD และ HORRAT(r) เพื่อยืนยันค่า LOQ

ชนิดสารปนเปื้อน ตัวแทน (กลุ่ม)	LOQ (mg/kg)	%Recovery (mean)	%RSD	HORRAT(r)
Chlorobenzene (1)	0.020	76.9	12.3	0.4
Toluene (2)	0.020	82.7	12.2	0.4
Methyl salicylate (3)	0.020	86.7	8.2	0.3
Benzophenone (3)	0.020	100.4	12.1	0.4
Lindane (4)	0.040	90.9	8.3	0.3

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของการวิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทนในพลาสติก PET ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ ระดับละ 7 ซ้ำ

ชนิดสารปนเปื้อน ตัวแทน	Spiked Level (mg/kg)	%Recovery (mean)	%RSD	Predicted RSD _R	HORRAT(r)
Chlorobenzene	0.220	86.0	5.3	20.6	0.3
	0.240	84.1	5.3	20.4	0.3
	0.540	96.4	5.4	17.6	0.3
Toluene	0.220	88.0	6.8	20.5	0.3
	0.240	86.2	6.5	20.3	0.3
	0.540	85.8	5.6	18.0	0.3
Methyl salicylate	0.220	93.8	6.1	20.3	0.3
	0.240	90.2	6.0	20.1	0.3
	0.540	97.3	7.9	17.6	0.4
Benzophenone	0.220	101.5	6.8	20.0	0.3
	0.240	98.1	6.2	19.9	0.3
	0.540	100.8	6.3	17.5	0.4
Lindane	0.220	88.8	6.5	20.5	0.3
	0.340	100.5	6.1	18.8	0.3
	0.640	85.8	6.5	17.5	0.4

การวิเคราะห์พลาสติก PET ที่มีการตกค้างสารปนเปื้อนสารตัวแทนกลุ่มสารอินทรีย์

ผลการวิเคราะห์พลาสติก PET ที่ผ่านการแช่ในสารปนเปื้อนตัวแทนกลุ่มสารอินทรีย์ทั้ง 4 กลุ่ม ในพลาสติก 2 ความหนา ที่สภาวะต่างกัน ทำการล้างพื้นผิวด้วย 10% v/v ethanol วิเคราะห์ปริมาณที่ตกค้างในเกล็ดพลาสติก (C_0) และทำการกำจัดสิ่งปนเปื้อนในเกล็ดพลาสติกด้วยสภาวะที่ต่างกัน วิเคราะห์ปริมาณที่เหลือในเกล็ดพลาสติก (C_1) ผลการวิเคราะห์ พบว่าการจำลองสภาวะการปนเปื้อนของพลาสติกที่อุณหภูมิ

40°C เป็นเวลา 14 วัน พลาสติกทั้ง 2 ความหนา ดูดซับสารปนเปื้อนตัวแทนในปริมาณที่สูงมาก (816–20,920 mg/kg) โดยเฉพาะกลุ่มสารระเหยง่าย (chlorobenzene และ toluene) วิเคราะห์ได้ปริมาณมากกว่า 12,000 mg/kg_{PET} (> 1.2%) แต่มีการปนเปื้อนที่พื้นผิวพลาสติกในปริมาณมาก ซึ่งสามารถชะออกโดยใช้ 10% v/v ethanol ได้ 27–78% (ค่า C_0 เท่ากับ 301–8,478 mg/kg_{PET}) ยกเว้นกลุ่มไม่ระเหยแบบมีขั้ว ที่ความหนา 0.3 mm มีปริมาณสารปนเปื้อนก่อนล้างพื้นผิวไม่แตกต่างจาก C_0 โดยค่า C_0 ของสารตัวแทนทุกกลุ่ม

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบ intermediate precision ของการวิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทนในพลาสติก PET ที่ 3 ระดับความเข้มข้น เป็นเวลา 3 วัน วันละ 8 ชั่วโมง

ชนิดสารปนเปื้อน ตัวแทน (กลุ่ม)	Spiked Level (mg/kg)	%Recovery (mean)	%RSD _i	Predicted RSD _R
Chlorobenzene (1)	0.020	82.6	17.0	29.7
	0.240	90.4	11.9	20.1
	0.540	88.6	10.2	17.9
Toluene (2)	0.020	89.7	17.1	29.3
	0.240	93.1	11.4	20.0
	0.540	91.2	10.5	17.8
Methyl salicylate (3)	0.020	89.5	16.9	29.3
	0.240	95.3	11.4	20.0
	0.540	92.0	10.2	17.8
Benzophenone (3)	0.020	96.1	16.5	29.0
	0.240	92.5	11.6	20.1
	0.540	95.9	10.3	17.7
Lindane (4)	0.040	84.8	15.8	26.6
	0.340	94.3	11.4	19.0
	0.640	89.5	9.8	17.4

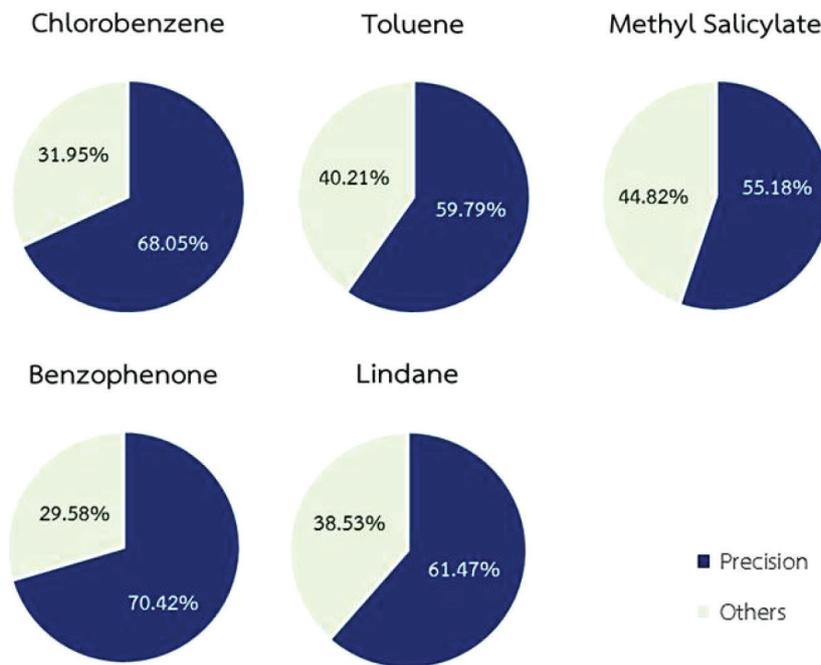
ตารางที่ 7 ผลการคำนวณค่าความไม่แน่นอนรวมที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของการวิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทนกลุ่มสารอินทรีย์

ชนิดสารปนเปื้อน ตัวแทน (กลุ่ม)	Spiked Level (mg/kg)	Expanded Uncertainty (mg/kg)	Uncertainty (%)
Chlorobenzene (1)	0.020	0.003584	17.92
Toluene (2)	0.020	0.004120	20.60
Methyl salicylate (3)	0.020	0.002462	12.31
Benzophenone (3)	0.020	0.004026	20.13
Lindane (4)	0.040	0.004453	11.13

หมายเหตุ: การคำนวณหาความไม่แน่นอนขยาย (calculation of combined standard uncertainty) ค่า expanded uncertainty คำนวณโดยคูณค่า combined standard uncertainty ด้วย coverage factor (k) = 2

สูงกว่าค่า sorption value ของ PET (ตารางที่ 1) ยกเว้น lindane (simple factor ที่ความหนา 0.3 และ 0.6 mm เท่ากับ 1.2 และ 1.4 ตามลำดับ) เมื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย 1% Triton-X100 ที่อุณหภูมิ 160 °C (วิธีล้างที่ 1) พบว่า C₁₋₁ อยู่ในช่วง 10-337 mg/kg_{PET} โดยสารกลุ่มระเหยง่ายในพลาสติกความหนา 0.3 mm มีค่า C₁₋₁ น้อยที่สุด (10-20 mg/kg_{PET}) ดังแสดงในตารางที่ 8

สำหรับสภาวะแช่ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 7 วัน พลาสติกทั้ง 2 ความหนา ปนเปื้อนสารตัวแทนน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 14 วัน ยกเว้น lindane หลังชะพื้นผิวด้วย 10% v/v ethanol พบว่า มีค่า C₀ อยู่ในช่วง 416-2,095 mg/kg_{PET} ซึ่งทุกกลุ่มมีค่า C₀ สูงกว่าค่า sorption value ของ PET (ตารางที่ 1) ยกเว้น lindane (simple factor ทั้ง 2 ความหนา เท่ากับ 1.8)



ภาพที่ 4 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทนกลุ่มสารอินทรีย์ 5 ชนิดในพลาสติก PET

ตารางที่ 8 ปริมาณสารปนเปื้อนตัวแทนในพลาสติก PET จากการจำลองกระบวนการปนเปื้อนในสถานะแช่ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 14 วัน

ชนิดสารปนเปื้อน ตัวแทน	ความหนา 0.3 มิลลิเมตร (mg/kg)			ความหนา 0.6 มิลลิเมตร (mg/kg)		
	ก่อนล้าง	C ₀	C ₁₋₁	ก่อนล้าง	C ₀	C ₁₋₁
Chlorobenzene	18,431±2747	8,478±392	20±2	20,920±4786	8,334±274	47±2
Toluene	12,112±2071	2,677±142	10±1	14,655±3989	3,227±130	21±1
Methyl salicylate	1,842±395	1,712±208	36±4	1,564±332	1,341±119	46±3
Benzophenone	2,609±599	2,665±794	203±5	2,396±391	1,865±67	337±10
Lindane	866±273	631±68	24±4	816±194	518±49	85±4

หมายเหตุ: C₀ หมายถึง ผลวิเคราะห์ที่ได้จากการล้างตัวอย่างด้วย 10% v/v ethanol, C₁₋₁ หมายถึง ผลวิเคราะห์ที่ได้จากการล้างตัวอย่างด้วย 1% v/v Triton-X100 ที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 15 นาที และอบแห้งที่อุณหภูมิ 160°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

หลังจากล้างด้วย 1% Triton-X100 (วิธีล้างที่ 1) พบว่า %decontamination efficiency กลุ่มสารระเหยง่าย ทั้ง 2 ความหนา อยู่ในช่วง 91-97% สำหรับกลุ่มอื่นที่ความหนา 0.3 mm และ 0.6 mm อยู่ในช่วง 85-96% และ 57-85% ตามลำดับ จากนั้นเลือกพลาสติกที่ความหนา 0.6 mm ที่สถานะแช่ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 7 วัน ล้างด้วยสารละลาย 2% NaOH ที่อุณหภูมิ 80°C อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 130°C และให้ความร้อน 220°C (วิธีล้างที่ 2) พบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดสารปนเปื้อน

อยู่ในช่วง 86-99% (C₁₋₂ = 15-148 mg/kg_{PET}) ซึ่งปริมาณสารปนเปื้อนเหลือน้อยกว่าการล้างด้วยวิธีที่ 1 ยกเว้น chlorobenzene สำหรับการล้างด้วยวิธีที่ 3 คือ บดพลาสติกให้เล็กลงและล้างด้วยสารละลาย 2% NaOH ผสมกับ 2% Triton-X100 ที่อุณหภูมิ 80°C อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 130°C และให้ความร้อน 220°C พบว่าค่า C₁₋₃ อยู่ในช่วงไม่พบสำหรับสารระเหยง่าย ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ปริมาณสารปนเปื้อนตัวแทนในพลาสติก PET จากการจำลองกระบวนการปนเปื้อนในสถานะแช่ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 7 วัน

สารปนเปื้อนตัวแทน	ความหนา 0.3 มิลลิเมตร (mg/kg)			ความหนา 0.6 มิลลิเมตร (mg/kg)				
	ก่อนล้าง	C ₀	C ₁₋₁	ก่อนล้าง	C ₀	C ₁₋₁	C ₁₋₂	C ₁₋₃
Chlorobenzene	4,659±97	2,095±36	81±5	2,660±92	1,022±47	92±3	94±3	ไม่พบ*
Toluene	1,726±29	990±26	82±9	1,200±35	1,187±31	41±2	15±1	ไม่พบ*
Methyl salicylate	1,736±61	657±33	60±8	872±40	648±27	97±12	24±1	0.35±0.02
Benzophenone	2,254±60	1,892±73	76±7	1,474±79	1,457±53	251±6	148±44	102±15
Lindane	958±61	416±34	59±5	718±58	428±41	183±13	62±1	83±5

หมายเหตุ: C₀ หมายถึง ผลวิเคราะห์ที่ได้จากการล้างตัวอย่างด้วย 10% v/v ethanol, C₁₋₁ หมายถึง ผลวิเคราะห์ที่ได้จากการล้างตัวอย่างด้วย 1% v/v Triton-X100 ที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 15 นาที และอบแห้งที่อุณหภูมิ 160°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง, C₁₋₂ หมายถึง ผลวิเคราะห์ที่ได้จากการล้างตัวอย่างด้วย 2% w/v NaOH ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 30 นาที และอบแห้งที่อุณหภูมิ 130°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อไล่ความชื้น จากนั้นให้ความร้อน 220°C เป็นเวลา 30 นาที, C₁₋₃ หมายถึง ผลวิเคราะห์ที่ได้จากการล้างตัวอย่างด้วย 2% w/v NaOH ผสมกับ 2% v/v Triton-X100 ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 30 นาที และอบแห้งที่อุณหภูมิ 130°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อไล่ความชื้น จากนั้นให้ความร้อน 220°C เป็นเวลา 30 นาที

*LOD ของ chlorobenzene และ toluene; LOD เท่ากับ 5 µg/L หรือ 20 µg/kg

วิจารณ์

การนำพลาสติกชนิด PET ที่ผ่านการใช้งานมาแปรใช้ใหม่ เพื่อใช้สัมผัสกับอาหารต้องมั่นใจว่าสามารถกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่ติดมากับพลาสติกได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสารเคมีต่างๆ ที่ตกค้างในเนื้อพลาสติกต้องไม่เกินเกณฑ์กำหนด สารเคมีที่อาจตกค้างอยู่มีมาก ดังนั้นการทดสอบประสิทธิภาพของกระบวนการรีไซเคิลจึงต้องจำลองสถานการณ์ โดยใช้สารปนเปื้อนตัวแทนเติมในพลาสติกบริสุทธิ์ให้ครอบคลุมกลุ่มสารเคมีที่มีการใช้ในชีวิตประจำวัน วิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทนในพลาสติก PET ตลอดกระบวนการรีไซเคิลเพื่อควบคุมคุณภาพพลาสติกแปรใช้ใหม่ ต้องเป็นวิธีที่สามารถวิเคราะห์สารได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเหมาะสมต่อการวิเคราะห์สารปนเปื้อนทั้งในระดับสูงและต่ำจากการทบทวนวรรณกรรม พบว่ามีการวิเคราะห์สารตัวแทนกลุ่มอินทรีย์ด้วยเทคนิค GC เนื่องจากมีความสามารถในการวัดสารอินทรีย์ได้หลากหลายและแยกสารที่วิเคราะห์ได้ ผู้วิจัยจึงพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทนโดยใช้เทคนิค GC-MS ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจง ใช้หลักการแมสสเปกโทรเมตรี (mass spectrometry) เป็นเทคนิคที่ตรวจวัดสาร โดยแยก

มวลต่อประจุ (m/z) ที่แตกต่างกัน แสดงผลในรูปสเปกตรัมของมวล ทำให้สามารถทราบโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุล รวมทั้งข้อมูลปริมาณของสารได้จากสัญญาณที่แปรผันตรงกับความเข้มข้นของสาร วิธีที่ศึกษาสามารถทดสอบสารปนเปื้อนตัวแทนกลุ่มสารอินทรีย์ 4 กลุ่ม ซึ่งครอบคลุมตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 435) พ.ศ. 2565⁽¹⁴⁾ ได้แก่ 1) สารระเหยง่ายแบบมีขี้ผึ้ง (chlorobenzene) 2) สารระเหยง่ายแบบไม่มีขี้ผึ้ง (toluene) 3) สารไม่ระเหยแบบมีขี้ผึ้ง (methyl salicylate และ benzophenone) และ 4) สารไม่ระเหยแบบไม่มีขี้ผึ้ง (lindane) เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์มีความจำเพาะต่อสารปนเปื้อนตัวแทนแต่ละกลุ่ม เนื่องจากไม่พบการรบกวนของสารอื่น โดยค่า m/z ของ chlorobenzene, toluene, methyl salicylate, benzophenone และ lindane คือ 112/77, 91/92, 120/152, 105/182 และ 181/219 ตามลำดับ ค่า m/z ที่เลือกให้สัญญาณสูงที่สุด สำหรับการปรับสภาวะเครื่อง GC-MS ได้ทดลองใช้คอลัมน์ HP-5MS และ DB-5MS ผลปรากฏคือคอลัมน์ HP-5MS ให้ sensitivity ที่ดีกว่า จากการทดลองฉีดสารแบบ splitless และ split ratio ที่ 2:1, 5:1 และ 10:1

