



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วารสาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 66 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2567 • Vol. 66 No. 2 April - June 2024



Approved by TCI
during (2022-2024)



ISSN 0125-684X

E-ISSN 2697-4525

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

ที่ปรึกษาด้านบริหาร นพ.ยงยศ ธรรมวุฒิ นพ.พิเชฐ บัญญัติ
นพ.บัลลังก์ อุปพงษ์ นพ.ปิยะ ศิริลักษณ์

ที่ปรึกษาด้านวิชาการ นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท ดร.สุมล ปิตรานนท์
ดร.ปนัดดา ชิลวา ดร.เดือนฉนอม พรหมชาติแก้ว
ดร.บุษราวรรณ ศรีวรรณะ

บรรณาธิการบริหาร ดร.ประไพ วงศ์สินคณัน

บรรณาธิการ ดร.นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา

รองบรรณาธิการ ดร.อภิวิชญ์ ธวัชสิน นางสิริภากร แสงกิจพร
ดร.สุภาพร ภูมิอมร

คณะบรรณาธิการ ศ.เกียรติคุณ ดร.พิไลพันธ์ พุฒวัฒน์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ.ดร.นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล มหาวิทยาลัยมหิดล
ดร.คณัย ทิวาเวช มหาวิทยาลัยนเรศวร
ศ.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศ.ดร.พรพิมล กองทิพย์ มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.ดร.ศรีสุรางค์ ตันติมาวนิช มหาวิทยาลัยมหิดล
ดร.สุณี ศิริวิชัยกุล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศ.ดร.พญ.ชนิตรา ธวัชจิตต์ มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ.ดร.ภญ.พินทิพย์ พงษ์เพชร นักวิชาการอิสระ
ภญ.สุวรรณา จารุณช นักวิชาการอิสระ
ดร.สลักจิต ชุตินพวิเวท นักวิชาการอิสระ
ดร.อุษาวดี ถาวรระ นักวิชาการอิสระ
นายสุธน วงษ์ศรี นักวิชาการอิสระ
นางสาววิษชุดา จิตตางกูร นักวิชาการอิสระ
ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา นักวิชาการอิสระ
รศ.ดร.นวลฉวี เวชประสิทธิ์ นักวิชาการอิสระ
ดร.วันทนา ปวีณกิตติพร นักวิชาการอิสระ
ดร.อรุณกร จันทร์แสง นักวิชาการอิสระ

ฝ่ายจัดการ นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
นางสาวประสาน จุลวงษ์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
นางสาวอภิมน จีรพงศ์ธร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
นายนาวิ ศรีธรรมย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
นางสาวภาวิณี สุขเจริญ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
นางสาวอภิสรรา โคมเดือน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

สำนักงานวารสาร สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
88/7 ซอยติวานนท์ 14 ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000
โทร. 0-2951-0000 ต่อ 99662 โทรสาร 0-2951-1297
E-mail : bull.dmsc@dmsc.mail.go.th

คำขอบคุณ นายศักดิ์วิชัย อ่อนทอง สถาบันวิจัยสมุนไพรมหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์ เชียงใหม่ เพื่อและอนุญาตให้ใช้ภาพประกอบ เป็นภาพประกอบปก

พิมพ์ที่ บริษัท ธารณการพิมพ์ จำกัด
457/6-7 ถนนพระสุเมรุ แขวงบวรนิเวศ เขตพระนคร กรุงเทพฯ 10200
โทร. 0-2282-6033-4

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 66 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2567

Vol. 66 No. 2 April - June 2024

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวิเคราะห์สารเทอร์พีนและเทอร์พีนอยด์
ในกัญชากัญชงโดยเทคนิค GC-MS/MS 169
วีรวุฒิ วิทยานันท์ และ ธรณิศวรร ไซยมงคล
- ความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเรื้อรังทางปากของสารสกัดน้ำจากใบกระท่อม
ในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar 187
ภัสสรภรณ์ ศรีมังกรแก้ว กฤติกาญจน์ สุวรรณสโรช และ อัญชลี สิริมนตาภรณ์
- กระบวนการปรุงสุกต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ของใบกัญชา
ทองสุข ปายะนันท์ อัจฉรี อินแก้ว สกฤรัตน์ สมสันติสุข วิทวัส วังแก้วหิรัญ
เลขา ปราสาททอง และ พิเชฐ บัญญัติ 208
- การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน 17α -Estradiol,
 17β -Estradiol และ Testosterone โดยเทคนิค UPLC-MS/MS 225
สุวิมล หมวดหะ วรรณพร พะเยาว์ อัจฉรี อินแก้ว วิทวัส วังแก้วหิรัญ กัญญารัตน์ เชื้อกุลชาติ
สกฤรัตน์ สมสันติสุข และ ทองสุข ปายะนันท์
- การพัฒนาวิธีและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ N-nitrosodimethylamine
ในผลิตภัณฑ์ยาเม็ด Metformin 243
ศศิตา อยู่สุข และ ปิยะมาศ กิจชนะพานิชย์

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

- การประเมินคุณภาพและตรวจติดตามสายพันธุ์ย่อยของวัชพืชชนิดหญ้าพันธุ์
Tokyo 172-1 ที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2558-2564 261
ชลดา เพ็ชรไทย สุภาภรณ์ ชุมพล สุกัลยาณี ไซมี อภิชัย ศุภสารสาทร และ สุภาพร ภูมิอมร

การผลิต Pseudovirion ของ HPV สายพันธุ์ 16 เพื่อการพัฒนาวิธี Pseudovirion-Based Neutralization Assay (PBNA) วิภาวี วงศ์ชนะ สกาลิน ไตรศิริวานิชย์ และ สุภาพร ภูมิอมร	272
--	-----

บทความทั่วไป

สมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนของอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน ณัฐธิดา พฤชกานนท์ และ ยุทธนา แยมคาย	285
การพัฒนาระบบบริหารคุณภาพหน่วยรับรองระบบงานสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017 สตีฟไฟลิฐ เอกะจัมปะกะ และ ปิยะวรรณ ชัยณรงค์เกื้อกุล	299

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 66 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2567

Vol. 66 No. 2 April - June 2024

CONTENTS

Page

Original Articles

- Method Development and Validation for Analysis of Selected Terpenes and Terpenoids in Cannabis and Hemp by GC-MS/MS** 169
Weerawut Wittayanant and Thoranit Chaimongkol
- Acute and Sub-Chronic Oral Toxicity of Kratom leaves aqueous extract in Wistar rats** 187
Passaraporn Srimangkornkaew, Kittigan Suwannasaroj, and Aunchalee Sirimontaporn
- The Effects of Cooking Processes on Cannabinoids Content of Cannabis Leaves** 208
Thongsuk Payanan, Atcharee Inkaew, Sakulrat Somsuntisuk, Witthawat Wangkaewhirun, Lekha Prasarthong, and Phichet Banyati
- Method Development and Validation for 17 α -Estradiol, 17 β -Estradiol and Testosterone Hormones Determination by UPLC-MS/MS** 225
Suwimol Muadmah, Wannaporn Payao, Atcharee Inkaew, Witthawat Wangkaewhiran, Kanyarat Chuakunchat, Sakulrat Somsuntisuk, and Thongsuk Payanan
- Method Development and Validation for Determination of N-nitrosodimethylamine in Metformin Tablets** 243
Sasida Yoosook and Piyamas Kitchanapanich

Laboratory Finding

- Quality Assessment and Subtype Monitoring of BCG Tokyo 172-1 Vaccine Produced by Queen Saovabha Memorial Institute During 2015–2021** 261

Chonlada Petthai, Supaporn Chumpol, Sukanlayanee Chaimee, Apichai Supasansatorn, and Supaporn Phumiamorn

- The Production of HPV Type 16 Pseudovirion for the Development of Pseudovirion-Based Neutralization Assay (PBNA)** 272

Wipawee Wongchana, Sakalin Trisiriwanich, and Supaporn Phumiamorn

General Articles

- Competency of Community Medical Sciences among Village Health Volunteers** 285

Nattiga Prucksikanont and Yutthana Yaebkai

- Development of the Management Systems of Accreditation Body of Bureau of Laboratory Quality Standards in Accordance with ISO/IEC 17011:2017** 299

Sitaphaisith Ekachampaka and Piyawan Chainarongkuekul

Method Development and Validation for Analysis of Selected Terpenes and Terpenoids in Cannabis and Hemp by GC-MS/MS

Weerawut Wittayanant and Thoranit Chaimongkol

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

ABSTRACT Terpenes are one of the major components present in cannabis and hemp varieties. The therapeutic effect of cannabis on physical health and brain depends on the specific composition of terpenes. The treatment of mood disorders and anxiety disorders was clinically confirmed and necessitated the entourage effect of terpenes coupled with cannabinoids. Besides the quantification of the cannabinoids, the determination of the terpene quantities and proportions in cannabis and hemp plants could be of importance for the plant selection process. In this study, a Triple Quadrupole Mass Spectrometer method has been developed and validated using SRM technique for the quantification of selected 21 terpenes in cannabis plant materials. Samples were prepared by extraction of the plant materials with ethyl acetate followed by sonication and centrifugation. The final sample extract was directly injected into the analytical instrument. The results showed that the linear range was between 0.05 and 5 mg/g with r^2 values higher than 0.99. The average recoveries for all terpenes in spiked samples were between 92.3 and 105.1%, with the exception of geraniol. The measured repeatability (% relative standard deviation) was acceptable and ranged from 1.6 to 13.2%. The limit of detection and limit of quantitation for targeted terpenes were determined to be 0.03 and 0.05 mg/g, respectively. The proposed method is highly selective, reliable, accurate and has been applied to the simultaneous determination of these major terpenes in the cannabis strains developed by our Department of Medical Sciences, in parts of the plant including inflorescences, leaves, stems, and roots for further registration of plant varieties with the Department of Agriculture.

Keyword: Terpenes, Terpenoids, Cannabis, Hemp, GC-MS/MS

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

Received: 20 September 2023

Revised: 31 January 2024

Accepted: 27 March 2024

Introduction

Terpenes and terpenoids are aromatic hydrocarbon biomolecules produced by a wide variety of plants serving such purposes as attracting insects for pollination and deterring herbivores.^(1,2) This phytochemical activity is crucial for the survival of the species. Terpenes are among the more abundant compounds that provide the unique aroma of cannabis and hemp plant materials and extracts.⁽³⁾ Terpenes are thought to impact the user's experience and preference of satisfaction linked to the fragrance property. Moreover, cannabis is considered a valuable medicinal plant with a variety of therapeutic benefits.^(4,5) Cannabis terpenes have also been shown to contribute to physiological responses associated with the use of cannabis-based consumer products⁽⁶⁾ and are credited for the so-called "entourage effect". Despite the fact that it is not typically regulated in Thailand, terpene profiles can provide valuable information for product quality. The quality control of incoming raw ingredients as well as finished products across their intended shelf life is important for health-related product manufacturing.

Of all the natural products found in plants, more than 140 terpenes, mainly mono- and sesquiterpenes, have been recognized in cannabis and hemp.^(7,8) Among the large number of cannabis terpenoids, only approximately 20 to 30 terpenoids have been reported and used for the chemotyping of cannabis cultivars.^(9,10) The concentration of individual terpenes varies by strain, depending on harvest time and drying or storage conditions. By cause of the volatility of terpenes, the concentration levels decrease over time. Thus, different storage conditions

should be taken into consideration to result in appropriate products. The drop in terpene amount over time varies for different terpenes.⁽¹¹⁾ The recent proliferation of new terpene profiling methods can be attributed to the ever-increasing legalization of cannabis use. Terpene analysis can be beneficial for patients and consumers as well as providers and breeders. Due to the uniqueness of terpene profiles, they can be used by cultivators as a "fingerprint" to partially identify the specific strain in question. Cannabis is wind-pollinated, which also contributes to the variability of cannabis metabolites including terpenes. As a result, many cannabis strains lack the level of standardization on genetic and chemotaxonomic to classify the species.⁽¹²⁾

Due to their high volatility, gas chromatographs equipped with FID and MS detector are the most frequently used technique for the analysis of terpenes.^(13,14) The most widely used sample preparation method for cannabis terpenoid analysis throughout the literature is liquid solvent extraction⁽¹⁵⁾ thanks to low cost-effectiveness. GC-MS/MS is among the instruments that have been used to provide a much-needed improvement of identification, selectivity, and sensitivity with a specific ion intensity ratio.⁽¹⁶⁾ Also, headspace (HS) GC was selected to recently report a comprehensive profiling of terpenoids in cannabis.⁽¹⁷⁾

The following study was conducted to address the development and full validation of a simple preparation of samples and a precise GC-MS/MS analytical method for accurate and efficient determination of the 21 major cannabis terpenes shown in Figure 1 that have

been indicated for pharmacological activities.⁽⁶⁾ The method was validated for specificity and selectivity, linearity, accuracy, precision, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ). We then applied this quantification

procedure on a cannabis strain (GG#1) to analyze four parts of plant including inflorescences, leaves, stems, and roots (20 samples for each part) for further registration of plant varieties with the Department of Agriculture.

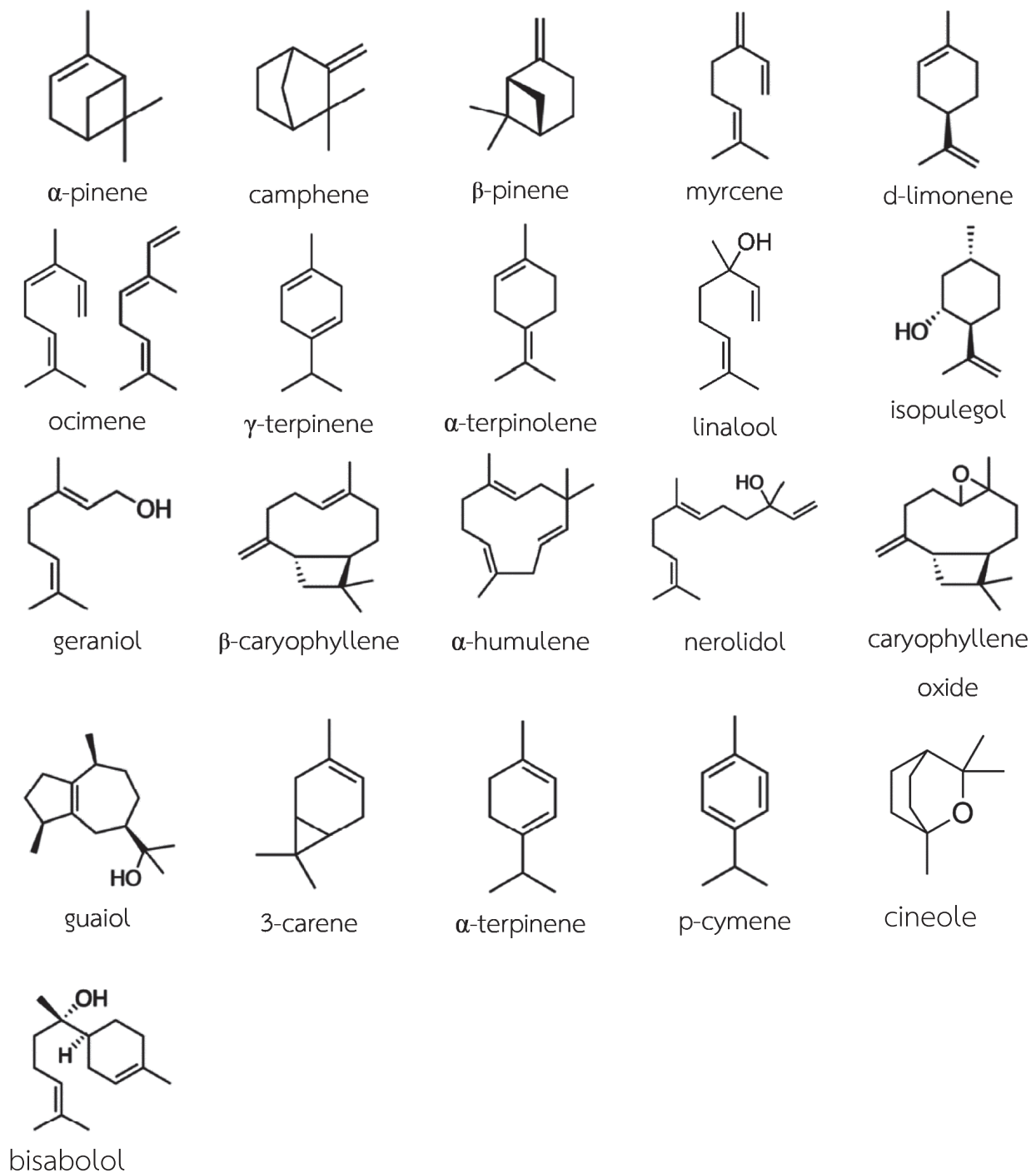


Figure 1 Selected terpenes and terpenoids from naturally occurring cannabis included in this work⁽¹⁶⁾

Materials and Methods

Chemicals and reagents

Ethyl acetate (HPLC grade) was purchased from J.T. Baker, USA. N-hexane (pesticide grade) and acetone were supplied by RCILabs, Thailand. Certified reference material, CRM of terpenes standards mixture with certified value and uncertainty approximately $2,500 \pm 130$ $\mu\text{g/mL}$ were purchased from Dr Ehrenstorfer, USA. The certified value is based on the gravimetric and volumetric preparation of this CRM. Twenty-one terpenes includes α -pinene, camphene, β -pinene, myrcene, d-limonene, ocimene (α -isomer and β -isomer), γ -terpinene, α -terpinolene, linalool, isopulegol, geraniol, β -caryophyllene, α -humulene, nerolidol (isomers 1 and 2), caryophyllene oxide, guaiaol, 3-carene, α -terpinene, p-cymene, cineole and bisabolol.

Standard solution preparation

The working standard solutions were prepared by diluting the CRM of terpenes in ethyl acetate to become a working solution of 250 $\mu\text{g/mL}$ and were stored in amber screw-capped glass vials in the dark at -20°C . The calibration curve of standard (1, 5, 10, 20, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$) was freshly prepared before use by serial dilution of stock solution to the appropriate concentrations. The residue concentrations were calculated using the calibration curve generated from the peak area response versus the working solution concentrations.

Instrument and materials

Digital balances with 1 and 0.01 mg readability for weighing samples and standards

were from Sartorius, Germany. The refrigerated centrifuge was Thermo Scientific, a UK product. Vortex mixer was from Vortex-2Genie, USA. Ultrasonic bath cleaner was purchased from Yakos, Taiwan. Calibrated micropipettes, 2–20 μL , 20–200 μL , and 100–1,000 μL , were used for the preparation of the standard solutions. Twenty-milliliter scintillation vials and 4 mL amber vials were used for extraction and reservoir recipient. All glassware were washed with acetone and n-hexane and dried before use.

An analytical method was developed for the Thermo Scientific TRACETM 1300 Gas Chromatograph and the TSQ 9000, Triple Quadrupole Mass Spectrometer. The GC-MS/MS system was equipped with PAL RTC autosampler using TraceFinder 4.1 EFS software. The analytical conditions of the GC-MS/MS method were provided in Table 1. The MS system was operated in electron ionization mode (EI, 70 eV). The analytes were separated in a fused silica capillary column DB-5MS (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) from Agilent. The column oven temperatures were programmed as follows: an initial temperature of 50°C was held for 2 min, then increased by 2°C/min to 85°C and then increased by 3°C/min to 165°C and then increased by 30°C/min to 280°C and was held for 10 min. The total run time was approximately 60 min. The injection volume was 2 μL using programmable temperature vaporizing (PTV) as an injector. The PTV temperature was set at 80°C for split injection with a split flow of 50 mL/min. The purge N_2 gas flow was set at 30 mL/min. By using the Thermo AutoSRM software, the two most intense transitions and their optimal

collision energies were selected. The most intense product was selected as the quantifier ion and the second most intense was set as the qualifier ion. Depending on the type of matrix interference, alternative transitions could be

selected for quantitative and qualitative ions. The settings on the mass spectrometry detector, including the retention time (RT), quantitative peak, confirmation peak, and collision energies (CE) were reported as shown in Table 1.

Table 1 Selected reaction monitoring (SRM) transitions and collision energies of terpenes

Analyte	Transition type	RT (min)	Window (min)	Mass	Product mass	CE (eV)
α -pinene	Quantification	6.67	0.50	91.10	65.10	16
	Qualification-1	6.67	0.50	93.10	77.00	12
	Qualification-2	6.67	0.50	93.10	91.10	6
camphene	Quantification	7.31	0.50	93.10	77.10	12
	Qualification-1	7.31	0.50	93.10	91.10	8
	Qualification-2	7.31	0.50	121.10	93.10	8
β -pinene	Quantification	8.51	0.50	69.10	41.10	6
	Qualification-1	8.51	0.50	121.10	79.10	10
	Qualification-2	8.51	0.50	121.10	93.10	6
myrcene	Quantification	9.19	0.50	41.10	39.10	8
	Qualification-1	9.19	0.50	69.10	39.10	14
	Qualification-2	9.19	0.50	69.10	41.10	6
3-carene	Quantification	10.02	0.50	79.10	77.10	10
	Qualification-1	10.02	0.50	121.10	93.10	6
	Qualification-2	10.02	0.50	121.10	105.10	6
α -terpinene	Quantification	10.49	0.50	93.10	77.10	10
	Qualification-1	10.49	0.50	93.10	91.10	6
	Qualification-2	10.49	0.50	121.10	93.10	6
p-cymene	Quantification	10.96	0.50	119.10	91.10	12
	Qualification-1	10.96	0.50	119.10	117.10	8
	Qualification-2	10.96	0.50	134.10	119.10	8
d-limonene	Quantification	11.15	0.50	68.10	67.10	6
	Qualification-1	11.15	0.50	93.10	77.10	12
	Qualification-2	11.15	0.50	93.10	91.10	6
cineole	Quantification	11.26	0.50	71.10	43.10	5
	Qualification-1	11.26	0.50	111.10	43.10	10
	Qualification-2	11.26	0.50	111.10	55.10	10
α -ocimene	Quantification	11.66	0.50	79.10	77.10	10
	Qualification-1	11.66	0.50	79.10	77.10	10
	Qualification-2	11.66	0.50	93.10	91.10	6
β -ocimene	Quantification	12.23	0.50	79.10	77.10	10
	Qualification-1	12.23	0.50	79.10	77.10	10
	Qualification-2	12.23	0.50	93.10	91.10	6

Table 1 Selected reaction monitoring (SRM) transitions and collision energies of terpenes (continued)

Analyte	Transition type	RT (min)	Window (min)	Mass	Product mass	CE (eV)
γ -terpinene	Quantification	12.80	0.50	93.10	77.00	12
	Qualification-1	12.80	0.50	93.10	91.10	6
	Qualification-2	12.80	0.50	136.10	93.10	10
α -terpinolene	Quantification	14.36	0.50	121.10	93.10	6
	Qualification-1	14.36	0.50	136.10	93.10	10
	Qualification-2	14.36	0.50	136.10	121.10	8
linalool	Quantification	15.63	1.00	55.10	29.10	10
	Qualification-1	15.63	1.00	71.10	41.10	10
	Qualification-2	15.63	1.00	71.10	43.00	6
isopulegol	Quantification	18.47	1.00	81.10	79.10	6
	Qualification-1	18.47	1.00	121.10	77.10	20
	Qualification-2	18.47	1.00	121.10	93.10	8
geraniol	Quantification	26.10	1.00	41.10	39.10	8
	Qualification-1	26.10	1.00	69.10	39.10	16
	Qualification-2	26.10	1.00	69.10	41.10	6
β -caryophyllene	Quantification	33.04	0.50	93.10	77.00	10
	Qualification-1	33.04	0.50	93.10	91.10	6
	Qualification-2	33.04	0.50	133.10	105.00	8
α -humulene	Quantification	34.72	0.50	93.10	77.00	12
	Qualification-1	34.72	0.50	147.10	77.10	32
	Qualification-2	34.72	0.50	147.10	105.10	8
nerolidol 1	Quantification	38.44	1.00	69.10	41.10	6
	Qualification-1	38.44	1.00	93.10	77.00	12
	Qualification-2	38.44	1.00	107.10	91.10	10
nerolidol 2	Quantification	39.74	1.00	69.10	41.10	6
	Qualification-1	39.74	1.00	93.10	77.00	12
	Qualification-2	39.74	1.00	107.10	91.10	10
caryophyllene oxide	Quantification	40.28	0.50	79.10	51.10	20
	Qualification-1	40.28	0.50	79.10	77.10	10
	Qualification-2	40.28	0.50	93.10	77.10	10
guaial	Quantification	41.09	1.00	107.10	91.10	10
	Qualification-1	41.09	1.00	161.10	105.10	8
	Qualification-2	41.09	1.00	161.10	119.10	8
bisabolol	Quantification	44.74	1.00	109.10	67.10	8
	Qualification-1	44.74	1.00	119.10	91.10	14
	Qualification-2	44.74	1.00	119.10	117.10	12

Sample and sample preparations

Sample for method development and validation

The sample blank selected is a material known not to contain detectable levels of the terpenes sought for spiking trace level of analytes. A sample blank of dried cannabis leaves (~10% moisture w/w) was obtained from the Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences. Also known as a matrix blank, the sample was homogenized into powder using a cryogenic blender (POWTEQ HM100, China) and passed through a 2-mm sieve as a blank sample to optimize and validate the method. The blank sample was then macerated in ethyl acetate for 30 min and the extract was filtered through the filter paper No.2. The collected powdered cannabis sample was dried in a ventilated oven at 50°C for 24 hours before use in method validation. The samples (0.1 g) from previous step were weighed into 20 mL scintillation vial and spiked with appropriate amount of standard solution. Five milliliters of ethyl acetate was added to the vial and closed suddenly with a screw cap. After mixing by vortex for 1 minute and sonication for 20 minutes, the vial was left at room temperature for at least 10 minutes. Then, approximately 4 mL of the resultant extract was transferred to a 15 mL test tube. Samples were centrifuged at 4,000 rounds per minute for 5 minutes and a portion was transferred to 2 mL GC vials.

Sample analysis for registration of plant varieties

A variety of Thai cannabis, GG#1, was developed by comprehensive research, including the study of botanical characteristics, chemical

and genetic profile in the Department of Medical Sciences. The species would be supervised and have distinctly different characteristics. To be registered by the Department of Agriculture, the terpene profile was determined in each variety from four parts of plant including inflorescences, leaves, stems and roots (4 × 20 samples).

Method development and validation

The method was developed and validated in accordance with AOAC guidelines with respect to linearity, accuracy (recovery), selectivity, repeatability, LOD, and LOQ. To achieve high sensitivity, MS conditions were optimized. An appropriate concentration of working solution of mixed standards was prepared and injected into the GC-MS/MS system. The obtained optimum MS parameters are selected. The identification of each compound with corresponding retention time were obtained by comparing with library database of instrument software.

The external standard calibration curve was performed for the quantification step. The six-point standard calibration curves were obtained by spiking mixed standards, ranging from 1 to 100 µg/mL, into ethyl acetate used as a solvent. The concentration-response relationship of the present method was required to be linear with r^2 values ≥ 0.99 . Accuracy, expressed as a percentage of recovery and precision (%RSD) was determined based on 10 replicated samples spiked at 0.05, 0.5, and 5 mg/g. The LOQs were evaluated by determining the lowest concentration spike for samples where accuracy and repeatability were satisfactory (within 70–120% and less than 20%, respectively). The estimation of LOD was calculated from the variability of the blank

signals read from the calibration curve. The standard deviation (SD) of the blank amount was used for determining the LODs, i.e. mean plus $3 \times \text{SD}$. The single analytical LOD of all terpenoids was selected to facilitate the method application in routine work and should be above all LODs calculated. Generally, LODs were estimated as one-third or half of the LOQs.

The selectivity of compounds for identification and confirmation of 21 terpenes when samples were analyzed, in all cases, should comply with three criteria. Firstly, same retention time as the standard (± 0.1 min); secondly, for GC-MS/MS, 2 product ions analyte peaks in the extracted ion chromatograms must fully overlap; and finally, ion ratios from sample extracts should be relatively within $\pm 30\%$ of the average of calibration standards from the same sequence.

Results

Under the optimized chromatographic gradient temperature, all 21 mono- and sesquiterpenoids of interest were separately resolved using the selected reaction monitoring (SRM) mode (Table 1). The results from method validation showed that the method was specific and selective. The method blank is a complete

analysis conducted using the solvents and reagents only, in the absence of any sample, and also known as a reagent blank or procedural blank with no interference in the chromatography system. The analytical peaks obtained by the injection of the cannabis leave sample blank, extract of a sample known not to contain detectable levels of the terpenes sought, aliquot into GC-MS/MS with SRM technique shown in Figure 2 presented no interference nor peak at or close to the retention time (RT) of the standard of interest. Moreover, the method was sensitive because the detected terpene peak has a signal-to-noise ratio (S/N) of more than 3 at the limit of detection. The specific ion intensity ratio of each component could improve the degree of confidence in the identification process. This GC-MS/MS SRM analysis allowed the detection and quantification of terpenes and terpenoids in cannabis plant tissues. The total ion chromatogram (TIC) of full chromatograms of 21 terpenes as well as some representative peak shapes of quantification and confirmation transitions is shown in Figure 3. The figure shows four examples of the chromatogram including one quantitation peak and two confirmation peaks at the same retention time in ion overlay display.

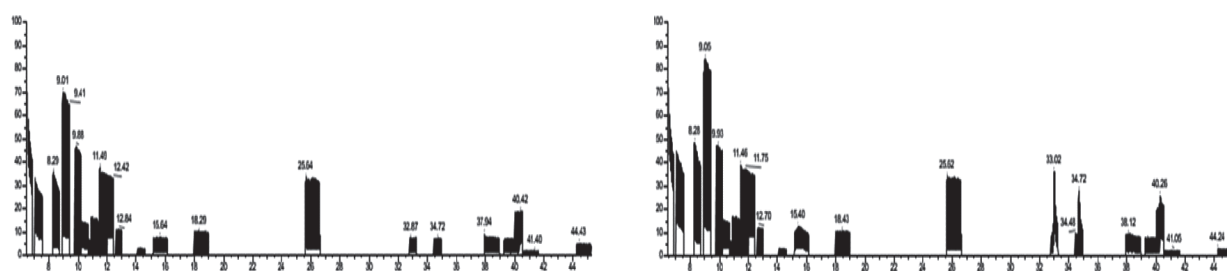


Figure 2 The total ion chromatogram (TIC) of the method blank and sample blank in GC-MS/MS under selected reaction monitoring (SRM) mode

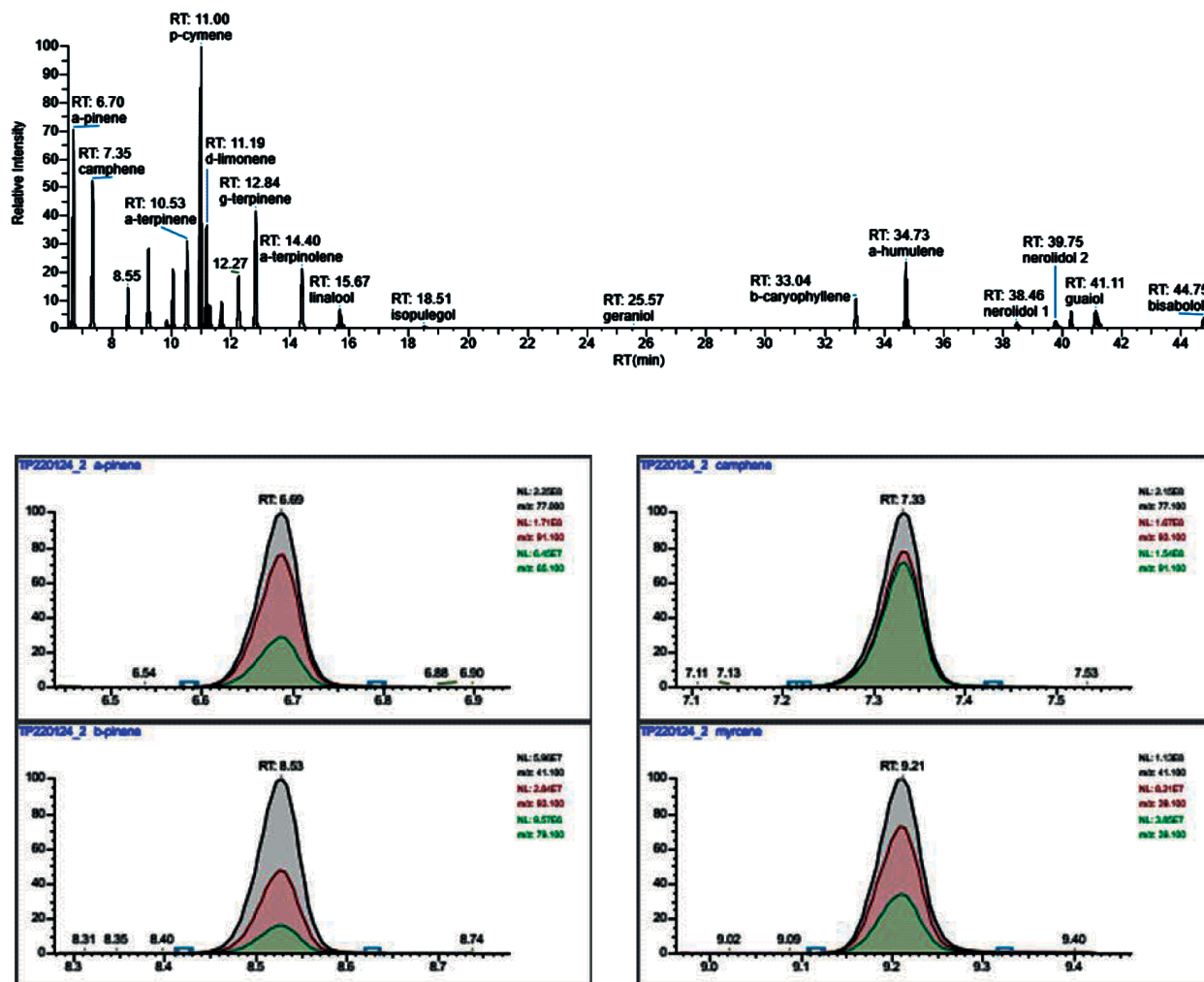


Figure 3 The total ion chromatogram (TIC) of 21 terpenes and some examples of quantification and qualification peaks; α -pinene, camphene, β -pinene and myrcene at LOD of 0.05 mg/g

The linearity of calibration curve was assessed and could be obtained by the relationship between the concentration of compounds and respective peak areas (responses). The standard curves with linearity in the range of 0.05 to 100 $\mu\text{g/mL}$ are shown in Figure 4. These curves for 20 substances had the coefficients of determination (r^2) ranging between 0.990 and 0.999, except geraniol (0.973), which was higher than the acceptable value of 0.99.