เพื่อเลือกการฉีดสารที่ให้ค่าสัญญาณสูงและลดการเกิดหางพีค (tailing) พบว่าใช้ split ratio ที่ 10:1 เหมาะสำหรับ toluene, chlorobenzene และ lindane ที่ 2:1 สำหรับ methyl salicylate และ benzophenone การปรับ step temperature program ของ oven โดยปรับ rate, flow และ hold time เพื่อให้ได้ retention time ที่เหมาะสมไม่ออกเร็วหรือช้าเกินไป และไม่เกิดการซ้อนทับกันของแต่ละพีค สารปนเปื้อนตัวแทน โดยใช้เวลารวมในการวิเคราะห์ตัวอย่างไม่มากเกินไป ใช้เวลารวม 20 นาที และ 17 นาที สำหรับ split ratio 10:1 และ 2:1 ตามลำดับ พบว่าพีคของสารปนเปื้อนตัวแทนที่ได้มีความสมมาตร และสารแต่ละชนิดมีพีคที่แยกออกจากกันอย่างชัดเจน การสกัดสารปนเปื้อนตัวแทนจากพลาสติกชนิด PET ใช้ตัวทำละลาย HFIP ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่รุนแรงสำหรับ PET ช่วยให้ polymer matrix เกิดการบวม และสกัดสารออกมาได้ง่าย การทดลองสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น ได้แก่ dichloromethane ไม่สามารถสกัดสารปนเปื้อนตัวแทนออกมาได้ทั้งหมด

จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่ากราฟมาตรฐานของสารปนเปื้อนตัวแทนทั้ง 4 กลุ่ม มีความเป็นเส้นตรงตลอดช่วงการวิเคราะห์ โดยมีค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.9986–0.9997 และไม่มีผลกระทบจากเมทริกซ์ โดยมีค่า R^2 และช่วงความเชื่อมั่นของ slope เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ค่า LOD ของสารตัวแทนกลุ่มที่ 1–3 และกลุ่มที่ 4 เท่ากับ 0.010 และ 0.020 mg/kg ตามลำดับ ซึ่งทุกค่าให้สัญญาณ signal/noise มากกว่า 3 ค่า LOQ เท่ากับ 0.020 และ 0.040 mg/kg ตามลำดับ ซึ่งมีการตรวจยืนยันจาก %recovery เฉลี่ย %RSD และ HORRAT ผ่านเกณฑ์การยอมรับของ AOAC guideline⁽¹⁷⁾ ผลการวิเคราะห์ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ โดย spiked sample blank 3 ระดับ ความเข้มข้น ระดับละ 7 ซ้ำ มีค่า recovery และ HORRAT(r) เป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับ นอกจากนี้ ได้ทดสอบ intermediate precision ของสารตัวแทนที่ 3 ระดับความเข้มข้น เป็นเวลา 3 วัน วันละ 8 ซ้ำ พบว่ามีค่า %RSD_i น้อยกว่า predicted RSD_R และค่า p -value มากกว่า 0.05 แสดงว่าไม่มีความแตกต่างในการ

วิเคราะห์ระหว่างวัน แสดงให้เห็นว่าวิธีมีความเหมาะสมต่อการวิเคราะห์สารตัวแทนในพลาสติก PET ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น ไม่ได้ใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง (certified reference materials; CRM) แต่ใช้การเติม (spiking) สารมาตรฐานลงใน matrix blank (vPET) แทน จึงมีการวางแผนในการควบคุมคุณภาพภายใน เพื่อความมั่นใจในผลการวิเคราะห์ตัวอย่างทุก batch โดยทำการทดสอบ reagent blank, matrix blank, duplicate analysis และ spiked sample blank ในตัวอย่างทุกๆ 10 ตัวอย่าง

เมื่อพิจารณาค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ โดยการเติมสารมาตรฐานใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้นต่ำที่สุด ในการทดสอบเป็นเวลา 3 วัน วันละ 8 ซ้ำ เนื่องจากเป็นช่วงความเข้มข้นที่จะเกิดความไม่แน่นอนมากที่สุด ทำให้แหล่งความไม่แน่นอนที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์มากที่สุด คือความเที่ยง จากผลการวิเคราะห์นี้ พบว่าค่าความไม่แน่นอนที่พิจารณาจากแหล่งความไม่แน่นอนที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของสารตัวแทน chlorobenzene, toluene, methyl salicylate, benzophenone และ lindane มีค่าเท่ากับ 17.92%, 20.60%, 12.31%, 20.13% และ 11.13% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าที่ควรจะเป็น โดยคำนวณจากค่า standard deviation ค่าความไม่แน่นอนที่ควรจะเป็นเท่ากับ 2 เท่าของ predicted Horwitz's RSD_r⁽²²⁾ (34.3%–38.0%) ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้เหมาะสมและสอดคล้องตามเกณฑ์การพิจารณาความสมเหตุสมผลของค่าความไม่แน่นอน

ในการประเมินประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ได้นำวิธีนี้ไปใช้วิเคราะห์พลาสติก PET ที่ปนเปื้อนสารตัวแทน โดยการจำลองสถานการณ์การปนเปื้อนของพลาสติก PET ที่มีความหนาแตกต่างกัน คือ 0.3 และ 0.6 mm เนื่องจากคาดว่าความหนาของพลาสติกอาจส่งผลต่อการดูดซับ นำมาแช่สารปนเปื้อนตัวแทน 2 สภาวะ คือ ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 14 วัน และที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 7 วัน เพื่อจำลองการปนเปื้อนที่คาดว่าจะแทนสภาวะจริงซึ่งขยะพลาสติกจะสัมผัสกับสารปนเปื้อนเป็นระยะเวลานาน จากนั้นกำจัดสารปนเปื้อนตัวแทนในพลาสติกก่อนนำไปรีไซเคิล โดย

การล้าง 3 รูปแบบ ที่ใกล้เคียงกับสภาวะที่ใช้โดยภาคอุตสาหกรรมรีไซเคิล^(11,15,20,21) ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสติก PET ที่ปนเปื้อนสารตัวแทนในทุกขั้นตอน ผลจากการวิเคราะห์ พบว่าสามารถตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทนปริมาณสูงที่ระดับ 20,000 mg/kg ได้ ซึ่งเป็นปริมาณเริ่มต้นของสารปนเปื้อนตัวแทนในเกล็ดพลาสติกก่อนการล้างทำความสะอาด และเมื่อทำการกำจัดสิ่งปนเปื้อนในเกล็ดพลาสติกด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ตรวจพบสารปนเปื้อนตัวแทนทั้ง 4 กลุ่ม ที่ระดับต่ำลงมาก และตรวจไม่พบ chlorobenzene และ toluene (LOD เท่ากับ 5 µg/L หรือ 20 µg/kg) นอกจากนี้พบว่าสารปนเปื้อนในกลุ่มสารไม่ระเหยถูกกำจัดออกได้ยากกว่าสารกลุ่มระเหยง่าย ตามหลักเกณฑ์ เงื่อนไข และแนวทางในการประเมินประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตแปรใช้ใหม่ และความปลอดภัยของเม็ดพลาสติกแปรใช้ใหม่ กำหนดให้สารปนเปื้อนตัวแทนที่ตกค้างในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการแปรใช้ใหม่ใน rPET ไม่เกิน 210 µg/kg_{PET}⁽¹⁴⁾ หากผู้ประกอบการพลาสติกกรีไซเคิลไม่สามารถกำจัดสารเหล่านี้ให้มีปริมาณตามเกณฑ์ที่กำหนด อาจต้องมีการนำภาชนะรีไซเคิลที่ได้มาทดสอบการแพร่กระจายหรือหาแนวทางอื่นต่อไป

จากผลการพัฒนาทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ และวิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทนจากการจำลองสถานการณ์การปนเปื้อนในพลาสติก PET พบว่าวิธีวิเคราะห์ที่ได้มีประสิทธิภาพตามเกณฑ์ที่กำหนดและเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ติดตามสารปนเปื้อนตัวแทน ในขั้นตอนการผลิต rPET ได้สอดคล้องตามที่กฎหมายกำหนด เนื่องจากประเทศไทยยังไม่มีหน่วยงานหรือห้องปฏิบัติการเปิดให้บริการตรวจวิเคราะห์รายการทดสอบสารปนเปื้อนตัวแทนใน rPET สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร เป็นห้องปฏิบัติการแรกที่พัฒนาวิธีวิเคราะห์ขึ้น ทำให้มีข้อจำกัดคือไม่มีห้องปฏิบัติการอื่นตรวจวิเคราะห์ในรายการนี้ ส่งผลให้ไม่มีแผนในการทดสอบความชำนาญ หากมีห้องปฏิบัติการอื่นสามารถตรวจวิเคราะห์ได้อาจมีการจัดการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory comparison) เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพภายนอก

สรุป

วิธีวิเคราะห์ที่ได้มีการพัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทนกลุ่มสารอินทรีย์ทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ chlorobenzene, toluene, benzophenone, methyl salicylate และ lindane ในพลาสติก PET โดยเทคนิค GC-MS เพื่อนำผลวิเคราะห์ไปใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของการรีไซเคิลพลาสติก ผลการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีดังกล่าว พบว่าวิธีวิเคราะห์ที่ได้มีประสิทธิภาพเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดและเหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน จากการจำลองสถานการณ์การปนเปื้อนของพลาสติกชนิด PET โดยแค่ PET บริสุทธิ์กับสารตัวแทนและล้างที่สภาวะต่างๆ เพื่อทดสอบการติดตามวิเคราะห์สารตัวแทนที่ปนเปื้อนในเนื้อพลาสติก โดยจากการวิเคราะห์หลังการล้างที่สภาวะต่างๆ พบว่ามีเพียงกลุ่มสารระเหยได้ที่มีปริมาณสารปนเปื้อนไม่เกินค่ากำหนด ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และแนวทางในการประเมินประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตแปรใช้ใหม่ และความปลอดภัยของเม็ดพลาสติกแปรใช้ใหม่ วิธีทดสอบที่ได้ทำการพัฒนาสามารถวิเคราะห์สารปนเปื้อนตัวแทนในพลาสติก PET รวมทั้งสามารถวิเคราะห์ติดตามสารตัวแทนในกระบวนการรีไซเคิลได้ ดังนั้นจึงสามารถใช้ประเมินกระบวนการผลิต rPET ได้สอดคล้องตามกฎหมาย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำหรับการสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวัสดุสัมผัสอาหารทุกท่าน ที่ช่วยเตรียมตัวอย่างพลาสติกในการวิเคราะห์ จนทำให้งานวิจัยครั้งนี้บรรลุผลสำเร็จได้

เอกสารอ้างอิง

1. Statista. Annual production of plastics worldwide from 1950 to 2021. [online]. 2022; [cited 2023 Apr 3]; [1 screen]. Available from: URL: <https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/>.

2. Nkwachukwu OI, Chima CH, Ikenna AO, Albert L. Focus on potential environmental issues on plastic world towards a sustainable plastic recycling in developing countries. *Int J Ind Chem* 2013; 4: 34. (13 pages).
3. Ferdous W, Manalo A, Siddique R, Mendis P, Zhuge Y, Wong HS, et al. Recycling of landfill wastes (tyres, plastics and glass) in construction—a review on global waste generation, performance, application and future opportunities. *Resour Conserv Recycl* 2021; 173: 105745. (13 pages).
4. Organization for Economic Co-operation and Development (OECE). Global plastics outlook: policy scenarios to 2060. [online]. 2022; [cited 2023 Mar 31]; [28 screens]. Available from: URL: https://read.oecd-ilibrary.org/view/?ref=1143_1143481-88j1bxuktr&title=Global-Plastics-Outlook-Policy-Scenarios-to-2060-Policy-Highlights.
5. Mendes AC, Pedersen GA. Perspectives on sustainable food packaging:—is bio-based plastics a solution?. *Trends Food Sci Technol* 2021; 112: 839–46.
6. Thiounn T, Smith RC. Advances and approaches for chemical recycling of plastic waste. *J Polym Sci* 2020; 58(10): 1347–64.
7. Nisticò R. Polyethylene terephthalate (PET) in the packaging industry. *Polym Test* 2020; 90: 106707. (18 pages).
8. Welle F. Twenty years of PET bottle to bottle recycling—An overview. *Resour Conserv Recycl* 2011; 55(11): 865–75.
9. Awaja F, Pavel D. Recycling of PET. *Eur Polym J* 2005; 41(7): 1453–77.
10. Eriksen MK, Christiansen JD, Daugaard AE, Astrup TF. Closing the loop for PET, PE and PP waste from households: influence of material properties and product design for plastic recycling. *Waste Manag* 2019; 96: 75–85.
11. U.S. Department of Health and Human Services. Use of recycled plastics in food packaging (chemistry considerations): guidance for industry. College Park, MD: Food and Drug Administration; 2021.
12. EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF). Scientific opinion on the criteria to be used for safety evaluation of a mechanical recycling process to produce recycled PET intended to be used for manufacture of materials and articles in contact with food. *EFSA J* 2011; 9(7): 2184. (25 pages).
13. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 435 (พ.ศ. 2565) ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่อง กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของภาชนะบรรจุที่ทำจากพลาสติก. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 139 ตอนพิเศษ 139 ง (วันที่ 17 มิถุนายน 2565) หน้า 11.
14. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. หลักเกณฑ์เงื่อนไข และแนวทางการประเมินประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตพลาสติกแปรใช้ใหม่และความปลอดภัยของเม็ดพลาสติกแปรใช้ใหม่สำหรับวัสดุสัมผัสอาหาร. [ออนไลน์]. 2565; [สืบค้น 7 ส.ค. 2566]; [18 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://food.fda.moph.go.th/media.php?id=512022642669264896&name=EvaluationCriteria.pdf>.
15. Welle F. Investigation into cross-contamination during cleaning efficiency testing in PET recycling. *Resour Conserv Recycl* 2016; 112: 65–72.
16. Félix JS, Alfaro P, Nerín C. Pros and cons of analytical methods to quantify surrogate contaminants from the challenge test in recycled polyethylene terephthalate. *Anal Chim Acta* 2011; 687(1): 67–74.
17. Latimer GW, editor. Official methods of analysis of AOAC International. 21st ed. Rockville, MD: AOAC International; 2019.
18. Bratinova S, Raffael B, Simoneau C. Guidelines for performance criteria and validation

- procedures of analytical methods used in controls of food contact materials. Luxembourg: European Communities; 2009.
19. Ellison SLR, Williams A, editors. EURACHEM/CITAC guide: quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. United Kingdom: EURACHEM/CITAC; 2012
 20. Komolprasert V, Lawson AR, Begley TH. Migration of residual contaminants from secondary recycled poly (ethylene terephthalate) into food-simulating solvents, aqueous ethanol and heptane. *Food Addit Contam* 1997; 14(5): 491-8.
 21. Hossain MS, Rahman MA. Post-consumer PET bottle recycling: chemical dose optimization. *J Eng Adv* 2020; 01(03): 70-5.
 22. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวทางปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
-

Method Development and Validation of Surrogate Organic Contaminants Analysis for Evaluation of the Recycled Polyethylene Terephthalate (rPET) Plastic Production Process by GC-MS

Chalathan Saengruengrit, Sasitorn Khaikaew, Passarin Saisuwan, Pimpisa Chaobon, Sasitorn Homdumrongvong, and Uma Boriboon

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

ABSTRACT The recycled Polyethylene terephthalate plastic (rPET) to be used as food packaging must be previously processed under efficient decontamination. According to the Notification of the Ministry of Public Health (No. 435) B.E. 2022, the decontamination steps in the recycling process must be displayed and the assessment of the surrogate contaminant testing is required. This study aimed to develop a method for the determination of surrogate organic contaminants in PET following contaminants removal. In this study, flakes of plastic containers were added with 4 organic substance groups of surrogate contaminants which included volatile polar (chlorobenzene), volatile non-polar (toluene), non-volatile polar (benzophenone and methyl salicylate), and non-volatile non-polar (lindane). The flakes were extracted using organic solvent then analyzed by GC-MS technique. Method validation data was indicated that the specificity was acceptable. The calibration curves of surrogate groups showed the good linear range with R^2 value > 0.995 . The LODs of surrogate groups 1-3 and 4 were 0.010 and 0.020 mg/kg, respectively, and the LOQs were 0.020 and 0.040 mg/kg, respectively. Accuracy and precision at 3 concentrations were investigated; %recovery, %RSD, and HORRAT were in the range of 86-102, 5.3-7.9, and 0.3-0.4, respectively. The analysis of PET plastic contaminated with all 4 groups of organic substances was monitored before and after cleaning under various conditions. In conclusion, the developed method is suitable for analysis of 4 groups of surrogate organic contaminant typically used to assess the efficiency of decontamination in the rPET production in compliance with legal requirements.

Keywords: Surrogate organic contaminants, Recycled PET plastic, Method development, Method validation, GC-MS

การศึกษาย้อนหลังของผลการรักษาโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ ด้วยยาริทูซิแมบชนิดชีววัตถุคล้ายคลึง

ชวภา ปิยะบุญญานนท์¹ พิมพ์ใจ นิการักษ์² และ นรมน อีระอัมพรพันธุ์²

¹กลุ่มงานอายุรกรรม โรงพยาบาลพระนั่งเกล้า นนทบุรี 11000

²คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 10400

บทคัดย่อ การรักษาหลักของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ คือให้ยาเคมีบำบัดร่วมกับยาโมโนโคลนอลแอนติบอดี CD20 ชื่อยาริทูซิแมบ (Rituximab) ซึ่งยาต้นแบบมีราคาสูง จึงพัฒนาชีววัตถุคล้ายคลึงที่มีผลการรักษาที่ไม่ต่างจากยาต้นแบบ ทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาอัตราการตอบสนอง (response rate) อัตราการอยู่รอด (survival rate) และผลข้างเคียง (side effect) ของยาริทูซิแมบชนิดชีววัตถุคล้ายคลึง (biosimilar rituximab) ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ในประเทศไทย การศึกษาเป็นเชิงพรรณนาจากผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ จำนวน 84 คน ค่ามัธยฐานอายุเท่ากับ 65 ปี (25-88 ปี) ให้ยาเคมีบำบัดร่วมกับยาริทูซิแมบชนิดชีววัตถุคล้ายคลึง ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2561 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2563 ในโรงพยาบาลรามธิบดีและโรงพยาบาลพระนั่งเกล้า ผลชิ้นเนื้อเป็นชนิด double expressor ร้อยละ 59.5 มีผู้ป่วยก่อนมะเร็งขนาดใหญ่ร้อยละ 63 มีผู้ป่วยระดับแลกเตทไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase; LDH) สูงกว่าปกติร้อยละ 69 หลังการรักษา 5 ปี พบว่าผลตอบสนองโรคสงบร้อยละ 84.5 ตอบสนองบางส่วนร้อยละ 3.6 และไม่ตอบสนองร้อยละ 11.9 ระยะเวลารอดชีวิตเฉลี่ย 50 เดือน ระยะเวลาปลอดโรคเฉลี่ย 53 เดือน พิจารณาตามคะแนน IPI ตั้งแต่ 0-4 พบระยะเวลารอดชีวิต 45, 56, 48, 47 และ 29 เดือน ตามลำดับ (p -value < 0.001) ผลข้างเคียงพบแบบไม่รุนแรงร้อยละ 9.5 และไม่พบผลข้างเคียงร้อยละ 90.5 จากการศึกษาพบว่าการรักษาโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ด้วยยาริทูซิแมบชนิดชีววัตถุคล้ายคลึงร่วมกับยาเคมีบำบัดมาตรฐานให้ผลการรักษาที่ดีและมีผลข้างเคียงน้อย

คำสำคัญ: มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์, ยาริทูซิแมบชนิดชีววัตถุคล้ายคลึง, ประสิทธิภาพ

Corresponding author E-mail: joe_chavada@hotmail.com

Received: 18 August 2023

Revised: 17 October 2023

Accepted: 31 October 2023

บทนำ

ยาิริทุซิแมบ (Rituximab) เป็นยาแอนติบอดี (therapeutic antibodies) ชนิด IgG ที่ออกฤทธิ์จับกับแอนติเจน (antigen) CD20 บนผิวเม็ดเลือดขาวชนิดบีเซลล์ (B-lymphocyte)⁽¹⁻⁴⁾ ได้รับการอนุมัติให้ใช้ทางการแพทย์ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1997 สำหรับการรักษาระยะเริ่มต้นน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ โดยให้ผลการรักษาและอัตราการรอดชีวิตโดยรวมที่เหนือกว่าการให้ยาเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียว^(5,6) จากผลศึกษาการรักษาโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ขนาดใหญ่ (diffuse large B-cell lymphoma) ด้วยยาเคมีบำบัดสูตรมาตรฐาน (standard CHOP chemotherapy) ซึ่งประกอบด้วยยา Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine และ Prednisolone เทียบกับการให้ยาิริทุซิแมบต้นแบบร่วมกับยาเคมีบำบัด R-CHOP (Rituximab with CHOP chemotherapy) พบผลตอบสนองอัตราการรอดชีวิตที่ 6 ปี เท่ากับร้อยละ 80 และร้อยละ 90 ตามลำดับ อัตราปลอดโรคที่ 6 ปี เท่ากับร้อยละ 56 และร้อยละ 74 ตามลำดับ พบว่าผู้ป่วยตอบสนองโรคสงบ (complete remission; CR) ร้อยละ 68 และร้อยละ 86 ตามลำดับ⁽⁵⁾ ในผู้ป่วยสูงอายุ 60-80 ปี ที่ได้ CHOP เปรียบเทียบกับ R-CHOP พบว่าผู้ป่วยตอบสนองโรคสงบ ร้อยละ 63 และร้อยละ 76 ตามลำดับ⁽⁷⁾

MabThera™ (Roche, USA) เป็นยาิริทุซิแมบต้นแบบที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย มีราคาสูง ทำให้ผู้ป่วยในประเทศกำลังพัฒนาบางรายที่มีข้อจำกัดไม่สามารถเข้าถึงยาได้⁽⁸⁾ บริษัทยาหลายแห่งได้พัฒนายาิริทุซิแมบชนิดชีววัตถุคล้ายคลึง (biosimilar rituximab)⁽⁹⁻¹³⁾ เช่น Reditux™ (Dr. Reddy's Laboratories, India), Truxima™ (Celltrion, South Korea), Rixathon™ (Sandoz, a Novartis division, Germany) เป็นยาทางเลือกที่ช่วยลดต้นทุนค่ายาิริทุซิแมบลงและทำให้ผู้ป่วยเข้าถึงยาได้มากขึ้น ยาิริทุซิแมบชนิดชีววัตถุคล้ายคลึงได้รับอนุมัติใช้ในอเมริกาและยุโรปในปี ค.ศ. 2017 มีการศึกษาที่เป็นหลักฐานเชิงประจักษ์ของยาิริทุซิแมบชนิดชีววัตถุคล้ายคลึงเพื่อยืนยันความคล้ายคลึงกับยาต้นแบบทั้งจากการวิเคราะห์คุณภาพ การศึกษาในสัตว์ทดลอง การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์/เภสัช

พลศาสตร์ การศึกษาการกระตุ้นปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และการศึกษาทางคลินิก⁽¹⁴⁾

การศึกษาการใช้ยาิริทุซิแมบชนิดชีววัตถุคล้ายคลึงในประเทศเนเธอร์แลนด์ พบว่าอัตราการรอดชีวิต 3 ปี อยู่ที่ร้อยละ 73 เท่ากับยาิริทุซิแมบต้นแบบที่มีอัตราการรอดชีวิต 3 ปี อยู่ที่ร้อยละ 73 เช่นกัน⁽¹⁵⁾ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังมีการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับประสิทธิภาพและผลข้างเคียงของยาิริทุซิแมบชนิดชีววัตถุคล้ายคลึงในประเทศไทยน้อย จึงเป็นที่มาของการศึกษาย้อนหลังโดยการทบทวนเวชระเบียน เพื่อศึกษาประสิทธิภาพ อัตราการตอบสนอง อัตราโรคสงบ ระยะเวลาการรอดชีวิต ระยะเวลาปลอดโรคกลับเป็นซ้ำ และผลข้างเคียงจากยาิริทุซิแมบชนิดคล้ายคลึงในผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ในโรงพยาบาลรามธิบดีและโรงพยาบาลพระนั่งเกล้า จำนวน 84 ราย

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วย

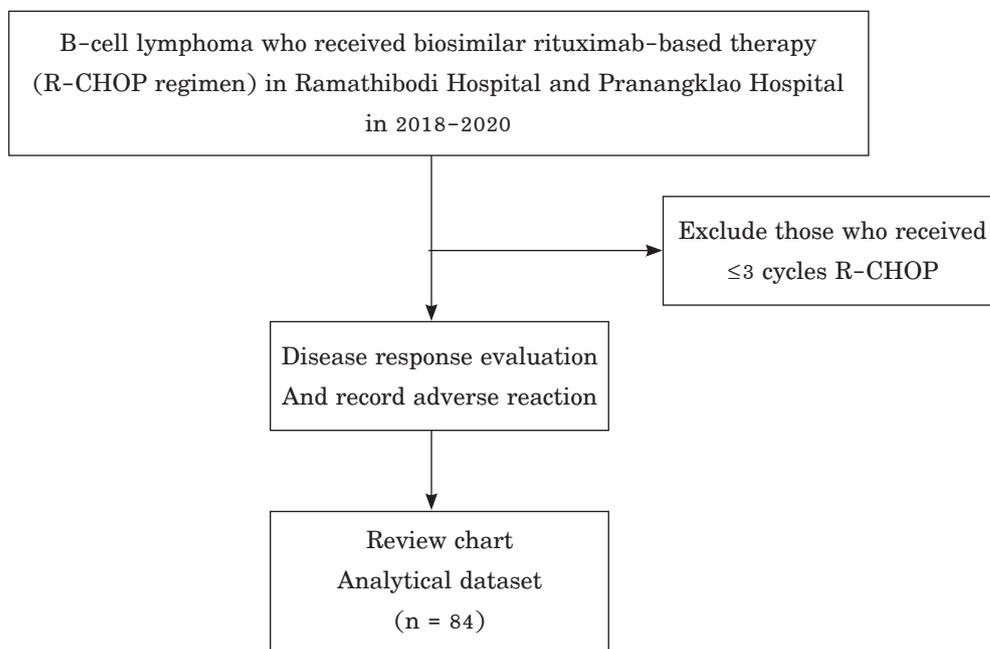
เก็บข้อมูลจากเวชระเบียนโดยเลือกผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ (B-cell lymphoma) ในโรงพยาบาลรามธิบดีและโรงพยาบาลพระนั่งเกล้า โดยศึกษาข้อมูลจากผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาในช่วงระหว่างวันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2561 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ. 2563 จำนวน 84 ราย จากโรงพยาบาลรามธิบดี จำนวน 64 ราย และจากโรงพยาบาลพระนั่งเกล้า จำนวน 20 ราย ซึ่งผู้ป่วยโรคหลักที่เข้าร่วมในการศึกษาคือ ผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ขนาดใหญ่ จำนวน 80 ราย รวมทั้งกลุ่มโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ขนาดใหญ่ (large B-cell lymphoma) ตำแหน่งอื่น ได้แก่ ผู้ป่วย primary mediastinal B-cell lymphoma จำนวน 2 ราย ผู้ป่วย primary CNS B-cell lymphoma จำนวน 1 ราย และผู้ป่วย intravascular large B-cell lymphoma จำนวน 1 ราย โดยผู้ป่วยทั้งหมดได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดมาตรฐานสูตร R-CHOP (Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, Prednisolone) อย่างน้อย 3 รอบเคมีบำบัดขึ้นไป

เกณฑ์คัดเข้า (inclusion criteria) ได้แก่ ผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ อายุมากกว่า 18 ปีขึ้นไป

ที่ได้รับการรักษาด้วยยา rituximab ชนิดชีววัตถุคล้ายคลึง สูตร R-CHOP มากกว่า 3 รอบเคมีบำบัด ในโรงพยาบาล รามาธิบดีและโรงพยาบาลพระนั่งเกล้า

เกณฑ์คัดออก (exclusion criteria) ได้แก่ ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา rituximab ชนิดชีววัตถุคล้ายคลึง สูตร R-CHOP น้อยกว่า 3 รอบเคมีบำบัด

การคำนวณขนาดตัวอย่างใช้วิธีอ้างอิงจากการศึกษาก่อนหน้า ซึ่งใช้ขนาดตัวอย่าง จำนวน 84 คน เก็บข้อมูลแบบ retrospective cohort study โดยเก็บข้อมูลประวัติผู้ป่วยย้อนหลังจากเวชระเบียน ค้นประวัติสำคัญ เช่น การวินิจฉัยโรค ผลชิ้นเนื้อ สูตรยาที่ได้รับ ผลข้างเคียง ผลการตอบสนอง โดยบันทึกข้อมูลตามแบบบันทึกข้อมูลผู้ป่วย ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การดำเนินงานวิจัย (Protocol flow chart)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลผู้ป่วยด้านอายุ เพศ ระยะโรค (Ann arbor stage) จำนวนตำแหน่งโรคนอกต่อมน้ำเหลือง ผลเลือดระดับ lactate dehydrogenase (LDH) สมรรถภาพผู้ป่วย ECOG performance score (eastern cooperative oncology group) คะแนนพยากรณ์โรค IPI score (international prognosis index) จำนวนรอบยาเคมีบำบัด ระดับการตอบสนองต่อการรักษา และการเกิดโรคกลับ ได้ถูกบันทึกไว้และวิเคราะห์ด้วยสถิติโดยใช้โปรแกรม STATA เวอร์ชัน 16.1 (StataCorp, College Station, TX) ใช้ pearson chi-square (χ^2) test เพื่อเปรียบเทียบกลุ่มอายุและใช้วิธี Kaplan-Meier เพื่อประเมินผลการรักษา ระยะเวลารอดชีวิต overall

survival (OS) และใช้สถิติ log-rank test เพื่อประเมินความแตกต่างของอัตราการตอบสนองต่อการรักษาของผู้ป่วยแต่ละกลุ่ม ใช้ผลจากการวิเคราะห์ด้วย cox regression เพื่อคำนวณค่าความเสี่ยง hazard ratio โดยช่วงความเชื่อมั่นที่ 95% confidence intervals (CIs) โดยแต่ละตัวแปรในการศึกษานี้ใช้ค่าความเชื่อมั่น p-value ที่น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

จริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลพระนั่งเกล้า อนุมัติเมื่อวันที่ 8 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2564 ตามเอกสารหมายเลข EC11/2564 และโรงพยาบาล

รามาริบัติ อนุมัติเมื่อวันที่ 4 มิถุนายน พ.ศ. 2564
ตามเอกสารหมายเลข COA. MURA2021/504

ผล

จากข้อมูลผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์
ในโรงพยาบาลรามาริบัติและโรงพยาบาลพระนั่งเกล้า

ที่ได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด R-CHOP อย่างน้อย
3 รอบเคมีบำบัดขึ้นไป ในช่วงระหว่างวันที่ 1 มกราคม
พ.ศ. 2561 ถึงวันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2563 ทั้งหมด
จำนวน 84 ราย ข้อมูลพื้นฐานทั่วไปและข้อมูลเกี่ยวกับโรค
ตั้งแสดงในตารางที่ 1 และข้อมูลผลการรักษา ตั้งแสดง
ในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ข้อมูลพื้นฐานและข้อมูลเกี่ยวกับโรคของผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ที่ได้รับการรักษาด้วย
ยาิริทุซิแมบชนิดชีววัตถุคล้ายคลึง

Characteristic	Rituximab biosimilar (N = 84)	
	Number	%
Disease subtype		
Diffuse large B-cell lymphoma	80	95.2
Primary mediastinal B-cell lymphoma	2	2.4
Primary CNS B-cell lymphoma	1	1.2
Intravascular B-cell lymphoma	1	1.2
Sex		
Female	44	52.4
Male	40	47.6
Age, year [median (range)]	65 (25–88)	
Age, year		
≤ 60	27	32.1
> 60	57	67.9
Ann Arbor stage		
I	6	7.1
II	30	35.7
III	11	13.1
IV	37	44
Lactate dehydrogenase (LDH)		
Normal	26	31
Elevated	58	69

ตารางที่ 1 ข้อมูลพื้นฐานและข้อมูลเกี่ยวกับโรคของผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ที่ได้รับการรักษาด้วย ยาริทูซิแมบชนิดชีววัตถุคล้ายคลึง (ต่อ)

Characteristic	Rituximab biosimilar (N = 84)	
	Number	%
ECOG performance status		
0	43	51.2
1	29	34.5
2	11	13.1
3	1	1.2
Bulky		
Bulky	53	63.1
Non-Bulky	31	36.9
Pathology		
GCB	23	27.4
Non-GCB	57	67.9
NA	4	4.7
Double expressor lymphoma; DEL		
DEL	50	59.5
Non DEL	34	40.5
International prognostic index; IPI score		
0	5	6
1	21	25
2	22	26.2
3	19	22.6
4	16	19
5	1	1.2

ตารางที่ 2 ข้อมูลผลการรักษาโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ด้วยยาริทูซิแมบชนิดชีววัตถุคล้ายคลึง

Characteristic	Rituximab biosimilar (N = 84)	
	Number	%
Median OS (month)	50	(0-71)
Response		
Complete remission; CR	71	84.5
Partial response; PR	3	3.6
Progressive disease; PD	10	11.9
Stable disease	0	0

ตารางที่ 2 ข้อมูลผลการรักษาโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ด้วยยาไรทีอิมบิแมบชนิดชีววัตถุคล้ายคลึง (ต่อ)

Characteristic	Rituximab biosimilar (N = 84)	
	Number	%
Relapse		
Relapse in 2 year	18	21.4
No relapse	53	63.1
NA/Missing data	13	15.5
Adverse reaction		
Mild infusion-related reaction	8	9.5
No adverse reaction	76	90.5

อัตราการตอบสนองต่อการรักษา

ผลการรักษาได้โรคสงบ จำนวน 71 ราย คิดเป็นร้อยละ 84.5 โรคตอบสนองบางส่วน (partial remission; PR) จำนวน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.6 และโรคไม่ตอบสนองหรือเป็นมากขึ้น (progressive disease; PD) จำนวน 10 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.9 ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อการรักษาที่ใกล้เคียงกับยาไรทีอิมบิแมบต้นแบบ⁽⁵⁾