The limit of detection (LOD) was evaluated as the lowest concentration that could be statistically distinguished from an instrument

blank, following the criteria that the signal-to-noise ratio must be greater than 3. The limit of quantification (LOQ) for each terpene was the lowest concentration at which the identification, accuracy, and precision criteria were met, according to the AOAC guidance. The LOD and LOQ for each individual terpene were determined to be 0.03 and 0.05 mg/g in the plant sample, respectively.

The method accuracy and the method precision were determined by spiking a cannabis leave sample with three different concentration levels at LOQ, $10 \times \text{LOQ}$ and $100 \times \text{LOQ}$ of

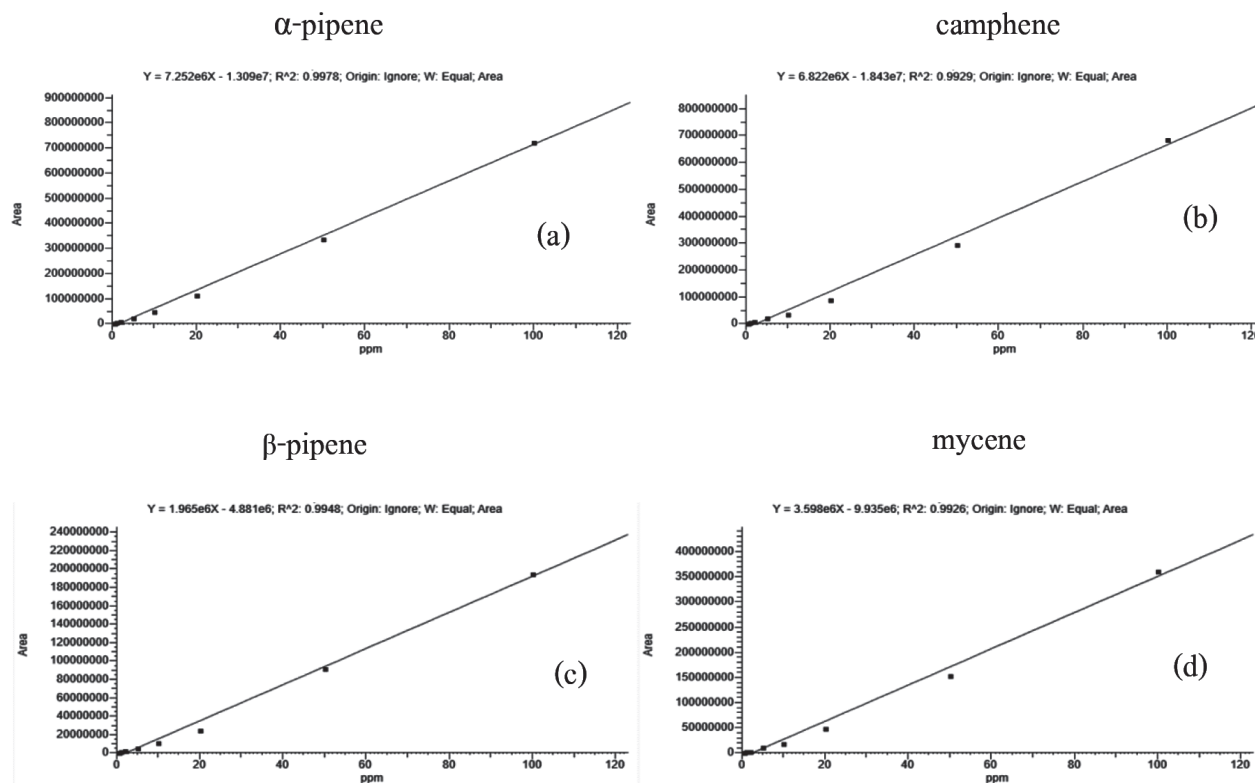


Figure 4 Calibration curves of some terpenes (0.05–100 $\mu\text{g/mL}$)

a) α -pinene, b) camphene, c) β -pinene and d) myrcene

the standard mixes. The three levels were within the dynamic range of concentrations of all the analytes. Accuracy was determined as the percent recovery from the comparison between the mean concentration obtained and

the expected concentration. The precision of the whole method was assessed by calculating the %relative standard deviations (%RSD) for repeatability. Accuracy and precision criteria are listed in Table 2.

Table 2 Acceptable criteria for analyte recovery and HorRat at different concentrations according to AOAC 2016⁽¹⁸⁾

Analyte concentration	%Recovery	HorRat
10 ppm	80–110	$0.3 \leq \text{HorRat} \leq 1.3$
100 ppm	90–107	$0.3 \leq \text{HorRat} \leq 1.3$
> 0.1%	95–105	$0.3 \leq \text{HorRat} \leq 1.3$

The method accuracy was determined by spiking a cannabis blank sample with three different concentration levels (LOQ, $10 \times \text{LOQ}$ and $100 \times \text{LOQ}$) of the standard mixes as presented in Figure 1. All the tested terpenoids

showed accuracies (%recovery) within 92.3–105.1%. The precision was calculated as repeatability represented by %RSD and Horwitz ratio (HorRat). The Horwitz ratio shown in Table 2 is the ratio of the observed RSD(r) from

the experiment and the corresponding predicted RSD(R) calculated from the Horwitz equation. The data showed the precision parameters were between 1.6% and 13.2% for %RSD and ranging from 0.3 to 1.1 for HorRat. The working range was estimated by spiking triplicates of five different concentrations (0.05, 0.1, 0.5, 1, and 5 mg/g). For most of the analytes studied, the linearity within the working range ($r^2 > 0.99$) was found to be 0.05–5 mg/g in the sample. The validation parameters for the GC-MS/MS method including linearity, accuracy and precision are shown in Table 3.

According to the acceptable criteria for analyte recovery and HorRat at different concentrations proposed by AOAC 2016 in Table 2, the method was accurate and fit for the intended use of the quantification procedure. Overall, these results indicated the good efficiency of the extraction and

instrumental protocol. Nevertheless, the accuracy of the whole method depends on the natural variability of terpenoids in the inflorescences and the precision of preparations (spiking a small volume of standards onto 0.1 g sample).

The results of the measurement uncertainty were estimated according to the ISO GUM approach or bottom-up approach (at a confidence level of approximately 95%, $k = 2$). An example of the estimation of measurement uncertainty value of d-limonene in dried cannabis leaves was shown in Figure 5. The major contributing factors were sample weight (42%), method precision (27%) and standard concentration (21%), while other elements such as bias or recovery (5%) and calibration curve (C_0 : 3%) contributed minimally as shown in Figure 5.

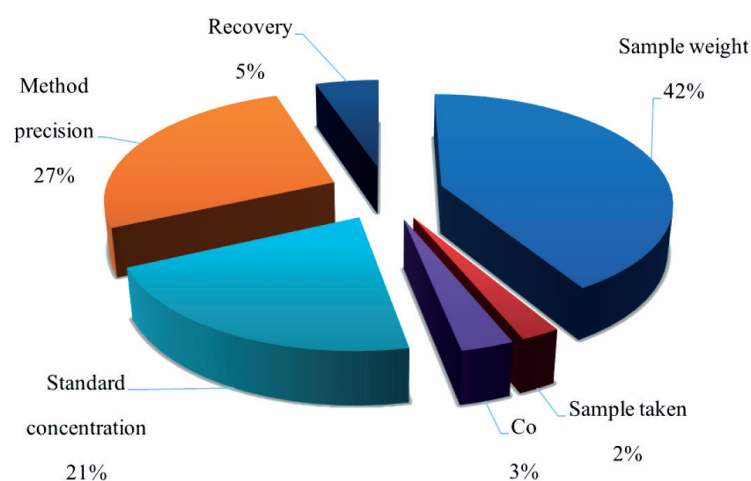


Figure 5 Contribution of the different sources to the overall combined uncertainties of d-limonene in dried cannabis leaves

Table 3 Validation parameters for the GC-MS/MS method: linearity, accuracy and precision (n = 10)

Compounds	Linearity (r ²)	Spiked-1 (0.05 mg/g)				Spiked-2 (0.5 mg/g)				Spiked-3 (5 mg/g)			
		Accuracy		Precision		Accuracy		Precision		Accuracy		Precision	
		Mean	%Rec	%RSD	HorRat	Mean	%Rec	%RSD	HorRat	Mean	%Rec	%RSD	HorRat
3-carene	0.9917	0.0475	95.0	2.7	0.3	0.4904	98.1	5.8	0.4	4.9524	99.0	3.5	0.3
α-humulene	0.9930	0.0466	93.2	11.0	0.9	0.4920	98.4	3.5	0.3	5.0214	100.4	3.3	0.3
α-ocimene	0.9929	0.0507	101.4	5.3	0.4	0.4915	98.3	4.2	0.3	4.9537	99.1	4.6	0.4
α-pinene	0.9978	0.0472	94.3	7.1	0.6	0.4718	94.4	4.1	0.3	5.0989	102.0	3.8	0.3
α-terpinene	0.9907	0.0511	102.1	6.6	0.5	0.4885	97.7	6.9	0.5	4.9116	98.2	4.0	0.3
α-terpinolene	0.9906	0.0508	101.5	6.8	0.5	0.4730	94.6	4.6	0.4	5.0248	100.5	4.7	0.4
β-caryophyllene	0.9928	0.0521	104.2	3.0	0.3	0.4764	95.3	2.7	0.2	4.9561	99.1	2.3	0.3
bisabolol	0.9974	0.0461	92.3	7.8	0.6	0.4810	96.2	4.8	0.4	5.0407	100.8	3.7	0.3
β-ocimene	0.9928	0.0462	92.5	11.3	0.9	0.4968	99.4	4.6	0.4	5.0001	100.0	3.7	0.3
β-pinene	0.9948	0.0491	98.1	6.6	0.5	0.4861	97.2	4.5	0.4	4.7611	95.2	3.2	0.3
camphene	0.9929	0.0492	98.3	3.7	0.3	0.4925	98.5	5.5	0.4	5.1031	102.1	3.4	0.2
caryophyllene oxide	0.9934	0.0486	97.3	9.9	0.8	0.4796	95.9	4.9	0.4	5.1529	103.1	4.4	0.3
cineole	0.9932	0.0494	98.7	5.0	0.4	0.4953	99.1	5.3	0.4	5.1147	102.3	2.4	0.3
d-limonene	0.9990	0.0517	103.5	4.3	0.3	0.4961	99.2	3.3	0.3	5.0936	101.9	3.0	0.3
geraniol	0.9986	0.0513	102.6	5.3	0.7	0.4963	99.3	3.3	0.3	4.1202	82.4	5.1	0.5
γ-terpinene	0.9939	0.0502	100.4	7.8	0.6	0.4975	99.5	4.4	0.3	4.9158	98.3	9.7	0.8
guaial	0.9734	0.0463	92.5	8.1	0.7	0.4836	96.7	4.4	0.3	5.1950	103.9	6.4	0.5
isopulegol	0.9948	0.0464	92.8	13.2	1.1	0.4883	97.7	5.2	0.4	5.1248	102.5	3.6	0.3
linalool	0.9900	0.0495	98.9	5.9	0.4	0.4954	99.1	4.5	0.3	5.0463	100.9	3.1	0.3
myrcene	0.9926	0.0510	102.0	6.2	0.5	0.5017	100.3	5.0	0.4	5.0670	101.3	3.4	0.3
nerolidol 1	0.9969	0.0487	97.4	10.2	0.8	0.5145	102.9	4.4	0.3	5.1062	102.1	1.6	0.3
nerolidol 2	0.9923	0.0474	94.9	9.5	0.8	0.4848	97.0	4.6	0.4	5.1425	102.9	4.7	0.3
p-cymene	0.9914	0.0526	105.1	2.7	0.3	0.4977	99.5	4.8	0.4	5.0283	100.6	3.4	0.3

The developed GG-MS/MS method was applied to the determination of terpene profile characteristics of GG#1 cannabis variety grown in our Department. Four parts of the plant including inflorescences, leaves, stems and roots were selected to be analyzed. The blind selection of 20 individual plants was harvested from a cannabis field trial plantation of approximately 100 plants from the same seed species. A total of 80 samples were tested for the quantification of terpenes to give the unique profile for the further species registration.

A variation in the total and individual terpene content between four different parts of the plant was observed. Table 4 shows, in general, that the concentration of all terpenes in inflorescence was higher than in other parts of the plant. For example, the content of α -pinene was around 10 times higher in the flowers than in leaves and stems. Three compounds,

which were caryophyllene oxide, geraniol, and isopulegol, were not traceable in any samples. Leaves and stems presented slightly the same content level of terpenes while roots did not contain any terpene in plant tissue. Figure 6 shows the distribution of cannabis terpenes present in four parts of GG#1 cannabis variety. These observable data may help in the selection of a specific variety or to differentiate one variety from another on the basis of terpene content profile. In our works, as all plants were grown in a specific area and under the same condition, the consistency in the terpene concentration was consequently noticed in these materials. More studies should be undertaken using the principal component analysis to investigate the distribution of terpenes in the same cannabis strain produced in different areas and with changes in climates, resources, and farmers' cultivation practices.

Table 4 Quantitative analysis of four parts of cannabis plant samples in mg/g (n = 20)

Terpenes	Average concentration $\pm$ SD (mg/g)			
	Inflorescences	Leaves	Stems	Roots
3-carene	0.83 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01	ND
α -humulene	3.54 $\pm$ 0.14	0.18 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.01	ND
α -ocimene	1.29 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.01	< LOQ
α -pinene	1.54 $\pm$ 0.09	0.09 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.01	ND
α -terpinene	2.54 $\pm$ 0.03	0.22 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.01	< LOQ
α -terpinolene	2.15 $\pm$ 0.06	0.21 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01	< LOQ
β -caryophyllene	5.25 $\pm$ 0.27	0.17 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.01	ND
bisabolol	2.52 $\pm$ 0.06	0.14 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.01	ND
β -ocimene	1.43 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01	< LOQ
β -pinene	0.47 $\pm$ 0.06	< LOQ	ND	ND
camphene	0.86 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	ND
caryophyllene oxide	ND	ND	ND	< LOQ
cineole	0.37 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01	ND
d-limonene	0.95 $\pm$ 0.03	< LOQ	0.11 $\pm$ 0.01	ND
geraniol	ND	ND	ND	ND
γ -terpinene	0.76 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01	ND
Guaiol	2.82 $\pm$ 0.08	0.17 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.01	ND
isopulegol	ND	ND	ND	ND
linalool	1.12 $\pm$ 0.02	ND	0.09 $\pm$ 0.01	< LOQ
myrcene	1.03 $\pm$ 0.02	< LOQ	0.12 $\pm$ 0.01	ND
nerolidol 1	1.5 $\pm$ 0.05	ND	0.09 $\pm$ 0.01	ND
nerolidol 2	2.57 $\pm$ 0.06	0.07 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.01	ND
p-cymene	0.54 $\pm$ 0.04	0.08 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01	ND

ND = not detected; < LOQ = less than 0.05 mg/g

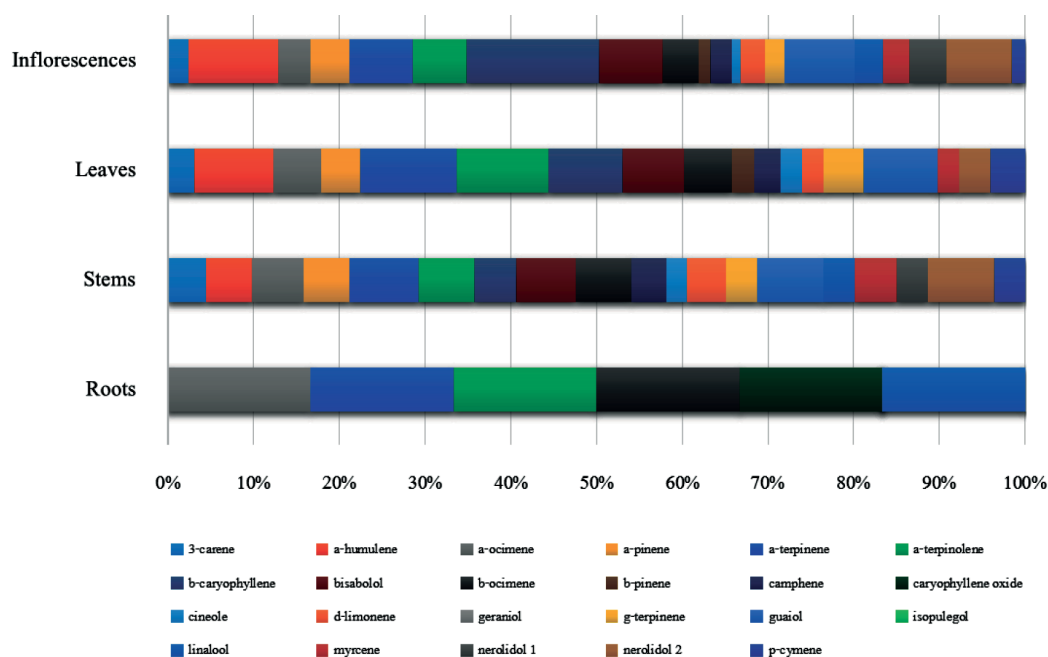


Figure 6 Distribution of cannabis terpenes present in four parts including inflorescences, leaves, stems and roots of GG#1 cannabis variety

Discussion

The challenge for the analysis of different classes of properties of terpenes is the selection of solvent of extraction. Even though the optimum solvent composition for terpene and cannabinoid compounds differs depending on the mixture of analytes of interest,⁽¹⁹⁾ in this work we found that ethyl acetate is the solvent of choice and represents an excellent extraction property with a compromised recovery rate obtained. The use of small amounts of organic solvent results in low environmental impact with less waste to be managed.⁽²⁰⁾ Another important parameter highly affecting the results was the sample concentration before instrument injection. Due to the powerful instrument sensitivity given by GC-MS/MS with the aid of triple quadrupole technique, the sample concentration of 0.005 g/mL was prepared and was enough for clear separate detection.

The terpene testing still provides sufficient concentrations of terpenes in working sample solutions to be quantified without concentrating them. Because the terpenes are very volatile and significantly lost during evaporation step, our technique has been shown to be suitable for recovery reservation. To identify individual terpene by gas chromatography using analytical column, the analytes were separated in a fused silica capillary column DB-5MS with ubiquitous stationary phase based on 5% phenyl/95% dimethylpolysiloxane. This middle polar column was selected firstly because it was available in our laboratory as a column of choice in pesticide residue analysis. The terpenoid compounds were therefore easily separated between each other using the temperature gradient programme⁽²¹⁾ set by constant low rate of temperature changes due to a big difference in volatility of the compounds.

The developed method presents a great analytical performance within a reasonable analysis timeframe, since it provides separation of multiple components in cannabis plant. Twenty-one analytes were separated with excellent resolution and the baseline was clean enough for identification and confirmation. Validation data including the linearity, accuracy and precision parameters shown in Table 3 confirmed the suitability of the method also for quantitative use. Sufficiently low sensitivity limits given by the instrument set-up were important especially from the terpene standpoint, and on the other hand, accurate results during extraction and analytical step allowed work with non-concentrated or non-diluted working sample solutions. This is a great advantage especially in view of the process simplicity.

The developed extraction and instrumental analyses provide sufficient sensitivity to identify target terpenes highly present in cannabis plants. Figure 3 shows the separation of 21 compounds and isomers; and in Table 4, the identification of terpenes with ion intensity ratio used for confirmation purpose is provided. Eighteen terpenes were abundantly present in inflorescence samples and could be used as complementary chemical markers in the qualification of Cannabis genus plants. A variation in the total and individual terpene content between parts of plant was observed. Within the inflorescences from cannabis flower, the content of terpenes was generally higher in the other parts. For example, the content of α -humulene was around twenty times higher in the leaves and stems (0.18 and 0.13 mg/g), while the compound was not detected in the roots. The trend was observed continually in

the rest of target terpenes. These observations may help in the selection of a specific variety or to differentiate one variety from another on the basis of terpene content. More studies are underway using principal component analysis to investigate the distribution of terpenes among different Thai cannabis varieties produced in Thailand under medical cannabis laws.

Conclusion

In this study, a GC-MS/MS method was developed for the simultaneous analysis and quantification of 21 terpenes. Using tandem mass spectrometer offers the added benefit of spectral confirmation of peaks to ensure that identification is accurate with no co-eluting interferences. The method was shown for cannabis terpenoids; however, it could also be used for other natural terpenes as well. The extraction and instrument method were fully validated showing the reliability and practicability of the method. A single solvent was used to demonstrate an environmentally friendly and simple microextraction of hemp and cannabis plant materials. The validation parameters, including linearity, sensitivity, selectivity, precision, and accuracy, were acceptable within analytical criteria. The working range covered the whole concentration of terpenoids present in GG#1 cannabis strain. This method has been successfully applied to the analysis of cannabis inflorescences, leaves, stems and roots. Data of terpenes profile from this work, which will be incorporated with botanic, genetic, and other chemical information from our Department along with the medical efficacy and safety of cannabis varieties, will be registered by the authority for the official recognition in Thailand.

Acknowledgement

Authors thank the Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, for providing the cannabis blank sample and the GG#1 cannabis parts of plant.

References

- Pichersky E, Raguso RA. Why do plants produce so many terpenoid compounds? *New Phytol* 2018; 220(3): 692–702.
- Lange BM. The evolution of plant secretory structures and emergence of terpenoid chemical diversity. *Annu Rev Plant Biol* 2015; 66: 139–59.
- Booth JK, Bohlmann J. Terpenes in Cannabis sativa – from plant genome to humans. *Plant Sci* 2019; 284: 67–72.
- Grotenhermen F. Pharmacology of cannabinoids. *Neuro Endocrinol Lett* 2004; 25(1–2): 14–23.
- Whiting PF, Wolff RF, Deshpande S, Di Nisio M, Duffy S, Hernandez AV, et al. Cannabinoids for medical use: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2015; 313(24): 2456–73.
- Russo EB. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br J Pharmacol* 2011; 163(7): 1344–64.
- Ahmed SA, Ross SA, Slade D, Radwan MM, Khan IA, ElSohly MA. Minor oxygenated cannabinoids from high potency Cannabis sativa L. *Phytochemistry* 2015; 117: 194–9.
- Giese MW, Lewis MA, Giese L, Smith KM. Development and validation of a reliable and robust method for the analysis of cannabinoids and terpenes in cannabis. *J AOAC Int* 2015; 98(6): 1503–22.
- Brown AK, Xia Z, Bulloch P, Idowu I, Francisco O, Stetefeld J, et al. Validated quantitative cannabis profiling for Canadian regulatory compliance – cannabinoids, aflatoxins, and terpenes. *Anal Chim Acta* 2019; 1088: 79–88.
- Fischedick JT, Hazekamp A, Erkelens T, Choi YH, Verpoorte R. Metabolic fingerprinting of Cannabis sativa L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry* 2010; 71(17–18): 2058–73.
- Brenneisen R. Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other Cannabis constituents. In: Marijuana and the cannabinoids. Totowa, NJ: Humana Press; 2007. p. 17–49.
- Booth JK, Yuen MMS, Jancsik S, Madilao LL, Page JE, Bohlmann J. Terpene synthases and terpene variation in Cannabis sativa. *Plant Physiol* 2020; 184(1): 130–47.
- Casano S, Grassi G, Martini V, Michelozzi M. Variations in terpene profiles of different strains of Cannabis sativa L. *Acta Hort* 2011; 925: 115–21.
- Lockwood GB. Techniques for gas chromatography of volatile terpenoids from a range of matrices. *J Chromatogr A* 2001; 936(1–2): 23–31.
- Antalick G, Perello MC, de Revel G. Development, validation and application of a specific method for the quantitative determination of wine esters by headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem* 2010; 121(4): 1236–45.
- Shapira A, Berman P, Futoran K, Guberman O, Meiri D. Tandem mass spectrometric quantification of 93 terpenoids in Cannabis

- using static headspace injections. *Anal Chem* 2019; 91(17): 11425–32.
17. Marchini M, Charvoz C, Dujourdy L, Baldovini N, Filippi JJ. Multidimensional analysis of cannabis volatile constituents: identification of 5,5-dimethyl-1-vinylbicyclo[2.1.1]hexane as a volatile marker of hashish, the resin of *Cannabis sativa* L. *J Chromatogr A* 2014; 1370: 200–15.
18. AOAC International. Appendix F: guidelines for standard method performance requirements. In: AOAC official methods of analysis. [online]. 2016; [18 screens]. Available from: URL: https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf.
19. Namdar D, Mazuz M, Ion A, Koltai H. Variation in the compositions of cannabinoid and terpenoids in *Cannabis sativa* derived from inflorescence position along the stem and extraction methods. *Ind Crops Prod* 2018; 113: 376–82.
20. Adams DJ, Dyson PJ, Tavenor SJ. Chemistry in alternative reaction media. Chichester, UK: John Wiley & Sons; 2005.
21. Delgado-Povedano MM, Sánchez-Carnerero Callado C, Priego-Capote F, Ferreira-Vera C. Untargeted characterization of extracts from *Cannabis sativa* L. cultivars by gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry in high resolution mode. *Talanta* 2020; 208: 120384.

การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวิเคราะห์ สารเทอร์พีนและเทอร์พีนอยด์ในกัญชากัญชง โดยเทคนิค GC-MS/MS

วีรวุฒิ วิทยานันท์ และ ธรรณิศจ์ ไชยมงคล

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ เทอร์พีน (Terpenes) เป็นหนึ่งในองค์ประกอบหลักที่มีอยู่ในพืชกัญชากัญชง ซึ่งผลของการรักษาอาการผิดปกติของร่างกายและสมองโดยใช้กัญชากัญชงขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและสัดส่วนจำเพาะของเทอร์พีน การบำบัดความผิดปกติทางอารมณ์และโรควิตกกังวลด้วยกัญชากัญชงต้องอาศัยการทำงานแบบ entourage effect ของสารกลุ่มเทอร์พีนร่วมกับสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ การกำหนดปริมาณและสัดส่วนของเทอร์พีนในกัญชากัญชงจึงมีความสำคัญต่อการคัดเลือกพืชสมุนไพร การศึกษาได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง triple quadrupole mass spectrometer โดยเทคนิค SRM และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีเพื่อหาชนิดและปริมาณของเทอร์พีนรวม 21 ชนิด เตรียมตัวอย่างโดยการสกัดส่วนของพืชด้วยเอทิลอะซิเตตตามด้วยการแยกสารด้วยการสั่นสะเทือนจากคลื่นอัลตราโซนิกและหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอน สารสกัดตัวอย่างที่ได้ถูกฉีดโดยตรงเข้าเครื่องมีโอวิเคราะห์ ผลการทดสอบพบช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ระหว่าง 0.05–5 มิลลิกรัมต่อกรัม โดยมีค่า $r^2 > 0.99$ ความแม่นยำจากการคืนกลับเฉลี่ยของเทอร์พีนทุกชนิดยกเว้น geraniol ในตัวอย่างมีค่าอยู่ระหว่าง 92.3–105.1% ความเที่ยงของวิธีแสดงด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) อยู่ในเกณฑ์ยอมรับระหว่างตั้งแต่ 1.6–13.2% ขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณของเทอร์พีนมีค่าเป็น 0.03 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจง เชื่อถือได้ แม่นยำ และสามารถนำไปใช้กับการหาปริมาณเทอร์พีนที่เป็นองค์ประกอบในส่วนต่างๆ ของกัญชากัญชงที่พัฒนาสายพันธุ์โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้แก่ ช่อดอก ใบ ต้น และราก เพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนพันธุ์พืชกับกรมวิชาการเกษตรต่อไป

คำสำคัญ: เทอร์พีน, เทอร์พีนอยด์, กัญชา, กัญชง, GC-MS/MS

Acute and Sub-Chronic Oral Toxicity of Kratom leaves aqueous extract in Wistar rats

Passaraporn Srimangkornkaew, Kittigan Suwannasaroj, and Aunchalee Sirimontaporn
National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand

ABSTRACT Kratom, or *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil. is widely used in pharmaceutical and medical applications, including food or dietary supplements. Toxicological testing data for Kratom has been less conducted in Thailand, although Kratom can be easily traded at present. This study aimed to assess the acute and sub-chronic oral toxicity of Kratom leaves aqueous extract in Wistar rats to obtain useful information for product registration, including confidence and product safety for consumers. The results showed the doses at 300 and 2,000 mg/kg body weight did not cause acute toxicity and mortalities in animals, thus Kratom leaves aqueous extract was classified in GHS (Globally Harmonised System for Classification and Labeling of Chemicals) category 5 or unclassified, with the LD₅₀ cut off at 5,000–∞ mg/kg body weight of the animal. The sub-chronic oral toxicity testing was investigated at 250, 500, and 1,000 mg/kg body weight. It was concluded that the no observed adverse effect level (NOAEL) of Kratom leaves aqueous extract was 1,000 mg/kg body weight of the animal. From this study, the toxicity profile of Kratom leaves aqueous extract provided valuable data that was essential and could be supported for future studies, especially the toxicity study of Kratom product, which was produced and sold in Thailand. In the future, chronic toxicity studies will be emphasized to evaluate its safety and long-term effects.

Keywords: *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil., Kratom leaves aqueous extract, Acute and sub-chronic oral toxicity

Corresponding author: E-mail: kittigan.suw@mahidol.edu

Received: 15 July 2023

Revised: 30 January 2024

Accepted: 27 March 2024

Introduction

Kratom (*Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil.) is a plant belonging to the Rubiaceae family and native to Southeast Asia.^(1,2) The botany of Kratom plants is perennial, with a height of around 15–30 meters.⁽³⁾ The trunk is generally straight, and the outer bark is smooth and gray.⁽⁴⁾ The leaves are dark green, glossy on their upper surfaces, ovate-acuminate in shape, and opposite in growth pattern.⁽⁵⁾ The spherical inflorescences are grown in clusters of three at the ends of the branches and are deep yellow.⁽⁶⁾ In Thai traditional medicine, Kratom leaves were used to suppress stomach pain, cure dysentery, cure diarrhea, relieve body aches and pains, and act as sedatives.⁽³⁾ It produces and accumulates substances in various groups, including alkaloids, flavonoids, triterpenes, phenolic compounds, etc. The indole

alkaloids are the largest group of compounds found in Kratom. The active substance is mitragynine, the main compound reported in Thai Kratom leaves as high as 66% by weight compared to the total alkaloids⁽³⁾, while other alkaloids are reported in small amounts, which are not more than 2% of the total alkaloids, such as 7-hydroxymitragynine, speciogynine, and mitraciliatine.⁽⁷⁾ Mitragynine is the main compound of alkaloids in Kratom leaves, and other alkaloids are derivatives or diastereomers of mitragynine (Figure 1).⁽⁸⁾ The mitragynine substance was first isolated in 1907.⁽⁹⁾ However, to synthesize mitragynine using organic synthesis, it was succeeded by Takayama H., et al.⁽¹⁰⁾ and Ma J., et al.⁽¹¹⁾ However, the amount that could be synthesized was less than the natural extraction.