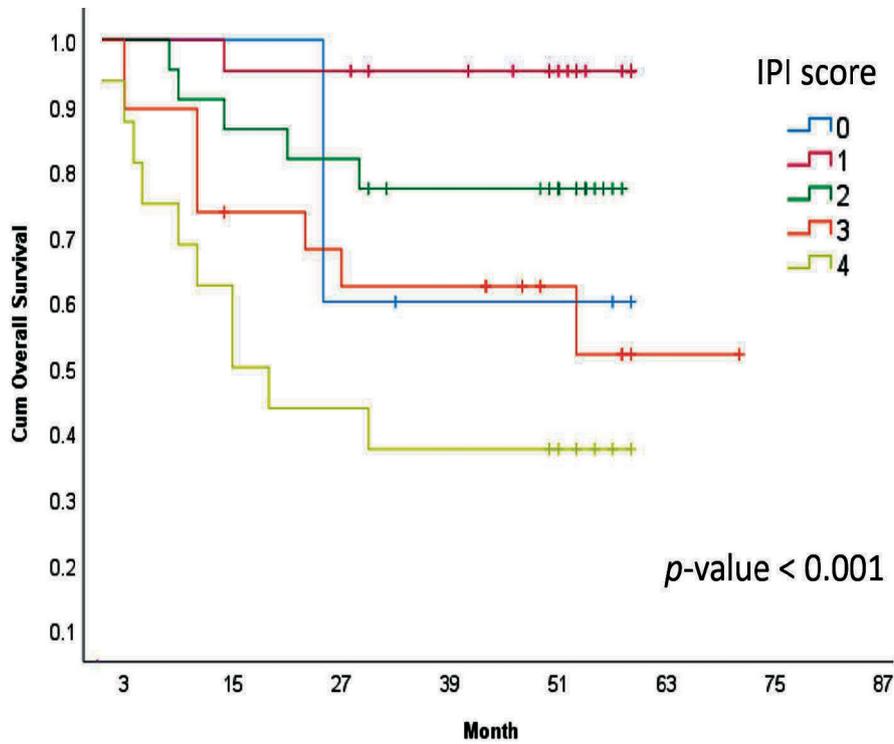
ระยะเวลารอดชีวิต

ระยะเวลารอดชีวิตเฉลี่ยของผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ในโรงพยาบาลรามธิบดีและโรงพยาบาลพระนั่งเกล้าที่ได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด R-CHOP คือ 52.7 เดือน

เมื่อพิจารณาแยกตามคะแนน IPI score ตั้งแต่ 0-4 พบว่ามีระยะเวลารอดชีวิตที่ 45, 56, 48, 47 และ 29 เดือน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 และมีค่า *p*-value < 0.001 ดังแสดงในภาพที่ 2

ตารางที่ 3 ระยะเวลารอดชีวิตเฉลี่ยของผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์แยกตาม IPI score

IPI	Estimate	Standard error	95% CI lower bound	95% CI upper bound
0	45.400	7.449	30.800	60.000
1	56.857	2.091	52.758	60.956
2	48.500	3.820	41.013	55.987
3	47.283	6.520	34.504	60.063
4	29.063	6.039	17.227	40.898
Overall	52.653	2.969	46.833	58.473



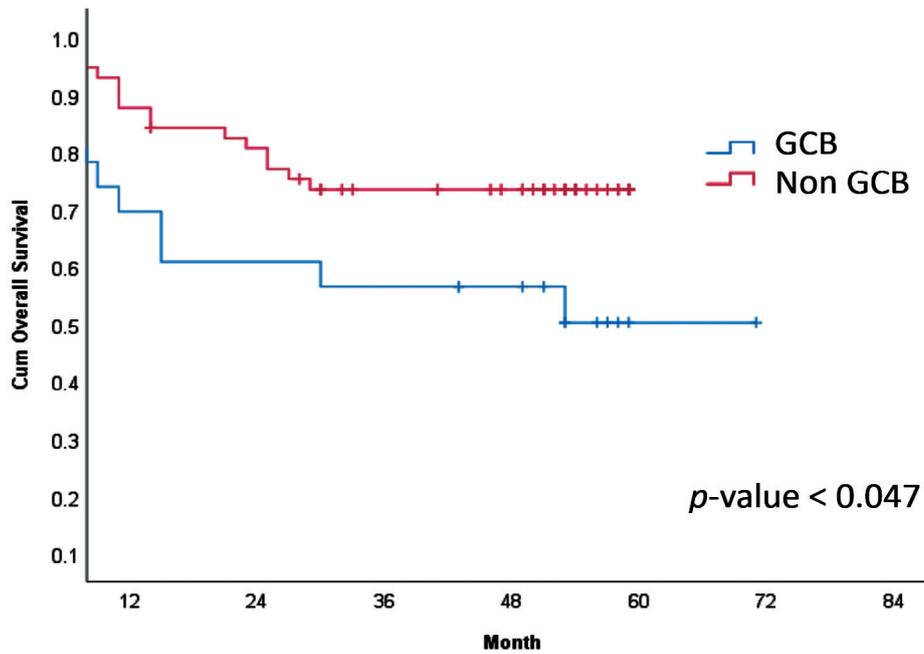
ภาพที่ 2 ระยะเวลารอดชีวิตเฉลี่ยของผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์แยกตาม IPI score

เมื่อพิจารณาแยกตามชนิดเซลล์ germinal center B-cell lymphoma (GCB subtype) และเซลล์ชนิดที่ไม่ใช่ germinal center B-cell (non-GCB subtype)

พบว่าระยะเวลารอดชีวิตแตกต่างกันที่ 43 และ 47 เดือนตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4 และมีค่า $p\text{-value} < 0.047$ ดังแสดงในภาพที่ 3

ตารางที่ 4 ระยะเวลารอดชีวิตเฉลี่ยของผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์แยกตามชนิดเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง GCB และ non-GCB

Subtype	Estimate	Standard error	95% CI lower bound	95% CI upper bound
GCB	43.174	6.341	30.745	55.603
Non-GCB	47.420	2.627	42.271	52.568
Overall	52.385	3.063	46.381	58.389



ภาพที่ 3 ระยะเวลารอดชีวิตเฉลี่ยของผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์แยกตามชนิดเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง GCB และ non-GCB

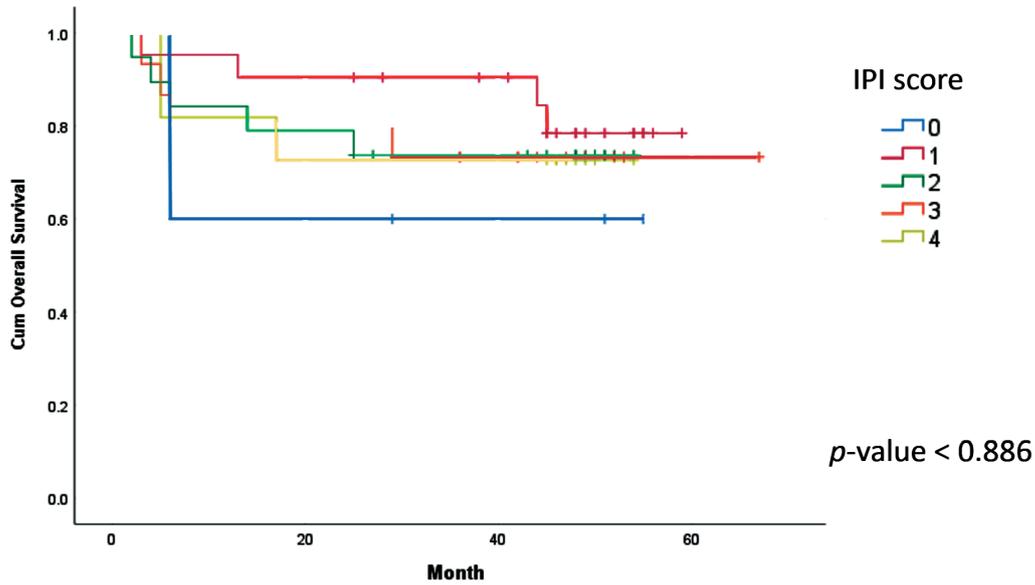
ระยะเวลาปลอดโรค

ระยะเวลาที่ผู้ป่วยปลอดโรคกลับเป็นซ้ำเฉลี่ยของผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ที่ได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด R-CHOP คือ 53.1 เดือน

เมื่อพิจารณาแยกตามคะแนน IPI score ตั้งแต่ 0-4 พบว่ามีระยะเวลาที่โรคมะเร็งกลับมาเป็นซ้ำที่ 35, 52, 42, 52 และ 41 เดือน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5 และมีค่า p -value <math>< 0.886</math> ดังแสดงในภาพที่ 4

ตารางที่ 5 ระยะเวลาปลอดโรคกลับของผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์แยกตาม IPI score

IPI score	Estimate	Standard error	95% CI	
			lower bound	upper bound
0	35.400	10.735	14.359	56.441
1	52.394	3.364	45.799	58.988
2	42.474	4.535	33.585	51.362
3	52.000	6.576	39.111	64.889
4	41.727	6.108	29.756	53.699
Overall	53.140	2.903	47.449	58.830



ภาพที่ 4 ระยะเวลาปลอดโรครีบของผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์แยกตาม IPI score

เมื่อพิจารณาแยกตามชนิดเซลล์ germinal center B-cell lymphoma (GCB subtype) และ เซลล์ชนิดที่ไม่ใช่ germinal center B-cell (non-GCB subtype) พบว่ามีระยะเวลาโรคมะเร็งกลับมาเป็นซ้ำเฉลี่ยแตกต่างกันที่ 51 และ 47 เดือน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 และมีค่า $p < 0.694$ ดังแสดงในภาพที่ 5

อัตราการเกิดโรครีบ

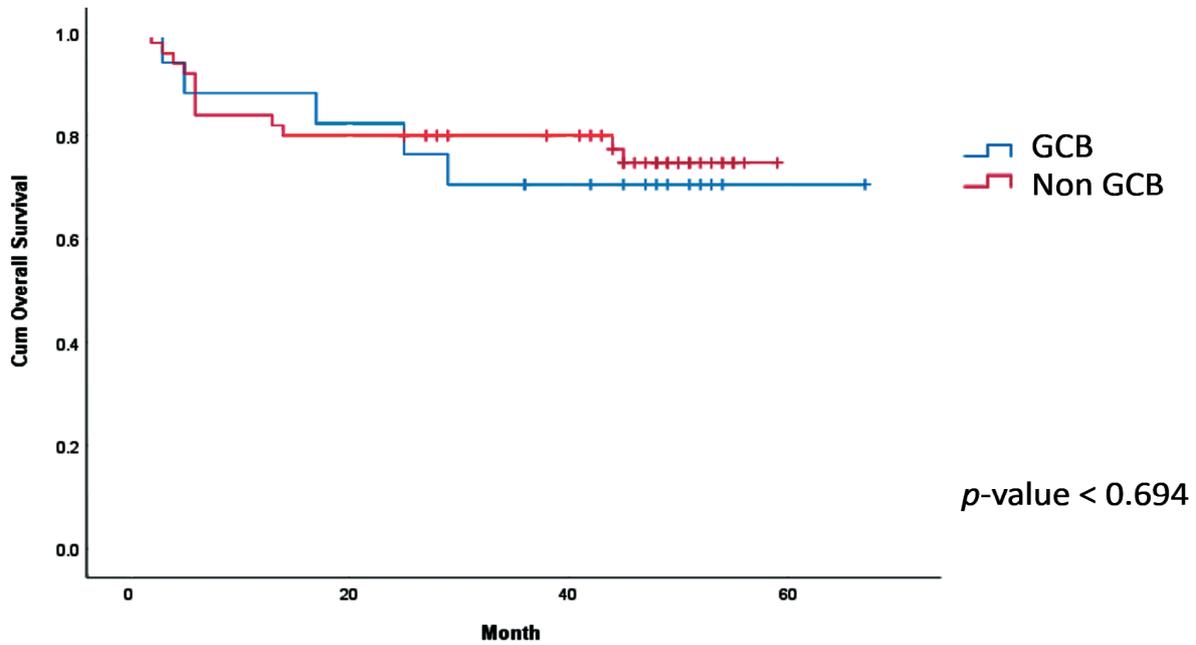
พบผู้ป่วยที่โรครีบเป็นซ้ำภายใน 2 ปี จำนวน 18 ราย คิดเป็นร้อยละ 21.4 และผู้ป่วยที่ยังไม่มีโรครีบเป็นซ้ำใน 2 ปี จำนวน 53 ราย คิดเป็นร้อยละ 63.1

อัตราการเกิดผลข้างเคียง

พบผู้ป่วยที่เกิดผลข้างเคียงขณะให้ยาทั้งหมดจำนวน 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 9.5 โดยผลข้างเคียงเป็นอาการผื่นคันขณะให้ยา (infusion-related reaction, IRR) ที่สามารถให้ยาต่อได้ โดยเพิ่มระยะเวลาให้ยาลดอัตราเร็วในการให้ยา และเพิ่มยาลดอาการแพ้กลุ่มสเตียรอยด์และยาแอนติฮีสตามีน โดยไม่มีผู้ป่วยรายใดเกิดผลข้างเคียงรุนแรงจนถึงขั้นต้องหยุดให้ยา

ตารางที่ 6 ระยะเวลาปลอดโรครีบของผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ แยกตามชนิดเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง GCB และ non-GCB

Subtype	Estimate	Standard error	95% CI lower bound	95% CI upper bound
GCB	51.941	5.821	40.532	63.351
Non-GCB	47.739	2.972	41.915	53.563
Overall	53.220	2.971	47.396	59.044



ภาพที่ 5 ระยะเวลาปลอดโรคกลับของผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ แยกตามชนิดเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง GCB และ non-GCB

วิจารณ์

การศึกษานี้เป็นการศึกษาย้อนหลังเกี่ยวกับผล การรักษาโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ ของผู้ป่วย ในโรงพยาบาลรามธิบดีและโรงพยาบาลพระนั่งเกล้า จำนวน 84 ราย ที่ได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดสูตร R-CHOP อย่างน้อย 3 รอบขึ้นไป เพื่อศึกษาประสิทธิภาพ และผลข้างเคียงที่สำคัญของยาปฏิชีวนะชนิดชีววัตถุ คล้ายคลึง ซึ่งเป็นยาหลักในการรักษาโรคมะเร็ง ต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ทั่วโลกในปัจจุบัน เนื่องจาก ยาปฏิชีวนะต้นแบบเป็นยานอกบัญชียาหลักแห่งชาติ ที่มีราคาแพง เมื่อมีการพัฒนายาปฏิชีวนะชนิดชีววัตถุ คล้ายคลึงจึงเริ่มนำมาใช้รักษาผู้ป่วยอย่างแพร่หลาย มากขึ้น เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการรักษาและเพิ่ม การเข้าถึงยาปฏิชีวนะมากขึ้น โดยประมาณค่าใช้จ่าย ในการรักษาผู้ป่วย 1 ราย ด้วยยาปฏิชีวนะชนิดชีววัตถุ คล้ายคลึงในประเทศไทย คิดเป็น 73,600 บาท เปรียบเทียบ กับ 193,456 บาท เมื่อใช้ยาปฏิชีวนะต้นแบบ⁽¹⁶⁾

การศึกษผลการรักษาในระยะยาว โดยศึกษาอัตราการตอบสนองต่อการรักษา ติดตามระยะเวลาที่ผู้ป่วยรอดชีวิตและระยะเวลาที่ผู้ป่วยอยู่โดยปลอดโรคกลับ เป็นซ้ำ รวมถึงศึกษาผลข้างเคียงที่สำคัญของยาปฏิชีวนะ

เนื่องจากประชากรในโรงพยาบาลพระนั่งเกล้า (20 ราย) มีสัดส่วนน้อยกว่าโรงพยาบาลรามธิบดี (64 ราย) โดยมี baseline characteristic ใกล้เคียงกันมากและเป็นโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดเซลล์แบบเดียวกัน ได้รับยาเดียวกันทั้งหมด จึงได้ทำการวิเคราะห์ผลรวมกัน

การรักษามะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ ด้วย ยาปฏิชีวนะชนิดชีววัตถุคล้ายคลึง พบว่าผลการรักษา โรคสงบ มีจำนวน 71 ราย คิดเป็นร้อยละ 84.5 ซึ่งจาก ผลการศึกษาในต่างประเทศพบว่าอัตราโรคสงบหลังได้ ยาปฏิชีวนะชนิดชีววัตถุคล้ายคลึงอยู่ที่ร้อยละ 72 เทียบกับ ยาปฏิชีวนะต้นแบบที่ให้การตอบสนองโรคสงบ ร้อยละ 74⁽⁵⁾

ผู้ป่วยโรคตอบสนองบางส่วน จำนวน 3 ราย คิดเป็น ร้อยละ 3.6 และโรคไม่ตอบสนองหรือเป็นมากขึ้น จำนวน 10 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.9 ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อการ รักษาที่ใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะต้นแบบ⁽⁵⁾

ผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ที่ได้รับ ยาปฏิชีวนะชนิดชีววัตถุคล้ายคลึง ประกอบในสูตรยา มาตรฐาน มีระยะเวลารอดชีวิตเฉลี่ย 52.7 เดือน มีผู้ป่วย ที่โรคกลับเป็นซ้ำภายใน 2 ปี จำนวน 18 ราย คิดเป็น ร้อยละ 21.4 และผู้ป่วยที่ยังไม่มีโรคกลับเป็นซ้ำใน 2 ปี

จำนวน 53 ราย คิดเป็นร้อยละ 63.1 จากการศึกษ พบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ที่ได้รับยา ไรทูซิแมบชนิดชีววัตถุคล้ายคลึงมีผลข้างเคียงทั้งหมด 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 9.5 โดยผลข้างเคียงเป็นอาการผื่นคัน ขณะให้ยาที่สามารถให้ยาต่อได้ โดยไม่มีผู้ป่วยรายใด เกิดผลข้างเคียงรุนแรงจนถึงขั้นต้องหยุดให้ยา ซึ่งพบ อัตราการเกิดผลข้างเคียงน้อย เมื่อเทียบกับการศึกษา ก่อนหน้านี้ที่พบผลข้างเคียง infusion-related reaction ในการให้ยาไรทูซิแมบครั้งแรกได้ร้อยละ 15.9⁽¹⁷⁾

สรุป

การรักษาโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ ด้วยยาไรทูซิแมบชนิดชีววัตถุคล้ายคลึง ประกอบในสูตรยา เคมีบำบัดมาตรฐาน ให้ผลการรักษาที่ดี มีผลข้างเคียงน้อย ให้ระยะเวลารอดชีวิตและระยะเวลาปลอดโรคกลับเป็นซ้ำที่ยาวนาน และช่วยลดต้นทุนค่าใช้จ่ายในการรักษา ผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดบีเซลล์ในประเทศไทย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณาจารย์หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชา อายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล และหน่วยเคมีบำบัด โรงพยาบาล พระนั่งเกล้าที่ให้การสนับสนุนการเก็บข้อมูลผู้ป่วยและ ให้คำแนะนำการวิเคราะห์ข้อมูล ตลอดจนเจ้าหน้าที่ พยาบาลและเภสัชกรของโรงพยาบาลรามธิบดีและ โรงพยาบาลพระนั่งเกล้าที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการ ทำวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. Boross P, Leusen JH. Mechanisms of action of CD20 antibodies. *Am J Cancer Res* 2012; 2(6): 676-90.
2. Weiner GJ. Rituximab: mechanism of action. *Semin Hematol* 2010; 47(2): 115-23.
3. Feugier P. A review of rituximab, the first anti-CD20 monoclonal antibody used in the treatment of B non-Hodgkin's lymphomas.