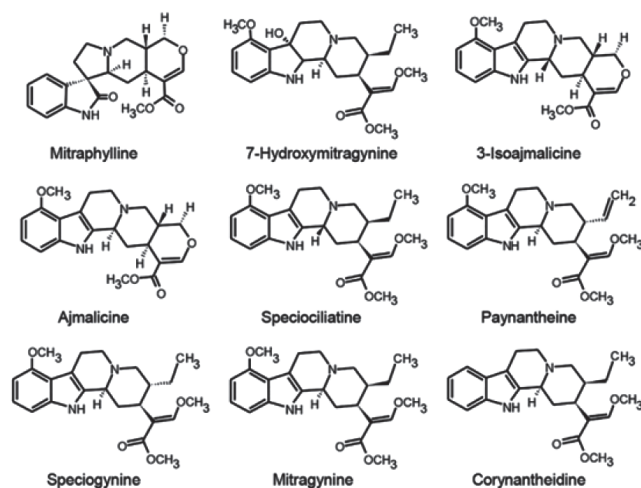


Figure 1 Chemical structures of alkaloids in *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil. Leaves⁽⁸⁾

The pharmacology of mitragynine affects the nervous system, digestive system, anti-inflammatory and antibacterial effects, and other systems such as high blood pressure, etc.⁽³⁾

For the toxicology study of Kratom, there were some reports; for example, Sabetghadam A., et al.⁽¹²⁾ indicated that the LD₅₀ of mitragynine in mice with oral administration was 477.1 mg/kg

body weight, and kratom extract containing 20–22% mitragynine content had an LD₅₀ of 591.6 mg/kg body weight, while the LD₅₀ value of the mitragynine compound with oral administration was higher than the intravenous administration reported by Smith LC., et al.⁽¹³⁾ and Harizal SN., et al.⁽¹⁴⁾ The oral administration of the methanol extract from Kratom given to rats at doses of 100, 500 and 1,000 mg/kg body weight caused no deaths in 14 days. This substance did not affect feed and water consumption, including visceral weight and blood values, but was found to have an effect on the weight gain of animals, while at a dose of 100 mg/kg body weight, it inhibited weight gain. The results of the aforementioned were consistent with Ilmie MU., et al.⁽¹⁵⁾ It was found that rats receiving methanol extract from Kratom for 14 days at doses of 100, 500 and 1,000 mg/kg body weight had significantly higher blood pressure than the control. At a dose of 1,000 mg/kg body weight, the liver tissue was damaged, but the lung and kidney tissues were not damaged, and no abnormality of the blood cell count was found. From Sabetghadam A., et al.⁽¹⁶⁾ it was reported that oral administration of mitragynine to rats for 28 days showed a decrease in red blood cell, white blood cell, and platelet counts, yet hemoglobin (HGB) and hematocrit (HCT) levels increased. Besides, those rats receiving the methanol extract from Kratom at doses of 100, 500 and 1,000 mg/kg body weight performed alanine aminotransferase (ALT) higher than the control group, which

was taken morphine-treated patients at the toxic dose also had changes in albumin and triglyceride levels, which indicated abnormalities in liver function and hepatic tissue injury.⁽¹⁴⁾

The rational of the Kratom study was that, due to legal control in the past, Kratom was classified as a narcotic drug type 5, but this law had been abolished in the present which effective on 27th August 2022.⁽¹⁷⁾ Thus, Kratom was popularly and widely used as medicine because it was believed to be safe with little or no side effects. Moreover, it was important to document toxicological data comprehensively for their safety reasons, resulting in more Kratom studies nowadays. Notwithstanding the widespread use of Kratom, there was still insufficient data about its toxicity. Therefore, this study was performed to evaluate acute and sub-chronic toxicity. The acute oral toxicity of Kratom leaves aqueous extract was studied for classification in the GHS (Globally Harmonised System for Classification and Labeling of Chemicals) category, which complied with OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 423, Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method (Figure 2).⁽¹⁸⁾ The methodology of sub-chronic oral toxicity modified from the OECD Guidelines for Testing of Chemicals 408, Repeated Dose 90-Days Oral Toxicity Study in Rodent⁽¹⁹⁾ that was performed to confirm the edible safety and to evaluate the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) for long-term use of Kratom leaves aqueous extract.



Preparation of the dose

For acute oral toxicity, Kratom leaves aqueous extract was being weighed and freshly mixed with sterile water as vehicle prior to administration, which was calculated at 300 and 2,000 mg/kg body weight. Kratom leaves aqueous extract for sub-chronic oral toxicity was prepared as same as the acute oral toxicity but using 3 dose levels (low, medium, and high dose), which were 250, 500, and 1,000 mg/kg body weight.

Preparation of animals

The 12 females of Wistar rats (9 weeks) and 50 males and 50 females of Wistar rats (6 weeks), whose their body weight ranged from 200 g $\pm$ 20% were used for acute and sub-chronic oral toxicity, respectively. All animals were obtained from the Office of Laboratory Animal Production, National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand.

Animal husbandry conditions

The animals were housed in stainless steel cages with feed (082, Perfect Companions, Thailand) and 5–7 ppm chlorinated water *ad libitum* under standard conditions of 12 hours light, 12 hours dark, at $22 \pm 3^\circ\text{C}$, and 30–70% relative humidity. All the animals were acclimatized for at least 5 days prior to the study. Guidelines of “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” were strictly followed throughout the study.⁽²¹⁾

Acute oral toxicity test

For the administration of the dose for acute oral toxicity, the animal was fasted (feed but not water) overnight (15–18 hours) prior to

administration. After that, a substance at dose levels of 300 and 2,000 mg/kg body weight was administered orally to the animal in a single dose and then feed to the animal after 3–4 hours that test substance had been administered.

Observational, the animal was monitored during the first 4 hours, with special attention during the first 30 minutes, and then periodically during the first 24 hours. A general observation of animals was observed individually for toxic effects such as changes in skin and fur, eye and mucous membranes, respiratory, circulatory, autonomic, and central nervous systems, somatomotor activity, and behaviour pattern daily. The addition would be directed to observations of tremors, convulsions, gasping, cyanosis, vocalization, salivation, diarrhea, lethargy, sleep, and coma. The body weight, feed, and water consumption of the survived animals were measured and recorded on days 1, 7, and 14 after each dose level administration.

Necropsy Examination, after 14 days, the survived animals were euthanized using CO_2 inhalation.⁽²²⁾ And all tested animals were sacrificed. The positions, shapes, sizes, and colours of internal organs were evaluated.

Sub-chronic oral toxicity test

Administration of doses for sub-chronic oral toxicity, 50 males and 50 females of Wistar rats were used and randomized into 5 groups (10 animals per sex/20 animals per group). Group 1 as the control group (vehicle control; sterile water), Group 2, 3, and 4 as the main groups at low dose, middle dose, and high dose (250, 500, and 1,000 mg/kg body weight of Kratom leaves aqueous extract, respectively), and Group 5 as the recovery group. The dosage

administration for each animal was calculated based on the body weight of the animal prior to administration at a constant volume of 1 ml per 500 g body weight. All animals were administered once daily for 90 days, and without dosing during the recovery period, 14 days for the recovery group.

Observational, all animals were monitored at least once a day for clinical signs at the similar time and were done outside the cage. After the last dose, animals in the recovery group were scheduled for follow-up observations to determine persistence and look at the exacerbation and/or reversibility of potential adverse effects for a total of 14 days. A general observation of animals was observed, as same as the acute oral toxicity test. In addition, the ophthalmological examination was performed before and after dosing, and the neurological examination was examined once a week, starting at week 11th. The animal body weight, feed, and water consumption data were measured and recorded weekly, and the recovery group was continuously observed for another 14 days after 90 days of administration.

For necropsy examination, the animal was fasted (feed but not water) overnight (15–18 hours) on the last day of each group, and CO₂ inhalation⁽²²⁾ was used to euthanize. The cardiac puncture method was used for the blood sample collection, which was separated into 2 tubes for hematological (200 µl) as an EDTA tube and clinical biochemistry analysis (800 µl). The automated analyzer (Procyte DxTM, IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA) was used to perform the hematological analysis of 13 parameters: red blood cell count (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit

(HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelet (PLT), white blood cell count (WBC), neutrophil (NEUT), lymphocyte (LYMPH), monocyte (MONO), eosinophil (EO), and basophil (BASO). The 17 parameters of clinical biochemistry analysis were measured using an automated blood analyzer (Cobas[®] c311, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), which consisted of sodium (Na), potassium (K), chloride (Cl), glucose (SGLU3), cholesterol (CHO2L), triglyceride (TRIGL), uric acid (UA2), blood urea nitrogen (U-BUN), creatinine (CREA2), total protein (TP2), albumin (ALB2), globulin (GLO), high-density lipoprotein (HDL4), low-density lipoprotein (LDL3), alanine amino transferase (ALT), aspartate amino transferase (AST), and alkaline phosphatase (ALP2S). The necropsy was evaluated the positions, shapes, sizes, and colors of internal organs. The organs were trimmed and weighed (all the paired organs were weighed separately) to determine relative organ weights as liver, kidneys, lung, adrenals, heart, spleen, brain, thymus, testes, and epididymides for males, uterus, and ovaries for females. Paraffin section technique: the organs were trimmed and embedded for histopathology examinations, and then the liver, kidneys, lung, heart, and spleen were compared by a scoring system between the control and high-dose groups.

Statistical Analysis

The mean $\pm$ standard deviation was used to show the quantitative results. The Kolmogorov-Smirnov test and Levene's test⁽²³⁾

were performed to statistically analyze the data for normality and homogeneity of variances. The data between the control group and each treatment group were compared by ANOVA and the Mann-Whitney U test. A significant difference using SPSS[®] Statistical software version 18.0.0 was consulted ($p \leq 0.05$).

Ethical approval

The study was approved by the National Laboratory Animal Center Animal Care and Use Committee (NLAC-ACUC), Mahidol University, Thailand, on May 25, 2022, coded RA2022-12 for acute oral toxicity and RA2022-13 for sub-chronic oral toxicity.

Results

For both toxicity test, it was shown that no animal mortalities occurred, and the clinical signs did not show any toxicity or changes in physical examination. The result of the ophthalmological and neurological examinations was normal.

The result of the animal motor activity assessment showed the average in the low dose (week 12), high dose (week 11), and recovery group (week 14) in male animals was statistically significant difference higher than the control group, but the recovery group of males (week 15) and females (week 14) was statistically significant difference lower than the control group ($p \leq 0.05$). Moreover, there was no statistically significant difference between animals for both sexes in fore-limb grip strength and hind-limb grip strength; only females of low dose (week 11) showed a statistically significant difference higher than when compared with the control group ($p \leq 0.05$). The individual body

weights of the survived animals continued to gain throughout the testing period. There was a statistically significant difference for only male body weight in the main group, but in the recovery group for both sexes, there was no statistically significant difference when compared with the control group ($p \leq 0.05$). The data on acute oral toxicity and sub-chronic oral toxicity are presented (Table 1 and Figure 3), respectively. For oral toxicity tests, acute and sub-chronic, the feed and water consumption of animals were measured daily, and the data showed that all animal feed and water consumptions were regular. The result showed the feed and water consumption data for sub-chronic oral toxicity in animals (Figures 4 and 5).

Regarding relative organ weight, the following organs (Tables 2 and 3) were converted to relative organ weights (organ-to-body weight ratios). There was a statistically significant difference in organ weight when compared with the control group for both sexes ($p \leq 0.05$). The averages of left and right testis (low dose), right epididymides (low dose and middle dose), heart, and pituitary glands (high dose) for male animals, including the right and left kidney, right adrenal gland, and right ovaries, and oviduct (recovery) for female animals, were statistically significant differences lower than the control group, but only the left thyroid and parathyroid glands in low dose for female animals were statistically significant differences higher than the control group.

Macroscopic findings were observed as mild multifocal thymic hemorrhage (all group in male animals and low dose and high dose in female animals), clear fluid retention in

the uterus (all group in female animals), severe distension of the stomach (severe gastric dilation), and moderate reddening at the peripheral area of both caudal lung lobes in high dose male animals. For microscopic findings, according to the macroscopic lesions at necropsy findings, necrosis consisted of the minimal to moderate focal thymic hemorrhage observed in the thymus gland for all groups in male animals and low dose and high dose in female animals, the mild to moderate dilation of the uterine lumen (all groups in female animals), the endometrial and glandular epithelial degeneration, and necrosis (low dose in female animals). The kidneys revealed minimal focal hyaline cast (control and recovery group in male animals), which was characterized by homogeneous eosinophilic material (tubular proteinosis) filling the tubular lumen, minimal focal tubular mineralization in the kidneys (recovery group in female animals), and minimal focal mononuclear cell infiltration at periportal areas without associated alteration of adjacent hepatocytes in the liver (high dose, recovery group in male animals, and control group in female animals).

The clinical biochemistry analysis showed a statistically significant difference when compared with the control group for both sexes ($p \leq 0.05$). TP2 and ALB2 (low dose), U-BUN TP2 and ALB2 (middle dose), ASTL ALTL ALB2 (high dose), Na (recovery) of males and TP2 ALB2 (middle dose), and CHO2I TRIGL ALB2 HDLC4 (recovery) of females were statistically significant differences higher than the control group. The averages of K (middle dose), CREA2 (high dose) for males and CREA2 (middle dose) for females were statistically

significant difference lower than the control group. In addition, the averages of Cl in low, moderate, and high dose groups for both sexes were statistically significant difference lower than the control group (Tables 4 and 5).

In the hematological analysis, the averages of RBC, HGB, and MONO of male animals in the moderate dose group were statistically significant difference lower than the control group ($p \leq 0.05$). The averages of RBC, HGB, and WBC of females in the moderate and high dose groups were statistically significant differences higher than the control group ($p \leq 0.05$), but only the WBC of females was related to the dose of the test item. For the recovery group, there was no statistically significant difference in hematological results when compared with the control group for both sexes ($p \leq 0.05$) (Tables 6 and 7).

Discussion

The toxicity study of Kratom leaves aqueous extract started with acute oral toxicity with a single dose of the test substance at 300 and 2,000 mg/kg body weight. All animals did not show signs of toxic effects, moribundity, or mortality, as in the studies of Harizal et al.⁽¹⁴⁾ and Kamal MSA et al.⁽²⁴⁾ where the animals were orally administrated single doses of 100, 500 and 1,000 and 175, 500 and 2,000 mg/kg body weight, respectively. However, the other signs of animals were differently found in this study, such as a low level of activity (slow movement) and rapid breathing caused by an increase in blood pressure⁽¹⁴⁾, fatigue and sleep sign⁽²⁴⁾, etc. Then, sub-chronic oral toxicity was performed by oral administration of the test substance for

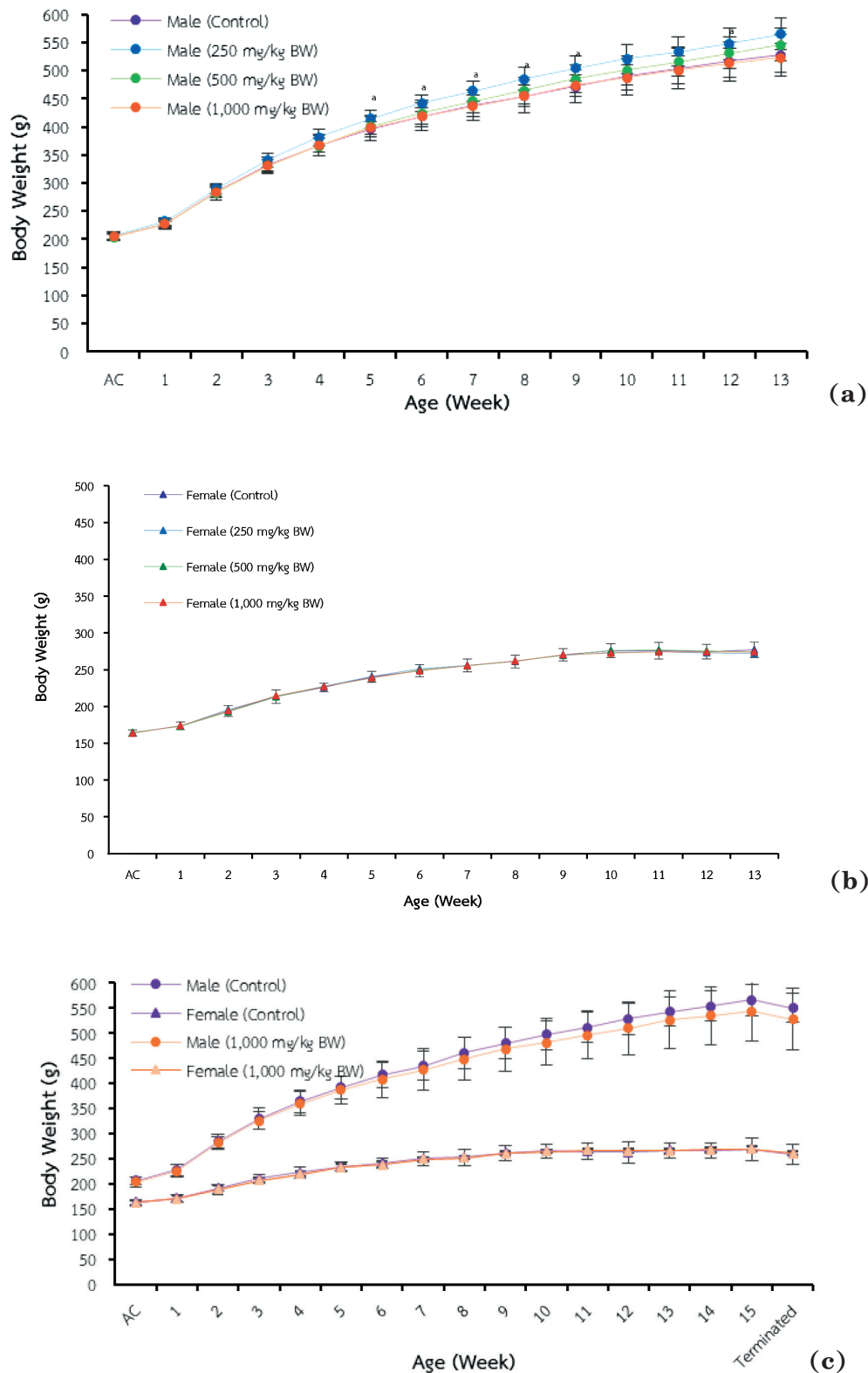


Figure 3 Effect of Kratom leaves aqueous extract on body weights (g) in animal treated for 90 days

(a) Control group, Treatment group (250, 500 and 1,000 mg/kg BW) (n = 40) in male animal (b) Control group, Treatment group (250, 500 and 1,000 mg/kg BW) (n = 40) in female animal and (c) Recovery group (n = 20) in male and female animal
Note: AC = Acclimatization

^aThe average is statistically significant difference of control group ($p \leq 0.05$)

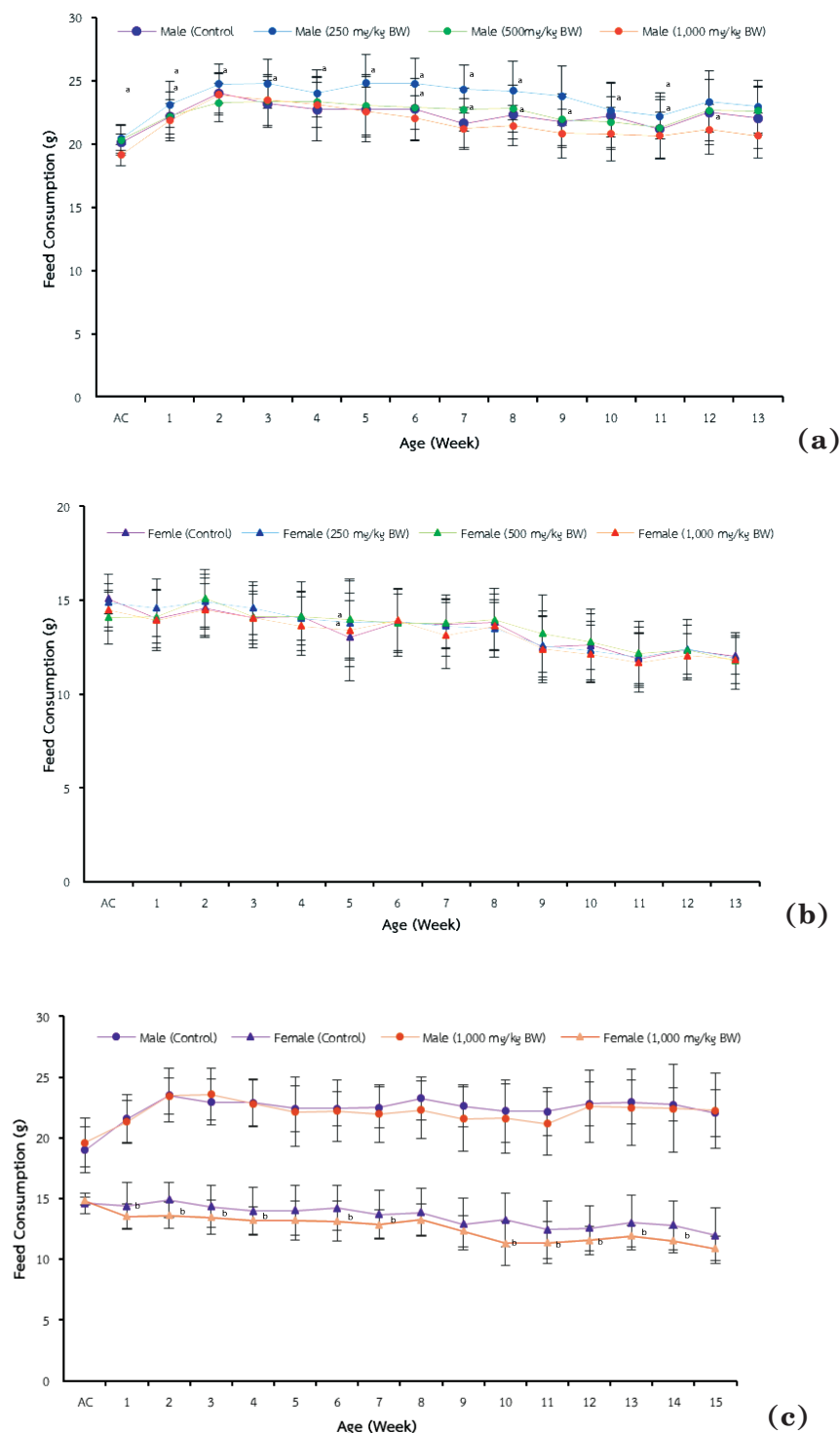


Figure 4 Effect of Kratom leaves aqueous extract on feed consumptions (g) in animal treated for 90 days

(a) Control group, Treatment group (250, 500 and 1,000 mg/kg BW) ($n = 40$) in male animal (b) Control group, Treatment group (250, 500 and 1,000 mg/kg BW) ($n = 40$) in female animal and (c) Recovery group ($n = 20$) in male and female animal
Note: AC = Acclimatization

^a The average is statistically significant difference control group ($p \leq 0.05$)

^b The average is statistically significant difference of control-recovery group ($p \leq 0.05$)

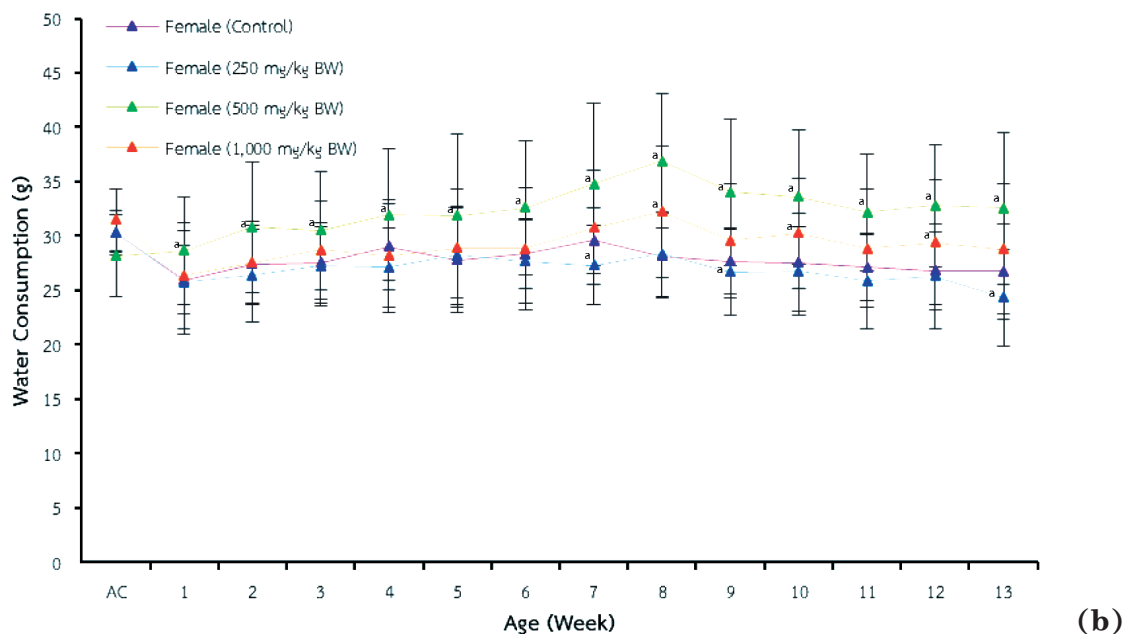
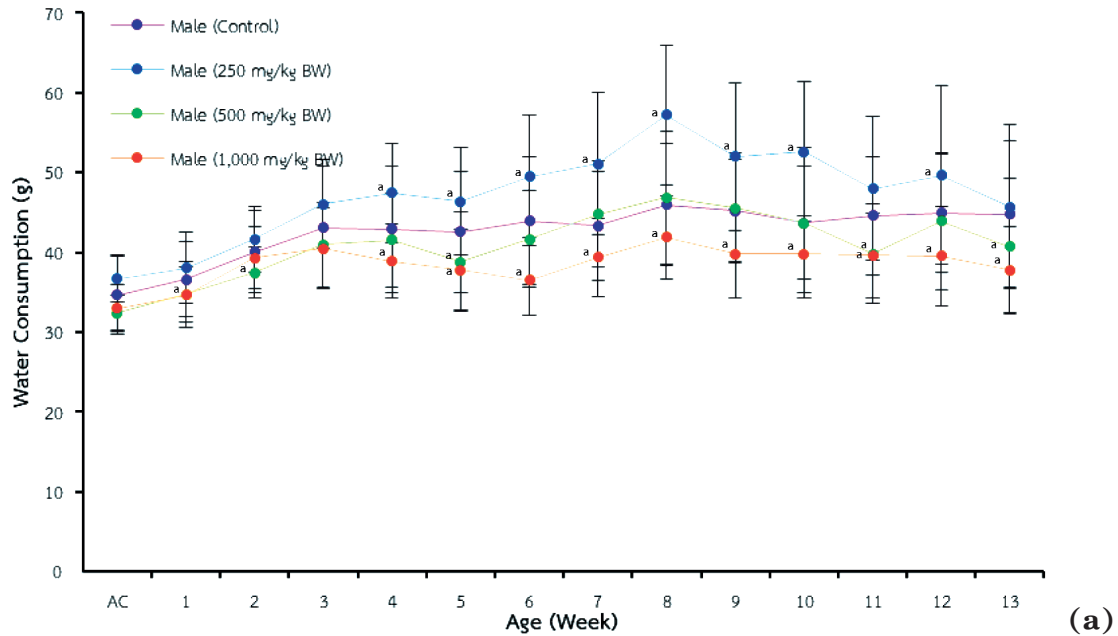


Figure 5 Effect of Kratom leaves aqueous extract on water consumptions (g) in male and female animal treated for 90 days

(a) Control group, Treatment group (250, 500 and 1,000 mg/kg BW) (n = 40) in male animal (b) Control group, Treatment group (250, 500 and 1,000 mg/kg BW) (n = 40) in female animal and (c) Recovery group (n = 20) in male and female animal
Note: AC = Acclimatization

^a The average is statistically significant difference of control group ($p \leq 0.05$)

^b The average is statistically significant difference of control-recovery group ($p \leq 0.05$)

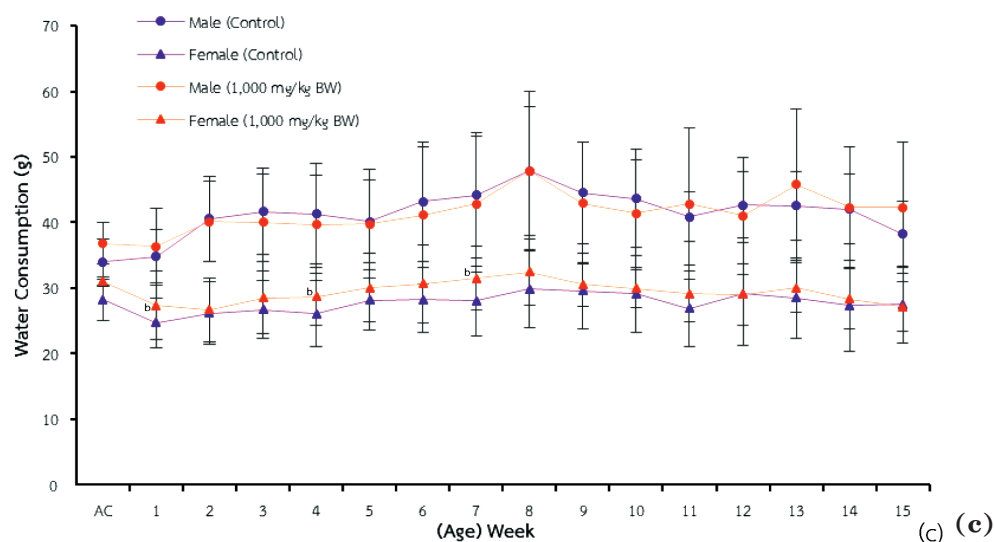


Figure 5 Effect of Kratom leaves aqueous extract on water consumptions (g) in male and female animal treated for 90 days

(a) Control group, Treatment group (250, 500 and 1,000 mg/kg BW) ($n = 40$) in male animal (b) Control group, Treatment group (250, 500 and 1,000 mg/kg BW) ($n = 40$) in female animal and (c) Recovery group ($n = 20$) in male and female animal

Note: AC = Acclimatization

^a The average is statistically significant difference of control group ($p \leq 0.05$)

^b The average is statistically significant difference of control-recovery group ($p \leq 0.05$) (continued)

Table 1 Effect of Kratom leaves aqueous extract on body weights (g) in animal for acute oral toxicity ($n = 12$)

Body Weight Change (%)	Animal No.	Body Weight (g)						Body Weight Change (%)
		Quarantine	Acclimatization	Day 0	Day 7	Day 14	Termination	
300	1	208	213	210	232	243	238.56	15.71
	2	207	208	204	224	232	230.35	13.73
	3	206	214	203	227	235	228.63	15.76
300	4	205	201	198	211	227	224.08	14.65
	5	201	201	198	221	223	224.69	12.63
	6	201	198	200	217	236	235.28	18.00
2,000	7	200	198	204	228	240	235.21	17.65
	8	200	200	204	221	230	229.07	12.75
	9	199	214	214	236	244	242.69	14.02
2,000	10	199	211	219	243	258	252.83	17.81
	11	197	203	205	224	240	234.22	17.07
	12	196	201	208	230	240	236.57	15.38

Table 2 Effect of Kratom leaves aqueous extract on relative organ weight in male animal treated for 90 days (n = 50)

Organ	Main Group				Recovery Group	
	Control (Sterile water)	Low (250 mg/kg BW)	Medium (500 mg/kg BW)	High (1,000 mg/kg BW)	Control (Sterile water)	High (1,000 mg/kg BW)
Liver	2.6122±0.11	2.7419±0.23	2.7661±0.15	2.7118±0.09	2.5055±0.12	2.5039±0.11
Right Kidney	0.2582±0.03	0.2584±0.02	0.2550±0.02	0.2630±0.01	0.2476±0.02	0.2543±0.01
Left Kidney	0.2496±0.03	0.2523±0.02	0.2505±0.02	0.2463±0.01	0.2412±0.01	0.2520±0.01
Heart	0.3110±0.02	0.3023±0.01	0.2974±0.01	0.2921±0.02 ^a	0.2926±0.01	0.3044±0.02
Spleen	0.1821±0.01	0.1774±0.01	0.1773±0.01	0.1699±0.01	0.1813±0.01	0.1678±0.03
Pituitary gland	0.0024±0.00	0.0022±0.00	0.0021±0.00	0.0020±0.00 ^a	0.0020±0.00	0.0021±0.00
Brain	0.4271±0.03	0.3981±0.02	0.4141±0.02	0.4322±0.05	0.4100±0.02	0.4326±0.05
Right Thyroid, Para	0.0018±0.00	0.0019±0.00	0.0019±0.00	0.0018±0.00	0.0019±0.00	0.0018±0.00
Left Thyroid, Para	0.0019±0.00	0.0018±0.00	0.0018±0.00	0.0018±0.00	0.0016±0.00	0.0018±0.00
Right Adrenal	0.0073±0.00	0.0079±0.00	0.0075±0.00	0.0082±0.00	0.0071±0.00	0.0071±0.00
Left Adrenal	0.0092±0.00	0.0091±0.00	0.0086±0.00	0.0093±0.00	0.0083±0.00	0.0083±0.00
Right Testis	0.3973±0.03	0.3699±0.02 ^a	0.3852±0.03	0.4037±0.02	0.3757±0.02	0.3875±0.06
Left Testis	0.3983±0.03	0.3699±0.02 ^a	0.3910±0.03	0.4102±0.01	0.3865 ±0.02	0.3935±0.05
Right Epididymis	0.1282±0.01	0.1180±0.01 ^a	0.1150±0.01 ^a	0.1252±0.00	0.1168±0.01	0.1216±0.01
Left Epididymis	0.1238±0.01	0.1187±0.01	0.1157±0.01	0.1275±0.01	0.1195±0.01	0.1217±0.01
Prostate gland	0.1064±0.02	0.0885±0.02	0.1019±0.02	0.1007±0.01	0.0848±0.02	0.1042±0.01
Thymus	0.0636±0.01	0.0627±0.01	0.0694±0.01	0.0636±0.01	0.0510±0.01	0.0604±0.01

Note: Values are average ± standard deviation

^a The average is statistically significant difference of control group ($p \leq 0.05$)

Table 3 Effect of Kratom leaves aqueous extract on relative organ weight in female animal treated for 90 days (n = 50)

Organ	Main Group				Recovery Group	
	Control (Sterile water)	Low (250 mg/kg BW)	Medium (500 mg/kg BW)	High (1,000 mg/kg BW)	Control (Sterile water)	High (1,000 mg/kg BW)
Liver	2.6361±0.20	2.5420±0.16	2.6335±0.22	2.5467±0.16	2.5177±0.04	2.4510±0.11
Right Kidney	0.2882±0.01	0.2912±0.01	0.2952±0.02	0.2895±0.01	0.3060±0.02	0.2830±0.01 ^b
Left Kidney	0.2785±0.02	0.2819±0.01	0.2789±0.02	0.2766±0.01	0.2924±0.01	0.2720±0.01 ^b
Heart	0.3565±0.02	0.3580±0.02	0.3516±0.01	0.3604±0.02	0.3538±0.02	0.3420±0.01
Spleen	0.2238±0.01	0.2343±0.02	0.2387±0.01	0.2308±0.02	0.2353±0.02	0.2220±0.01
Pituitary gland	0.0051±0.00	0.0052±0.00	0.0051±0.00	0.0049±0.00	0.0056±0.00	0.0048±0.00
Brain	0.7421±0.03	0.7748±0.05	0.7709±0.04	0.7701±0.05	0.7989±0.06	0.7684±0.02
Right Thyroid, Para	0.0029±0.00	0.0029±0.00	0.0030±0.00	0.0029±0.00	0.0031±0.00	0.0031±0.00

Table 3 Effect of Kratom leaves aqueous extract on relative organ weight in female animal treated for 90 days (n = 50) (continued)

Organ	Main Group				Recovery Group	
	Control (Sterile water)	Low (250 mg/kg BW)	Medium (500 mg/kg BW)	High (1,000 mg/kg BW)	Control (Sterile water)	High (1,000 mg/kg BW)
Left Thyroid, Para	0.0025±0.00	0.0032±0.00 ^a	0.0028±0.00	0.0029±0.00	0.0026±0.00	0.0030±0.00
Right Adrenal	0.0175±0.00	0.0187±0.00	0.0170±0.00	0.0155±0.00	0.0183±0.00	0.0154±0.00 ^b
Left Adrenal	0.0190±0.00	0.0206±0.00	0.0198±0.00	0.0200±0.00	0.0196±0.00	0.0195±0.00
Right Ovary, oviduct	0.0267±0.00	0.0293±0.00	0.0284±0.00	0.0272±0.00	0.0288±0.00	0.0257±0.00 ^b
Left Ovary, oviduct	0.0265±0.00	0.0271±0.00	0.0280±0.00	0.0279±0.01	0.0264 ±0.00	0.0276±0.00
Uterus	0.2035±0.04	0.1981±0.06	0.2335±0.07	0.2110±0.07	0.2450±0.09	0.2489±0.11
Thymus	0.1008±0.01	0.0984±0.02	0.0905±0.01	0.0865±0.02	0.0883±0.02	0.0868±0.02

Note: Values are average ± standard deviation

^a The average is statistically significant difference of control group ($p \leq 0.05$)

^b The average is statistically significant difference of control-recovery group ($p \leq 0.05$)

Table 4 Effect of Kratom leaves aqueous extract on clinical biochemistry analysis result in male animal treated for 90 days (n = 50)

Parameter	Main Group				Recovery Group	
	Control (Sterile water)	Low (250 mg/kg BW)	Medium (500 mg/kg BW)	High (1,000 mg/kg BW)	Control (Sterile water)	High (1,000 mg/kg BW)
SGLU3 (mg/dL)	415.48±74.33	396.76±41.87	410.54±71.77	416.44±33.33	375.1±42.99	331.5±63.93
U-BUN (mg/dL)	19.15±2.53	21.07±2.02	21.87±2.06 ^a	19.60±1.72	19.2±1.18	19.0±2.34
CREA2 (mg/dL)	0.43±0.05	0.42±0.02	0.40±0.04	0.37±0.02 ^a	0.44±0.02	0.42±0.03
UA2 (mg/dL)	7.04±0.91	6.91±0.81	7.18±0.71	7.58±0.63	6.6±0.75	6.5±0.76
CHO2I (mg/dL)	74.34±23.23	81.31±17.61	80.00±11.83	71.08±10.07	71.2±10.38	74.1±15.41
TRIGL (mg/dL)	96.50±32.29	109.83±39.54	100.09±22.12	101.54±21.43	87.5±20.15	79.3±14.84
HDLC4 (mg/dL)	54.82±15.75	64.79±13.77	63.37±9.46	56.26±6.91	53.3±6.93	55.8±12.37
LDLC3 (mg/dL)	12.97±8.80	10.13±5.14	10.89±2.59	8.98±3.21	8.3±2.68	10.4±3.96
ASTL (U/L)	82.29±10.28	90.71±14.48	84.36±20.22	103.23±25.58 ^a	102.4±15.95	86.5±19.78
ALTL (U/L)	51.62±12.31	72.26±20.17	66.94±28.23	87.00±30.12 ^a	81.2±27.40	60.5±22.02
ALP2S (U/L)	81.20±8.52	88.30±10.65	85.00±7.18	78.56±5.64	80±6.80	80±10.99
TP2 (g/dL)	7.01±0.20	7.28±0.21 ^a	7.32±0.19 ^a	7.20±0.17	7.15±0.08	6.97±0.28
ALB2 (g/dL)	4.91±0.13	5.10±0.11 ^a	5.17±0.13 ^a	5.06±0.11 ^a	4.99±0.02	4.97±0.12
GLO (g/dL)	2.10±0.12	2.17±0.20	2.15±0.08	2.14±0.11	2.16±0.06	2.00±0.18
Na (mmol/L)	146.60±0.97	145.50±1.08	145.90±1.45	145.78±1.20	147±1.10	149±1.14 ^b
K (mmol/L)	9.81±0.97	9.33±0.66	9.04±0.54 ^a	9.55±1.00	9.71±0.43	9.74±0.58
Cl (mmol/L)	101.75±1.11	100.15±0.88 ^a	99.34±0.78 ^a	100.33±1.77 ^a	101.8±0.55	101.9±1.36

Note: Values are average ± standard deviation

^a The average is statistically significant difference of control group ($p \leq 0.05$)

^b The average is statistically significant difference of control-recovery group ($p \leq 0.05$)

Table 5 Effect of Kratom leaves aqueous extract on clinical biochemistry analysis result in female animal treated for 90 days (n = 50)

Parameter	Main Group				Recovery Group	
	Control (Sterile water)	Low (250 mg/kg BW)	Medium (500 mg/kg BW)	High (1,000 mg/kg BW)	Control (Sterile water)	High (1,000 mg/kg BW)
SGLU3 (mg/dL)	250.73±71.62	285.52±57.62	274.10±96.51	255.42±64.73	189.78±18.52	175.44±20.08
U-BUN (mg/dL)	18.41±2.52	20.78±2.65	18.85±1.49	17.49±3.35	16.76±1.43	16.54±1.18
CREA2 (mg/dL)	0.47±0.04	0.43±0.04	0.42±0.03 ^a	0.43±0.04	0.47±0.03	0.44±0.03
UA2 (mg/dL)	4.55±0.76	4.49±0.60	4.85±0.61	4.72±0.50	3.80±0.49	4.12±0.48
CHO2I (mg/dL)	80.03±21.29	83.24±11.53	88.22±12.26	81.26±9.02	75.42±9.37	90.12±10.21 ^b
TRIGL (mg/dL)	66.79±15.43	58.99±13.74	63.78±21.69	63.27±16.82	46.58±6.19	66.80±14.71 ^b
HDLC4 (mg/dL)	67.13±16.30	70.41±7.96	75.72±9.80	69.56±7.18	62.76±6.69	74.44±9.08 ^b
LDLC3 (mg/dL)	8.27±4.60	7.71±2.28	8.16±1.68	7.51±1.59	6.36±2.25	8.44±0.61
ASTL (U/L)	76.19±6.56	76.65±6.21	83.91±25.81	83.08±7.23	87.04±13.65	87.22±7.71
ALTL (U/L)	41.41±9.22	39.82±7.43	40.20±12.62	42.24±4.06	45.60±10.76	50.08±8.26
ALP2S (U/L)	45.80±4.42	47.70±3.95	44.40±6.20	46.60±6.33	39.80±3.35	39.40±1.34
TP2 (g/dL)	6.89±0.14	7.09±0.20	7.20±0.23 ^a	7.10±0.20	6.87±0.15	7.12±0.19
ALB2 (g/dL)	5.22±0.12	5.35±0.20	5.44±0.21 ^a	5.40±0.24	5.23±0.11	5.47±0.18 ^b
GLO (g/dL)	1.66±0.13	1.74±0.15	1.75±0.07	1.70±0.13	1.65±0.14	1.66±0.12
Na (mmol/L)	146.30±1.70	145.70±1.16	146.70±2.31	145.30±1.16	146.20±1.30	147.00±1.58
K (m mol/L)	10.27±1.02	9.78±0.61	10.31±1.62	10.69±0.93	10.26±0.64	10.75±0.83
Cl (mmol/L)	105.98±1.64	103.91±1.07 ^a	103.38±1.28 ^a	103.83±2.01 ^a	105.50±0.93	105.32±1.32

Note: Values are average ± standard deviation

^a The average is statistically significant difference of control group ($p \leq 0.05$)

^b The average is statistically significant difference of control-recovery group ($p \leq 0.05$)

Table 6 Effect of Kratom leaves aqueous extract on hematological analysis result in male animal treated for 90 days (n = 50)

Parameter	Main Group				Recovery Group	
	Control (Sterile water)	Low (250 mg/kg BW)	Medium (500 mg/kg BW)	High (1,000 mg/kg BW)	Control (Sterile water)	High (1,000 mg/kg BW)
RBC (M/ μ L)	9.94±0.30	9.90±0.54	9.53±0.25 ^a	9.98±0.65	9.64±0.23	9.84±0.47
HGB (g/dL)	17.61±0.42	17.38±0.93	17.00±0.29 ^a	17.56±0.96	17.02±0.31	17.14±1.09
HCT (%)	55.43±1.54	54.54±2.98	53.79±1.00	55.43±3.37	53.34±0.91	53.50±3.44
MCV (fL)	55.75±0.78	55.10±1.31	56.50±1.27	55.57±1.31	55.34±1.27	54.36±2.48
MCH (pg)	17.72±0.32	17.57±0.39	17.85±0.39	17.62±0.34	17.66±0.35	17.44±0.82
MCHC (g/dL)	31.77±0.29	31.88±0.27	31.62±0.23	31.68±0.39	31.90±0.16	32.02±0.19
PLT (K/ μ L)	685.20±56.00	702.70±63.36	689.60±41.67	708.67±38.30	680.80±59.23	680.40±61.16
WBC (K/ μ L)	8.16±0.96	6.87±1.34	8.16±1.39	8.41±1.39	6.91±0.83	6.82±1.02
NEUT (%)	9.93±2.32	11.78±2.63	9.48±1.44	9.87±1.53	11.00±1.21	12.97±2.60
LYMPH (%)	84.07±2.32	82.58±3.25	85.93±2.00	84.99±1.57	83.50±1.32	81.74±2.80
MONO (%)	4.92±0.96	4.62±1.30	3.72±0.62 ^a	4.09±0.76	4.20±0.64	4.16±0.79
EO (%)	0.89±0.38	0.86±0.10	0.70±0.26	0.83±0.37	1.18±0.69	0.82±0.36
BASO (%)	0.19±0.24	0.16±0.08	0.17±0.14	0.22±0.14	0.12±0.13	0.30±0.25

Note: Values are average ± standard deviation

^a The average is statistically significant difference of control group ($p \leq 0.05$)

Table 7 Effect of Kratom leaves aqueous extract on hematological analysis result in female animal treated for 90 days (n = 50)

Parameter	Main Group				Recovery Group	
	Control (Sterile water)	Low (250 mg/kg BW)	Medium (500 mg/kg BW)	High (1,000 mg/kg BW)	Control (Sterile water)	High (1,000 mg/kg BW)
RBC (M/ μ L)	9.00 $\pm$ 0.48	9.37 $\pm$ 0.30	9.48 $\pm$ 0.34 ^a	9.48 $\pm$ 0.36 ^a	9.46 $\pm$ 0.47	9.80 $\pm$ 0.59
HGB (g/dL)	16.81 $\pm$ 0.88	17.31 $\pm$ 0.32	17.85 $\pm$ 0.56 ^a	17.70 $\pm$ 0.56 ^a	17.64 $\pm$ 1.01	18.34 $\pm$ 1.11
HCT (%)	52.09 $\pm$ 3.12	53.73 $\pm$ 1.26	55.28 $\pm$ 1.90	54.89 $\pm$ 1.89	54.26 $\pm$ 3.21	57.16 $\pm$ 4.17
MCV (fL)	57.88 $\pm$ 1.84	57.37 $\pm$ 0.89	58.36 $\pm$ 1.27	57.91 $\pm$ 1.03	57.34 $\pm$ 1.01	58.26 $\pm$ 1.06
MCH (pg)	18.68 $\pm$ 0.52	18.49 $\pm$ 0.30	18.86 $\pm$ 0.46	18.68 $\pm$ 0.36	18.62 $\pm$ 0.31	18.68 $\pm$ 0.16
MCHC (g/dL)	32.28 $\pm$ 0.37	32.23 $\pm$ 0.24	32.29 $\pm$ 0.24	32.24 $\pm$ 0.24	32.52 $\pm$ 0.11	32.12 $\pm$ 0.43
PLT (K/ μ L)	690.60 $\pm$ 56.84	733.00 $\pm$ 40.16	710.40 $\pm$ 58.58	653.90 $\pm$ 88.84	701.60 $\pm$ 45.93	691.00 $\pm$ 93.69
WBC (K/ μ L)	4.31 $\pm$ 0.62	5.11 $\pm$ 0.99	5.85 $\pm$ 0.60 ^a	6.53 $\pm$ 0.70 ^a	4.31 $\pm$ 0.80	4.34 $\pm$ 1.03
NEUT (%)	8.59 $\pm$ 2.18	9.89 $\pm$ 2.26	8.12 $\pm$ 2.42	8.14 $\pm$ 1.81	8.90 $\pm$ 1.44	8.70 $\pm$ 2.29
LYMPH (%)	85.52 $\pm$ 3.15	85.10 $\pm$ 2.89	85.79 $\pm$ 2.95	86.20 $\pm$ 2.59	85.64 $\pm$ 1.58	85.28 $\pm$ 2.58
MONO (%)	4.81 $\pm$ 0.87	4.19 $\pm$ 0.80	5.26 $\pm$ 1.22	4.93 $\pm$ 1.07	4.44 $\pm$ 0.47	5.30 $\pm$ 1.41
EO (%)	0.78 $\pm$ 0.29	0.58 $\pm$ 0.18	0.54 $\pm$ 0.16	0.49 $\pm$ 0.22	0.68 $\pm$ 0.24	0.62 $\pm$ 0.08
BASO (%)	0.30 $\pm$ 0.34	0.24 $\pm$ 0.18	0.29 $\pm$ 0.23	0.24 $\pm$ 0.11	0.34 $\pm$ 0.24	0.10 $\pm$ 0.14

Note: Values are average $\pm$ standard deviation

^a The average is statistically significant difference of control group ($p \leq 0.05$)

a total of 90 days, and the results showed that there was no mortality caused by the toxicity of the test substance up to the dose level of 1,000 mg/kg body weight. The body weights continued to gain throughout the study and were statistically significant differences but were not related to the dose of the test substance, including feed and water consumption. The feed and water consumption of animals is a normal, transient change that was not related to animal health.

The clinical biochemistry analysis results showed that U-BUN, CREA2, ASTL, ALTL, TP2, ALB2, K, and Cl in the main group and ALB2, HDLC4, TRIGL, CHO2I, and Na in the recovery group showed statistically significant differences. The results of the clinical analysis showed similarity with previous studies.^(15,16,25,26) The hematological analysis result showed that RBC, HGB, WBC, and MONO showed

statistically significant differences, but only the WBC of female Wistar rats was related to doses of the test substance. However, the increase in WBC levels in the moderate and high dose groups was still within the historical control range.^(27,28)

Other studies showed that the hematological data, which contained RBC⁽¹⁶⁾, HGB⁽¹⁶⁾, and WBC^(16,25) showed statistically significant differences, as in this study. But parameters NEU^(16,25), HCT⁽¹⁶⁾, PLT⁽²⁵⁾, and LYM⁽²⁵⁾ showed a statistically significant difference.

For pathological evaluation, according to the macroscopic lesions at necropsy findings, the minimal to moderate focal thymic hemorrhage might be attributed to necropsy technique and considered a dissection-induced artifact, and there was no evidence of a vascular lesion.⁽²⁹⁾ The mild to moderate dilation of the uterine lumen and the endometrial and

glandular epithelial degeneration and necrosis were physiological changes during the proestrus and estrus stage, respectively, of the estrus cycle.⁽³⁰⁻³²⁾ The severe gastric dilation and red discoloration of the peripheral area of both caudal lung lobes showed no remarkable alteration on microscopic examination. The kidneys revealed a minimal focal hyaline cast, which was characterized by homogeneous eosinophilic material (tubular proteinosis) filling the tubular lumen and occurred incidentally at low severity and frequency.⁽³³⁾ In the liver, minimal focal mononuclear cell infiltration at periportal areas without associated alteration of adjacent hepatocytes was considered a background lesion and occurred spontaneously.⁽³⁴⁾ All findings were not considered to be treatment-related changes. Some studies found the abnormalities or changes in the internal organs of the animals, such as liver^(14-16,24,26), kidney^(14-16,25,26), heart⁽²⁵⁾, lung^(15,25), and brain⁽¹⁶⁾ In other studies for toxicity in accordance with Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) guideline No. 407⁽³⁵⁾, it was reported that the Sprague-Dawley rats were orally administered test substances for 28 days with dose levels at 100, 200, and 500 mg/kg body weight⁽¹⁵⁾, and 1, 10, and 100 mg/kg body weight⁽¹⁶⁾, including 10, 50, and 150 mg/kg body weight.⁽³⁶⁾ The results for all studies mentioned above showed no deaths in rats during the 28-day period but showed some signs of toxicity, such as a toxic effect on the liver, kidney, and lung with abnormal values in biochemical analysis such as AST, creatinine, etc., as presented by Ilmie MU., et al⁽¹⁵⁾

Sabetghadam A., et al⁽¹⁶⁾ described that mitragynine was relatively safe at lower doses (1-10 mg/kg) and exhibited toxicity at the highest dose (100 mg/kg), which was confirmed by liver, kidney, and brain histopathological changed. In addition, Hassan Z., et al⁽³⁶⁾ explained evidence of toxicity from histological investigation of the kidney, liver, and brain tissues, including a low platelet count in hematological analysis and a high amount of uric acid, AST, ALT, and alkaline phosphatase in biochemical analysis. However, chronic preclinical toxicological investigations of mitragynine for a longer period are recommended to confirm this observation and also to provide adequate safety data for future clinical trials.

Conclusion

In conclusion, there were no related signs of the acute toxicity arising from the orally administration of Kratom leaves aqueous extract to Wistar rats. The result suggested that the test substance could be classified in GHS category 5 or unclassified, with the LD₅₀ cutoff at 5,000-∞ mg/kg body weight. However, sub-chronic and chronic toxicity studies should be further carried out to assess the long-term safety of the test substance. The results of the sub-chronic oral toxicity study were shown that no mortality in the animals was caused by the toxicity of the test substance up to the dose level of 1,000 mg/kg body weight. In addition, the evidence from the test item-body weight, food and water consumption, hematological, clinical biochemistry, relative organ weight, and histopathological effects could confirm that

Kratom leaves aqueous extract did not show any signs of toxicity. Thus, the no observed adverse effect level (NOAEL) of Kratom leaves aqueous extract was considered to be 1,000 mg/kg body weight per day for Wistar rats under experimental conditions.

Acknowledgement

The author would like to acknowledge the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand, for all facilities, equipments, and materials support, including all of the animals, during this study. The Kratom leaves aqueous extract for this study was obtained from Ruay Anan 168 Co., Ltd. conflict of interest and no commercial gain.

Conflict of interest

The Kratom leaves aqueous extract for this study was obtained from Ruay Anan 168 Co., Ltd. conflict of interest and no commercial gain.

References

1. USDA, Agricultural Research Service, National Plant Germplasm System. Germplasm Resources Information Network (GRIN-Taxonomy). *Mitragyna speciosa*. [online]. 1839; [cited 2023 Dec 7]; [1 screen]. Available from: URL: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxon/taxonomydetail?id=417532>.
2. Ahmad K, Aziz Z. *Mitragyna speciosa* use in the northern states of Malaysia: a cross-sectional study. *J Ethnopharmacol* 2012; 141(1): 446-50.
3. Wungsintaweekul J. Kratom. Center for continuing pharmacy education. [serial online]. 2017; [cited 2023 Sep 4]; [33 screens]. Available from: URL: <https://www.scribd.com/document/441049644/Kratom-CPE-Juraithip-15-March-2017>.
4. Raffa RB. The Botany of *Mitragyna speciosa* (Korth.) havil. and related species. In: Eisenman SW, editor. *Kratom and other mitragynines: the chemistry and pharmacology of opioids from a non-opium source*. Florida: CRC Press; 2014. p. 57-76.
5. Warner ML, Kaufman NC, Grundmann O. The pharmacology and toxicology of kratom: from traditional herb to drug of abuse. *Int J Legal Med* 2016; 130(1): 127-38.
6. Ramanathan S, Leon F, Chear NJY, Yusof SR, Murugaiyah V, et al. Chapter 5-Kratom (*Mitragyna speciosa* Koth.): a description on ethnobotany, alkaloid chemistry, and neuropharmacology. In: Rahman A, editor. *Studies in natural products chemistry: bioactive natural products*. Vol. 69. Amsterdam: Elsevier Science; 2021. p. 195-225.
7. Tanna RS, Nguyen JT, Hadi DL, Manwill PK, Bocanegra LF, Layton ME, et al. Clinical pharmacokinetic assessment of kratom (*Mitragyna speciosa*), a botanical product with opioid-like effects, in healthy adult participants. *Pharmaceutics*. [serial online]. 2022; [cited 2023 Sep 4]; 14(3): [16 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030620>.
8. Buckhalter S, Soubeyrand E, Ferrone SAE, Rasmussen DJ, Manduca JD, et al. The antidepressant-like and analgesic effects of Kratom alkaloids are accompanied by changes in low frequency oscillations but not Δ FosB accumulation. *Front Pharmacol*. [serial online]. 2021; [cited 2023 Sep 4]; 12: [20 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.696461>.

9. Hooper D. The anti-opium leaves. *Pharm J* 1907; 78: 453.
10. Takayama H, Maeda M, Ohbayashi S, Kitajima M, Sakai S, Aimi N. The first total synthesis of (-)-mitragynine, an analgesic indole alkaloid in *Mitragyna speciosa*. *Tetrahedron Lett* 1995; 36(51): 9337-40.
11. Ma J, Yin W, Zhou H, Liao X, Cook JM. General approach to the total synthesis of 9- methoxy-substituted indole alkaloids: synthesis of mitragynine as well as 9- methoxygeissoschizol and 9-methoxy-*N*_b -methylgeissoschizol. *J Org Chem* 2009; 74(1): 264-73.
12. Sabetghadam A, Navaratnam V, Mansor SM. Dose-response relationship, acute toxicity, and therapeutic index between the alkaloid extract of *Mitragyna speciosa* and its main active compound mitragynine in mice. *Drug Dev Res* 2013; 74: 23-30.
13. Smith LC, Lin L, Hwang CS, Zhou B, Kubitz DM, Wang H et al. Lateral flow assessment and unanticipated toxicity of kratom. *Chem Res Toxicol* 2019; 32(1): 113-21.
14. Harizal SN, Mansor SM, Hasnan J, Tharakan JKJ, Abdullah J. Acute toxicity study of the standardized methanolic extract of *Mitragyna speciosa* Korth. in rodent. *J Ethnopharmacol* 2010; 131(2): 404-9.
15. Ilmie MU, Jaafar H, Mansor SM, Abdullah JM. Subchronic toxicity study of standardized methanolic extract of *Mitragyna speciosa* Korth in Sprague-Dawley rats. *Front Neurosci*. [serial online]. 2015; [cited 2023 Sep 4]; 9: [6 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00189>.
16. Sabetghadam A, Ramanathan S, Sasidharan S, Mansor SM. Subchronic exposure to mitragynine, the principal alkaloid of *Mitragyna speciosa*, in rats. *J Ethnopharmacol* 2013; 146(3): 815-23.
17. Thai Government gazette. Act of legislation of kratom B.E. 2565. [online]. 2022; [cited 2023 Dec 7]: [15 screens]. Available from: URL: <https://ratchakitcha.soc.go.th/documents/17220044.pdf>.
18. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). Test No. 423: acute oral toxicity-acute toxic class method, OECD guidelines for the testing of chemicals. [online]. 2001; [cited 2023 May 24]; [14 screens]. Available from: URL: https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en.
19. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). Test No. 408: repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents, OECD guidelines for the testing of chemicals. [online]. 2018; [cited 2023 May 24]; [16 screens]. Available from: URL: https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-408-repeated-dose-90-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070707-en.
20. Mudge EM, Brown PN. Determination of mitragynine in *Mitragyna speciosa* raw materials and finished products by liquid chromatography with UV detection: single-laboratory validation. *J AOAC Int* 2017; 100(1): 18-24.
21. Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies, National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, DC: The National Academies Press; 2011.
22. Office of Animal Care and Use. Guidelines for euthanasia of rodent fetuses and neonates. [online]. 2013; [cited 2023 Jun 2]; [3 screens]. Available from: URL: https://oacu.oir.nih.gov/system/files/media/file/2021-02/b4_rodent_euthanasia_pup.pdf.

23. Mooi E, Sarstedt M. Hypothesis testing & ANOVA. In: A concise guide to market research. 3rd ed. Berlin, Germany: Springer-Verlag GmbH; 2011. p. 113-160.
24. Kamal MA, Ghazali A, Yahya N, Wasiman M, Ismail Z. Acute toxicity study of standardized *Mitragyna speciosa* Korth. aqueous extract in Sprague Dawley rats. J Plant Stud. [serial online]. 2012; [cited 2023 Sep 4]; 1(2):[10 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.5539/jps.v1n2p120>.
25. Sawangjaroen K, Chittrakarn S, Prasongthan S, Janchawee B, Keawpradub N, Vongvatcharanon U. Chronic toxicity study of the crude extract of *Mitragyna speciosa* Korth. leaves. Faculty of Science (Pharmacology), Prince of Songkla University. [online]. 2009; [cited 2023 Sep 4]; [33 screens]. Available from: URL: <https://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2010/8020/1/350499.pdf>.
26. Sakaran R, Othman F, Jantan I, Thent ZC, Das S. Effect of subacute dose of *Mitragyna speciosa* Korth. crude extract in female Sprague Dawley rats. J Med Bioeng. 2014; 3(2): 98-101.
27. Srimangkornkaew P, Suwannasaroj K, Yottharat P, Sirimontaporn A. historical control data from repeated dose 90-days oral toxicity studies of Wistar rats (Mlac:WR). Bull Dept Med Sci 2021; 63(3): 595-606.
28. Kort MD, Weber K, Wimmer B, Wilutzky K, Neuenhahn P, Allingham P, et al. Historical control data for hematology parameters obtained from toxicity studies performed on different Wistar rat strains: acceptable value ranges, definition of severity degrees, and vehicle effects. Toxicol Res Appl. [serial online]. 2020; [cited 2023 Sep 4]; 4: [32 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.1177/2397847320931484>.
29. Willard-Mack CL, Elmore SA, Hall WC, Harleman J, Kuper CF, Losco P, et al. Non-proliferative and proliferative lesions of the rat and mouse hematology system. Toxicol Pathol 2019; 47(6): 665-783.
30. Ajayi AF, Akhigbe RE. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. Fertil Res Pract 2020; 6: 5. (15 pages).
31. Dixon D, Alison R, Bach U, Colman K, Foley GL, Harleman JH, et al. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. J Toxicol Pathol 2014; 27(3-4 Suppl): 1S-107S.
32. Westwood FR. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. Toxicol Pathol 2008; 36(3): 375-84.
33. Frazier KS, Seely JC, Hard GC, Betton G, Burnett R, Nakatsuji S, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse urinary system. Toxicol Pathol 2012; 40(4 Suppl): 14S-86S.
34. Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, Nyska A, Rousseaux C, Nolte T, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. Toxicol Pathol 2010; 38(7 Suppl): 5S-81S.
35. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test No. 407: repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents, OECD guidelines for the testing of chemicals. [online]. 2008; [cited 2023 Jun 5]; [13 screens]. Available from: URL: https://www.oecd-ilibrary.org/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents_5lmqcr2k7pd2.pdf.
36. Hassan Z, Singh D, Suhaimi FW, Chear NJ-Y, Harun N, See CP, et al. Evaluation of toxicity profile of kratom (*Mitragyna speciosa* Korth.) decoction in rats. Regul Toxicol Pharmacol. [serial online]. 2023; [cited 2023 Sep 10]; 143: [9 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2023.105466>

ความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเรื้อรังทางปากของสารสกัดน้ำจากใบกระท่อม ในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar

ภัสสรภรณ์ ศรีมังกรแก้ว กฤติกาญจน์ สุวรรณโสธ และ อัญชลี สิริมนตาภรณ์

ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม 73170

บทคัดย่อ กระท่อมถูกใช้แพร่หลายในด้านเภสัชกรรมและการแพทย์ รวมถึงอาหารหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ในขณะที่ข้อมูลการทดสอบทางพิษวิทยามีการดำเนินการในประเทศไทยไม่มากนัก อีกทั้งสามารถซื้อขายได้ง่ายในปัจจุบัน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเรื้อรังทางปากของสารสกัดน้ำจากใบกระท่อมในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ รวมทั้งสร้างความมั่นใจและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์แก่ผู้บริโภค ผลการทดสอบพบว่าที่ขนาด 300 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษเฉียบพลันและการตายในสัตว์ทดลอง แสดงให้เห็นว่าสารนี้จัดอยู่ในระบบการจัดกลุ่มสารเคมี การติดฉลาก และการแสดงรายละเอียดบนเอกสารข้อมูลความปลอดภัยสากลหมวดที่ 5 หรือไม่ระบุประเภท มี LD_{50} ที่ 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมขึ้นไปของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง หลังจากนั้นได้ทำการทดสอบความเป็นพิษทางปากแบบกึ่งเรื้อรังที่ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง สรุปได้ว่าปริมาณที่มากที่สุดที่ได้รับต่อเนื่องเป็นเวลานานโดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายใด ๆ ต่อร่างกายต่อวันในสัตว์ทดลอง คือ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง การศึกษานี้ทำให้ได้ข้อมูลความเป็นพิษของสารทดสอบดังกล่าวที่มีคุณค่า ซึ่งจำเป็นและสามารถสนับสนุนการศึกษาในอนาคต โดยเฉพาะการศึกษาความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์กระท่อมที่ผลิตและจำหน่ายในประเทศไทย ในอนาคตการศึกษาเพิ่มเติมด้านความเป็นพิษเรื้อรังจะใช้ในการประเมินผลความปลอดภัยในการใช้ระยะยาว

คำสำคัญ: *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil., สารสกัดน้ำจากใบกระท่อม, การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเรื้อรัง

กระบวนการปรุงสุกต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสาร กลุ่มแคนนาบินอยด์ของใบกัญชา

ทองสุข ปายะนันท์¹ อัจฉรี อินแก้ว¹ สกฤตน์ สมสันติสุข¹ วิทวัส วังแก้วหิรัญ¹ เลขา ปราสาททอง¹
และ พิเชฐ บัญญัติ²

¹สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

²กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การปรุงอาหารด้วยกัญชาส่งผลต่อการเพิ่มหรือลดของสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ ทำให้อาหารมีฤทธิ์เปลี่ยนไป จึงศึกษาผลกระทบของการปรุงอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงของสาร CBD, CBDA, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC และ THCA ที่ผ่านกระบวนการต้ม ผัด และทอด โดยใช้ใบกัญชาสดพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงและใบกัญชาที่กำลังพัฒนาพันธุ์ ทั้ง 2 พันธุ์ โดยสถาบันวิจัยสมุนไพร เปรียบเทียบปริมาณสารระหว่างใบสดและใบที่ผ่านการปรุง วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าการต้มทำให้ปริมาณสาร CBD และ Δ^9 -THC ในใบกัญชาเพิ่มขึ้นร้อยละ 248.18 และ 760.79 ตามลำดับ สาร CBDA และ THCA ลดลงร้อยละ 88.08 และ 88.30 ตามลำดับ พบสารในน้ำต้มเพียงเล็กน้อย การผัด CBD และ Δ^9 -THC เพิ่มขึ้นร้อยละ 110.12 และ 260.31 สาร CBDA และ THCA ลดลงร้อยละ 94.11 และ 56.62 ตามลำดับ การทอดทำให้ปริมาณสารลดลงจากใบสด แต่ยังพบสารในน้ำมันทอด เมื่อประเมินความเสี่ยงของ Δ^9 -THC จากการบริโภคอาหารกัญชา เปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงวิกฤตจาก EFSA ที่ 1 ไมโครกรัม/กิโลกรัมน้ำหนัก พบว่าการบริโภคใบกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงทั้งใบสดและใบปรุงสุกทุกวิธี 1 ใบ ให้ค่า margin of safety (MOS) ในช่วง 0.05–0.22 ซึ่งน้อยกว่า 1 แสดงว่าการบริโภคนี้ไม่ทำให้ได้รับสาร Δ^9 -THC เกินค่ามาตรฐาน ส่วนใบกัญชาที่กำลังพัฒนาพันธุ์ 1 ใบ ให้ค่า MOS ในช่วง 0.01–10.62 แสดงว่าการได้รับสาร Δ^9 -THC เกินค่ามาตรฐานหรือมีความเสี่ยงต่อสุขภาพอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นในการบริโภคกัญชาควรคำนึงถึงปริมาณสารที่มีอยู่เดิมและวิธีในการปรุงเพื่อให้สามารถบริโภคได้อย่างปลอดภัย