Future Oncol 2015; 11(9): 1327-42.

4. Salles G, Barrett M, Foà R, Maurer J, O'Brien S, Valente N, et al. Rituximab in B-cell hematologic malignancies: a review of 20 years of clinical experience. *Adv Ther* 2017; 34(10): 2232-73.
5. Pfreundschuh M, Kuhnt E, Trümper L, Osterborg A, Trneny M, Shepherd L, et al. CHOP-like chemotherapy with or without rituximab in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol* 2011; 12(11): 1013-22.
6. Marcus R, Imrie K, Belch A, Cunningham D, Flores E, Catalano J, et al. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood* 2005; 105(4): 1417-23.
7. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346(4): 235-42.
8. Intragumtornchai T, Bunworasate U, Siritanaratkul N, Khuhapinant A, Nawarawong W, Norasetthada L, et al. Inferior progression-free survival for Thai patients with diffuse large B-cell lymphoma treated under Universal Coverage Scheme: the impact of rituximab inaccessibility. *Leuk Lymphoma* 2013; 54: 83-9.
9. Jurczak W, Długosz-Danecka M. Rituximab biosimilars in clinical practice. *Leuk Lymphoma* 2020; 61(7): 1523-24.
10. Gota V, Karanam A, Rath S, Yadav A, Tembhare P, Subramanian P, et al. Population pharmacokinetics of Reditux™, a biosimilar Rituximab, in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016; 78(2): 353-9.
11. Roy PS, John S, Karankal S, Kannan S, Pawaskar P, Gawande J, et al. Comparison of the

- efficacy and safety of Rituximab (Mabthera™) and its biosimilar (Reditux™) in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with chemo-immunotherapy: a retrospective analysis. *Indian J Med Paediatr Oncol* 2013; 34(4): 292-8.
12. Kim WS, Coiffier B, Buske C, Ogura M, Kwak L, Jurczak W, et al. CT-P10 versus reference rituximab in combination with CVP in advanced-stage follicular lymphoma: Phase 3, double-blind, randomized trial. *Ann Oncol* 2017; 28: 94.
 13. Rioufol C, Salles G. Biosimilar monoclonal antibodies in lymphoma: a critical appraisal. *Expert Rev Anticancer Ther* 2015; 15(5): 569-78.
 14. สมาคมรูมาตีสซึ่มแห่งประเทศไทย. คำแถลงฉันทามติการใช้ยาชีววัตถุคล้ายคลึงในการรักษารูมาตีสซึ่มและออโตอิมมูน ฉบับที่ 4. กรุงเทพฯ: สมาคมรูมาตีสซึ่มแห่งประเทศไทย; 2566. หน้า 6-7.
 15. Brink M, Kahle XU, Vermaat JSP, Zijlstra JM, Chamuleau M, Kersten MJ, et al. Impact of rituximab biosimilars on overall survival in diffuse large B-cell lymphoma: a Dutch population-based study. *Blood Adv* 2021; 5(15): 2958-64.
 16. กลุ่มนโยบายแห่งชาติด้านยา. ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่องกำหนดราคากลางยา พ.ศ. 2562. [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 1 กรกฎาคม 2566]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: https://ndi.fda.moph.go.th/drug_value/index.
 17. Ding J, Leng Z, Gu H, Jing X. A novel prednisone premedication protocol significantly decreases infusion-related reactions of rituximab in newly diagnosed diffuse large B-cell lymphoma. *Oncol Lett* 2023; 25: 258. (7 pages).

Biosimilars of Rituximab-based Therapy for Treatment of B-cell Lymphoma: A Retrospective Analysis

Chavada Piyabun-yanon¹, Pimjai Niparuck² and Noramon Teeraumpornpant²

¹Medicine unit, Pranangklaao Hospital, Nonthaburi 11000, Thailand

²Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

ABSTRACT Rituximab is a monoclonal anti-CD20 antibody used with chemotherapy to treat B-cell lymphoma. Rituximab with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisolone (R-CHOP) is a standard chemoimmunotherapy regimen for treating diffuse large B-cell lymphoma worldwide. As original rituximab is still expensive, so biosimilar of rituximab has been developed and used widely in many countries. Our objectives were to study the efficacy and safety of biosimilar rituximab for treatment of B-cell lymphoma in Thailand. Retrospective descriptive study was conducted in 84 patients with B-cell lymphoma. the patients received biosimilar rituximab plus CHOP chemotherapy in Ramathibodi and Pranangklaao hospitals from January 2018 to December 2020. A total of 84 patients with B-cell lymphoma were evaluated and their mean age was 65 years (range, 25–88 years). Of all the patients, 59.5% had double expressor lymphoma expression, 63% had bulky disease, and 69% had high serum lactate dehydrogenase (LDH); and after 5 years of follow-up, 84.5% were found to have complete remission, 3.6% had partial remission and 11.9% had progressive disease. The median survival time was 50 months and the median progression-free survival was 53 months. Based on each IPI score 0–4, the overall survival periods were 45, 56, 48, 47 and 29 months, respectively (p -value < 0.001). Regarding adverse events, 9.5% had only mild infusion-related reactions and 90.5% had no adverse drug reactions. Thus, biosimilar rituximab and standard chemotherapy together are quite efficacious for treating B-cell lymphoma, causing just minor side effects.

Keywords: B-cell lymphoma, Biosimilar rituximab, Efficacy

การเตรียมห้องปฏิบัติการอณูชีวโมเลกุล ในการตรวจหาเชื้ออุบัติใหม่: ประสบการณ์จากการระบาดใหญ่ ของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ที่สถาบันบำราศนราดูร

สุมนมัลย์ อุทัยมกุล

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การแพร่ระบาดของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ในปี 2019 หรือ Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus-2 (SARS-CoV-2) ที่ก่อโรค COVID-19 เริ่มมีรายงานในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 จากการพบกลุ่มผู้ป่วยอาการปอดบวมโดยไม่ทราบสาเหตุ ณ เมืองอู่ฮั่น สาธารณรัฐประชาชนจีน และได้แพร่กระจายไปทั่วโลก การตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็นขั้นตอนสำคัญในการวินิจฉัยและรักษาผู้ป่วย รวมทั้งใช้สอบสวน เฝ้าระวัง และป้องกันโรค โดยองค์การอนามัยโลกแนะนำให้วินิจฉัยเชื้อไวรัสด้วยวิธีการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมสำหรับคัดกรองผู้ที่เข้าข่ายสงสัยติดเชื้อ ประกอบกับรัฐบาลไทยได้ขอความร่วมมือทุกจังหวัดให้ดำเนินการตามนโยบาย หนึ่งจังหวัด-หนึ่งแล็บ ดังนั้นการเตรียมห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) โดยการจัดทำแผนผังลำดับงานที่เป็นมาตรฐานและปฏิบัติงานอย่างปลอดภัยด้วยชีวนิรภัยระดับ 2 แบบเสริมสมรรถนะ (biosafety level 2 enhance) สำหรับเชื้ออันตรายกลุ่มเสี่ยงระดับ 3 จึงเป็นสิ่งเร่งด่วนในสถานการณ์ระบาดทั่วโลก การนำระบบจัดการคุณภาพมาปรับใช้ออกแบบห้องปฏิบัติการ โดยแบ่งพื้นที่สำหรับกิจกรรมก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการทำปฏิกิริยา PCR ได้แก่ ห้องเตรียมน้ำยา และห้องสกัดสารพันธุกรรม พื้นที่สำหรับตรวจวัดสารพันธุกรรมที่ตั้งเครื่อง real-time PCR เป็นห้องสำหรับเพิ่มปริมาณและตรวจหาสารพันธุกรรม รวมทั้งวิเคราะห์ผลตรวจโดยเสนอรูปแบบของการจัดห้องปฏิบัติการ ไว้ 2 ระบบ คือ semi-automation และ fully automation จากประสบการณ์ปฏิบัติงานด้วยเทคนิค PCR และการบริหารจัดการด้านความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจด้านอณูชีวโมเลกุลสำหรับเชื้ออุบัติใหม่อื่นๆ ที่จัดอยู่ในกลุ่มเสี่ยงระดับ 3 ต่อไป

คำสำคัญ: การเตรียมห้องปฏิบัติการอณูชีวโมเลกุล, เชื้ออุบัติใหม่, ไวรัสโคโรนา 2019

Corresponding author E-mail: sumonmal.u@dmsc.mail.go.th

Received: 22 July 2023

Revised: 19 October 2023

Accepted: 20 October 2023

บทนำ

จากสถานการณ์การระบาดของโรคปอดอักเสบจากเชื้อไวรัสที่ไม่ทราบสาเหตุ ซึ่งภายหลังองค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) ได้ตั้งชื่อเป็นโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (coronavirus disease; COVID-19) หรือโรคโควิด 19 ประเทศไทยเริ่มตอบโต้การระบาดของโรคโควิด 19 ด้วยการเปิดศูนย์ปฏิบัติการภาวะฉุกเฉินทางสาธารณสุข (Emergency Operation Center; EOC) เมื่อวันที่ 4 มกราคม พ.ศ. 2563 กรณีโรคปอดอักเสบรุนแรงจากเชื้อไวรัส และแต่งตั้งคณะทำงานเพื่อเฝ้าระวังและติดตามสถานการณ์การระบาดของโรค วันที่ 13 มกราคม พ.ศ. 2563 มีรายงานพบผู้ป่วยยืนยันติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่รายแรกในประเทศไทย โดยเป็นนักท่องเที่ยวชาวจีนและเป็นผู้ป่วยยืนยันติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่รายแรกนอกสาธารณรัฐประชาชนจีน และในวันที่ 15 มกราคม พ.ศ. 2563 พบผู้ป่วยคนไทยรายแรกติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ที่มีประวัติเดินทางกลับจากต่างประเทศ ต่อมาวันที่ 31 มกราคม พ.ศ. 2563 กระทรวงสาธารณสุขแถลงการณ์พบผู้ป่วยคนไทยรายแรกติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ภายในประเทศ

จากสถานการณ์เมื่อวันที่ 8 มกราคม พ.ศ. 2563 มีรายงานพบผู้ป่วยเข้าเกณฑ์เฝ้าระวัง (patient under investigation; PUI) เป็นนักท่องเที่ยวชาวจีน จากการตรวจ ณ จุดคัดกรองโรคที่สนามบินสุวรรณภูมิ โดยทีมงานกองด่านควบคุมโรคติดต่อระหว่างประเทศ กรมควบคุมโรค⁽¹⁾ ซึ่งถูกส่งต่อไปกักกันโรคและทำการรักษาที่สถาบันบำราศนราดูร โดยเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อคัดกรองหาเชื้อก่อโรคทางเดินหายใจ 33 ชนิด ด้วยวิธี real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) ที่ห้องปฏิบัติการอณูชีวโมเลกุลของสถาบันบำราศนราดูร แต่ไม่พบการติดเชื้อใดๆ ตามแนวทางของการสอบสวนโรคเพื่อหาสาเหตุสำหรับวินิจฉัยโรค จะมีการส่งตัวอย่างไปตรวจเพิ่มเติมที่ห้องปฏิบัติการอ้างอิง 2 แห่ง ได้แก่ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคอุบัติใหม่ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สภากาชาดไทย ซึ่งได้ตรวจหากลุ่มเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค

polymerase chain reaction (Family-Wide polymerase chain reaction (PCR))⁽²⁾ ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหากลุ่มของเชื้อไวรัสโคโรนาที่ตำแหน่งยีนต่างๆ และพบผลบวก coronavirus เมื่อนำไปถอดรหัสพันธุกรรมแบบ direct sequencing ได้ผลตรวจเป็น bats severe acute respiratory syndrome (SARS) like coronavirus (CoV) ส่วนกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ตรวจตัวอย่างเชื้อผู้ป่วยรายแรกของประเทศไทย ด้วยวิธี real-time RT-PCR พร้อมกันใช้เทคโนโลยี next generation sequencing ทำการถอดรหัสพันธุกรรมได้สำเร็จ ซึ่งเป็นการตรวจหา whole genome sequencing novel coronavirus 2019 (Wuhan strain) โดยวันที่ 11 มกราคม พ.ศ. 2563 รัฐบาลสาธารณรัฐประชาชนจีนได้เผยแพร่ข้อมูลรหัสพันธุกรรมทำให้สามารถนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกันได้ และวันที่ 12 มกราคม พ.ศ. 2563 ผู้เชี่ยวชาญได้ยืนยันว่าผู้ป่วยรายนี้มีเชื้อตรงกัน จึงได้มีการประกาศพบผู้ป่วยยืนยันรายแรกในวันที่ 13 มกราคม พ.ศ. 2563 ซึ่งเป็นผู้ป่วยรายแรกนอกสาธารณรัฐประชาชนจีน โดยสรุปผลจาก 2 ห้องปฏิบัติการที่ให้ผลตรงกันของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และห้องปฏิบัติการของศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคอุบัติใหม่ ด้วยวิธี whole genome sequencing⁽³⁾

การตรวจด้านอณูชีวโมเลกุลด้วยเทคนิค real-time PCR เพื่อหาสารพันธุกรรมมีความจำเป็นในการตรวจวินิจฉัย และการยืนยันการติดเชื้อ เพื่อตอบสนองการเฝ้าระวัง ป้องกัน และควบคุมโรคของประเทศ ในการเปิดบริการตรวจหาสารพันธุกรรมของ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR จากการใช้ยาที่พัฒนาโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์หรือน้ำยาสำเร็จรูปที่ผ่านการประเมินคุณภาพโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อตรวจวินิจฉัยสำหรับผู้สงสัยติดเชื้อก่อโรค COVID-19 วางระบบงานตามมาตรฐานการปฏิบัติงาน PCR และมาตรฐานความปลอดภัยสำหรับห้องปฏิบัติการชีวโรยระดับ 2 แบบเสริมสมรรถนะ (biosafety level 2 enhanced: BSL-2 enhanced) เมื่อปริมาณสิ่งส่งตรวจมากขึ้นจำเป็นต้องมีการปรับเปลี่ยนระบบงานไปใช้เครื่องอัตโนมัติ เพื่อลดระยะเวลาการตรวจ

ประเทศไทยในระยะเริ่มต้นให้บริการตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อก่อโรค COVID-19 ด้วยวิธี real-time RT-PCR โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 15 แห่ง ต่อมา มีหน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชน ได้เปิดบริการเพิ่มขึ้น โดยมีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตรวจสอบมาตรฐานและโครงสร้างทางกายภาพ รวมทั้งประเมินคุณภาพด้วยโปรแกรมทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการ ทำให้มีห้องปฏิบัติการเครือข่ายที่ผ่านการรับรองและให้บริการการตรวจได้ครอบคลุมทุกพื้นที่ ซึ่งปัจจุบันมีห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรอง จำนวน 534 แห่ง⁽⁴⁾ (ข้อมูลในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2566) อย่างไรก็ตาม องค์ความรู้ในการออกแบบห้องปฏิบัติการ การเตรียมความพร้อมตามมาตรฐานและความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการเป็นพื้นฐานสำคัญสำหรับการรองรับการตรวจหาเชื้ออุบัติใหม่ที่สามารถเกิดขึ้นได้ในอนาคต

ห้องปฏิบัติการอณูชีวโมเลกุล สถาบันบำราศนราดูร มีประสบการณ์ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคทางเดินหายใจตะวันออกกลาง หรือ Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) มาก่อน ซึ่ง MERS-CoV จัดเป็นเชื้ออันตรายในกลุ่มเสี่ยงระดับ 3 ดังนั้นจึงสามารถนำความรู้และประสบการณ์มาประยุกต์ใช้ได้รวดเร็วทันเวลา โดยบทความนี้มีวัตถุประสงค์ถ่ายทอดประสบการณ์ ในช่วงการเตรียมห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยเชื้อ SAR-CoV-2 ซึ่งจัดเป็นเชื้ออันตรายในกลุ่มเสี่ยงระดับ 3 จำเป็นต้องใช้ห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับ 3 (BSL-3) ในการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส กรณีการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคอณูชีวโมเลกุลสามารถใช้แนวทางปฏิบัติงานกับสิ่งส่งตรวจตามมาตรฐานความปลอดภัยด้วยเทคนิคชีววิทยาระดับเสริม (BSL-2 enhanced) เพื่อเป็นข้อมูลในการวางแผนจัดเตรียมห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยเชื้อติดต่ออันตรายสำหรับหน่วยงานอื่นที่อาจต้องทำหน้าที่ตรวจเชื้อในกลุ่มนี้