คำสำคัญ: ใบกัญชา, ตะนาวศรีก้านแดง, กระบวนการปรุงสุก, แคนนาบินอยด์

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

Received: 4 November 2023

Revised: 10 February 2024

Accepted: 27 March 2024

บทนำ

ในปี พ.ศ. 2564 ประเทศไทยมีนโยบายกัญชาเสรี ทำให้พืชกัญชาและกัญชง (*Cannabis sativa* L.) ได้รับความสนใจอย่างมากจากผู้ผลิตและผู้บริโภค เนื่องจากมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เป็นประโยชน์ ได้แก่ บรรเทาอาการปวด ช่วยให้อารมณ์ผ่อนคลาย กระตุ้นความอยากอาหาร ลดการอักเสบ เป็นต้น⁽¹⁾ จึงมีการนำไปใช้ประโยชน์หลากหลายรูปแบบทั้งใช้เป็นยาเพื่อการรักษาทางการแพทย์ เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางและเครื่องอุปโภค และเป็นวัตถุดิบในการประกอบอาหารเมนูต่าง ๆ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้อาหารมีรสชาติกลมกล่อม เสริมสร้างคุณค่าทางโภชนาการ เพิ่มทางเลือกให้แก่ผู้บริโภค และเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ จึงเป็นประเด็นทางธุรกิจที่ผู้ประกอบการจำนวนมากให้ความสนใจ ข้อมูลจาก grand view research⁽²⁾ รายงานว่าตลาดกัญชาในประเทศไทยปี พ.ศ. 2564 มีมูลค่า 80.3 ล้านดอลลาร์สหรัฐ และคาดการณ์ว่าระหว่างปี พ.ศ. 2565–2573 จะมีอัตราการขยายตัวแบบทบต้นโดยเฉลี่ยต่อปี (compound annual growth rate; CAGR) อยู่ที่ร้อยละ 58.4 โดยผลิตภัณฑ์อาหารผสมกัญชาในต่างประเทศส่วนมากเป็นขนมอบ (เค้ก คุกกี้ บราวนี่) ขนมขบเคี้ยว ลูกอม เยลลี่ ช็อกโกแลต⁽³⁾ และเครื่องดื่ม (ชา น้ำผลไม้ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ น้ำอัดลม) อาหารไทยมีเอกลักษณ์ที่แตกต่างจากประเทศอื่น ๆ ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์กัญชาในประเทศไทยมีความหลากหลาย เช่น ลูกชิ้น เครื่องดื่มสมุนไพร ชอส และผงปรุงรส เป็นต้น รวมทั้งมีการใช้กัญชาในเมนูอาหารไทย โดยการนำใบกัญชามาเป็นส่วนหนึ่งในอาหารโดยใช้ 1 ใบต่อเมนู เช่น กะเพราใบกัญชา ไข่เจียวกัญชา ใบกัญชาทอด ข้าวต้มใบกัญชา ต้มยำใบกัญชา ต้มไก่บ้านมะขามอ่อนใบกัญชา น้ำพริกผสมใบกัญชา แกงผสมใบกัญชา และยำผสมใบกัญชา เป็นต้น⁽⁴⁾

การบริโภคกัญชาส่งผลต่อร่างกายแตกต่างจากการสูบ คือ ใช้เวลาในการออกฤทธิ์ช้ากว่าแต่มีผลออกฤทธิ์ในระยะเวลานาน เมื่อบริโภคแล้วใช้เวลา 30–90 นาที ในการลำเลียงสารเตตราไฮโดรเตตราแคนนาบินอล (tetrahydrocannabinol; THC) ไปยังสมอง และมีระยะเวลาในการออกฤทธิ์สูงสุดประมาณ 2–4 ชั่วโมงหลังจากบริโภค โดยกลไกของการดูดซึมสารออกฤทธิ์มี 3 รูปแบบ ได้แก่ 1) การดูดซึมจาก

ทางเดินอาหารหรือการย่อยผ่านกระเพาะอาหาร เช่น บราวนี่ เม็ดแคปซูล และอาหารที่ผสมกัญชาอื่น ๆ แม้ว่าผลของการออกฤทธิ์จากกลไกนี้อาจล่าช้ากว่าวิธีอื่นแต่ฤทธิ์อยู่ได้นานที่สุด 2) การดูดซึมทางปากและการย่อยโดยน้ำลาย เช่น อมยี่ม ยาอม และทิงเจอร์ กลไกนี้อาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคทันทีแต่จะหมดฤทธิ์ภายในไม่กี่ชั่วโมง และ 3) ประเภทไฮบริด พบในอาหารที่ออกแบบมาให้อุดซึมได้ทั้งในปากและกระเพาะอาหาร เช่น เครื่องดื่มหมักใบกัญชา (infused drinks) ช็อกโกแลตแท่ง กลไกนี้ให้การออกฤทธิ์ที่รวดเร็วและผลกระทบทียาวนาน⁽⁵⁾ จากรายงานข่าวการได้รับผลข้างเคียงต่อสุขภาพจากการบริโภคอาหารผสมกัญชา⁽⁶⁾ บางรายมีอาการรุนแรงถึงขั้นต้องเข้ารับรักษาในโรงพยาบาล อาจเป็นผลจากการใส่ส่วนผสมของกัญชาที่มากเกินไปหรือผู้บริโภคเป็นกลุ่มเสี่ยง ทั้งนี้มีข้อเสนอแนะเพื่อป้องกันความเสี่ยงด้านสุขภาพจากการบริโภคกัญชา โดยผู้ที่มีอายุต่ำกว่า 18 ปี สตรีมีครรภ์หรือให้นมบุตร ผู้ป่วยโรคหัวใจที่ไม่สามารถควบคุมอาการได้ ผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านการแข็งตัวของเลือด ผู้ป่วยที่มีภาวะการทำงานของตับหรือไตบกพร่อง และผู้ป่วยที่มีประวัติโรคทางจิตเวชไม่ควรรับประทาน⁽⁴⁾ ซึ่งการใช้กัญชาเป็นส่วนผสมในอาหารและเครื่องดื่มเกินขนาดอาจเกิดจากผู้ผลิตไม่ทราบข้อมูลของปริมาณสารออกฤทธิ์ในวัตถุดิบกัญชา เนื่องจากกัญชาแต่ละพันธุ์มีส่วนของ THC แคนนาบิไดออล (cannabidiol; CBD) และสารออกฤทธิ์อื่น ๆ แตกต่างกัน และมีปัจจัยที่ควรคำนึงถึง เช่น อายุ ระยะในการเก็บเกี่ยว คุณภาพ และส่วนของกัญชาที่นำมาใช้ รวมทั้งกระบวนการปรุงหรือผลิตที่อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสาร โดยอาจส่งผลให้มีสารออกฤทธิ์เพิ่มขึ้นหรือน้อยลงเพราะสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในกัญชา ได้แก่ THC และ CBD ส่วนใหญ่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของสาร tetrahydrocannabinolic acid (THCA) และ cannabidiolic acid (CBDA) ตามลำดับ ผ่านกระบวนการ decarboxylation และปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ได้แก่ ความร้อน ดังนั้นการรายงานปริมาณสารสำคัญอยู่ในรูปผลรวมของ neutral form และ acidic form⁽⁷⁾ คำนวณจาก total THC เท่ากับ $\Delta^9\text{-THC} + \Delta^8\text{-THC} + (0.877 \times \text{THCA})$

และ total CBD เท่ากับ $CBD + (0.877 \times CBDA)$ ในกระบวนการปรุงอาหารไทยนิยมใช้น้ำหรือน้ำมันเป็นส่วนประกอบ จากคุณสมบัติทางเคมีของสาร THC และ CBD ที่เป็นสารไม่มีขั้ว จึงทำให้น้ำและน้ำมันที่ได้มีสัดส่วนของสารออกฤทธิ์ที่ต่างกัน

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 438 พ.ศ. 2565 เรื่อง ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของส่วนของกัญชาหรือกัญชง (ฉบับที่ 2)⁽⁸⁾ กำหนดมาตรฐานให้มีปริมาณสาร (THC) ไม่เกิน 1.6 มิลลิกรัมต่อหน่วยบรรจุ และ (CBD) ไม่เกิน 1.41 มิลลิกรัมต่อหน่วยบรรจุ หรือหากเป็นผลิตภัณฑ์อาหารประเภทผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลือง ซอสในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท น้ำปลาผสมชนิดเหลวและแห้ง และน้ำเกลือปรุงอาหาร ต้องตรวจพบสาร THC ไม่เกินร้อยละ 0.0032 โดยน้ำหนัก และสาร CBD ไม่เกินร้อยละ 0.0028 โดยน้ำหนัก หากนำมาใช้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม อาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพร่างกายของผู้บริโภคได้ เนื่องจากสาร THC ซึ่งเป็นสารชนิดหนึ่งในกลุ่มแคนนาบินอยด์ (cannabinoids) ที่พบเฉพาะในพืชกัญชากัญชง เป็นสารออกฤทธิ์ต่อจิตประสาทที่ส่งผลต่อการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง ระบบหัวใจ และหลอดเลือด การได้รับในปริมาณสูงหรือการแพ้กัญชาทำให้เกิดอาการต่าง ๆ เช่น หัวใจเต้นเร็วและร้าวจนผัดผิงหะ การควบคุมการเคลื่อนไหวของร่างกายแย่ลง กระวนกระวาย เจ็บหน้าอกเป็นลม หรืออาจหยุดหายใจ⁽⁹⁾

ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารออกฤทธิ์ในกัญชาเมื่อผ่านกระบวนการปรุงสุก รูปแบบต่าง ๆ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จึงทำการศึกษาเพื่อเป็นแนวทางให้กับผู้ประกอบการและผู้บริโภค ในการผลิตและเลือกบริโภคอาหารและเครื่องดื่มได้อย่างปลอดภัย โดยเป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นที่มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลจากกระบวนการปรุงสุกต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารสำคัญกลุ่มแคนนาบินอยด์ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงในใบกัญชา โดยใช้ใบกัญชาสด 2 พันธุ์ ที่มีคุณลักษณะองค์ประกอบสารสำคัญแตกต่างกัน ได้แก่ พันธุ์ที่มี CBD และ CBDA สูง และพันธุ์ที่มี THC และ THCA สูง ซึ่งพันธุ์ที่มี CBD และ CBDA สูง เป็นพันธุ์ตะนาวศรี ก้านแดงมีลักษณะโดดเด่น คือ มีสีแดงที่กึ่ง ก้าน และ

ก้านใบ มีกลิ่นหอมหวานคล้ายกลิ่นผลไม้สุกและไม่มีกลิ่นฉุนมีช่อดอกจำนวนมาก พัฒนาโดยสถาบันวิจัยสมุนไพร (สวพ.) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และจดทะเบียนรับรองกัญชาสายพันธุ์ไทยกับกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์⁽¹⁰⁾ ส่วนพันธุ์ที่มี THC และ THCA สูง เป็นพันธุ์ที่ยังไม่ได้รับขออนุญาตอยู่ระหว่างการศึกษาและพัฒนา ในกระบวนการปรุงสุกเลือกวิธีการต้ม ผัด และทอด เนื่องจากเป็นกรรมวิธีพื้นฐานของการปรุงอาหารแบบไทยและเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของสารกับใบกัญชาสด ใช้วิธีทดสอบของห้องปฏิบัติการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารด้วยเทคนิค HPLC วิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ 5 ชนิด ได้แก่ CBDA, CBD, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC และ THCA มีการประเมินความเสี่ยงของสาร Δ^9 -THC จากการบริโภคอาหารที่มีส่วนประกอบของกัญชา โดยอ้างอิงจากข้อมูลการศึกษาค่าอ้างอิงวิกฤต (acute reference dose; ARfD) จาก European Food Safety Authority (EFSA) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนัก⁽¹¹⁾

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างใบกัญชา

ใบกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงปลูกที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตสกลนคร และใบกัญชาพันธุ์ที่มี THC และ THCA สูง ซึ่งอยู่ระหว่างการพัฒนาพันธุ์ ปลูกที่สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งทั้ง 2 พันธุ์ มีอายุ 3 เดือน ใช้จำนวนพันธุ์ละ 500 ใบ ซึ่งใบกัญชาถูกเก็บและขนส่งมายังห้องปฏิบัติการภายในวันเดียวกัน จากนั้นทำการสุ่มเตรียมและเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -18 ± 3 องศาเซลเซียส

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน: cannabidiolic acid (CBDA) (Dr. Ehrenstorfer, Germany) cannabidiol (CBD) delta 9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) (Bureau of Drug and Narcotic DMSc, Thailand) delta 8-tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC) และ

tetrahydrocannabinolic acid (THCA) (Lipomed, Switzerland) โดยสารมาตรฐานทั้งหมดมีความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 97

สารเคมี: acetonitrile, ethanol และ methanol (HPLC grade, Merck, Germany), dichloromethane และ hexane (HPLC grade, Burdick & Jackson, USA), glacial acetic acid (AR grade, Labscan, Thailand) และ deionized water (DI water) (Type I มีค่า resistivity > 18 mΩ.cm)

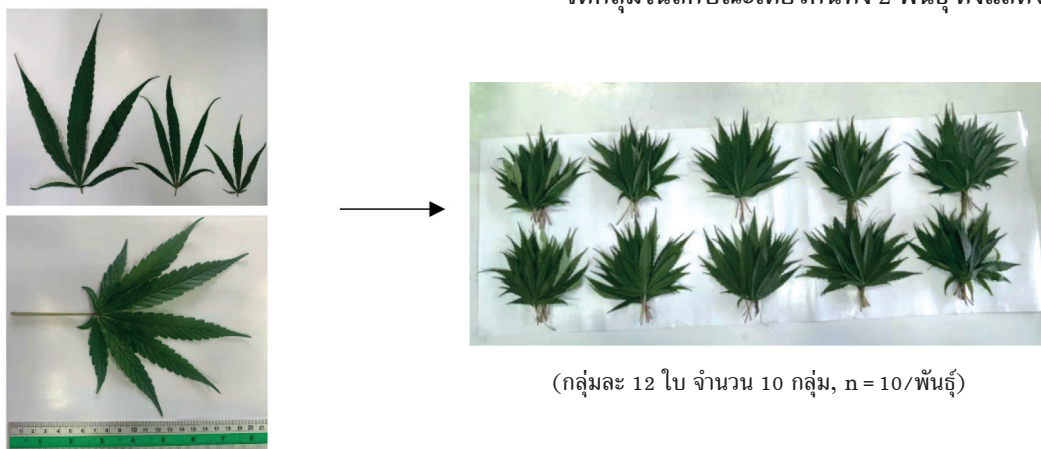
เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง HPLC-UV detector: Agilent Technologies series 1260 (Agilent Technologies, USA), คอลัมน์ Brownlee SPP 2.7 μm C18, 3.0 × 150 mm (PerkinElmer, USA), เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 กรัม (Sartorius รุ่น LP 620S, Sartorius AG Germany) และ 0.01 มิลลิกรัม (METTLER รุ่น XPE, Mettler-Toledo AG, Switzerland), เครื่องบดป่น (Nessei, Japan), vortex mixer (Vortex Genie2 รุ่น G560E, Scientific Industries, USA), reciprocal shaker (YAMATO รุ่น SA300, Japan) refrigerated centrifuge (HERMLE รุ่น Z366K, HERMLE Labortechnik GmbH), turbo nitrogen evaporator temperature controlled (Organomation รุ่น N-EVAP 34 position, USA), SPE vacuum manifold, volumetric flask ขนาด 1,000 และ

10 มิลลิลิตร (BOROSIL, Maharashtra India), graduated cylinder ขนาด 100 มิลลิลิตร (BOROSIL, Maharashtra India), screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร (BIOFIL, Guangzhou Jet Bio-Filtration, China), test tube ขนาด 15 มิลลิลิตร (Pyrex, USA), SPE CHROMABOND HR-X, 85 μm, 6 mL/200 mg (macherey-nagel, Germany), micropipette ขนาด 10–100, 20–200, 100–1,000 และ 1,000–10,000 ไมโครลิตร, micro-spin filter tube 0.22 μm PVDF, cellulose nitrate ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 mm 0.45 μm และตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -18±3 องศาเซลเซียส (Sanyo, รุ่น SF-C1497, บริษัท ชันโย เอส.เอ็ม.ไอ. (ไทยแลนด์) จำกัด, ประเทศไทย)

การสุ่มตัวอย่างใบกัญชา

ใบกัญชาที่ใช้ในการศึกษาเป็นกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงและใบกัญชาพันธุ์ที่มี THC และ THCA สูง เก็บในระยะ 3 เดือน (ใบเพสลาด) สุ่มตัวอย่างโดยนำใบกัญชาในพันธุ์เดียวกันทั้งหมดรวมกัน และคัดแยกตามขนาดใบที่ใกล้เคียงกันโดยการวัด ประกอบด้วย 3 กลุ่ม ได้แก่ ขนาดเล็ก กลาง และใหญ่ จากนั้นสุ่มใบจากทั้ง 3 ขนาด ขนาดละ 4 ใบ รวมทั้งสิ้น จำนวน 12 ใบต่อกลุ่ม ซึ่งน้ำหนักของทั้ง 12 ใบ เพื่อหาน้ำหนักเฉลี่ยต่อใบ และบันทึกน้ำหนักเฉลี่ยที่ได้ของแต่ละใบ ทำการสุ่มเช่นนี้จำนวนทั้งสิ้น 10 กลุ่ม (n = 10) จากนั้นจัดกลุ่มในลักษณะเดียวกันทั้ง 2 พันธุ์ ดังแสดงในภาพที่ 1



(กลุ่มละ 12 ใบ จำนวน 10 กลุ่ม, n = 10/พันธุ์)

ภาพที่ 1 การสุ่มตัวอย่างใบกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงโดยการแบ่งกลุ่มใบกัญชาตามขนาด ประกอบด้วย ขนาดเล็ก กลาง และใหญ่ สุ่มจากทุกขนาด ขนาดละ 4 ใบ รวมทั้งสิ้น 12 ใบต่อกลุ่ม จำนวน 10 กลุ่มต่อพันธุ์

การเตรียมตัวอย่าง

สภาวะศึกษาเป็นตัวสะท้อนการเป็นตัวแทนการปรุงอาหารในชีวิตประจำวัน โดยใช้ใบที่ยังไม่ผ่านกระบวนการปรุง (ใบสด) ศึกษาการใช้ใบกัญชาประกอบอาหารด้วยกระบวนการทำให้สุกทั้ง 3 วิธี ได้แก่ กระบวนการต้ม ผัด และทอด แต่ละวิธีจำนวน 10 ซ้ำ ($n = 10$) และใช้เพียงส่วนประกอบหลักของกระบวนการเท่านั้นในแต่ละวิธี ได้แก่ น้ำและน้ำมัน โดยไม่มีการเติมองค์ประกอบอื่น ทำเหมือนกันทั้ง 2 พันธุ์ รายละเอียดดังนี้ ใบที่ยังไม่ผ่านกระบวนการปรุง: นำใบกัญชาจำนวน 12 ใบ ปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องบดปั่นและเก็บที่ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -18 ± 3 องศาเซลเซียส

กระบวนการต้ม: นำใบกัญชาจำนวน 12 ใบ ผสมน้ำเปล่า 1 ลิตร ต้มในหม้อปิดฝาที่อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บตัวอย่างน้ำต้มรอบที่ 1 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และต้มต่อจนครบเวลา 30 นาที เก็บตัวอย่างน้ำต้มรอบที่ 2 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บใบกัญชาที่ผ่านการต้มมาปั่นละเอียดและเก็บที่ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -18 ± 3 องศาเซลเซียส

กระบวนการผัด: นำใบกัญชาจำนวน 12 ใบ ใส่ในกระทะ เติมน้ำมันปาล์ม 45 มิลลิลิตร (3 ช้อนโต๊ะ) และผัดที่อุณหภูมิประมาณ 90–100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดมาปั่นละเอียดและเก็บที่ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -18 ± 3 องศาเซลเซียส

กระบวนการทอด: นำใบกัญชาจำนวน 12 ใบ ใส่ในกระทะ เติมน้ำมันปาล์ม 100 มิลลิลิตร และทอดที่อุณหภูมิประมาณ 150–170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นแยกเฉพาะใบกัญชาทอด นำมาปั่นละเอียดเก็บที่ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -18 ± 3 องศา และเก็บตัวอย่างน้ำมันที่ใช้ทอดที่ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -18 ± 3 องศาเซลเซียส

การสกัดสารสำคัญกลุ่มแคนนาบินอยด์

การสกัดสารจากใบกัญชา (ใบสดและใบที่ผ่านกระบวนการต้ม ผัด และทอด) โดยการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในพืชกัญชา และผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี HPLC: ซั่งตัวอย่างใบกัญชาที่ปั่นละเอียด 2.5 ± 0.05 กรัม ลงใน screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำเมทานอล 10 มิลลิลิตร

และผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer จากนั้นเขย่าด้วยเครื่อง shaker เป็นเวลา 20 นาที และ centrifuge ที่ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบน 2 มิลลิลิตร ใส่ test tube ขนาด 15 มิลลิลิตร และนำไป clean-up ด้วย SPE CHROMABOND HR-X, 85 μm , 6 mL/200 mg ดังนี้ 1) pre-washing ด้วย methanol 5 มิลลิลิตร และ DI water 5 มิลลิลิตร 2) loading ด้วยสารละลายตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร 3) washing ด้วย 25% methanol 3 มิลลิลิตร และ 4) eluting ด้วย 90:10 acetonitrile:methanol 5 มิลลิลิตร และ 60:40 acetonitrile:methanol 3 มิลลิลิตร จากนั้นระเหยสารสกัดที่ได้ด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40 ± 5 องศาเซลเซียส เกือบแห้ง ละลาย residue ด้วย acetonitrile 0.5 มิลลิลิตร กรองผ่าน micro-spin filter ขนาด 0.2 μm และเก็บสารสกัดใน vial สีชา ขนาด 1.5 mL เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง HPLC โดยขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection; LOD) เท่ากับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

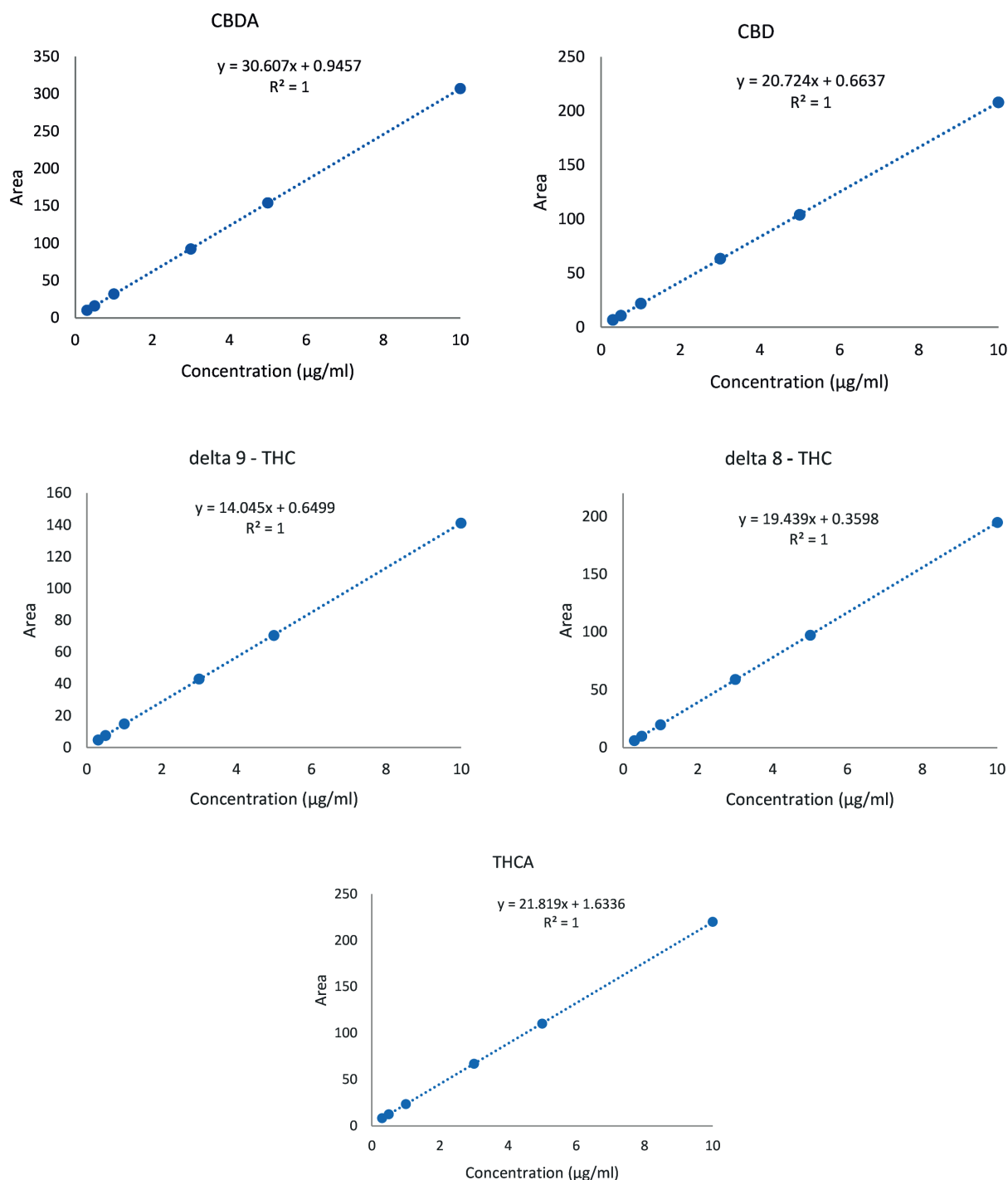
การสกัดจากน้ำต้มใบกัญชา⁽¹²⁾: ซั่งตัวอย่างน้ำต้มใบกัญชา 10.0 ± 0.05 กรัม ลงใน screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำ dichloromethane 10 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer จากนั้นเขย่าด้วยเครื่อง shaker เป็นเวลา 20 นาที และ centrifuge ที่ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายด้านล่างทั้งหมด 10 มิลลิลิตร ใส่ test tube ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไประเหยด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40 ± 5 องศาเซลเซียส เกือบแห้ง ละลาย residue ด้วย acetonitrile 0.5 มิลลิลิตร กรองผ่าน micro-spin filter ขนาด 0.2 μm และเก็บสารสกัดใน vial สีชา ขนาด 1.5 mL เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง HPLC โดย LOD เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

การสกัดสารจากน้ำมันทอดใบกัญชา⁽¹³⁾: ซั่งตัวอย่างน้ำมันทอดใบกัญชา 0.50 ± 0.01 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำ 9:1 ethanol:hexane ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และผสมด้วย

vortex mixer ให้ตัวอย่างละลายหมด (อาจใช้การ sonication เป็นเวลา 5–10 นาที เพื่อช่วยให้ละลายได้ดีขึ้น) ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายตัวอย่างกรองผ่าน micro-spin filter ขนาด 0.2 μm และเก็บสารสกัดใน vial สีชา ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง HPLC โดย LOD เท่ากับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

การสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียมจาก mixed working standard solution ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย สารมาตรฐานกลุ่มแคนนาบินอยด์ 5 ชนิด ได้แก่ CBDA, CBD, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC และ THCA โดยเตรียมใน acetonitrile ช่วงระดับความเข้มข้น 0.3, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 และ 10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 2

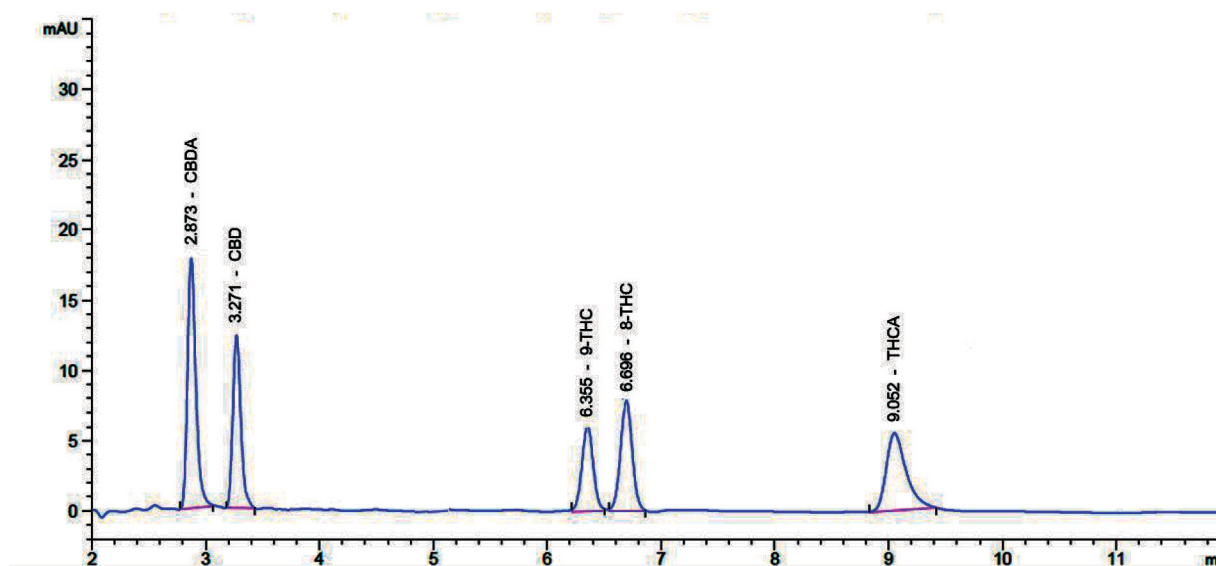


ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐานของสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ ได้แก่ CBDA, CBD, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC และ THCA

การวิเคราะห์สารสำคัญกลุ่มแคนนาบินอยด์ด้วย HPLC–UV detector

ดำเนินการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC–UV detector โดย mobile phase ที่ใช้ประกอบด้วย A: 0.1% acetic acid in DI water:methanol (95:5) และ B:

0.1% acetic acid in acetonitrile:methanol (95:5) โปรแกรมที่ใช้ในการแยกสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ คือ isocratic โดยใช้ flow rate 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 15 นาที ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานกลุ่มแคนนาบินอยด์ ได้แก่ CBDA (2.873 นาที), CBD (3.271 นาที), Δ9-THC (6.355 นาที), Δ8-THC (6.696 นาที) และ THCA (9.052 นาที)

การประเมินความเสี่ยงของสาร Δ9-THC จากการบริโภคอาหารมีส่วนประกอบของกัญชา

ประเมินการรับสัมผัสจากการบริโภค (exposure assessment)⁽¹⁴⁾ จากข้อมูลปริมาณสาร Δ9-THC ที่วิเคราะห์ได้จากใบกัญชาสดและใบกัญชาที่ผ่านกระบวนการปรุงรูปแบบต่าง ๆ โดยใช้ปริมาณการบริโภค

ตามคู่มือกัญชากับตำรับอาหารไทย⁽⁴⁾ ซึ่งแนะนำให้ใช้กัญชาจำนวน 1 ใบต่อเมนู สำหรับน้ำหนักตัวของผู้บริโภค ใช้ข้อมูลน้ำหนักตัวเฉลี่ยของประชากรไทยที่รายงานโดยสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ⁽¹⁵⁾ แบ่งตามช่วงอายุ คือ 18–34.9 ปี, 35–64.9 ปี และ 65 ปี ขึ้นไป นำข้อมูลคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณการรับสัมผัสจากการบริโภค} = \frac{\text{ปริมาณสาร } \Delta 9\text{-THC (}\mu\text{g/g)} \times \text{ปริมาณการบริโภคต่อครั้ง (g)}}{\text{น้ำหนักตัวของผู้บริโภค (kg bw)}} \quad (\mu\text{g/kg bw})$$

จากนั้นคำนวณ margin of safety (MOS) เพื่อศึกษาว่าปริมาณการรับสัมผัสจากการบริโภคมีความเสี่ยงทำให้เกิดอันตรายอย่างเฉียบพลันต่อสุขภาพหรือไม่

โดยเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงวิกฤต (acute reference dose; ARfD) จาก European Food Safety Authority (EFSA) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1 (μg/kg bw)

$$\text{margin of safety (MOS)} = \frac{\text{ปริมาณการรับสัมผัสจากการบริโภค (}\mu\text{g/kg bw)}}{\text{ค่าอ้างอิงวิกฤต (}\mu\text{g/kg bw)}}$$

หากค่า MOS น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 หมายถึง ปริมาณ $\Delta 9$ -THC ที่ร่างกายได้รับมีไม่มากพอที่จะก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพได้หรือไม่มีความเสี่ยงอย่างมีนัยสำคัญ แต่หากค่า MOS มากกว่า 1 หมายถึง ปริมาณ $\Delta 9$ -THC ที่ได้รับเกินค่ามาตรฐานหรืออยู่ในระดับที่ไม่ปลอดภัยต่อสุขภาพมีความเสี่ยงต่อสุขภาพจากการสัมผัสสาร

ผล

ปริมาณสารสำคัญกลุ่มแคนนาบินอยด์ในใบกัญชาสด

จากการชั่งน้ำหนักใบสด พบว่าใบกัญชาพันธุ์ ตะนาวศรีก้านแดงมีน้ำหนักโดยเฉลี่ย 0.860 ± 0.088 กรัมต่อใบ และใบกัญชาที่กำลังพัฒนาพันธุ์มีน้ำหนักโดยเฉลี่ย 0.669 ± 0.091 กรัมต่อใบ ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ พบว่าใบพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงสดมีปริมาณสาร CBDA และ CBD สูงกว่าพันธุ์ที่กำลังพัฒนา โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 256.91 ± 18.10 และ 29.74 ± 3.66 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนใบสดพันธุ์ที่กำลังพัฒนา มีปริมาณสาร $\Delta 9$ -THC และ THCA สูงกว่าพันธุ์ตะนาวศรี ก้านแดง โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 102.83 ± 8.36 และ $1,317.36 \pm 53.32$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และทั้งสองพันธุ์ไม่พบสาร $\Delta 8$ -THC ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 4

ปริมาณสารสำคัญกลุ่มแคนนาบินอยด์ในใบกัญชาต้ม

ใบกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงเมื่อนำมาต้ม พบว่ามีปริมาณสาร CBDA เฉลี่ยประมาณ 30.62 ± 4.33 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ CBD 103.55 ± 7.81 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับใบสด พบว่ามีปริมาณสาร CBDA ลดลงร้อยละ 88.08 และ CBD เพิ่มขึ้นร้อยละ 248 ส่วนน้ำต้มใบกัญชาที่เวลา 10 และ 30 นาที พบว่ามีปริมาณสาร CBDA 0.98 ± 0.11 และ 1.09 ± 0.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และไม่พบสารชนิดอื่น ๆ สำหรับใบกัญชาที่กำลังพัฒนาพันธุ์ พบปริมาณสาร $\Delta 9$ -THC เฉลี่ยประมาณ 885.15 ± 12.48 มิลลิกรัมต่อ

กิโลกรัม และ THCA 154.09 ± 12.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับใบสด พบว่ามีปริมาณสาร $\Delta 9$ -THC เพิ่มขึ้นร้อยละ 761 และ THCA ลดลงร้อยละ 88.30 ส่วนน้ำต้มใบกัญชาทั้ง 10 และ 30 นาที พบว่ามีปริมาณ THCA 7.86 ± 0.86 และ 5.67 ± 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 4

ปริมาณสารสำคัญกลุ่มแคนนาบินอยด์ในใบกัญชาผัด

กระบวนการผัดที่อุณหภูมิ 90–100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที พบสาร CBDA ในใบกัญชาพันธุ์ ตะนาวศรีก้านแดงประมาณ 15.14 ± 1.69 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลดลงร้อยละ 94 เมื่อเปรียบเทียบกับใบสด และ CBD ประมาณ 62.49 ± 3.49 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเพิ่มขึ้นจากใบสดร้อยละ 110 ส่วนใบกัญชาชนิดที่กำลังพัฒนาพันธุ์ พบสาร $\Delta 9$ -THC 370.51 ± 8.55 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ THCA 571.45 ± 22.54 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับใบสด พบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นร้อยละ 260 และลดลงร้อยละ 57 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 4

ปริมาณสารสำคัญกลุ่มแคนนาบินอยด์ในใบกัญชาทอด

กระบวนการทอดที่อุณหภูมิ 150–170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 2 วิธี ได้แก่ ใบกัญชาทอดและน้ำมันทอดใบกัญชา พบว่าใบทอดพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงมีปริมาณ CBDA ในใบกัญชาทอดน้อยกว่าในน้ำมันทอดใบกัญชา โดยพบ 4.94 ± 0.50 และ 8.57 ± 0.67 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และพบ CBD 25.03 ± 1.31 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งน้อยกว่าใบสด พบสาร CBD ส่วนใหญ่อยู่ในน้ำมันทอดใบกัญชา 53.75 ± 4.48 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับใบกัญชาทอดพันธุ์ที่กำลังพัฒนามีปริมาณ $\Delta 9$ -THC เท่ากับ 176.21 ± 6.26 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ THCA 156.01 ± 6.70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนน้ำมันทอดพบ $\Delta 9$ -THC และ THCA 10.4 ± 0.92 และ 60.17 ± 2.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 4

ตารางที่ 1 ปริมาณสารสำคัญกลุ่มแคนนาบินอยด์จากใบกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงและพันธุ์ที่กำลังพัฒนาในใบสดและใบที่ผ่านกระบวนการปรุงสุก (n = 10)

พันธุ์กัญชา	กรรมวิธี		ปริมาณสารสำคัญกลุ่มแคนนาบินอยด์ (mg/kg)				
			CBDA	CBD	Δ9-THC	Δ8-THC	THCA
ตะนาวศรี	สด	ใบกัญชาสด	256.91±18.10	29.74±3.66	14.07±2.25	ND	36.51±3.60
ก้านแดง	ต้ม	ใบกัญชาต้ม	30.62±4.33 (-88.08%)	103.55±7.81 (+248.18%)	8.55±1.28 (-39.23%)	ND	ND
		น้ำต้ม 10 นาที	0.98±0.11	ND	ND	ND	ND
		น้ำต้ม 30 นาที	1.09±0.30	ND	ND	ND	ND
		ผัด	ใบกัญชาผัด	15.14±1.69 (-94.11%)	62.49±3.49 (+110.12%)	12.31±1.32 (-12.51%)	ND
	ทอด	ใบกัญชาทอด	4.94±0.50 (-98.08%)	25.03±1.31 (-15.84%)	3.7±0.36 (-73.70%)	ND	2.49±0.37 (-93.18%)
		น้ำมันทอด	8.57±0.67	53.75±4.48	ND	ND	ND
พันธุ์ที่กำลังพัฒนา	สด	ใบกัญชาสด	24.54±7.76	1.65±0.37	102.83±8.36	ND	1317.36±53.32
	ต้ม	ใบกัญชาต้ม	8.03±1.35 (-67.28%)	16.02±2.48 (+870.91%)	885.15±12.48 (+760.79%)	ND	154.09±12.7 (-88.30%)
		น้ำต้ม 10 นาที	0.31±0.24	ND	0.41±0.05	ND	7.86±0.86
		น้ำต้ม 30 นาที	0.63±0.06	ND	0.84±0.10	ND	5.67±0.10
	ผัด	ใบกัญชาผัด	13.21±0.72 (-46.18%)	0.60±0.09 (-63.64%)	370.51±8.55 (+260.31%)		571.45±22.54 (-56.62%)
		ทอด	ใบกัญชาทอด	15±0.95 (-38.88%)	5.84±0.73 (+253.94%)	176.21±6.26 (+71.36%)	
	น้ำมันทอด		ND	ND	10.4±0.92		60.17±2.03

หมายเหตุ: 1) ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ใบกัญชาสด ต้ม ทอด และน้ำมันทอด เท่ากับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ LOD ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ น้ำต้มเท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

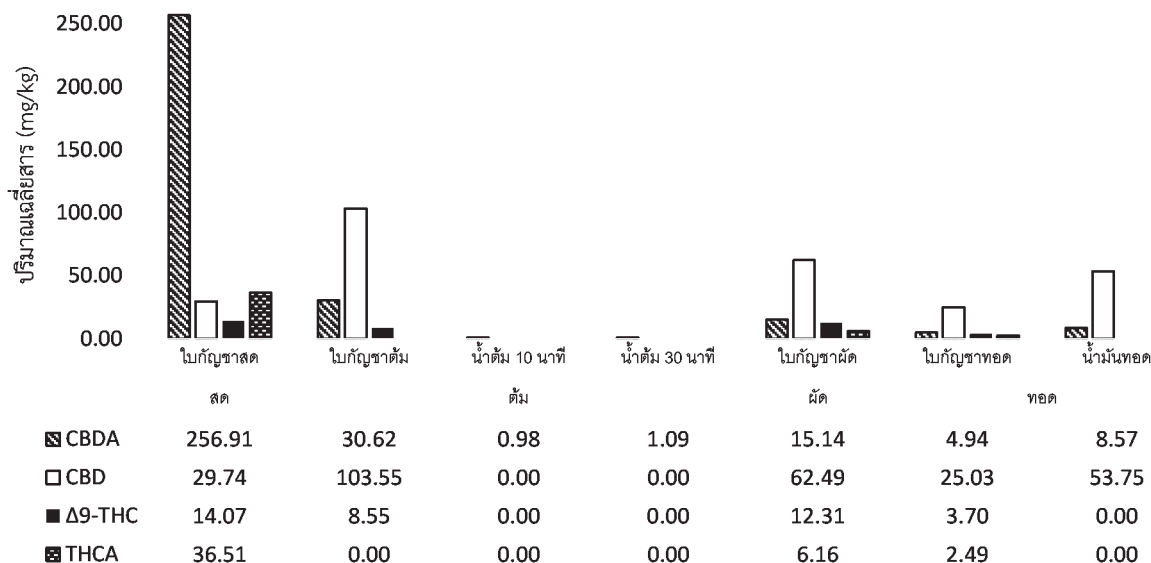
$$2) \text{ คำนวณร้อยละการเพิ่มขึ้น/ลดลง จาก } \frac{(\text{ความเข้มข้นหลังปรุงสุก} - \text{ความเข้มข้นใบสด}) \times 100}{\text{ความเข้มข้นใบสด}}$$

การประเมินความเสี่ยงของสาร $\Delta 9$ -THC จากการบริโภคอาหารที่มีส่วนประกอบของกัญชา

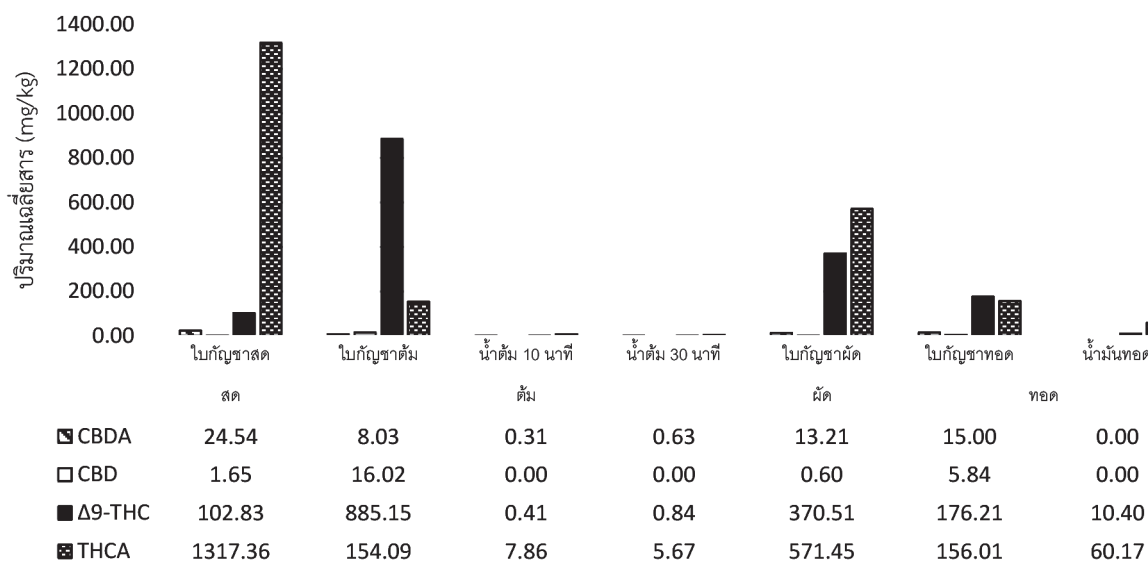
จากการประเมินการรับสัมผัสจากการบริโภคอาหารที่มีส่วนประกอบของกัญชา พบว่าการบริโภคใบกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดง จำนวน 1 ใบ น้ำหนักใบละ 0.86 กรัม โดยผู้บริโภคที่มีอายุ 18 ปีขึ้นไป ร่างกายจะได้รับสาร $\Delta 9$ -THC ในช่วง 0.05–0.22 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก (ไม่รวมค่า 0.00) เมื่อคำนวณค่า

margin of safety (MOS) เปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงวิกฤต (ARfD) ที่ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก⁽¹¹⁾ พบว่ามีค่า MOS ในช่วง 0.05–0.22 ซึ่งน้อยกว่า 1 แสดงว่าถ้าบริโภคใบกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงในปริมาณ 1 ใบ ที่น้ำหนักใบละ 0.86 กรัม จะไม่ทำให้ได้รับสารเกินค่ามาตรฐานและอยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อสุขภาพ สำหรับการบริโภคกัญชาชนิดที่กำลังพัฒนาพันธุ์ พบว่าการบริโภคอาหารที่มีใบกัญชาพันธุ์นี้

ปริมาณสารสำคัญที่ตรวจพบในใบกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดง



ปริมาณสารสำคัญที่ตรวจพบในใบกัญชาพันธุ์ที่กำลังพัฒนา



ภาพที่ 4 ปริมาณสารสำคัญกลุ่มแคนนาบินอยด์ (CBDA, CBD, Δ9-THC, Δ8-THC และ THCA) ของกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงและพันธุ์ที่กำลังพัฒนา ในใบสดและใบที่ผ่านกระบวนการต้ม ผัดและทอด

จำนวน 1 ใบ น้ำหนักใบละ 0.669 กรัม โดยผู้บริโภคมียายุ 18 ปีขึ้นไป ร่างกายจะได้รับสาร Δ9-THC ในช่วง 0.01–10.62 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก (ไม่รวมค่า 0.00) ซึ่งค่าการได้รับสัมผัสที่สูงที่สุดพบในใบกัญชาต้มที่บริโภคโดยผู้บริโภคมียายุ 65 ปีขึ้นไป และเมื่อคำนวณค่า MOS เปรียบเทียบกับค่า ARfD ที่ 1 ไมโครกรัมต่อ

กิโลกรัมน้ำหนัก⁽¹¹⁾ พบว่ามีค่า MOS ในช่วง 0.01–10.62 ซึ่งอาหารบางประเภทที่ให้ค่ามากกว่า 1 แสดงว่าการได้รับสาร Δ9-THC เกินค่ามาตรฐานหรืออยู่ในระดับที่อาจไม่ปลอดภัยต่อสุขภาพมีความเสี่ยงต่อสุขภาพอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การประเมินความเสี่ยงของสาร $\Delta 9$ -THC จากการบริโภคอาหารมีส่วนประกอบของใบกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงและพันธุ์กำลังพัฒนา

กระบวนการแปรรูปของ ใบกัญชา	ปริมาณสาร $\Delta 9$ -THC ($\mu\text{g/g}$)	ปริมาณสาร $\Delta 9$ -THC ที่ได้รับจากการบริโภค (คำนวณจาก น้ำหนักใบละ 0.86 g) (μg)	การได้รับสัมผัส (Dietary exposure) ($\mu\text{g/kg bw}$)			Acute Reference dose (ARfD) ($\mu\text{g/kg bw}$)	Margin of Safety (MOS) = Dietary exposure/ARfD		
			18-34.9 ปี (น้ำหนักเฉลี่ย 63.12 kg)	35-64.9 ปี (น้ำหนักเฉลี่ย 63.53 kg)	65 ปีขึ้นไป (น้ำหนักเฉลี่ย 55.77 kg)		18-34.9 ปี	35-64.9 ปี	65 ปี ขึ้นไป
ใบกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดง/ การบริโภค 1 ใบ									
ใบกัญชาสด	14.07	12.10	0.19	0.19	0.22	1	0.19	0.19	0.22
ใบกัญชาต้ม	8.55	7.35	0.12	0.12	0.13		0.12	0.12	0.13
น้ำต้ม 10 นาที	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00
น้ำต้ม 30 นาที	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00
ใบกัญชาผัด	12.31	10.59	0.17	0.17	0.19		0.17	0.17	0.19
ใบกัญชาทอด	3.70	3.18	0.05	0.05	0.06		0.05	0.05	0.06
น้ำมันทอด	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00
ใบกัญชาพันธุ์กำลังพัฒนา/ การบริโภค 1 ใบ									
ใบกัญชาสด	102.83	68.79	1.09	1.08	1.23	1	1.09	1.08	1.23
ใบกัญชาต้ม	885.15	592.17	9.38	9.32	10.62		9.38	9.32	10.62
น้ำต้มใบกัญชา 10 นาที	0.41	0.28	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00
น้ำต้มใบกัญชา 30 นาที	0.84	0.56	0.01	0.01	0.01		0.01	0.01	0.01
ใบกัญชาผัด	370.51	247.87	3.93	3.90	4.44		3.93	3.90	4.44
ใบกัญชาทอด	176.21	117.88	1.87	1.86	2.11		1.87	1.86	2.11
น้ำมันทอด	10.40	6.96	0.11	0.11	0.12		0.11	0.11	0.12

หมายเหตุ: ค่ามาตรฐานของ $\text{MOS} \leq 1$ แสดงว่าเป็นค่าที่อยู่ในระดับการบริโภคที่ปลอดภัยต่อสุขภาพ⁽¹¹⁾

วิจารณ์

จากการศึกษาพบว่ากัญชาทั้ง 2 พันธุ์ มีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน โดยพันธุ์ตะนาวศรี ก้านแดงมีสารกลุ่ม CBD และ CBDA สูง ส่วนพันธุ์ที่กำลังพัฒนามีสารกลุ่ม THC และ THCA สูง โดยพบว่าองค์ประกอบของสารกลุ่มดังกล่าวที่พบมากที่สุดในใบกัญชาสดอยู่ในรูป acidic form ได้แก่ CBDA และ THCA ซึ่งเป็นสารที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท เนื่องจากไม่สามารถจับกับ cannabinoid receptors (CB1 และ CB2) ในร่างกายได้⁽¹⁶⁾ แต่เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการสังเคราะห์สาร CBD และ THC ตามลำดับ สาร CBDA และ THCA มีความไม่เสถียรต่ออุณหภูมิสูง เมื่อมีแสงหรือความร้อนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้เกิดปฏิกิริยา decarboxylation โดย carboxyl group หลุดออกไปในรูปของ CO₂⁽⁷⁾ มีการศึกษาทาง molecular modeling⁽¹⁷⁾ พบว่า THCA จะเปลี่ยนเป็น THC อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิสูงกว่า 160 องศาเซลเซียส ในเวลา 10 นาที และที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ในเวลาไม่กี่วินาที กระบวนการ decarboxylation ของ THCA เป็น THC สามารถเกิดได้สูงสุดเพียงแค่ร้อยละ 70 เท่านั้น⁽¹⁸⁾ การศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น ที่เปรียบเทียบกับพฤติกรรมการบริโภคของคนไทย โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลจากกระบวนการปรุงสุกต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารสำคัญกลุ่มแคนนาบินอยด์ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงในใบกัญชาเพียง 2 พันธุ์ และนำผลการทดลองที่ได้มาพิจารณาเปรียบเทียบกับข้อมูลเชิงวิชาการเท่านั้น ผลการทดลองพบว่าการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สาร THCA ในใบกัญชาพันธุ์ที่กำลังพัฒนาเกิดการ decarboxylation เปลี่ยนเป็นสาร THC และทำให้ปริมาณสาร THC เพิ่มขึ้นจากใบสดร้อยละ 760.79 ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงมากกว่าการผัดที่อุณหภูมิ 90–100 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที และการทอดที่อุณหภูมิ 150–170 องศาเซลเซียส เวลา 60 วินาที ที่มีการเพิ่มขึ้นของสาร THC เพียงร้อยละ 260.31 และ 71.36 ตามลำดับ พบปริมาณ THC ในใบกัญชาทอดน้อยกว่าใบผัด เกิดจาก THC ส่วนหนึ่งละลายอยู่ในน้ำมันทอด เพราะมีคุณสมบัติละลายได้ดีในไขมันและอีกส่วนหนึ่ง

อาจเกิดการสลายตัวจาก THC เนื่องจาก THCA และ THC สามารถเกิด polymerization และ oxidation ไปเป็น cannabinolic acid (CBNA) และ cannabinol (CBN) ตามลำดับ ซึ่งการสลายตัวนี้เกิดได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 85–100 องศาเซลเซียส⁽¹⁹⁾ สำหรับการเกิด decarboxylation ของ CBDA มีการทดลองในสารสกัดกัญชา⁽²⁰⁾ พบว่า CBDA สามารถเกิด decarboxylation ได้ร้อยละ 95 ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที และร้อยละ 97 เมื่อใช้อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เวลา 50 นาที และ 130 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที จากการศึกษาดังกล่าว⁽²⁰⁾ มีรายงานว่าอัตราการเกิด decarboxylation ของ CBDA ขึ้นอยู่กับชนิดของ matrix โดยทดลองกับ isolated CBDA พบว่าที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที สาร CBDA เกิด decarboxylation ร้อยละ 52 แสดงว่าในสารสกัดกัญชามีปัจจัยที่ช่วยให้กระบวนการ decarboxylation เกิดได้ดีขึ้น เมื่อพิจารณาผลของการเปลี่ยนแปลงสาร CBDA และ CBD ในใบกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดง พบว่าการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที สาร CBDA มีปริมาณลดลงร้อยละ 88.08 ในขณะที่ CBD เพิ่มขึ้นร้อยละ 248.18 ส่วนการผัดที่อุณหภูมิ 90–100 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที เกิดการเพิ่มขึ้นของ CBD ร้อยละ 110.12 และการทอดที่อุณหภูมิ 150–170 องศาเซลเซียส เวลา 60 วินาที เกิดการลดลงของ CBD ร้อยละ 15.84 และพบว่าสาร CBD ส่วนใหญ่จะละลายอยู่ในน้ำมัน เมื่อพิจารณาถึงอัตราการเกิดปฏิกิริยา decarboxylation พบว่าการเพิ่มขึ้นของสาร CBD เกิดในอัตราเร็วที่น้อยกว่าการลดลงของ CBDA เนื่องจาก CBD มีจุดเดือดที่ค่อนข้างต่ำประมาณ 160–180 องศาเซลเซียส จึงทำให้ CBD อาจสลายตัวได้⁽¹⁹⁾

คุณสมบัติที่สำคัญของสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ คือ ละลายได้ดีในไขมันและละลายได้น้อยในน้ำ โดย THC สามารถละลายได้มากกว่า 1 กรัมต่อมิลลิลิตร ใน ethanol และ acetone⁽²¹⁾ แต่ละลายในน้ำได้เพียง 2.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส⁽²²⁾ เช่นเดียวกับ CBD ที่ละลายน้ำได้ 12.6 มิลลิกรัมต่อลิตร⁽²³⁾ ในการศึกษาเมื่อนำใบกัญชาต้มในน้ำ พบปริมาณสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ละลายออกมา

ค่อนข้างน้อย โดยมีอัตราการละลาย (transfer rate) ของ CBD และ THC อยู่ในช่วงร้อยละ 0.40–0.82 และ CBDA และ THCA อยู่ในช่วงร้อยละ 0.38–2.57 (ไม่รวมร้อยละ 0) สังเกตได้ว่า THCA และ CBDA มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีกว่า เนื่องจากมีโครงสร้างทางเคมีที่มีขั้วมากกว่าสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้า⁽²⁴⁾ ที่ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในใบชาแห้งและน้ำจากการชงชา พบว่ามีสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ทั้งหมด (total cannabinoid content) เฉลี่ยอยู่ที่ 14,960 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยแบ่งเป็น CBD และ CBDA ร้อยละ 87 และ Δ 9-THC ประมาณ 16–935 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อนำใบชาไปชงเป็นน้ำชา พบว่ามีอัตราการละลายของ CBD อยู่ในช่วงร้อยละ 0.3–4.2 และ Δ 9-THC อยู่ในช่วงร้อยละ 0.1–1.4

การประเมินความเสี่ยงของสาร Δ 9-THC จากการบริโภคอาหารมีส่วนประกอบของกัญชา อ้างอิงจากค่าอ้างอิงวิกฤต (acute reference dose; ARfD) ตาม EFSA⁽¹¹⁾ พบว่าการบริโภคใบกัญชาพันธุ์เตนาสรีก้านแดงทั้งรูปแบบใบสด ใบที่ผ่านกรรมวิธีการปรุงน้ำต้มใบกัญชา และน้ำมันทอดใบกัญชา จำนวน 1 ใบ เป็นปริมาณที่สามารถบริโภคอย่างปลอดภัย แต่สำหรับพันธุ์ที่กำลังพัฒนามีปริมาณ Δ 9-THC ค่อนข้างสูง ทำให้การบริโภคใบสดและใบที่ผ่านกรรมวิธีการปรุงแม้เพียง 1 ใบ ผู้บริโภคจะได้รับปริมาณสาร Δ 9-THC สูงกว่าเกณฑ์ความปลอดภัย โดยเฉพาะใบกัญชาต้มที่ผ่านความร้อนเป็นเวลานานจะทำให้มีปริมาณ Δ 9-THC มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับค่า health based guidance value (HBGV) หรือ ARfD ของ EFSA กับข้อกำหนดของหน่วยงานจากประเทศอื่น ๆ พบว่าข้อกำหนดของ EFSA ค่อนข้างต่ำกว่า EFSA กำหนดให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อสุขภาพ (lowest-observed-adverse-effect level; LOAEL) ของ Δ 9-THC ที่ส่งผลต่อระบบประสาทส่วนกลางอยู่ที่ 2.5 มิลลิกรัมต่อวัน และปริมาณสารสูงสุดที่รับได้ต่อวัน (provisional maximum tolerable daily intake; PMTDI) เท่ากับ 0.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก เมื่อนำค่า LOAEL

มาคำนวณกับ uncertainty factor ประมาณ 30 จะได้ค่า HBGV ของ THC เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก การศึกษาของ Food Standards Australia New Zealand (FSANZ) ประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ พบว่าค่า TDI เท่ากับ 6 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก และ LOAEL เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อวัน เมื่อนำมาคำนวณกับ uncertainty factor เท่ากับ 10 จะได้ค่า HBGV เท่ากับ 6 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก ซึ่งใกล้เคียงกับค่ากำหนดของ Swiss Federal Office of Public Health (Bundesamt für Gesundheit (BAG) ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ และ Croatian Food Agency (Hrvatska Agencija za Hranu (HAH)) ประเทศโครเอเชีย⁽²⁵⁾ ในปี ค.ศ. 2020 EFSA รายงานผลการประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพมนุษย์อย่างเฉียบพลันจากการได้รับ Δ 9-THC⁽¹¹⁾ MOS มากกว่า 1 พบว่าการบริโภคผลิตภัณฑ์จากกัญชาที่วางจำหน่ายในท้องตลาดโดยกลุ่มที่มีการบริโภคสูงส่งผลให้ปริมาณการได้รับสัมผัสสูงกว่าค่าอ้างอิงวิกฤตของ EFSA เช่น ปริมาณการได้รับสัมผัสจากขนมปังและแป้งกัญชามีค่าเท่ากับ 0.3–1.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก พาสต้ามีค่าเท่ากับ 1.2–6.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก ผลิตภัณฑ์ธัญชาติสำหรับอาหารเข้ามีค่าเท่ากับ 0.18–1.27 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก เบียร์และผลิตภัณฑ์คล้ายเบียร์มีค่าเท่ากับ 7–41 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก เป็นต้น ดังนั้นการบริโภคใบกัญชาพันธุ์เตนาสรีก้านแดง จำนวน 1 ใบ น้ำหนักโดยเฉลี่ย 0.860 ± 0.088 กรัมต่อใบ ที่มีปริมาณการได้รับสัมผัส $0.05\text{--}0.22$ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก อยู่ในเกณฑ์ที่มีความปลอดภัยต่อสุขภาพ ส่วนพันธุ์ที่กำลังพัฒนาจำนวน 1 ใบ น้ำหนักโดยเฉลี่ย 0.669 ± 0.091 กรัมต่อใบ เท่ากับปริมาณการได้รับสัมผัส $0.01\text{--}10.62$ ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก อาจต้องพิจารณาเลือกบริโภคใบสดหรือใบที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่ไม่นานเกินไปหรือบริโภคน้อยกว่าจำนวน 1 ใบ เพื่อป้องกันผลกระทบต่อสุขภาพ หากพิจารณาถึงข้อกำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 438 พ.ศ. 2565 ซึ่งกำหนดให้ปริมาณ Δ 9-THC มีค่าไม่เกิน 1.6 มิลลิกรัมต่อหน่วยบรรจุ พบว่าการบริโภคใบกัญชาพันธุ์ที่กำลังพัฒนา

จำนวน 1 ใบ (0.669 ± 0.091 กรัม) มีปริมาณ $\Delta 9$ -THC ไม่เกินข้อกำหนด การศึกษานี้เป็นแนวทางตัวอย่างของ กัญชา 2 ชนิดพันธุ์ เท่านั้น ผลการศึกษายังไม่ครอบคลุม การนำไปใช้กับกัญชาพันธุ์อื่น ๆ และกระบวนการปรุงรูปแบบอื่น ผู้บริโภคจึงควรมีความระมัดระวังในการบริโภคอาหารและเครื่องดื่มจากกัญชา โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่วางจำหน่ายในท้องตลาดหรือร้านอาหาร โดยไม่มีการขึ้นทะเบียนหรือไม่มีการตรวจสอบ เนื่องจากผู้ผลิตอาจนำส่วนอื่น ๆ ของกัญชาที่มีปริมาณสารออกฤทธิ์สูงมาใช้ เช่น ช่อดอก ใบส่วนที่ใกล้ช่อดอก และใบอบแห้ง ซึ่งอาจทำให้ผู้บริโภคได้รับสาร $\Delta 9$ -THC มากเกินไป และส่งผลเป็นอันตรายต่อสุขภาพ รวมทั้งควรระวังปัจจัยอื่น ๆ จากการบริโภคกัญชา เช่น การปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. และ *E. coli* การปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดศัตรูพืช และโลหะหนัก เป็นต้น⁽²⁶⁾

สรุป

การเปลี่ยนแปลงของสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ชนิด CBDA, CBD, $\Delta 9$ -THC, $\Delta 8$ -THC และ THCA ในกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงและพันธุ์ที่กำลังพัฒนาที่ผ่านกระบวนการปรุงสุก ได้แก่ ต้ม ผัด และทอด พบว่าใบกัญชาผ่านกระบวนการปรุงสุกที่ใช้ความร้อน สาร CBDA และ THCA มีปริมาณลดลง ส่วน CBD และ $\Delta 9$ -THC มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น โดยการต้มส่งผลให้ปริมาณสาร CBD ในกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงเพิ่มขึ้นร้อยละ 248.18 และ CBDA ลดลงร้อยละ 88.08 ส่วนพันธุ์ที่กำลังพัฒนา พบว่า $\Delta 9$ -THC เพิ่มขึ้นร้อยละ 760.79 และ THCA ลดลงร้อยละ 88.30 พบสารในน้ำต้มใบกัญชาเพียงเล็กน้อยในช่วงร้อยละ 0.00–2.57 กระบวนการผัดใบกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดง พบ CBD เพิ่มขึ้นร้อยละ 110.12 และ CBDA ลดลงร้อยละ 94.11 ส่วนใบกัญชาพันธุ์กำลังพัฒนา พบสาร $\Delta 9$ -THC เพิ่มขึ้นร้อยละ 260.31 และ THCA ลดลงร้อยละ 56.62 สำหรับการทอด พบใบทอดพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงมีปริมาณ CBD และ CBDA ลดลงจากใบสด ร้อยละ 15.84 และ 98.08 ตามลำดับ ทั้งนี้พบสารส่วนใหญ่อยู่ในน้ำมันทอดใบกัญชา และใบทอดพันธุ์ที่กำลังพัฒนามีปริมาณ $\Delta 9$ -THC เพิ่มขึ้นร้อยละ