วัสดุและวิธีการศึกษา

การดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการ: ดำเนินงานตามแนวทางมาตรฐานด้านอณูชีวโมเลกุล และความปลอดภัยในการปฏิบัติงาน

ด้วยเทคนิค BSL-2 แบบเสริมสมรรถนะ มีการประเมินความเสี่ยงก่อนการดำเนินงาน โดยศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องทั้งระบบของห้องปฏิบัติการ การบริหารจัดการระบบความปลอดภัยตามกลุ่มเสี่ยงของเชื้อโรค พร้อมทั้งจัดทำแบบประเมินความเสี่ยงของห้องปฏิบัติการ สถานที่และสภาพแวดล้อม มีพื้นที่ปฏิบัติการสำหรับใช้รับสิ่งส่งตรวจ พื้นที่สะอาดสำหรับใช้จัดเก็บชุดสวมและอุปกรณ์ เพื่อป้องกันส่วนบุคคล พื้นที่ส่วนปฏิบัติงานตรวจวิเคราะห์ และพื้นที่จัดเก็บตัวอย่างที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ หรือใช้บ่งฆ่าเชื้อ เป็นต้น

บุคลากรที่ทำหน้าที่ตรวจวิเคราะห์: จำเป็นต้องได้รับการอบรมเพื่อพัฒนาศักยภาพในการตรวจด้านอณูชีวโมเลกุล ฝึกทักษะการปฏิบัติงานตามหลักความปลอดภัยทางชีวภาพ การสวมและถอดอุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล (personal protective equipment; PPE) อย่างถูกต้องและได้รับการอบรมการใช้เครื่องมือตามมาตรฐาน เช่น ตู้ชีวนิรภัย ระดับ 2 (biological safety cabinet class II; BSC Class II) สำหรับการปฏิบัติงานกับสิ่งส่งตรวจ ต้องใช้ความระมัดระวังในการผสมตัวอย่างที่ทำให้เกิดการฟุ้งกระจายหรือ aerosol การใช้เครื่องอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รวมทั้งฝึกอบรมการใช้งานน้ำยาสำหรับตรวจหาสารพันธุกรรม และเครื่องมือที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้บุคลากรที่ปฏิบัติงานต้องได้รับการอบรมด้านความปลอดภัยและฝึกปฏิบัติเรื่องการสวมใส่และถอด PPE รวมทั้งทักษะการปฏิบัติงานเพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อโรค

เครื่องมือ น้ำยา และวัสดุอุปกรณ์: จำเป็นต้องมีเครื่องมือและอุปกรณ์พื้นฐานที่จำเป็นและเหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ BSC Class II สำหรับเตรียมตัวอย่าง ปิเปตอัตโนมัติ (autopipette) ตู้เย็นสำหรับเก็บน้ำยา ตู้แช่สำหรับเก็บหรือรักษาตัวอย่าง เครื่องมือสำหรับสกัดสารพันธุกรรม เครื่องตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี real-time PCR และเครื่อง autoclave

กระบวนการก่อนการทดสอบ: มีพื้นที่สำหรับจัดเก็บและเตรียมตัวอย่างในขั้นตอนก่อนตรวจวิเคราะห์ มีอุปกรณ์จัดเก็บและขนส่งตัวอย่างที่ปลอดภัย ควบคุมอุณหภูมิตามระยะเวลาในการขนส่งถึงห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์

กระบวนการทดสอบ: วิธีการตรวจด้วยเทคนิคอณูชีวโมเลกุล จำเป็นต้องจัดทำแผนผังลำดับการปฏิบัติงานเพื่อป้องกันการปนเปื้อนและการจัดเตรียมพื้นที่ให้ถูกต้องตามหลักการตรวจด้วยวิธี PCR ทั้งนี้ขณะเตรียมตัวอย่างสงสัยเชื้ออันตราย ควรบันทึกระยะเวลาที่ต้องปฏิบัติงาน และติดป้ายสถานะห้อง เช่น “ห้ามเข้า ขณะนี้เจ้าหน้าที่กำลังตรวจวิเคราะห์สิ่งส่งตรวจสงสัยเชื้ออันตราย”

การแปลผลและการรายงานผล: แปลผลตามคู่มือและคำแนะนำในเอกสารกำกับน้ำยา และรายงานผลตามระบบมาตรฐานการรายงานผลที่กำหนดไว้

การควบคุมคุณภาพ: ในการตรวจวิเคราะห์มีตัวอย่างที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพภายในด้วยชุดควบคุมที่มาพร้อมกับชุดตรวจวิเคราะห์ และการเข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญตามระบบของการตรวจ หรือเข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญกับกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กระบวนการหลังการทดสอบ: สิ่งส่งตรวจหาสารพันธุกรรมควรเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งและเก็บ RNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เก็บหลอดตัวอย่างที่หลีกเลี่ยงการปฏิบัติงานไว้ทวนสอบในภาชนะที่ปิดมิดชิดระบุสัญลักษณ์ติดเชื้อ หรือ biohazard sign และห้องปฏิบัติการมีระบบการทำลายขยะติดเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ก่อนนำออกจากห้องปฏิบัติการ วัสดุวิทยาศาสตร์ที่ใช้แล้วหรือตัวอย่างที่หลีกเลี่ยงการตรวจวิเคราะห์ ชุด PPE และขยะติดเชื้ออื่นๆ พร้อมทั้งจัดการลดการปนเปื้อน (decontamination) การอบนึ่งฆ่าเชื้อและนำออกไปกำจัดตามระบบของสถานพยาบาล

การประเมินด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ: การปฏิบัติงานตามมาตรฐานที่กำหนดตามกลุ่มเสี่ยงของระดับเชื้อโรค การสวมใส่หรือถอดอุปกรณ์ PPE และการนำไปกำจัดตามหลักวิชาการ รวมทั้งการจัดให้มีชุดจัดการสารปนเปื้อนหรือ biological spill kit ให้พร้อมใช้งานในพื้นที่ปฏิบัติการ

การจัดแบ่งพื้นที่

การจัดเตรียมพื้นที่ห้องปฏิบัติการ: สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค real-time PCR ที่มีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (nucleic acid) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง

เพื่อหลีกเลี่ยงกระบวนการปนเปื้อนจากผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ลดการรายงานผลผิดพลาด การปฏิบัติงานจำเป็นต้องเตรียมการตั้งแต่การออกแบบห้องปฏิบัติการจัดให้มีพื้นที่แยกออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ การเตรียมน้ำยา การสกัดตัวอย่าง การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และวัดผล^(5,6) โดยมีพื้นที่ปฏิบัติงาน แบ่งเป็น 3 บริเวณ ได้แก่

บริเวณที่ 1 ห้องเตรียมน้ำยาสำหรับ PCR (reagent preparation area: PCR 1) บริเวณนี้ควรมีพื้นที่ขั้นต่ำ 2.5×3 ตารางเมตร มีประตูที่ใช้เปิดและปิดสะดวกอย่างล้าสมัย และมีที่แขวนเสื้อกาวน์สำหรับใช้เฉพาะห้องนี้ อุปกรณ์เครื่องมือพื้นฐานประกอบด้วยตู้เย็น 2-8 องศาเซลเซียส ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บน้ำยา ตู้ PCR cabinet ซึ่งมีจำหน่ายสำเร็จรูปนำเข้าจากต่างประเทศ หรือสั่งทำเป็นตู้พลาสติกติดหลอดแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet; UV) พร้อมสวิทช์เปิด UV หลังการใช้งาน และมีการตั้งเวลาปิดไฟ UV ได้ อุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็นวางไว้ใกล้ๆ ตู้นี้ คือ vortex mixer, spin down centrifuge, autopipette ขนาด P10, P20, P200 และ P1000 พร้อม filter tip และถุงมือยางแบบไร้แปง เป็นต้น ห้องนี้จัดไว้เพื่อเตรียมน้ำยาสำหรับปฏิกิริยา PCR จัดเป็นห้องที่สะอาด ไม่อนุญาตให้นำสิ่งส่งตรวจและ PCR product เข้ามาในบริเวณนี้โดยเด็ดขาด การเตรียมน้ำยาดังต้นสำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 (master mix) สามารถผสมน้ำยาใช้เองตามสูตรที่มีและผสมสารตั้งต้นต่างๆ ที่จำเป็น หรือนำน้ำยาสำเร็จรูปจากต่างประเทศมาแบ่งเป็นหลอดเล็กๆ ก่อนที่จะนำออกไปเติมตัวอย่างที่สกัดแล้วในห้องถัดไป ดังแสดงในภาพที่ 1

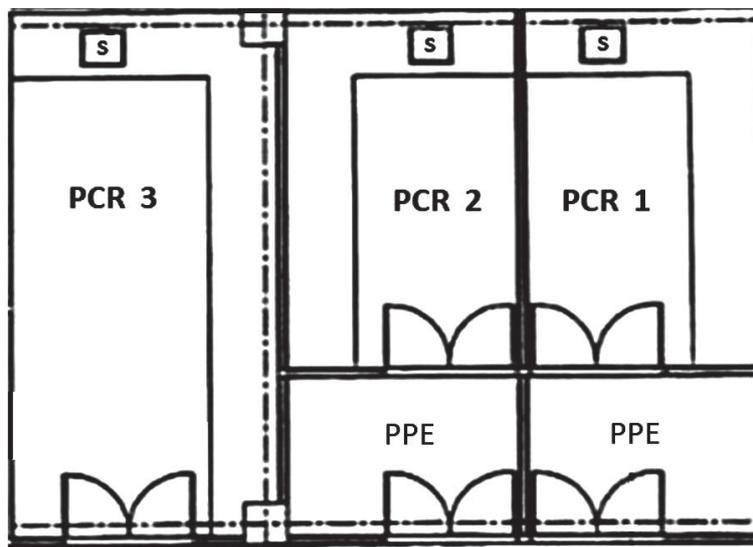
บริเวณที่ 2 ได้แก่ ห้องเตรียมตัวอย่างและสกัดสารพันธุกรรมจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย (specimen preparation area: PCR 2) บริเวณนี้ควรจัดเตรียมพื้นที่ 3×4 ตารางเมตร มีประตู 2 ชั้น ไม่จำเป็นต้องเป็นห้องความดันลบ ประตูชั้นแรกเข้าไปภายในเป็นพื้นที่สำหรับสวมใส่และถอด PPE เมื่อผ่านประตูที่ 2 จะเป็นห้องสำหรับปฏิบัติงาน มีอ่างล้างมือ เครื่องมือ และอุปกรณ์พื้นฐานที่จำเป็น ประกอบด้วย ตู้ BSC Class II, vortex mixer เครื่องสกัดสารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ หรือสกัดสารพันธุกรรมแบบ manual จำเป็นต้องใช้

เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) ที่มีความเร็วรอบในช่วง 12,500–16,000 g ตู้เย็นอุณหภูมิ 2–8 องศาเซลเซียส ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับเก็บตัวอย่างควบคุมคุณภาพ autopipette ขนาด P20, P200 และ P1000 พร้อม filter tip และถุงมือยางแบบไร้แป้ง นอกจากนี้การปฏิบัติงานควรจัดให้มีพื้นที่รับสิ่งส่งตรวจ อาจใช้กล่องส่งผ่านตัวอย่าง (pass box) ก่อนส่งเข้าห้องปฏิบัติการ PCR หากไม่มีกล่องส่งผ่านตัวอย่างสามารถออกแบบห้องให้มีประตู 2 ชั้น เพื่อส่งตัวอย่างผ่านทางประตูปกติ

บริเวณที่ 3 ห้องตรวจวัดสารพันธุกรรมและวิเคราะห์ผล (post-PCR หรือ detection area: PCR 3) บริเวณนี้ควรจัดเตรียมพื้นที่ 2 × 3 ตารางเมตร พร้อม

อ่างล้างมือ เป็นบริเวณที่มีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมห้ามนำหลอด PCR หรืออุปกรณ์ที่อยู่ในส่วนนี้ย้อนกลับไปในห้อง PCR 1 และห้อง PCR 2 โดยเด็ดขาด เพื่อป้องกันการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นได้ ควรมีทิศทางการเดินจากห้อง PCR 1 ไปยังห้อง PCR 2 แต่ห้อง PCR 3 ไม่จำเป็นต้องเป็นห้องติดกับห้อง PCR 2 ซึ่งห้อง PCR 3 ที่มีประตูชั้นเดียว สามารถจัดให้มี pass box และนำอุปกรณ์เข้าห้องโดยผ่านทางนี้ได้ ดังแสดงในภาพที่ 1

เครื่องมือและอุปกรณ์พื้นฐานที่จำเป็น ประกอบด้วย เครื่องวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (เครื่อง real-time PCR) พร้อมคอมพิวเตอร์และโปรแกรมที่ใช้ประมวลผล รวมทั้งการจัดเตรียมถุงมือยางชนิดไร้แป้งในแต่ละจุด

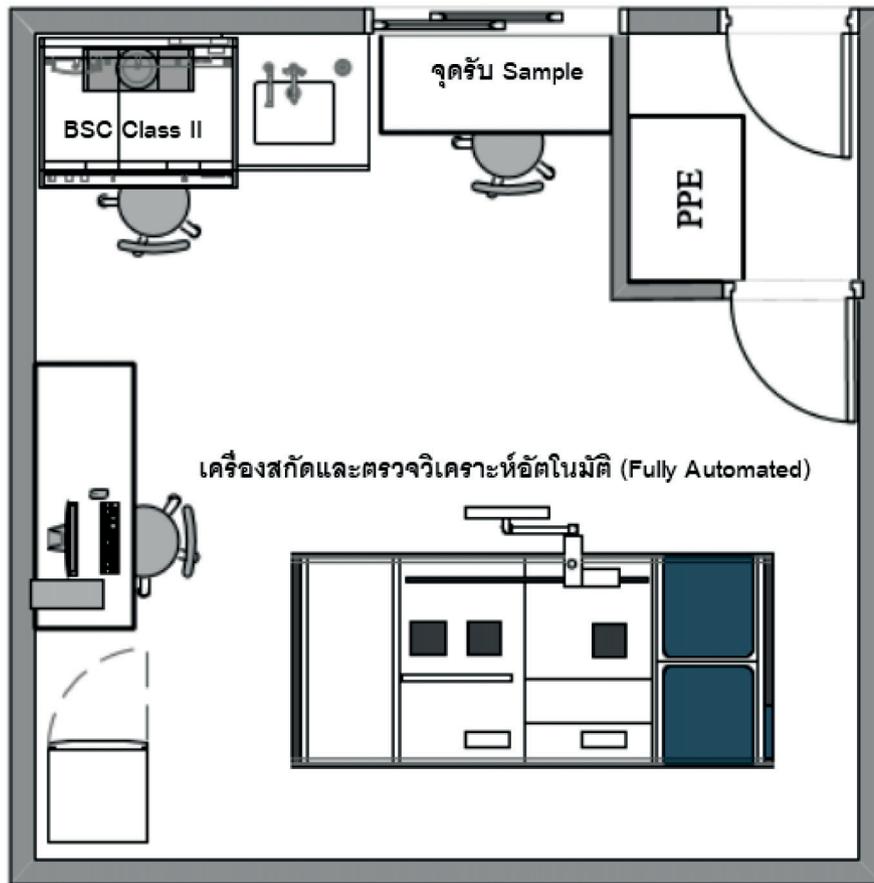


ภาพที่ 1 การแบ่งพื้นที่สำหรับงาน PCR โดยมีความกว้างของแต่ละห้อง 3–4 เมตร แยกจากกัน โดยแบ่งเป็น 3 พื้นที่ ได้แก่ ห้องเตรียมน้ำยาสำหรับปฏิกิริยา สวมรองเท้าและเสื้อกาวน์ผ้าก่อนเข้าพื้นที่เตรียมน้ำยา (PCR 1) ห้องสกัดสารพันธุกรรม สวมอุปกรณ์ personal protective equipment ก่อนเข้าพื้นที่สกัดตัวอย่างตามมาตรฐานความปลอดภัยระดับ 2 แบบเสริมสมรรถนะ (PCR 2) ห้องเพิ่มปริมาณและตรวจวัดสารพันธุกรรม (PCR 3) และ [S] คือ อ่างล้างมือในแต่ละห้อง

ในสถานการณ์โรคระบาดเมื่อห้องปฏิบัติการได้รับสิ่งส่งตรวจจำนวนมาก จำเป็นต้องมีระบบ fully automation ซึ่งใช้เครื่องมืออัตโนมัติสกัดสารพันธุกรรม พร้อมเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและตรวจสอบผล เนื่องจากเป็นระบบการทำงานสกัดและวัดผลด้วยระบบปิด ดังนั้นสามารถใช้ห้องที่มีขนาด 5 × 5 ตารางเมตร

ห้องเดียวพร้อมอ่างล้างมือ โดยแบ่งพื้นที่ภายในให้เป็นสัดส่วน ต้องมีบุคลากรทำหน้าที่เตรียมน้ำยา สกัดหลังจากผู้ป่วยใส่หลอดเพื่อนำเข้าเครื่องอัตโนมัติ และต้องจัดพื้นที่สำหรับสวมใส่และถอดอุปกรณ์ PPE ดังแสดงในภาพที่ 2

เครื่องมือและอุปกรณ์พื้นฐานที่จำเป็น ประกอบด้วย และ P1000 พร้อม filter tip และถุงมือยางแบบไร้แปง
 ตู้ BSC Class II, vortex mixer, ตู้เย็นอุณหภูมิตั้งแต่ -20°C เป็นต้น
 2-8 องศาเซลเซียส, autopipette ขนาด P20, P200



ภาพที่ 2 ตัวอย่างการวางแผนผังห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องอัตโนมัติ (ขนาด 5 × 5 เมตร)