71.36 ส่วนน้ำมันทอดพบสารสำคัญกัญชาส่วนหนึ่งเช่นกัน

การประเมินความเสี่ยงของ $\Delta 9$ -THC จากการบริโภคอาหารมีส่วนประกอบของกัญชา โดยเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงวิกฤต (ARfD) จาก EFSA ที่ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก พบว่าการบริโภคใบกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงทั้งใบสดและใบปรุงสุกจำนวน 1 ใบ ไม่ทำให้ได้รับสารเกินค่ามาตรฐาน ส่วนใบกัญชาพันธุ์ที่กำลังพัฒนาจำนวน 1 ใบ อาจส่งผลให้ผู้บริโภคได้รับสาร $\Delta 9$ -THC เกินค่ามาตรฐานหรือมีความเสี่ยงต่อสุขภาพอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นผู้บริโภคควรมีความระมัดระวังปริมาณในการบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มจากกัญชา เพื่อป้องกันความเสี่ยงต่อสุขภาพ งานวิจัยนี้เป็นเพียงการศึกษาในเบื้องต้น จึงควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณภายใต้โครงการบูรณาการพัฒนากัญชาทางการแพทย์และผลิตภัณฑ์สุขภาพจากพืชกัญชา ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562–2565 ขอขอบคุณสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตสกลนคร สำหรับการจัดหาตัวอย่างใบกัญชาและถ่ายทอดองค์ความรู้เรื่องการปลูกกัญชา และขอขอบคุณนางลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ หัวหน้าฝ่ายยาสัตว์และวัตถุออกฤทธิ์ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ให้การปรึกษาในการวางแผนงานจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. บังอร ศรีพานิชกุลชัย. การใช้กัญชาเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์. ว. เกษตรศาสตร์อีสาน 2562; 15(4): 1–26.
2. Grand View Research. Thailand legal cannabis market size, share & trends analysis report by derivative (Marijuana, Hemp), by sources (CBD, THC), by end-use (Medical Use, Recreational Use, Industrial Use), and

- segment forecasts, 2022–2030. [online]; [cited 2023 Jul 20]; [10 screens]. Available from: URL: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/thailand-legal-cannabis-market-report>.
- Fortune Business Insights. Cannabis-infused food market size, share & Industry analysis, by application (bakery, confectionery, snacks, condiments) and regional forecast, 2023–2030. [online]; [cited 2023 Jul 23]; [3 screens]. Available from: URL: <https://www.fortune-businessinsights.com/cannabis-infused-food-market-103167>.
 - มาลา สร้อยสำโรง, พินท์สุตา เพชรประสม, บรรณาธิการ. กัญชาภัยกับตำรับอาหารไทย. นนทบุรี: กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข; 2564.
 - Barrus DG, Capogrossi KL, Cates SC, Gourdet CK, Peiper NC, Novak SP, et al. Tasty THC: promises and challenges of cannabis edibles. *Methods Rep (RTI Press)* 2016; 2016: 10.3768. (22 pages).
 - ไทยรัฐออนไลน์. ไขอาการแพ้กัญชา เนย นม ขนม สายหวานพึงระวัง เมานาน 4-6 ชั่วโมง. [ออนไลน์]. 2565; [สืบค้น 23 ก.ค. 2566]; [9 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.thairath.co.th/scoop/interview/2420986>.
 - Wang M, Wang YH, Avula B, Radwan MM, Wanas AS, van Antwerp J, et al. Decarboxylation study of acidic cannabinoids: a novel approach using ultra-high-performance supercritical fluid chromatography/photodiode array-mass spectrometry. *Cannabis Cannabinoid Res* 2016; 1(1): 262–71.
 - ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 438 (พ.ศ. 2565) ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่อง ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของส่วนของกัญชาหรือกัญชง (ฉบับที่ 2). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 139 ตอนพิเศษ 251 ง (วันที่ 21 ตุลาคม 2565). หน้า 31.
 - ยาใจ อภิบุญโยภาส, วินัย วนานุกูล. ภาวะพิษจากกัญชา Cannabinoids poisoning. *จุลสารพิษวิทยา* 2552; 17(2): 3–5.
 - ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง โฆษณาคำขอให้ออกหนังสือรับรองพันธุ์พืชขึ้นทะเบียน ตามพระราชบัญญัติพันธุ์พืช พ.ศ. 2518. วันที่ 23 กรกฎาคม 2564. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์; 2564.
 - European Food Safety Authority (EFSA); Arcella D, Cascio C, Mackay K. Acute human exposure assessment to tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC). *EFSA J* 2020; 18(1): e05953. (41 pages).
 - สกลรัตน์ สมสันติสุข, อัจฉรี อินแก้ว, เสาวณีย์ วาจาสิทธิ์, สุวิมล หมวดหมี, กัญญารัตน์ เชื้อกุลชาติ, วิทวัส วังแก้ว หิรัญ, และคณะ. การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในน้ำมันมะพร้าว โดยเทคนิค LC-MS/MS. *ว.กรมวิทย์ พ* 2564; 63(3): 556–70.
 - Vaclavik L, Benes F, Fenclova M, Hricko J, Krmela A, Svobodova V, et al. Quantitation of cannabinoids in cannabis dried plant materials, concentrates, and oils using liquid chromatography–diode array detection technique with optional mass spectrometric detection: single-laboratory validation study, first action 2018.11. *J AOAC Int* 2019; 102(6): 1822–33.
 - Arcella D, Baines J, Boon PE, Cressey P, DiNovi M, Hambridge T, et al. Chapter 6 Dietary exposure assessment for chemicals in food. In: Sheffer M, editor. *Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food*. 2nd ed. Canada: WHO Press; 2020. p. 1–175.
 - สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. ฐานข้อมูลปริมาณอาหารที่คนไทยบริโภค. [ออนไลน์]; [สืบค้น 27 ก.ค. 2566]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://consumption.acfs.go.th/main.jsessionid=6F6A437752A47CF9F56D314DEB0BC098>.
 - Burstein SH. The cannabinoid acids: nonpsychoactive derivatives with therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 1999; 82(1): 87–96.

17. Perrotin-Brunel H, Buijs W, Van Spronsen J, Van Roosmalen MJ, Peters CJ, Verpoorte R, et al. Decarboxylation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol: kinetics and molecular modeling. *J Mol Struct* 2011; 987(1-3): 67-73.
18. Dussy FE, Hamberg C, Luginbühl M, Schwerzmann T, Briellmann TA. Isolation of Δ^9 -THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Δ^9 -THC in cannabis products. *Forensic Sci Int* 2005; 149(1): 3-10.
19. Repka MA, Munjal M, ElSohly MA, Ross SA. Temperature stability and bioadhesive properties of Δ^9 -tetrahydrocannabinol incorporated hydroxypropylcellulose polymer matrix systems. *Drug Dev Ind Pharm* 2006; 32(1): 21-32.
20. Seo C, Jeong M, Lee S, Kim EJ, Rho S, Cho M, et al. Thermal decarboxylation of acidic cannabinoids in Cannabis species: identification of transformed cannabinoids by UHPLC-Q/TOF-MS. *J Anal Sci Technol* 2022; 13: 42. (12 pages).
21. Rosenkrantz H, Thompson GR, Braude MC. Oral and parenteral formulations of marijuana constituents. *J Pharm Sci* 1972; 61(7): 1106-12.
22. Garrett ER, Hunt CA. Physiochemical properties, solubility, and protein binding of Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *J Pharm Sci* 1974; 63(7): 1056-64.
23. Grifoni L, Vanti G, Donato R, Sacco C, Bilia AR. Promising nanocarriers to enhance solubility and bioavailability of cannabidiol for a plethora of therapeutic opportunities. *Molecules* 2022; 27(18): 6070. (22 pages).
24. Triesch N, Vijayakumar N, Weigel S, These A. Cannabinoid contents in hemp teas and estimation of their transfer into tea infusions. *Food Addit Contam Part A* 2023; 40(7): 890-901.
25. King D, Bhatarah P, Duffy P, Yates A, O'Sullivan SE. Health guidance levels for THC in CBD products: safety assessment & regulatory recommendations. [online]. [cited 2023 Aug 1]; [40 screens]. Available from: URL: <https://theaci.co.uk/wp-content/uploads/2021/03/Joint-report-CMC-ACI-CPDRG-Health-Guidance-Levels-for-THC-in-CBD-products.pdf>.
26. Gibson K. Unlicensed weed tainted with E. coli, lead and salmonella, study finds. [online]. 2022; [cited 2023 Aug 1]; [1 screen]. Available from: URL: <https://www.cbsnews.com/news/cannabis-unlicensed-weed-e-coli-lead-and-salmonella-study-finds/>.

The Effects of Cooking Processes on Cannabinoids Content of Cannabis Leaves

Thongsuk Payanan¹, Atcharee Inkaew¹, Sakulrat Somsuntisuk¹,
Witthawat Wangkaewhirun¹, Lekha Prasarthong¹, and Phichet Banyati²

¹Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000

²Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000

ABSTRACT The cooking processes can affect the increment or reduction of the substances, cannabinoids, in cannabis leaves, causing foods to have different effects. This study aimed to investigate the alteration of cannabinoids content; CBD, CBDA, $\Delta 9$ -THC, $\Delta 8$ -THC, and THCA in the cannabis leaves that were cooked by boiling, stir-frying, and deep-frying. This study employed 2 strains of cannabis leaves; Tanao Si Kan Dang and the ongoing-developed strain, which were developed by the medicinal plant research institute. The cannabinoids content was compared between fresh leaves and cooked leaves, using HPLC. The results indicated that boiling process resulted in an enhancement of CBD and $\Delta 9$ -THC for 248.18% and 760.79%, but the CBDA and THCA were reduced for 88.08 and 88.30. Additionally, these substances were slightly found in the boiling water. For stir-fried, heat was found to increase the contents of CBD and $\Delta 9$ -THC for 110.12% and 260.31% and also reduce the CBDA and THCA for 94.11% and 56.62%. Lastly, deep-fried process affected the reduction of the cannabinoids content compared to the fresh leaves, but some substances were detected in the oil. The exposure assessment to $\Delta 9$ -THC from cannabis in food based on the acute reference dose of 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ from the EFSA showed that the consumption of one fresh or cooked Tanao Si Kan Dang leaf contributed to Margin of Safety (MOS) during 0.05–0.22 ($\text{MOS} < 1$), thus this $\Delta 9$ -THC exposure did not exceed the safety guideline. However, consumption of the developed strain leaf led to MOS 0.01–10.62, showing that the exposure to $\Delta 9$ -THC exceeded the guideline or could significantly cause the adverse effects to consumers health. Therefore, when consuming for cannabis in food, both the amount of existing substances and cooking processes should be aware before taken for safety concern.

Keywords: Cannabis leaves, Tanao Si Kan Dang, Cooking process, Cannabinoids

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ ปริมาณฮอร์โมน 17α -Estradiol, 17β -Estradiol และ Testosterone โดยเทคนิค UPLC-MS/MS

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

บทคัดย่อ ฮอร์โมน 17α -estradiol, 17β -estradiol และ testosterone เป็นฮอร์โมนเพศที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญของระบบสืบพันธุ์ รวมถึงส่งผลต่อการแสดงลักษณะของเพศหญิงและเพศชาย ปัจจุบันพบว่าการนำฮอร์โมนเพศสังเคราะห์มาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงปลานิลและปลาหมอแบบเพศเดี่ยว โดยใช้ testosterone เหนี่ยวนำให้เกิดปลานิลเพศผู้ และ 17β -estradiol เพื่อให้เกิดปลาหมอเพศเมีย การผสมฮอร์โมนในอาหารอาจก่อให้เกิดการตกค้างในเนื้อสัตว์และสิ่งแวดล้อม ส่งผลให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้บริโภค จึงมีข้อกำหนดจากสหภาพยุโรป (EU) ประกาศห้ามใช้ฮอร์โมนดังกล่าวในการทำปศุสัตว์และเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มฮอร์โมนเพศ ได้แก่ 17α -estradiol, 17β -estradiol และ testosterone ในเนื้อปลา ด้วยเทคนิค UPLC-MS/MS คำนวณผลโดยใช้ procedural mixed standard calibration curve พบว่า LOD และ LOQ เป็น 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ช่วงการวิเคราะห์อยู่ระหว่าง 2–100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่า coefficient of determination (R^2) มากกว่า 0.999 ความแม่นยำแสดงด้วย %recovery อยู่ในช่วง 89.7–114.0% และความเที่ยงแสดงด้วย %RSD อยู่ในช่วง 3.5–26.5% แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความจำเพาะ แม่นยำ น่าเชื่อถือ เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ: 17α -Estradiol, 17β -Estradiol, Testosterone, ฮอร์โมน, UPLC-MS/MS

Corresponding author E-mail: suwimol.m@dmasc.mail.go.th

Received: 6 June 2023

Revised: 12 February 2024

Accepted: 27 March 2024

บทนำ

ฮอร์โมน (hormone) เป็นสารเคมีที่ถูกสร้างจากต่อมไร้ท่อที่ถูกส่งไปตามกระแสเลือดเพื่อไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย ฮอร์โมนที่มีหน้าที่ควบคุมการสืบพันธุ์ กระตุ้นการเจริญเติบโตของไขในรังไข่ หรือสร้างเชื้อสุมิในอณฑะ เรียกว่า ฮอร์โมนเพศ จัดอยู่ในกลุ่มสารสเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) มีโครงสร้างเป็นวงพื้นฐานของสเตียรอยด์ ถูกสังเคราะห์โดยมีคอเลสเตอรอล (cholesterol) เป็นสารตั้งต้น ได้แก่ estradiol (17α -estradiol และ 17β -estradiol) เป็นฮอร์โมนเพศหญิง ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะเพศหญิงและรักษาสสมดุลระบบสืบพันธุ์⁽¹⁾ และ testosterone ซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศชาย⁽²⁾ ปัจจุบันฮอร์โมนเพศสังเคราะห์มีบทบาทในการพัฒนาระบบเลี้ยงปลาแบบเพศเดี่ยวหรือแปลงเพศใดเพศหนึ่ง (mono sex) อย่างแพร่หลายเนื่องจากต้องการเพิ่มผลผลิตในการเพาะเลี้ยง นิยมทำโดยการผสมฮอร์โมนเพศในอาหารสำหรับลูกปลา เพื่อเหนี่ยวนำเพศปลาในระยะที่ยังไม่มีการพัฒนาเพศหรือระยะงูไข่แดงยุบให้ได้เพศปลาตามที่ต้องการ⁽³⁾ วิธีการนี้พบมากในการเพาะเลี้ยงปลานิลและปลาทอมซึ่งเป็นปลาเศรษฐกิจที่คนไทยนิยมเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายทั้งเพื่อการค้าและบริโภคเพราะเนื้ออร่อยรสชาติดีราคาถูก^(4,5) โดยทั่วไปปลานิลเพศผู้มีขนาดใหญ่และเจริญเติบโตไวกว่าเพศเมีย เนื่องจากปลานิลเพศเมียต้องใช้พลังงานส่วนใหญ่ในการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์มากกว่าใช้ในการเจริญเติบโต^(6,7) จึงมีการใช้ฮอร์โมน testosterone เหนี่ยวนำเพศปลานิลให้เป็นเพศผู้⁽³⁾ ส่วนปลาทอมเพศเมียโดยธรรมชาติมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้โดยเพศเมียมีขนาดประมาณ 17–20 เซนติเมตร น้ำหนัก 95–125 กรัม ในขณะที่เพศผู้มีขนาดเพียง 15–18 เซนติเมตร น้ำหนัก 60–95 กรัม⁽⁸⁾ มีการใช้ฮอร์โมน 17β -estradiol ซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศเมียเหนี่ยวนำเพศปลาทอมให้เป็นเพศเมีย⁽⁹⁾

การนำฮอร์โมนสังเคราะห์มาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนของฮอร์โมนในอาหารและสิ่งแวดล้อม เช่น แหล่งน้ำหรือดินสำหรับการทำเกษตรกรรม มีรายงานพบการสะสมของฮอร์โมนอยู่ในตะกอนจากกระชังเลี้ยงปลา โดยพบฮอร์โมนเพศหญิงชนิด estrone สะสมอยู่ในตะกอน 0–0.17

ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และสะสมในปลา 0.09–1.24 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม⁽¹⁰⁾ พบการตกค้างของฮอร์โมนชนิด estriol ในน้ำบริเวณลำคลองจังหวัดระยองและชลบุรี 0.001–0.063 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในน้ำทะเลบริเวณมาบตาพุด 0.001–0.004 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในหอยแมลงภู่ (Pernaviridis) 0.001–0.153 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม⁽¹¹⁾ และมีรายงานพบการตกค้าง testosterone ในผลิตภัณฑ์ปลาจากตลาดค้าปลีกเมืองกรุงโคโรประเทศอียิปต์ได้แก่เบอร์เกอร์ปลา ลูกชิ้นปลา และปลาแห้ง 0.1–1.32, 0.01–0.20 และ 0.13–1.28 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ⁽¹²⁾ โดยทั่วไปมนุษย์และสัตว์สามารถขับฮอร์โมนส่วนเกินออกจากร่างกายทางปัสสาวะและอุจจาระได้⁽¹³⁾ แต่หากมนุษย์ได้สัมผัสหรือบริโภคเนื้อสัตว์ที่ปนเปื้อนฮอร์โมนจากสิ่งแวดล้อมสะสมอาจมีผลกระทบต่อสุขภาพโดยเฉพะระบบสืบพันธุ์ เช่น เกิดภาวะแท้งบุตรในสตรีวัยเจริญพันธุ์ เนื่องจากสารเหล่านี้ส่งผลต่อการลดระดับการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ในร่างกาย และในเพศชายอาจพบภาวะการถดถอยของจำนวนหรือคุณภาพของอสุจิลดลง⁽¹⁴⁾ สารสเตียรอยด์ฮอร์โมนชนิด 17β -estradiol หากเข้าสู่ร่างกายจะเกิดกระบวนการ metabolism เป็น estrone และ estriol มีฤทธิ์เป็นสารก่อมะเร็งเต้านม⁽¹⁵⁾ การตกค้างของฮอร์โมน testosterone มีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งในต่อมไทรอยด์ ปากมดลูก มดลูก และต่อมลูกหมาก ทำให้เด็กหญิงและชายเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เร็ว⁽¹²⁾ โดย Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives ได้กำหนดค่า acceptable daily intake (ADI) ของสารสเตียรอยด์ฮอร์โมน 17β -estradiol ที่ 0–0.05 $\mu\text{g/kg bw/day}$ และ testosterone ที่ 0–2 $\mu\text{g/kg bw/day}$ เพื่อเป็นการเฝ้าระวังผลกระทบต่อสุขภาพมนุษย์⁽¹⁶⁾ ในขณะที่ยุโรป (European Union; EU) ได้ประกาศห้ามใช้ฮอร์โมนทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ 17β -estradiol, melengestrol acetate, progesterone, testosterone, trenbolone acetate และ zeranol ในการทำปศุสัตว์และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อปกป้องกลุ่มคนเปราะบางต่อการได้รับสารสเตียรอยด์ฮอร์โมน เช่น เด็กที่ยังไม่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์⁽¹⁷⁾

เทคนิคในการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มสเตียรอยด์ฮอร์โมนในเนื้อสัตว์มีหลากหลาย ส่วนใหญ่นิยมตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS/MS หรือ LC-MS/MS นอกจากนี้สามารถตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนได้ด้วยเทคนิค thin-layer chromatography (TLC) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพใช้ตรวจคัดกรองได้อย่างรวดเร็ว ราคาถูก และตรวจวิเคราะห์หลายตัวอย่างได้พร้อมกัน^(18,19) เทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) สามารถใช้ในการวิเคราะห์ในรูปแบบ semi-quantitative ที่มีขีดจำกัดการตรวจพบในระดับต่ำและมีความจำเพาะสูง แต่มีข้อจำกัดคือ 1 ชุดตรวจ สามารถระบุได้เพียง 1 ชนิดสารเท่านั้น ทำให้ค่าใช้จ่ายสูง ใช้เวลานาน สิ้นเปลืองสารเคมี และก่อให้เกิด waste จำนวนมาก^(20,21) ซึ่งหากตรวจพบต้องมีการยืนยันผลอีกครั้งด้วยเทคนิคขั้นสูง เทคนิค GC-MS/MS หรือ LC-MS/MS เป็นการตรวจวัดด้วยมวลต่อประจุ มีความจำเพาะความไวสูง สามารถตรวจยืนยันชนิด และวัดปริมาณสารที่ตรวจพบได้ถูกต้องแม่นยำ สามารถแยกสารที่สนใจออกจากสารที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงหรือสัญญาณรบกวนได้ ทำให้ตรวจวัดได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำเหมาะสำหรับการตรวจสารที่ไม่อนุญาตให้ใช้หรือไม่มีค่ากำหนด แต่ข้อจำกัดของเทคนิค GC-MS/MS คือ สารที่นำมาวิเคราะห์ต้องเป็นสารที่ระเหยได้ (volatile compounds) ซึ่งสารกลุ่มสเตียรอยด์ฮอร์โมนมีความสามารถในการระเหยต่ำ ดังนั้นการวิเคราะห์ต้องผ่านการเตรียมสารให้อยู่ในรูปที่ระเหยได้ง่าย โดยการทำอนุพันธ์ด้วยปฏิกิริยาเคมีหรือกระบวนการ derivatization ก่อนตรวจวัด ซึ่งสิ้นเปลืองทั้งเวลาและค่าใช้จ่าย^(22,23) เทคนิค LC-MS/MS ตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการสกัดแล้วสามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยตรง มีความสะดวก รวดเร็ว สามารถวิเคราะห์ฮอร์โมนหลายชนิดได้พร้อมกันในครั้งเดียว⁽²⁴⁾ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงได้นำเทคนิคนี้มาพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มฮอร์โมน 3 ชนิด ได้แก่ 17 α -estradiol, 17 β -estradiol และ testosterone ในเนื้อปลาเพื่อรองรับประกาศของ EU โดยใช้เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูง คือ UPLC-MS/MS ทำการปรับ

สภาวะเครื่องมือ และ mobile phase ให้เหมาะสมเพื่อให้สามารถวิเคราะห์แยกชนิดและปริมาณฮอร์โมน 17 α -estradiol และ 17 β -estradiol ออกจากกันได้ เนื่องจากประกาศของ EU ระบุห้ามใช้สารชนิด 17 β -estradiol อย่างชัดเจน รวมถึงพัฒนาให้สามารถวิเคราะห์ได้ในความเข้มข้นต่ำ ดำเนินการทดสอบความถูกต้องของวิธีตรวจวิเคราะห์ตาม EURACHEM Guide 2014⁽²⁵⁾ เพื่อยืนยันว่าวิธีมีความถูกต้องเหมาะสม วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้จึงสามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อประโยชน์ในการเฝ้าระวังความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค สำหรับปริมาณการปนเปื้อนของสารกลุ่มฮอร์โมนในอาหารและสิ่งแวดล้อม ได้ข้อมูลระดับการปนเปื้อนของฮอร์โมนและนำไปควบคุมการใช้สารกลุ่มฮอร์โมนอย่างถูกต้องให้กับภาคการเกษตรและอุตสาหกรรม รวมถึงใช้ข้อมูลปริมาณการตกค้างฮอร์โมนเพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดที่ตรวจพบในอาหารและสิ่งแวดล้อมเพื่อรองรับกฎหมายในประเทศไทย

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: acetonitrile (HPLC, Merck, Germany), hexane (HPLC, Burdick & Jackson, Korea), methanol (HPLC, Merck, Germany), formic acid (AR grade, ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 98, Fisher) และ DI water (Type I มีค่า resistivity > 18 m Ω .cm)

สารมาตรฐาน: 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, testosterone (ทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์ของ Dr. Ehrenstorfer GmbH, ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 95, Germany) และ internal standard zeranol-D5 (ผลิตภัณฑ์ของ Witega Laboratorien Berlin, ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 99, Germany)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียม stock standard แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารมาตรฐาน 10 มิลลิกรัม ละลายด้วย methanol 10 มิลลิลิตร มีอายุการใช้งาน 1 ปี เตรียม mixed intermediate standard

โดยเจือจาง stock standard 3 ชนิด ผสมด้วยกันให้ได้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน methanol มีอายุการใช้งาน 3 เดือน เตรียม mixed working standard ความเข้มข้น 1 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน methanol มีอายุการใช้งาน 1 เดือน

เตรียม stock internal standard ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่งสาร 10 มิลลิกรัม ละลายด้วย methanol ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร เตรียม intermediate internal standard โดยเจือจาง stock internal standard ให้ได้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน methanol และเตรียม working internal standard ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน methanol มีอายุการใช้งานตามใบรับรอง

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.001 กรัม (Sartorius, รุ่น LC 620S และ 0.01 มิลลิกรัม Sartorius, รุ่น MC 210S), เครื่องบดปั่น (Tefal, DPA130, France), refrigerated centrifuge (Hermle, Z366K, Hermle Labortechnik, Germany), shaker (Yamato, SA300, JICA, Japan), vortex mixer (Vortex Genie2, G 560 E, Scientific Industries, USA.), nitrogen evaporator (Organomation, N-EVAP 34 position, USA.), nitrogen gas (ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 99.9), micro pipette ขนาด 2-20, 20-200 และ 100-1,000 ไมโครลิตร (Eppendorf, Research plus, Germany), screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร, glass test tube ขนาด 10 มิลลิลิตร,

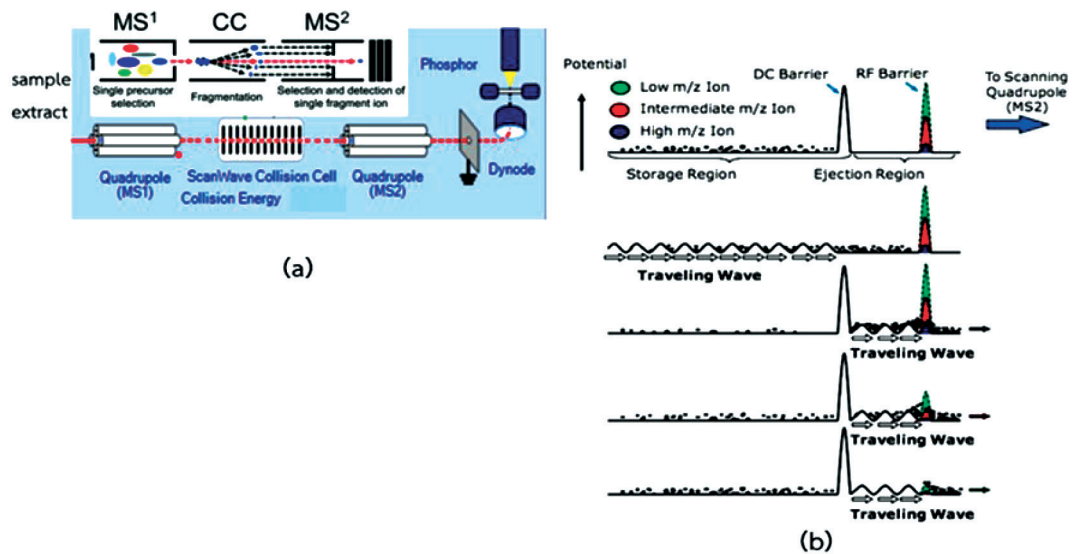
micro-spin filter tube 0.20 ไมโครเมตร ชนิด PVDF (Vertical, Vertical Chromatography, Thailand), cellulose nitrate ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร 0.2 ไมโครเมตร (Vertical, Vertical Chromatography, Thailand), HPLC vial สีชา ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และ solid phase extraction cartridges (SPE) Oasis HLB 6 cc (200 มิลลิกรัม) (Oasis, HLB, Waters, Ireland)

เครื่อง Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) รุ่น ACQUITY UPLC I-Class (Waters™, USA), Zorbax SB C-18 (150 mm × 3 mm, 5 µm, Agilent Technologies, USA) โดยมีสถานะอุณหภูมิของคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส injection volume 5 ไมโครลิตร deionized water เป็น mobile phase A และ methanol เป็น mobile phase B การแยกสารกลุ่มฮอร์โมนเป็นแบบ gradient ดังแสดงในตารางที่ 1

เครื่อง Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) ชนิด Triple Quadrupole Analyzers รุ่น Xevo TQ-XS, (Waters™, USA) ใช้เทคนิค electrospray ionization (ESI) multiple reaction monitoring (MRM) mode ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยมีสถานะ Polarity: negative & positive, Capillary voltage: 3.0 KV, Cone gas Flow: 150 L/hr, Desolvation temperature: 500 องศาเซลเซียส, Desolvation gas flow: 800 L/hr, Source temperature: 150 L/hr โดยมีพารามิเตอร์ mass spectrometer ดังแสดงในตารางที่ 2

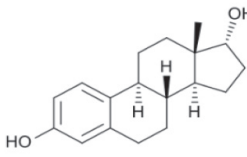
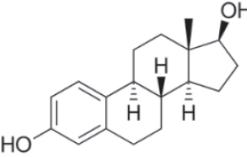
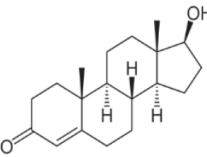
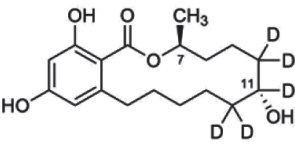
ตารางที่ 1 Gradient UPLC conditions สำหรับสารกลุ่มฮอร์โมน

Time (min)	Mobile phase A	Mobile phase B	Flow rate (ml/min)
0.0	50	50	0.30
8.0	35	65	0.30
11.0	25	75	0.30
12.0	0	100	0.30
14.0	10	90	0.30
16.0	10	90	0.30
18.0	50	50	0.30



ภาพที่ 1 แสดงการทำงานของ MRM mode (a) และการทำงานของ ScanWave collision cell (b) (ภาพจากเอกสารการบรรยายของบริษัท WatersTM, <https://doi.org/10.1039/C9AN02145K>)

ตารางที่ 2 The specific MS/MS parameters for hormones

No.	Compound Structure	Parention (m/z)	Productions (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	ESI polarity	Transition type
1		271.2	145.0	-2	-28	Negative	Quantification
		271.2	239.1	-2	-42		Qualification
2		271.2	145.0	-2	-42	Negative	Quantification
		271.2	183.0	-2	-40		Qualification
3		289.4	97.1	38	22	Positive	Quantification
		289.4	109.1	38	20		Qualification
4		326.2	264.2	-48	-24	Negative	

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ใช้เนื้อปลานิลเป็นตัวแทน (representative matrix) ในการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ โดยใช้ตัวอย่างปลานิล ประมาณ 1 กิโลกรัม จากตลาดสด แล่เฉพาะเนื้อส่วนที่กินได้ ตัดส่วนที่เป็นไขมันและหนังออก หั่นตัวอย่างเป็นชิ้นขนาดเล็ก บดด้วยเครื่องบดปั่นจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ทดสอบตามวิธีตัวอย่างที่ตรวจไม่พบการตกค้างของสารกลุ่มฮอร์โมน นำมาใช้เป็น matrix blank ในการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา

การเตรียมตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่าง 2 ± 0.005 กรัม ลงใน screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน internal standard ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัม และ DI water 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม methanol 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง shaker เป็นเวลา 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดชั้น methanol ทั้งหมดใส่ในหลอด centrifuge tubes สกัดซ้ำด้วย methanol 5 มิลลิลิตร จากนั้น นำสกัดได้ทั้ง 2 ครั้ง ผสมรวมกันเติม hexane อิมัลชันด้วย methanol 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน 1 นาที และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดชั้น hexane ทั้ง และดูดชั้น methanol 7.5 มิลลิลิตร ใส่ใน test tube ขนาด 10 มิลลิลิตร ระเหยด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส ให้เหลือประมาณ 500 ไมโครลิตร เติมน DI water 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน 1 นาที และทำการ clean-up สารที่สกัดได้ ด้วย SPE Oasis HLB 6 cc (200 มิลลิกรัม) ที่ถูก pre-washing ด้วย methanol 5 มิลลิลิตร และ DI water 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นใส่สารละลายที่สกัดได้ทั้งหมดลงใน cartridge ล้าง cartridge ด้วย acetonitrile:DI water อัตราส่วน 20:80 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ eluted ด้วย acetonitrile 10 มิลลิลิตร โดยทุกขั้นตอนต้องควบคุมให้มีอัตราการไหลสม่ำเสมอ และ cartridge ไม่แห้ง เก็บ eluent ใน glass test tube ขนาด 10 มิลลิลิตร นำไประเหยด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40-45

องศาเซลเซียส ให้แห้ง จากนั้นละลายสารที่สกัดได้ด้วย 0.1% formic acid:methanol อัตราส่วน 65:35 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองผ่าน PVDF filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร และนำไปตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง UPLC-MS/MS

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

ตัวอย่าง

ใช้เนื้อปลานิลเป็นตัวแทนในการทดสอบความถูกต้องของวิธี

การวิเคราะห์ method blank และ matrix blank

วิเคราะห์ method blank โดยสกัดตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาซึ่งใช้สารเคมีทั้งหมดแต่ไม่มีการเติมตัวอย่าง วิเคราะห์ matrix blank โดยสกัดตัวอย่าง เนื้อปลาที่ไม่มีการปนเปื้อนของสารกลุ่มฮอร์โมนและเติมน internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัม สกัดตามวิธีวิเคราะห์ข้างต้น จากนั้นฉีดสารสกัด method blank และ matrix blank เข้าเครื่อง UPLC-MS/MS เพื่อพิจารณาว่ามี m/z หรือ peak รบกวนที่มีค่า retention time ตรงกับตำแหน่งสารมาตรฐานกลุ่มฮอร์โมนหรือไม่

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและ matrix effect

เตรียมสารละลายมาตรฐาน 17α -estradiol, 17β -estradiol และ testosterone ความเข้มข้น 7 ระดับ ได้แก่ 0, 2, 5, 10, 50, 75 และ 100 นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตร เติมน internal standard ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายผสม 0.1% formic acid:methanol อัตราส่วน 65:35 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง concentration ratio (แกน x) กับ peak area ratio (แกน y) ของสารมาตรฐานต่อ internal standard คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient determination; R^2) เกณฑ์ยอมรับ ≥ 0.951 ⁽²⁶⁾ คำนวณหา residuals plot เมื่อ calibration curve เป็นเส้นตรง และทดสอบ matrix effect ในขั้นตอนต่อไป