ผล

กระบวนการดำเนินงานและประเมินความพร้อมของห้องปฏิบัติการที่จัดตั้งใหม่ จำเป็นต้องมีการกำหนด checklist เพื่อจัดเตรียมอุปกรณ์ในแต่ละพื้นที่ของห้องปฏิบัติการ PCR ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายการเครื่องมือและอุปกรณ์เพื่อใช้ในการประเมินความพร้อม

ลำดับที่	รายการเครื่องมือและอุปกรณ์	จำนวน	มี	ไม่มี
PCR 1: Reagent preparation room (Master Mix): Clean area				
1	PCR cabinet (with UV) for master mix preparation	1		
2	Freezer -20°C (for reagent storage)	1		
3	Adjustable autopipette 2, 20, 200 and 1000 µL	4		
4	Filtered tips 0.1-10 µL, 2-20 µL, 5-200 µL, 100-1000 µL	4		
5	Vortex mixer	1		

ตารางที่ 1 รายการเครื่องมือและอุปกรณ์เพื่อใช้ในการประเมินความพร้อม (ต่อ)

ลำดับที่	รายการเครื่องมือและอุปกรณ์	จำนวน	มี	ไม่มี
6	Spin down centrifuge	1		
7	Microcentrifuge tube 1.5 ml	1		
8	Microcentrifuge tubes rack	1		
9	Disposable gloves latex powder free	1		
10	70% Alcohol	1		
11	Distilled water	1		
12	Gauze pad	1		
PCR 2: Sample preparation room (Biosafety level 2 enhanced practice)				
1	BSC Class II	1		
2	เครื่องสกัดอัตโนมัติ	1		
3	Adjustable autopipette 20 μ L, 200 μ L	2		
4	Filtered tips 2-20 μ L, 5-200 μ L	2		
5	Bench top microcentrifuge (capable of 20,000 x g)	1		
6	Microcentrifuge tube 2.0 ml	1		
7	Microcentrifuge tubes rack	1		
8	Vortex mixer	1		
9	Refrigerator (2-8 $^{\circ}$ C) (for reagent storage)	1		
10	Disposable gloves latex powder free	1		
11	70% Alcohol	1		
12	Distilled water	1		
13	Gauze pad	1		
PCR 3: Room/Area				
1	เครื่อง real-time PCR	1		
2	Adjustable autopipette 20 μ L	1		
3	Filtered tips 2-20 μ L	1		
4	Vortex mixer	1		
5	Spin down centrifuge	1		

ขั้นตอนวิเคราะห์ความเสี่ยงและแนวทางปฏิบัติงาน ด้วยเทคนิคอณูชีวโมเลกุล โดยมีเกณฑ์มาตรฐานของระดับความเสี่ยง (degree of risk) ตามความรุนแรงของผลกระทบ (impact) ตั้งแต่ 1-5 และโอกาสที่จะเกิดความเสี่ยงตั้งแต่ 1-5 ได้แก่ ระดับ 1 น้อยมาก 2 น้อย 3 ปานกลาง 4 สูง และ 5 สูงมาก⁽⁷⁾ ซึ่งพิจารณาความเสี่ยง

จากความถี่ของการเกิดเหตุการณ์และความรุนแรงที่เกิดขึ้น หลักการของความเสี่ยง เกิดจากความถี่ \times ความรุนแรง สามารถแสดงได้ 3 สี ได้แก่ เขียว เหลือง แดง หมายถึง ความเสี่ยงน้อย ปานกลาง สูง ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3

ความรุนแรงของผลกระทบ

5 = สูงมาก						ความถี่
4 = สูง						
3 = ปานกลาง						
2 = น้อย						
1 = น้อยมาก						
	1 = น้อยมาก	2 = น้อย	3 = ปานกลาง	4 = สูง	5 = สูงมาก	

ภาพที่ 3 การวิเคราะห์ความเสี่ยงตามความรุนแรงของผลกระทบและโอกาสเกิดความเสี่ยง

จากการทำแผนภูมิความเสี่ยง (risk map) ความเสี่ยงทางชีวภาพของห้องปฏิบัติการ ดังแสดง สามารถนำมาทำแผนบริหารความเสี่ยง รวมทั้งประเมิน ตัวอย่างในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แผนการบริหารความเสี่ยงและประเมินความเสี่ยงทางชีวภาพห้องปฏิบัติการตรวจ SARS-CoV-2

ความเสี่ยง	ปัจจัยเสี่ยง	แนวทางการจัดการความเสี่ยง	ผลกระทบ	โอกาสเกิด
ห้องเตรียมน้ำยา master mix	1. มีการปนเปื้อนจากการปฏิบัติงาน 2. เตรียมน้ำยาไม่ถูกต้อง	- ต้องแยกห้องและเครื่องมือใช้งานเฉพาะสำหรับเตรียมน้ำยา ในขั้นตอน pre-PCR - มีคู่มือปฏิบัติงานหรือเอกสารประกอบสำหรับเตรียมน้ำยา master mix - ฝึกอบรมบุคลากรให้ผ่านเกณฑ์ก่อนการปฏิบัติงาน	1 4	1 2
ห้องเตรียมตัวอย่าง	1. ติดเชื้อจากการปฏิบัติงานเตรียมตัวอย่าง 2. สลับตัวอย่างหรือเตรียมตัวอย่างผิดคน	- เลือกใช้ PPE ให้เหมาะสม - ปฏิบัติงานเตรียมตัวอย่างในตู้ BSC Class II - ปฏิบัติตามคู่มือปฏิบัติงานอย่างเคร่งครัด ทวนสอบรายละเอียดบนหลอดตัวอย่างทุกครั้ง (primary กับ secondary tube)	5 4	2 1
ห้องตรวจวิเคราะห์ real-time RT-PCR	เลือกใช้ protocol ไม่ถูกต้อง	มีคู่มือการปฏิบัติงานหรือเอกสารประกอบสำหรับการทำ real-time RT-PCR	4	1
ห้องตรวจวิเคราะห์ SARS-CoV-2 ด้วยเครื่องอัตโนมัติ	ตัวอย่างหกหล่นในขั้นตอนนำตัวอย่างเข้าเครื่องอัตโนมัติ	เตรียมตัวอย่างใส่กล่องมีฝาปิด-เปิดในตู้ BSC Class II และนำตัวอย่างเข้าเครื่องอัตโนมัติภายใน 3 วินาที	4	1

บุคลากรที่เกี่ยวข้องต้องได้รับการอบรม โดยเฉพาะเจ้าหน้าที่ตรวจวิเคราะห์ เพื่อให้มีความรู้ด้านอณูชีวโมเลกุล ฝึกทักษะการปฏิบัติงาน PCR เพื่อป้องกันการปนเปื้อน ฝึกสวมใส่และถอดอุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล (PPE) อย่างถูกต้อง และได้รับการอบรมการใช้เครื่องมือตามมาตรฐาน เช่น ตู้ BSC Class II การใช้งานเครื่อง autoclave ฝึกอบรมการใช้งานเครื่องมือ

และน้ำยาสำหรับตรวจหาสารพันธุกรรม รวมทั้งเครื่องมืออื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง ลักษณะการฝึกอบรมหน้างาน ประเมินผลโดยการทำแบบทดสอบและฝึกภาคปฏิบัติ มีเกณฑ์ผ่านไม่ต่ำกว่าร้อยละ 80 และต้องมีแผนการฝึกอบรมเพื่อฟื้นฟูความรู้อย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง มีนักเทคนิคการแพทย์เข้ารับการฝึกอบรมและพัฒนาศักยภาพด้านการตรวจหาเชื้ออุบัติใหม่ และได้รับมอบหมาย

ให้ปฏิบัติงานตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ SARS-CoV-2 จำนวน 26 คน มีระบบการทำงานเป็นผลัดช่วงเวลา โดยการปฏิบัติงานกับเชื้ออันตราย จำเป็นต้องมีเจ้าหน้าที่ปฏิบัติงานร่วมกันอย่างน้อย 2 คน เพื่อความปลอดภัย

การจัดเตรียมห้องปฏิบัติการและเครื่องมือ อุปกรณ์พื้นฐานที่จำเป็นสำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 นอกจากการแบ่งพื้นที่ปฏิบัติงานตามหลักการ PCR แล้ว ยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 ระบบ ตามชนิดของเครื่องมือที่ใช้ ได้แก่ ระบบ semi-automation เป็นการใช่วิธีสกัดสารพันธุกรรมจากสิ่งส่งตรวจด้วยมือหรือเครื่องอัตโนมัติร่วมกับเครื่อง real-time PCR ในการเพิ่มปริมาณและตรวจวัดสารพันธุกรรม ดังแสดงในภาพที่ 1 เมื่อห้องปฏิบัติการได้รับสิ่งส่งตรวจเพิ่มขึ้นจำนวนมากในสถานการณ์โรคระบาด จำเป็นต้องมีระบบ fully automation ซึ่งใช้เครื่องมืออัตโนมัติสกัดสารพันธุกรรม พร้อมเพิ่มปริมาณและตรวจสอบผล การออกแบบห้องปฏิบัติการสามารถใช้ 1 ห้อง และมีพื้นที่เหมาะสมกับขนาดของเครื่องอัตโนมัติและอุปกรณ์ประกอบ ดังแสดงในภาพที่ 2

การควบคุมการปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการ PCR

นอกจากโครงสร้างทางกายภาพ สิ่งที่สำคัญในการป้องกันผลวิเคราะห์ผิดพลาด คือการควบคุมการปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการ PCR โดยแยกอุปกรณ์ในแต่ละพื้นที่ไม่ใช้ปะปนกัน จัดให้มีถุงมือยางไว้แปรงและเสื้อกาวน์ รองเท้าในแต่ละห้องแยกส่วนกัน หลังจากปฏิบัติงานทุกครั้งต้องทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 70% หรือใช้ bleach agent หรือ 0.5% sodium hypochlorite ทำความสะอาดและเช็ดด้วยน้ำกลั่นตามทุกครั้ง ทำการบำรุงรักษาและสอบเทียบเครื่องมือตามมาตรฐานที่กำหนด การตรวจสอบการปนเปื้อนจำเป็นต้องใช้ negative control ควบคู่ทุกครั้งในการทำปฏิกิริยา PCR รวมทั้งตรวจสอบปฏิกิริยาแบบ non-template control คือ ผสมน้ำปราศจากสาร DNase และ RNase กับน้ำยา master mix

ผลการดำเนินงานในด้านการเตรียมความพร้อมของเครื่องมือและน้ำยา ตลอดจนวัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็นให้มีครบถ้วน โดยมีการนำเครื่องตรวจวิเคราะห์

อัตโนมัติมาใช้ให้เหมาะสมกับปริมาณตัวอย่างที่ได้รับ และเพื่อความรวดเร็วในการรายงานผลตามเวลาที่กำหนด กระบวนการก่อนการทดสอบ กระบวนการทดสอบ กระบวนการหลังการทดสอบ การแปลผล และการรายงานผล เป็นไปตามระบบคุณภาพที่กำหนดไว้ในวิธีการดำเนินงานตามมาตรฐาน เข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญ และมีผลการประเมินผ่านเกณฑ์ที่กำหนด

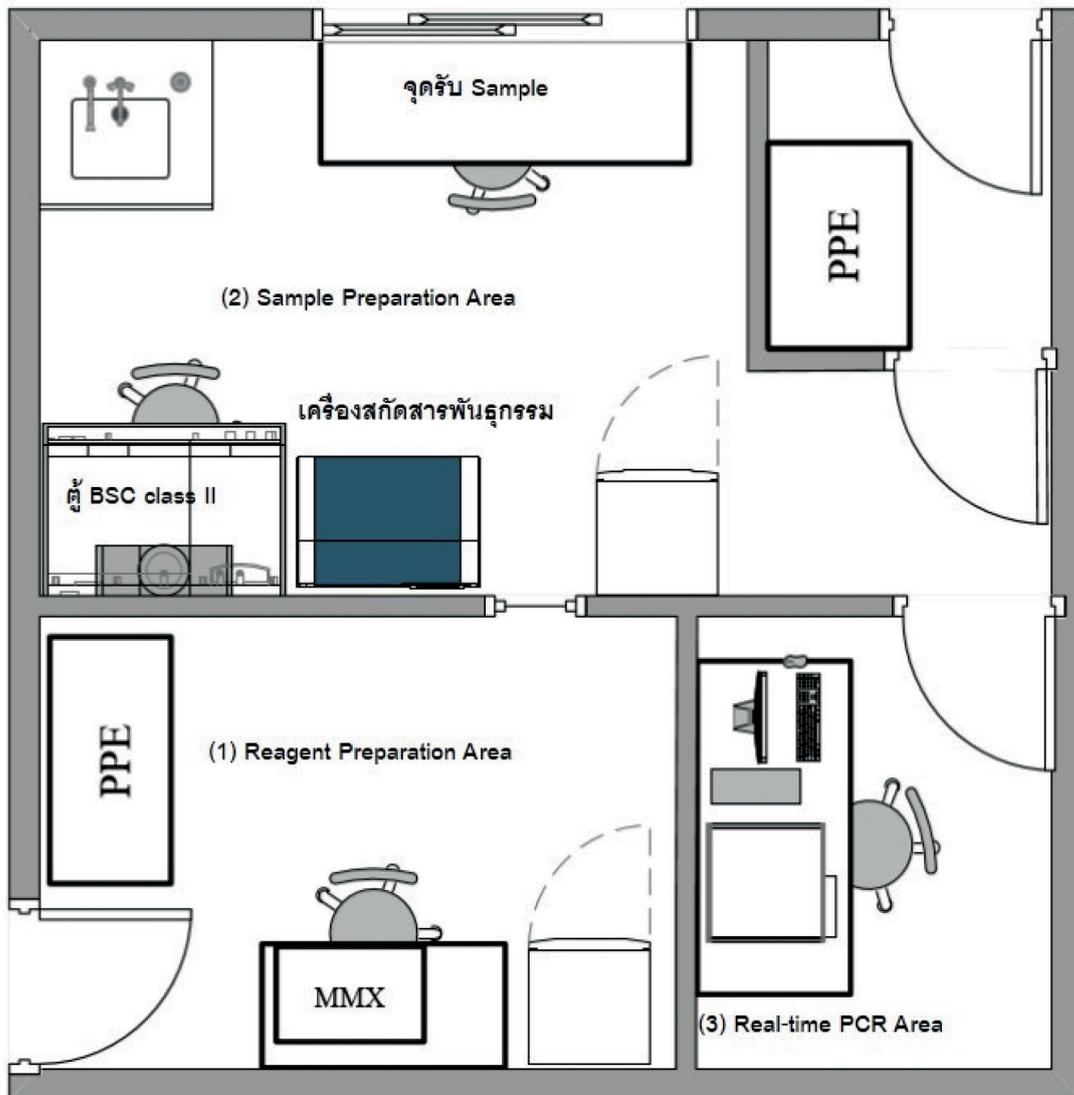
วิจารณ์

เนื่องจากเชื้อ SARS-CoV-2 เป็นเชื้ออันตรายที่ถูกจัดไว้ในกลุ่มเสี่ยงกลุ่มที่ 3 ตามข้อปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการ หากเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสนี้ต้องปฏิบัติงานในมาตรฐานความปลอดภัยระดับ 3 (biosafety level 3; BSL3)^(8,9) แต่ในการปฏิบัติงานตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR องค์การอนามัยโลกและคำแนะนำจากหน่วยงานที่มีประสบการณ์ในสาธารณรัฐประชาชนจีน⁽¹⁰⁾ ให้ปฏิบัติงานที่ความปลอดภัยระดับ 2 แบบเสริมสมรรถนะ (BSL-2 enhanced) คือ จัดพื้นที่ปฏิบัติงานไว้ในระดับ 2 เพิ่มวิธีปฏิบัติงานตามมาตรฐานความปลอดภัยแบบระดับ 3 อย่างเคร่งครัด ได้แก่ การเลือกใช้อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล เพิ่มความระมัดระวังในขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม โดยผู้ปฏิบัติงานสวมเสื้อกาวน์ชนิดกันน้ำแบบใช้แล้วทิ้ง หมวก หน้ากาก N-95 face-shield และสวมถุงมือ 2 ชั้น รองเท้าหุ้มปิด ในกรณีที่ไม่ใส่เสื้อกาวน์กันน้ำให้ใช้กาวน์ผ้าเสริมด้วยผ้ากันเปื้อนพลาสติกได้ การปฏิบัติงานกับสิ่งส่งตรวจควรทำในตู้ BSC Class II และเป็นพื้นที่สำหรับผสมตัวอย่างที่สกัดสารพันธุกรรมแล้วกับน้ำยา PCR ที่เตรียมไว้ในหลอดปฏิกิริยา เมื่อปฏิบัติงานเสร็จแล้วต้องทำความสะอาดพื้นผิวที่ปฏิบัติงานด้วยน้ำยาทำลายเชื้อไวรัสและขยะในห้องนี้จำเป็นต้องใส่ถุงเฉพาะและนำออกไปอบฆ่าเชื้อก่อนกำจัดตามระบบต่อไป

นอกจากการออกแบบห้องโดยโครงสร้างแยกเป็น 3 ห้อง ที่กั้นด้วยผนังปูน ในสถานการณ์เร่งด่วนสามารถสร้างห้องอย่างรวดเร็ว โดยใช้ผนังกระจกกั้นห้องแทนหรือถ้าหน่วยงานใดมีพื้นที่โล่ง ขนาด 5 × 5 เมตร จะกั้นแยกส่วนภายในด้วยผนังกระจกให้เป็น 3 ห้องย่อย

เพื่อความรวดเร็วในการจัดเตรียมพื้นที่ปฏิบัติงาน และติดตั้งเครื่องปรับอากาศแยกในแต่ละห้องเพื่อป้องกันการปนเปื้อน โดยเฉพาะห้องเตรียมสิ่งส่งตรวจที่ติดตั้ง

ตู้ชีวนิรภัยต้องคำนึงถึงระบบการไหลเวียนอากาศ และทิศทางลมที่ต้องไม่รบกวนระบบการทำงานของตู้ BSC Class II ทั้งนี้ในแต่ละห้องต้องจัดให้มีพื้นที่สำหรับอุปกรณ์ PPE ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ตัวอย่างการวางแผนผังห้อง PCR (ขนาด 5 × 5 เมตร)

- (1) Reagent preparation area พื้นที่เตรียมน้ำยา master mix (MMX) โดยใช้ PCR cabinet
- (2) Sample preparation area บริเวณผสมน้ำยา master mix และ RNA template/PCR control ในตู้ BSC Class II หรือใน PCR cabinet (optional)
- (3) Real-time PCR area บริเวณเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและตรวจวัดผลผลิต

จากสถานการณ์ของโรค COVID-19 ที่ส่งผลกระทบต่อในวงกว้างและแพร่ระบาดไปทั่วโลก และองค์การอนามัยโลกประกาศเป็นภาวะฉุกเฉินทางสาธารณสุขระหว่างประเทศ ข้อมูลการติดเชื้อในประเทศไทย

ในปี พ.ศ. 2563 ระบาดแรกพบเฉพาะผู้ที่เดินทางมาจากต่างประเทศ จากนั้นจึงเกิดการแพร่ระบาดทั่วประเทศ^(1,3) สถาบันบำราศนราดูร กรมควบคุมโรค มีบทบาทในการกักกันผู้ป่วยสงสัยโรคติดต่ออันตราย

มีประสบการณ์ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อโรคทางเดินหายใจตะวันออกกลางมาก่อน ในการตรวจวินิจฉัยโรค COVID-19 ได้ตรวจคัดกรองหาเชื้อก่อโรคทางเดินหายใจเบื้องต้นและประสานงานส่งตัวอย่างกับห้องปฏิบัติการอ้างอิง 2 แห่ง ได้แก่ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และห้องปฏิบัติการของศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพโรคอุบัติใหม่ โดยห้องปฏิบัติการอณูชีวโมเลกุลของสถาบันบำราศนราดูร เป็นเครือข่ายตรวจวินิจฉัยเชื้อ SARS-CoV-2 ในประเทศไทยช่วงแรก เมื่อ 4 มีนาคม พ.ศ. 2563 และระยะต่อมามีเครือข่ายห้องปฏิบัติการในประเทศเพิ่มขึ้น โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้รับมอบหมายให้ขยายเครือข่ายห้องปฏิบัติการสู่โรงพยาบาลสังกัดสำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข ให้คำแนะนำและแนวทางในการเปิดบริการ พร้อมสนับสนุนตัวอย่างทดสอบความชำนาญและระบบคุณภาพสำหรับห้องปฏิบัติการ⁽¹¹⁾

การจัดเตรียมห้องปฏิบัติการที่ใช้เทคนิค real-time PCR เป็นพื้นฐานของงานด้านอณูชีวโมเลกุลที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง อาจทำให้เกิดผลบวกปลอมได้หากไม่มีระบบจัดการที่ดี จากการดำเนินงานด้านแผนการบริหารความเสี่ยงและประเมินความเสี่ยงทางชีวภาพห้องปฏิบัติการตรวจ SARS-CoV-2 จากตารางที่ 1 พบว่าปัจจัยเสี่ยงจากการเตรียมน้ำยาไม่ถูกต้องและโอกาสติดเชื้อจากการปฏิบัติงานเป็น 2 ปัจจัย ที่มีผลกระทบในระดับสูงและสูงมาก อย่างไรก็ตามมีโอกาสเกิดได้น้อยหากปฏิบัติตามคู่มือปฏิบัติงาน⁽¹¹⁾ ให้การฝึกอบรมบุคลากรมีผลประเมินผ่านเกณฑ์ก่อนการปฏิบัติงาน และดำเนินงานตามแนวทางการจัดการความเสี่ยง การออกแบบและสร้างห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ให้ถูกต้องเหมาะสมทั้งทางวิศวกรรม ระดับความปลอดภัยทางชีวภาพ และการรักษาความปลอดภัยทางชีวภาพ โดยเฉพาะเชื้ออุบัติใหม่ที่ต้องปฏิบัติงานให้ถูกต้องตามชนิดกลุ่มเสี่ยงของเชื้อโรค และถูกต้องตามหลักการอณูชีวโมเลกุลที่สำคัญ คือ การป้องกันการปนเปื้อน (contamination) ซึ่งเกิดได้ทั้งจากการปนเปื้อนของตัวอย่างตรวจและโดยเฉพาะจากผลผลิตของปฏิกิริยา PCR (amplicon)

ทำให้จำเป็นต้องแยกพื้นที่ก่อน PCR และหลัง PCR ออกจากกันให้ชัดเจน จัดให้มีอุปกรณ์ใช้ปฏิบัติงานเฉพาะในแต่ละพื้นที่ไม่ปะปนกัน การสวมใส่ชุด และอุปกรณ์ป้องกันร่างกาย การใช้ถุงมืออย่างแบบไร้แปง การใช้ filter tip เพื่อลดโอกาสการปนเปื้อน การตรวจหาการปนเปื้อนทำโดยใช้ตัวอย่างควบคุมลบ ชนิด non-template control ควบคุมไปทุกครั้งกับการทำ PCR ของสิ่งส่งตรวจ โดยในหลอดปฏิกิริยาของตัวอย่างควบคุมลบชนิดนี้จะมีส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ทุกอย่างยกเว้น DNA template หรือสารพันธุกรรมที่สกัดมาจากสิ่งส่งตรวจ ดังนั้นถ้ามีการตรวจพบผลผลิตของ PCR จากตัวอย่างควบคุมลบ แสดงว่ามีการปนเปื้อนในปฏิกิริยาเกิดขึ้น ซึ่งอาจพบปัญหานี้ได้ในกรณีในห้องปฏิบัติการได้รับตัวอย่างจำนวนมากและมีผลการตรวจที่ให้ผลบวกจำนวนมาก หากไม่มีความระมัดระวังในการเตรียมสิ่งส่งตรวจอาจเกิดการปนเปื้อนในระบบการปฏิบัติงานได้ ดังนั้นหลังการปฏิบัติงานควรทำความสะอาดอุปกรณ์และพื้นที่ปฏิบัติงานด้วย 70% alcohol หรือ bleach agent ทุกครั้ง

ระบบการปฏิบัติงานชนิดที่ใช้วิธีสกัดตัวอย่าง DNA หรือ RNA จากสิ่งส่งตรวจด้วยมือหรือเครื่องสกัดสารพันธุกรรมร่วมกับเครื่องอัตโนมัติในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและตรวจสอบผล หรือระบบ semi-automation ควรแบ่งพื้นที่ปฏิบัติงานเป็น 3 ส่วน คือ เตรียมน้ำยา สกัดสารพันธุกรรม และตรวจวัดผลผลิต PCR ส่วนการใช้ระบบ fully automation เป็นการใช้อัตโนมัติในการสกัดสารพันธุกรรม พร้อมเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและตรวจสอบผล มีข้อดีเนื่องจากเป็นระบบปิด ดังนั้นจึงไม่มีความจำเป็นต้องแบ่งพื้นที่แยกเป็นส่วนต่างๆ เหมือนระบบ semi-automation ทำให้ประหยัดพื้นที่ แต่ลงทุนสูงในด้านค่าใช้จ่ายของเครื่องตรวจวิเคราะห์

จากประสบการณ์ในกรณีที่ปฏิบัติงานกับสิ่งส่งตรวจที่สงสัยเชื้ออุบัติใหม่ ผู้ปฏิบัติงานจำเป็นต้องผ่านการฝึกอบรมเรื่องวิธีปฏิบัติงานด้วยเทคนิคอณูชีวโมเลกุล การปฏิบัติงานตามหลักความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ BSL-2 แบบเสริมสมรรถนะสำหรับห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาล เพื่อความปลอดภัย

ของผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อมภายนอก การจัดทำมาตรฐานห้องปฏิบัติการเพื่อขอการรับรองคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ เพื่อความมั่นใจในคุณภาพผลการตรวจ ตลอดจนการป้องกันและควบคุมการติดเชื้ออย่างมีมาตรฐาน

สรุป

การเตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการอณูชีวโมเลกุล เพื่อตรวจวินิจฉัยหาเชื้ออุบัติใหม่ในช่วงการระบาดใหญ่ของโรคโควิด 19 มีความสำคัญอย่างมากจากประสบการณ์ตรวจวินิจฉัยเชื้อ MERS-CoV ในอดีตทำให้หน่วยงานสามารถปฏิบัติงานได้รวดเร็วทันสถานการณ์ นำผลการตรวจไปใช้บริหารจัดการ ดูแลรักษาผู้ป่วย และเฝ้าระวังป้องกันควบคุมโรคได้ทันเวลา บุคลากรมีความปลอดภัยและไม่ติดเชื้อจากการปฏิบัติงาน การเตรียมความพร้อมนี้สามารถขยายผลเพื่อนำไปใช้ในการวินิจฉัยโรคอื่นๆ ที่มีความสำคัญทางสาธารณสุขหรือรับมือกับโรคอุบัติใหม่ที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยงระดับ 3 ในอนาคตได้ ดังนั้นห้องปฏิบัติการของประเทศต้องเตรียมความพร้อมในทุกด้าน ทั้งบุคลากรและปัจจัยที่เกี่ยวข้องในห้องปฏิบัติการ สภาวะแวดล้อม ขั้นตอนการทำงาน และเครื่องมือ ตลอดจนพื้นที่ปฏิบัติงาน การออกแบบห้องปฏิบัติการให้ได้มาตรฐานและปลอดภัย เพื่อให้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางการดำเนินงานของหน่วยงานกระทรวงสาธารณสุขและภาคเอกชน จากผลความร่วมมือในการทำงานเป็นเครือข่าย ส่งผลให้บุคลากรทางห้องปฏิบัติการมีความพร้อมในการปฏิบัติงานและเพิ่มศักยภาพในการรักษา ควบคุม ป้องกันโรคอุบัติใหม่ที่เป็นปัญหาได้ทั้งในปัจจุบันและอนาคต สามารถตอบสนองต่อนโยบายรัฐบาลที่ประสงค์ให้บริการประชาชนได้อย่างทั่วถึงด้วยวิธี PCR ที่เป็นมาตรฐาน เพื่อประโยชน์ในการเฝ้าระวัง ป้องกัน และควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันบำราศนราดูร กรมควบคุมโรค และคุณศิริรัตน์ ลิกานนท์สกุล ที่ได้ให้คำปรึกษาและตรวจสอบเนื้อหาทางงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณ อาจารย์

ศิริพรรณ วงศ์วานิช ที่ช่วยตรวจสอบข้อความและให้ข้อเสนอแนะในการส่งบทความเพื่อตีพิมพ์จากประสบการณ์ของผู้นิพนธ์ และขอขอบคุณ คุณอำภา ศรีอินแก้ว และคุณชไมพร ตามเดช เจ้าหน้าที่บริษัท โรช ไดแอกนอสติก ประเทศไทย ที่สนับสนุนข้อมูลด้านห้องปฏิบัติการ PCR

เอกสารอ้างอิง

1. แสงทอง จันท์เจ็ด. จะไม่รอให้เกิดพายุ กรมควบคุมโรค และภาคี ท่ามกลางวิกฤติโควิด 19 พ.ศ. 2562-2563 เล่ม 1. นนทบุรี: กองนวัตกรรมและวิจัย กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2563.
2. Wachrarapluesadee S, Buathong R Iamsirithawon S, Chaifoo W, Ponpinit T, Ruchuisrasarod C, et al. Identification of a novel pathogen using family-wide PCR: initial confirmation of COVID-19 in Thailand. *Front Public Health* 2020; 8: 555013. (5 pages).
3. แสงทอง จันท์เจ็ด, ญานณี แสงสง่า, พรรณพร กะตะจิตต์. จะไม่รอให้เกิดพายุ กรมควบคุมโรคและภาคี ท่ามกลางวิกฤติโควิด 19 พ.ศ. 2562-2563 เล่ม 2. นนทบุรี: กองนวัตกรรมและวิจัย กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2563.
4. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายชื่อห้องปฏิบัติการเครือข่ายที่ผ่านการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการเครือข่ายตรวจ SARS-CoV-2. [ออนไลน์]. 2566; [สืบค้น 18 ตุลาคม 2566]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://service.dmsc.moph.go.th/labs-covid19/thai>
5. Dieffenbach CW, Dveksler GS. PCR primer: a laboratory manual. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1995.
6. ทีมงาน Molecular Diagnostics บริษัท โรช ไดแอกนอสติกส์ (ประเทศไทย) จำกัด. การจัดเตรียมห้องปฏิบัติการ พี ซี อาร์. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ไทยพิมพ์; 2550.
7. รติกร กัมทะพงค์. การประเมินความเสี่ยงทางชีวภาพ (Bio risk assessment). [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 18 ตุลาคม 2566]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://nih.dmsc.moph.go.th/data/data/64/EID/Webinar10.pdf>.

8. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 2 March 2020 (WHO/COVID-19/laboratory/2020.4). Geneva: World Health Organization; 2020.
9. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance. [online]. 2020; [cited 2020 Mar 9]; [7 screens]. Available from: URL: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/331501/WHO-COVID-19-laboratory-2020.5-eng.pdf>.
10. National Health Commission of People's Republic of China. Laboratory biosafety guide for the novel coronavirus. [online]. 2020; [cited 2023 Oct 27]; [4 screens]. Available from: URL: <https://rs.yiigle.com/yufabiao/1179586.htm>.
11. อาชวินทร์ โจนวิวัฒน์, อธิวัฒน์ ปริมสิริคุณาวุฒิ, รติกร กัณฑ์พงษ์, บรรณาธิการ. คู่มือการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ทางห้องปฏิบัติการ SARS-CoV-2. นนทบุรี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2564.

Preparedness of Biomolecular Laboratories for Detecting Emerging Pathogens: Insights from the COVID-19 Pandemic Experiences at Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute

Sumonmal Uttayamakul

National Institute of Health, Department of Medical Science, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT In December 2019, the novel coronavirus or severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) was reported as the cause of the unidentified pneumonia (now known as COVID-19) in Wuhan City, Republic of China. Since then disease has spread to all other parts of the world. Laboratory investigation is very useful for diagnosing and monitoring patients, including information for disease control and prevention. The World Health Organization has recommended the nucleic acid amplification test for COVID-19 virus screening for patients under investigation. In addition, the Thai government requested cooperation from all provinces to implement the One Province One Laboratory policy. The laboratory preparedness for real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) technique had to be urgently set up to meet the laboratory standard workflow and safety arrangement in compliance with the biosafety level 2 enhanced practices for dangerous pathogens in risk group 3 during the global pandemic. In implementing a quality management for laboratory design, the spaces were divided and designated for pre-PCR activities including reagent preparation and nucleic acid extraction rooms, and amplification and detection room with the real-time PCR machine as well as result analyses in the post-PCR area. In conclusion, two systems of molecular platform were proposed: semi-automation and fully automation. The experiences in PCR technique and laboratory safety management could be further applied to other biomolecular laboratories for detecting other emerging infectious pathogens classified in risk group 3.

Keywords: Biomolecular preparedness, Emerging pathogens, Novel coronavirus 2019

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	Yongyot Thammawut Ballang Uppapong	Phichet Banyati Piya Sirilak
Technical Advisor	Pimjai Naigowit Panadda Silva Busarawan Sriwanthana	Sumol Pavitranon Duanthanorm Promkhatkaew
Executive Editor	Prapai Wongsinkongman	
Editor	Nuanjan Wichukchinda	
Assistant Editor	Apiwat Tawatsin Supaporn Phumiamorn	Siripakorn Sangkitporn
Editorial Board	Pilaipan Puthavathana Prasert Auewarakul Danai Tiwawech Padet Siriyasatien Pornpimol Kongtip Srisurang Tantimavanich Sunee Sirivichayakul Chanitra Thuwajit Pintip Pongpech Suwanna Charunut Salakchit Chutipongvivate Usavadee Thavara Suthon Vongsheree Wichuda Chittangkura Supanee Duangteraprecha Nuanchawee Wetprasit Wantana Paveenkittiporn Uruyakorn Chansang	Mahidol University Mahidol University Naresuan University Chulalongkorn University Mahidol University Mahidol University Chulalongkorn University Mahidol University Independent Scholar Independent Scholar
Administration	Numfon Noiprasert Prasan Julwong Aphimon Jiraphongsathorn Navy Srivarom Pawinee Sukcharoen	Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences 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. Tewit Tungkasereeruk Bureau of Radiation and Medical Devices, Department of Medical Sciences for generosity and permission to use the photo of the OSL DMSc Holder as a 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

คำนิยาม

D

Discovery

นำความรู้มาประยุกต์ใช้ในการทำงานได้เหมาะสม



M

Moral

ปฏิบัติงานด้วยความซื่อสัตย์สุจริต มีความโปร่งใส ตรวจสอบได้



S

Sciences/Standard

ทำงานอย่างมีมาตรฐานตามหลักวิชาการ



C

Change

ยอมรับฟังความคิดเห็นของผู้อื่นอย่างสร้างสรรค์ ทำงานเป็นทีม



<https://bit.ly/BullDmssc>