ทดสอบ matrix effect โดยเตรียม standard on matrix⁽²⁷⁾ ให้มีระดับความเข้มข้นต่างๆ เหมือนกับสารละลายมาตรฐานที่ทำกราฟมาตรฐานและเติม internal standard ในทุกหลอด สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ standard on solution (แกน x) กับ standard on matrix (แกน y) ทดสอบความเป็นเส้นตรงและทดสอบช่วงความเชื่อมั่น (confidential interval; CI) ของความชัน (slope) โดยค่า CI ต้อง

คลุม 1 ซึ่งแสดงว่าไม่มี matrix effect ดังสมการที่ 1 หรือทำการทดสอบ matrix effect (%ME) ถ้า %ME น้อยกว่า $\pm 20\%$ แสดงว่าเมทริกซ์ไม่มีผลกระทบสามารถใช้ standard on solution ถ้า %ME มากกว่า $\pm 20\%$ แสดงว่าเมทริกซ์มีผลกระทบ ดังสมการที่ 2 ดังนั้นต้องเลือกใช้ standard calibration curve ที่เหมาะสมมาคำนวณปริมาณสารในตัวอย่าง

$$CI_{slope} = b \pm t_{(0.05, n-2)} S_b$$

เมื่อ b = slope

$t_{(0.05, n-2)}$ = t-distribution (two-tail) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, degree of freedom = $n-2$

S_b = standare deviation ของ slope

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

สมการที่ 1

$$\% ME = \left(\frac{\text{slope of matrix}}{\text{slope of solvent}} - 1 \right) \times 100$$

สมการที่ 2

กรณี %ME เป็นบวกมากกว่า 20% แสดงว่าเกิดการเสริมสัญญาณไอออน (ion enhancement) และหาก %ME เป็นลบน้อยกว่า -20% แสดงว่าเกิดการกดสัญญาณไอออน (ion suppression)⁽²⁸⁾

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity)

ทดสอบ matrix blank และ matrix spiked ในเนื้อปลาที่เติมสารมาตรฐาน 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, testosterone และ zeronol-d5 ความเข้มข้น 50 ng/g จำนวน 3 ซ้ำ นำเข้าเครื่อง UPLC-MS/MS ด้วยสภาวะที่เหมาะสม โดยพิจารณา matrix blank ต้องไม่พบสัญญาณพีคที่ตรงกับสารที่สนใจและ matrix spiked ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด สามารถแยกพีคออกจากกันได้

การสร้างกราฟมาตรฐาน (procedural mixed standard calibration curve)⁽²⁷⁾

ซึ่ง matrix blank จำนวน 7 หลอด เติมสารมาตรฐาน 17 α -estradiol, 17 β -estradiol และ

testosterone ที่ 7 ระดับความเข้มข้น 0, 2, 5, 10, 50, 75 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และเติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในทุกหลอด สกัดและทำให้บริสุทธิ์เหมือนการสกัดตัวอย่าง จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง concentration ratio (แกน x) กับ peak area ratio (แกน y) ของสารมาตรฐานต่อ internal standard ยืนยันความเป็นเส้นตรงด้วยการคำนวณค่า R^2 เกณฑ์ยอมรับ ≥ 0.951 ⁽²⁶⁾

การทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงการวิเคราะห์ (linearity and working range)

เติมสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ความเข้มข้น 0, 2, 5, 10, 50, 75 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank และเติม internal standard ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในทุกหลอด วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง concentration ratio (แกน x) กับ peak area ratio (แกน y) ของสารมาตรฐานต่อ internal standard

ยืนยันความเป็นเส้นตรงด้วยการคำนวณค่า R^2 เกณฑ์ยอมรับ $\geq 0.951^{(26)}$ และสร้าง residual plot

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection; LOD)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่ำ 1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank และเติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ 10 ซ้ำ ผลที่ได้ต้องให้สัญญาณค่า signal/noise > 3

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation; LOQ)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank เติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ 10 ซ้ำ และคำนวณปริมาณเปรียบเทียบกับ calibration curve จากนั้นคำนวณ %recovery, %RSD และ HORRAT โดยเกณฑ์ยอมรับค่าเฉลี่ย %recovery อยู่ในช่วง 70–120^(26,29) %RSD ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม $< 30\%^{(26,29)}$ และค่า HORRAT (Horwitz ratio) $\leq 2^{(30)}$ คำนวณ HORRAT จากสมการ

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

การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง (accuracy and precision)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 2, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เติม internal standard ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank วิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ จากนั้นคำนวณปริมาณเปรียบเทียบกับ calibration curve คำนวณค่าเฉลี่ย %recovery, %RSD และ HORRAT โดยเกณฑ์ยอมรับค่าเฉลี่ย %recovery อยู่ในช่วง 70–120^(26,29) %RSD ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม $< 30\%^{(26,29)}$ และค่า HORRAT (Horwitz ratio) $\leq 2^{(30)}$

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (uncertainty)

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด⁽³¹⁾ คำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนจากทุกแหล่ง ได้แก่ น้ำหนัก ปริมาตร กราฟมาตรฐาน ความเที่ยงและความแม่นยำ คำนวณค่าความไม่แน่นอนรวมทั้งหมด จากนั้นหาค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($k = 2$) เพื่อการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตามวิธีที่ได้ทดสอบ

ผล

ผลการวิเคราะห์ method blank และ matrix blank

พบว่า method blank และ matrix blank ของเนือปลา ไม่พบสัญญาณรบกวนที่มี m/z และ retention time (RT) ตรงกับสารมาตรฐานทุกชนิด ดังแสดงในภาพที่ 2 แสดงว่าสารเคมีทั้งหมดที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง และ matrix blank ของเนือปลาที่ผ่านการทดสอบตามวิธีแล้ว ไม่ปนเปื้อนของสารกลุ่มฮอร์โมน

ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง

matrix blank ไม่พบสัญญาณพีคที่ตรงกับสารที่สนใจและ matrix spiked ที่เติมสารมาตรฐาน

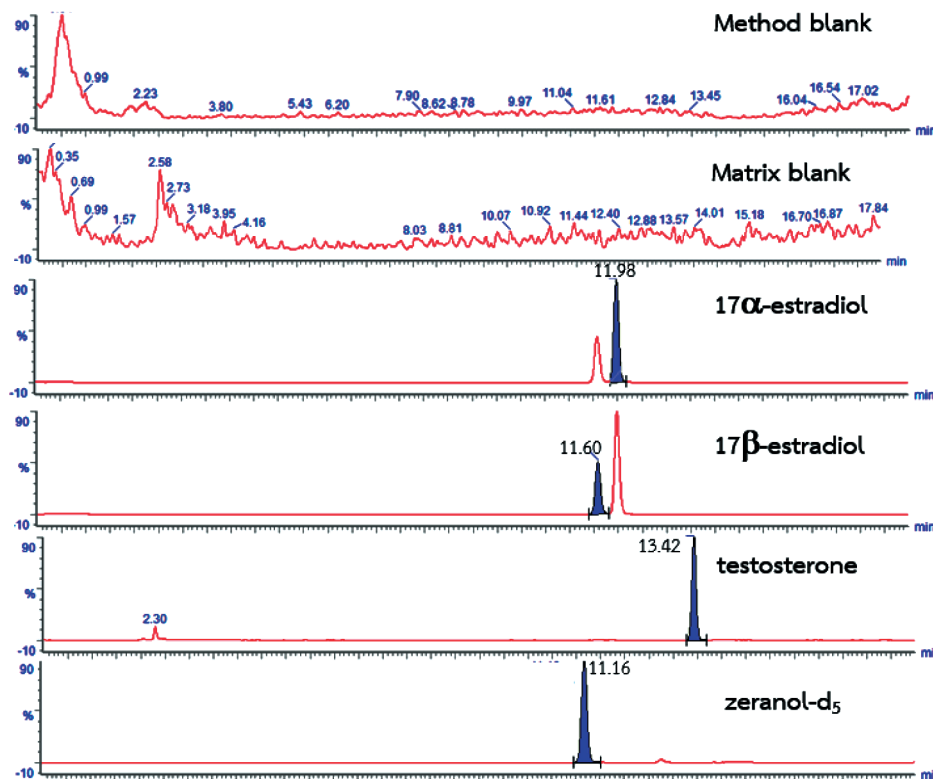
17 α -estradiol, 17 β -estradiol, testosterone และ zeranol-d5 ในเนือปลา พบว่าสามารถแยกพีคของสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ออกจากกันได้ โดยมีค่า retention time 11.98, 11.60, 13.42 และ 11.16 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2 แสดงว่าวิธีการทดสอบนี้มีความจำเพาะเจาะจง

ผลการทดสอบผลกระทบของเมทริกซ์

ผลการทดสอบ matrix effect พบว่าความเป็นเส้นตรงของสาร 17 α -estradiol, 17 β -estradiol และ testosterone ใน standard on solution กับ standard on matrix มีค่าความชันต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 3 และมีค่าช่วงความเชื่อมั่น (confidential interval; CI) ของความชัน 17 α -estradiol, 17 β -estradiol และ testosterone เท่ากับ 0.34–0.37,

0.11–0.12 และ 0.16–0.18 ตามลำดับ ซึ่งค่าความชันที่ได้ ไม่คลุม 1 แสดงว่าเมทริกซ์เนื้อปลามีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีผลต่อการวิเคราะห์แบบกดสัญญาณ (suppression) โดย %ME ของสารทั้ง 3 สาร มีค่า

น้อยกว่า -20% ดังแสดงในตารางที่ 3 ดังนั้นการสร้างกราฟมาตรฐาน สำหรับการทดสอบนี้เลือกทำแบบ procedural mixed standard calibration curve



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของ method blank, matrix blank และ matrix spiked สารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง concentration ratio กับ peak area ratio ของสารมาตรฐาน 17 α -estradiol, 17 β -estradiol และ testosterone ในช่วงความเข้มข้น 2–100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นเส้นตรง โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9999, 0.9991 และ 0.9996 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์ยอมรับที่ 0.951⁽²⁶⁾

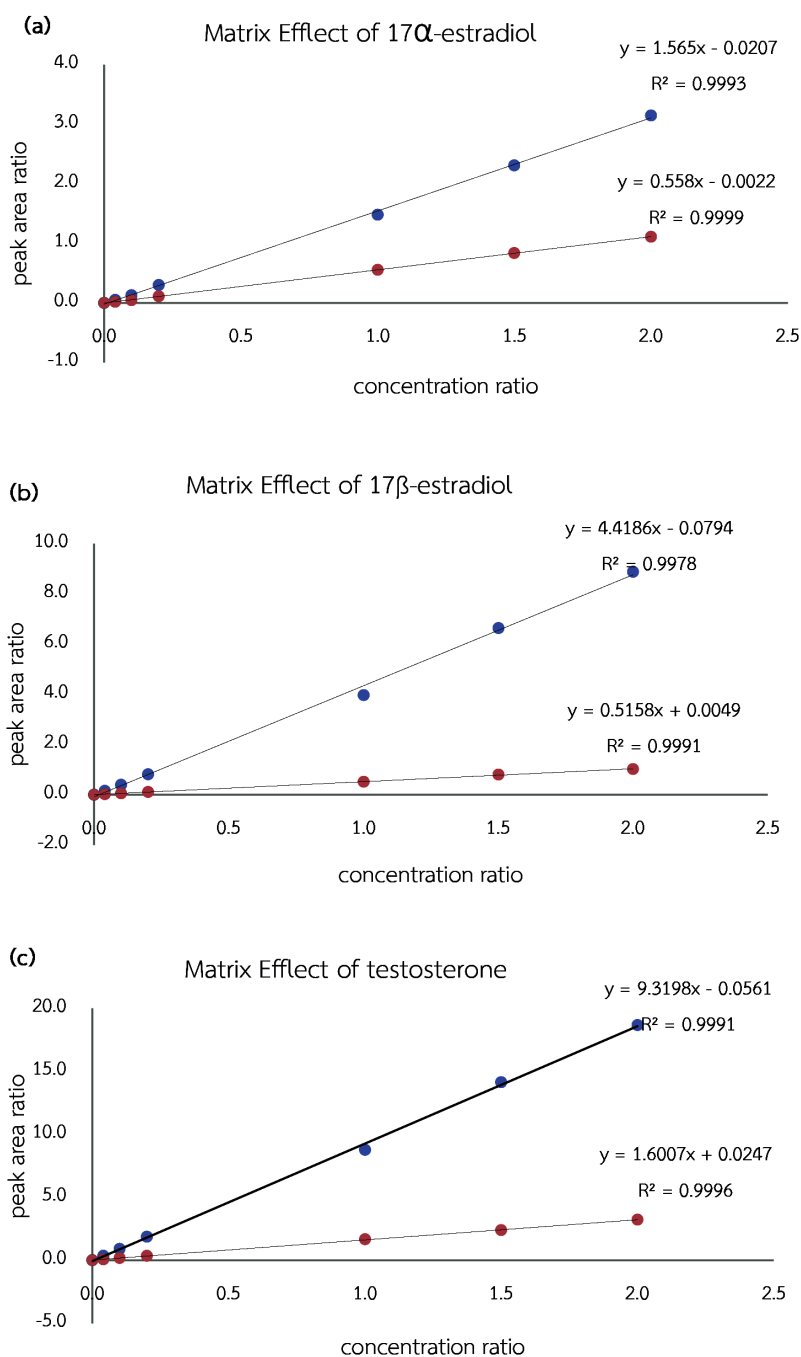
ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์

กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง concentration ratio กับ peak area ratio ของสารมาตรฐาน 17 α -estradiol, 17 β -estradiol และ testosterone ในช่วงความเข้มข้น 2–100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีความเป็นเส้นตรง โดยค่า R^2 เข้าใกล้ 1 เท่ากับ 0.9971, 0.9942 และ 0.9738 ตามลำดับ และ residual

plot เส้นกราฟมีความเป็นเส้นตรง โดยมีการกระจายของ y-residual plot รอบค่าศูนย์ ดังแสดงในภาพที่ 4

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และ ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

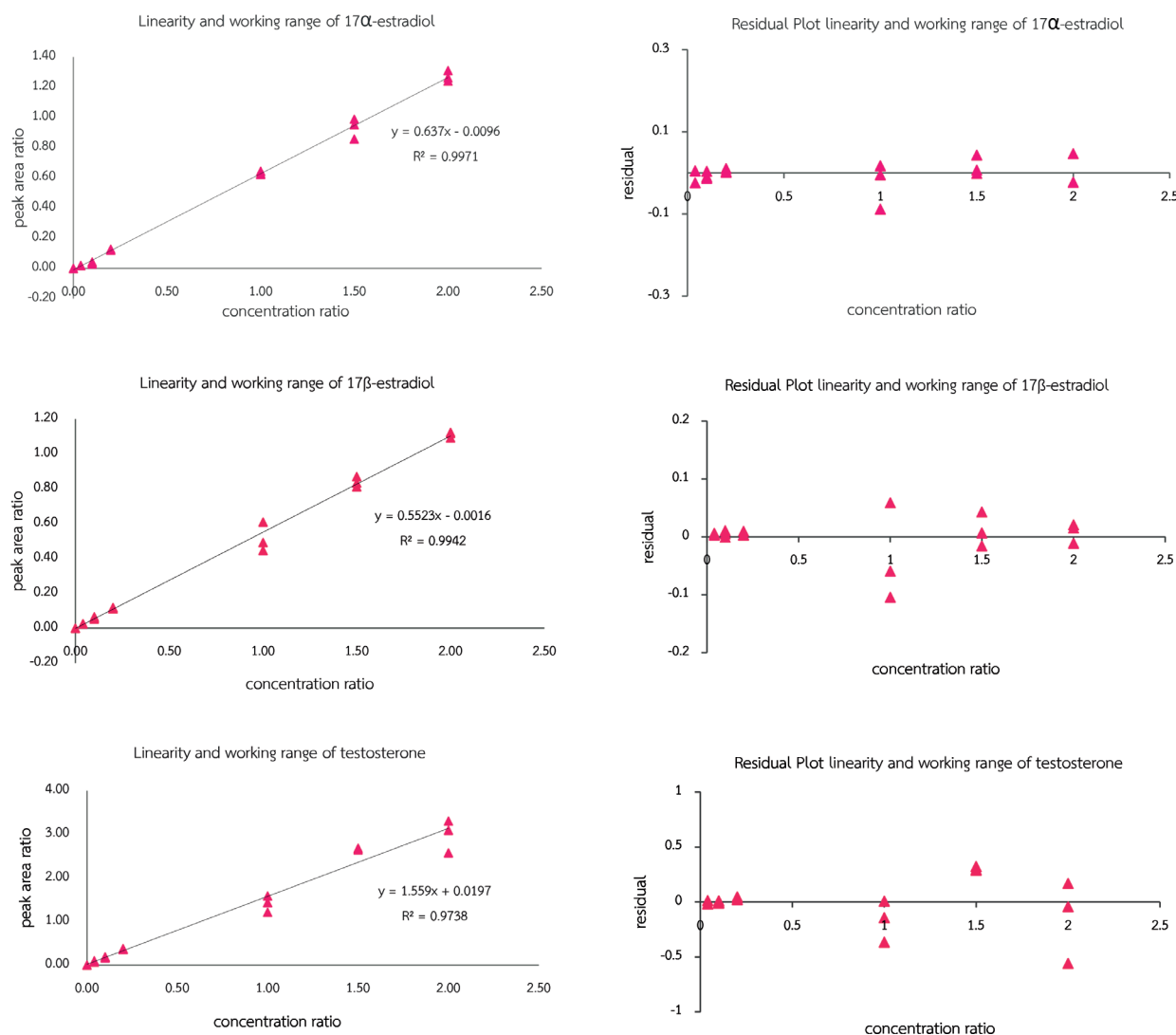
ผล LOD ของสารกลุ่มฮอร์โมนทั้ง 3 ชนิด พบว่า เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยให้สัญญาณ signal to noise ในช่วง 14.5–70.8 ซึ่งมากกว่าเกณฑ์กำหนด คือ 3 ส่วนค่า LOQ เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผลการพิสูจน์ค่า LOQ โดยการเติมสารมาตรฐานวิเคราะห์ 10 ซ้ำ พบว่ามีความแม่นยำที่ประเมินจากค่าเฉลี่ย %recovery ในช่วง 91.9–113.7% และความเที่ยงจาก %RSD และ HORRAT ในช่วง 5.5–26.5% และ 0.2–1.0 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4



ภาพที่ 3 ความเป็นเส้นตรงของสาร (a) 17 α -estradiol, (b) 17 β -estradiol และ (c) testosterone ใน standard on solution กับ standard on matrix

ตารางที่ 3 ค่า %ME ของสารทั้ง 3 ชนิด ใน standard on solution กับ standard on matrix

Compound	%ME	Evaluation
17 α -estradiol	-64.3	suppression
17 β -estradiol	-88.3	suppression
testosterone	-82.8	suppression



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างของ concentration ratio กับ peak area ratio ของสารมาตรฐาน 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, testosterone และการตกค้าง (residual plot)

ตารางที่ 4 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ของการวิเคราะห์ฮอร์โมนเพศ

	17 α -estradiol	17 β -estradiol	testosterone	เกณฑ์ยอมรับ
Limit of Detection (LOD) 1 μg/kg				
Range of S/N	15.6–32.1	46.1–70.8	14.5–23.0	S/N > 3
Average S/N	23.4	59.0	18.5	S/N > 3
Limit of Quantification (LOQ) 2 μg/kg				
Average conc. (μ g/kg)	2.3	2.1	1.8	–
Recovery (%)	113.7	104.7	91.9	70–120
Relative standard deviation (%RSD)	5.5	9.7	26.5	< 30
%RSD _{expected}	26.9	26.9	26.9	–
HORRAT	0.2	0.4	1.0	≤ 2

การทดสอบค่าความแม่นยำและความเที่ยง	107.6–113.6, 89.7–114.0 และ 91.9–107.0%
การทดสอบค่าความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีที่ระดับความเข้มข้น 2, 5 และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ชั่วโมง ให้ค่าความแม่นยำ (accuracy) แสดงโดย mean recovery ของสาร 17 α -estradiol, 17 β -estradiol และ testosterone อยู่ในช่วง	ตามลำดับ ซึ่ง %recovery ทุกระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วงการยอมรับ 70–120% และมีความเที่ยง (precision) แสดงโดย %RSD และ HORRAT ซึ่งอยู่ในช่วง 3.5–26.5% และ 0.2–1.0 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบค่าความแม่นยำและความเที่ยง (accuracy and precision)

Compound	Spiked level ($\mu\text{g/kg}$)	%Recovery (n = 10) (Min - Max)	Mean $\pm$ SD	%RSD	%RSD _{expected}	HORRAT
17 α -estradiol	2	102.4–119.7	113.6 $\pm$ 6.2	5.5	26.9	0.2
	50	87.6–118.7	107.6 $\pm$ 9.0	8.3	16.6	0.5
	100	98.8–118.6	110.7 $\pm$ 5.8	5.2	14.9	0.3
17 β -estradiol	2	85.7–118.6	104.7 $\pm$ 10.1	9.7	26.9	0.4
	50	77.7–105.4	89.7 $\pm$ 10.2	11.4	16.6	0.7
	100	106.4–119.0	114.0 $\pm$ 3.9	3.5	14.9	0.2
testosterone	2	60.2–118.7	91.9 $\pm$ 24.3	26.5	26.9	1.0
	50	71.5–119.1	107.0 $\pm$ 14.4	13.6	16.6	0.8
	100	83.7–116.6	101.4 $\pm$ 14.1	13.9	14.9	0.9

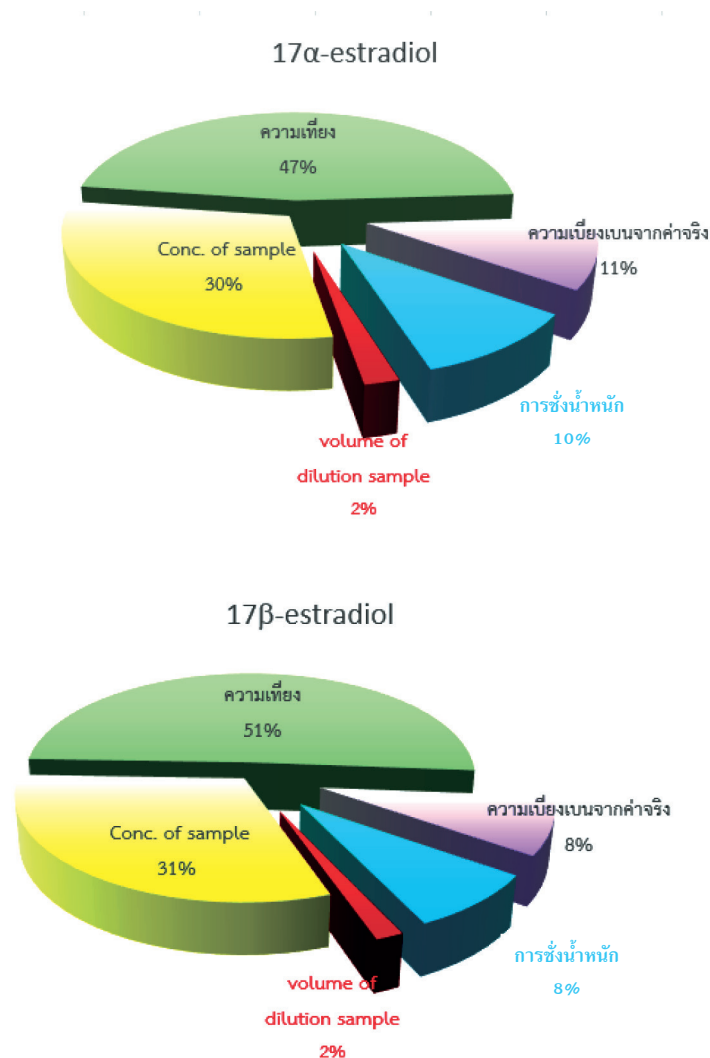
ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์

สาร 17 α -estradiol, 17 β -estradiol และ testosterone ในเนื้อปลาตามแนวของ ISO GUM Approach พบแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน ได้แก่ การชั่งน้ำหนัก volume of dilution sample ความเข้มข้นที่อ่านได้จาก calibration curve (concentration of sample) ความเที่ยงและความเบี่ยงเบนจากค่าจริง เมื่อคำนวณ relative standard uncertainty น้อยกว่า 20% และค่าความไม่แน่นอนขยายของสาร 17 α -estradiol, 17 β -estradiol และ testosterone เท่ากับ ± 8.5 , 10.2 และ 23.5 ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $k = 2$ ดังแสดงในตารางที่ 6 และภาพที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งความไม่แน่นอนที่ส่งผลต่อปริมาณสาร 17 α -estradiol จากมากไปหาน้อย ได้แก่ ความเที่ยง (47%) ความเข้มข้นที่อ่านได้จาก

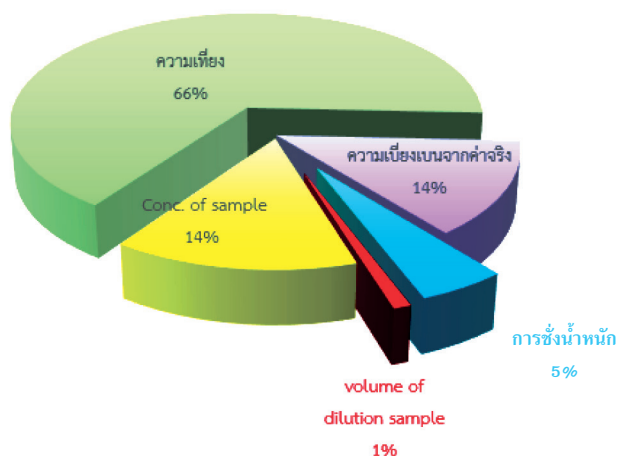
calibration curve สารมาตรฐาน (30%) ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (11%) การชั่งน้ำหนัก (10%) และ volume of dilution sample (2%) 17 β -estradiol ได้แก่ ความเที่ยง (51%) ความเข้มข้นที่อ่านได้จาก calibration curve สารมาตรฐาน (31%) ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (8%) การชั่งน้ำหนัก (8%) และ volume of dilution sample (2%) สำหรับ testosterone ได้แก่ ความเที่ยง (66%) ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (14%) ความเข้มข้นที่อ่านได้จาก calibration curve สารมาตรฐาน (14%) การชั่งน้ำหนัก (5%) และ volume of dilution sample (1%) ดังแสดงในภาพที่ 5 โดยเกณฑ์ความสมเหตุสมผลของค่าความไม่แน่นอนต้องมีค่าน้อยกว่า predicted Horwitz's $\text{RSDR} \times 2^{(30)}$ เมื่อพิจารณาพบว่าค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% มีค่าน้อยกว่าเกณฑ์ยอมรับ ($16.6 \times 2 = 33.2$)

ตารางที่ 6 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สาร 17 α -estradiol, 17 β -estradiol และ testosterone

Source of uncertainty	Unit	17 α -estradiol			17 β -estradiol			testosterone		
		X	u(x)	Percent	x	u(x)	Percent	X	u(x)	Percent
การชั่งน้ำหนัก	g	2	0.03	10.0	2	0.03	8.0	2	0.03	5.0
Volume of dilution sample	mL	2	0.01	2.0	2	0.01	2.0	2	0.01	1.0
Concentration of sample	$\mu\text{g/kg}$	53.31	2.21	30.0	48.26	2.60	30.0	59.39	2.44	14.0
ความเที่ยง	%	100	6.46	47.0	100	8.85	47.0	100	18.89	66.0
ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง	%	100	1.48	11.0	100	1.48	8.0	100	3.84	14.0
- Combined relative standard uncertainty of sample conc.	$\mu\text{g/kg}$	53.31	4.2	100	48.26	5.1	100	59.39	11.7	100
- Expanded Uncertainty at C.I. 95% (k = 2)			8.5			10.2			23.5	



ภาพที่ 5 สัดส่วนองค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สาร 17 α -estradiol, 17 β -estradiol และ testosterone ในเนื้อปลา



ภาพที่ 5 สัดส่วนองค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สาร 17α -estradiol, 17β -estradiol และ testosterone ในเนื้อปลา (ต่อ)

วิจารณ์

สารกลุ่มฮอร์โมนเพศหรือสเตียรอยด์ฮอร์โมน มีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติกประกอบด้วย คาร์บอน 18–21 อะตอม ไฮโดรเจนและออกซิเจน 2 อะตอม มีคุณสมบัติเป็นสารไม่มีขั้ว (hydrophobic) ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์โดยเฉพาะไขมันและแอลกอฮอล์ จากการศึกษาทางวิจัยตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดสารกลุ่มฮอร์โมนเพศ ได้แก่ methanol^(24,32,33) และ ethyl acetate⁽³⁴⁾ โดยเฉพาะ methanol มีคุณสมบัติช่วยตกตะกอนโปรตีนส่งผลให้ %recovery เพิ่มขึ้นเนื่องจากสามารถกำจัดสิ่งรบกวนจากตัวอย่างได้ วิธีที่พัฒนานี้วิเคราะห์สารกลุ่มฮอร์โมนได้ 3 ชนิด ได้แก่ 17α -estradiol, 17β -estradiol และ testosterone ในการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีนอกจากมีการทดสอบ specificity, accuracy, precision, linearity และ working range ยังทดสอบ matrix effect พบว่าเนื้อปลามีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการวิเคราะห์ในลักษณะของการกดสัญญาณ ผลการวิเคราะห์ค่าปริมาณที่ตรวจวัดได้ต่ำกว่าค่าจริง จึงต้องคำนวณผลด้วย procedural mixed standard calibration curve โดยการเติมสารมาตรฐานใน matrix ชนิดเนื้อเยื่อเหมือนกันแทนการทำ calibration curve on solution และใช้ internal standard ในการควบคุมและลดความผิดพลาดในกระบวนการทดสอบ การสร้างกราฟ

มาตรฐานจะเป็นการเปรียบเทียบเป็นสัดส่วน (ratio) โดย plot ระหว่าง concentration ratio กับ response ratio ของ standard กับ internal standard ซึ่งการคำนวณเปรียบเทียบเป็นสัดส่วนช่วยชดเชยค่าการกลับคืนได้ทำให้ precision และ accuracy ที่ดี⁽²⁴⁾ ในการเลือกสารที่ใช้เป็น internal standard ส่วนใหญ่เป็นสาร isotope ของสารนั้นเพราะมีคุณสมบัติคล้ายกัน ไม่รบกวนการทดสอบ แต่สาร isotope มีราคาสูงและสารบางชนิดมีขั้นตอนการสั่งซื้อยากทำให้ไม่สามารถหา internal standard ได้ตามที่ระบุ ในการทดสอบนี้เลือกใช้ zexanol-d5 เป็น internal standard เพียงชนิดเดียวในการคำนวณปริมาณที่ตรวจพบกับสารกลุ่มฮอร์โมนทุกสาร ส่งผลทำให้ค่าความไม่แน่นอนของ method precision มีค่าสูงมากกว่า 60% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความไม่แน่นอนที่มาจากแหล่งอื่น เมื่อพิจารณาความสมเหตุสมผลของค่าความไม่แน่นอนจาก predicted Horwitz's $RSDR \times 2$ ⁽³⁰⁾ พบว่าค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% มีค่าน้อยกว่าเกณฑ์ยอมรับ วิธีนี้จึงมีความเหมาะสม

ตามประกาศของ EU มีการระบุห้ามใช้ฮอร์โมน 6 ชนิด ได้แก่ 17β -estradiol, melengestrol acetate, progesterone, testosterone, trenbolone acetate และ zexanol โดยระบุชนิดสาร 17β -estradiol อย่างชัดเจน ดังนั้นในการวิเคราะห์ควรเป็นวิธีที่ตรวจวิเคราะห์

การตกค้างในปริมาณต่ำและสามารถแยก 17 β -estradiol และ 17 α -estradiol อย่างชัดเจน เนื่องจากสาร 17 β -estradiol และ 17 α -estradiol ทั้ง 2 ชนิด เป็น isomer กัน มีสูตรโมเลกุล และค่า m/z เท่ากัน ทั้ง parent ion และ product ion ทำให้สารทั้งสอง แยกจากกันได้ยาก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงตรวจวัด ชนิดและปริมาณสารกลุ่มฮอร์โมนด้วยเครื่อง UPLC-MS/MS Xevo TQ-XS ส่วน LC เป็นชนิด ultra performance liquid chromatography มีคุณสมบัติ ทนความดันได้มากถึง 15,000 psi สามารถใช้ injection volume และ mobile phase ปริมาณน้อย และเปลี่ยน mobile phase เป็น DI water:methanol นอกจากนี้ detector เป็น MS/MS รุ่น Xevo TQ-XS ส่วน collision cell ถูกออกแบบการทำงานเป็น ScanWave Daughter mode โดยมี DC barrier และ RF barrier เป็นตัวกัก parent ion และ daughter ion ก่อน แล้วปล่อยสู่ MS2 พร้อมกัน ดังแสดงในภาพที่ 1 ทำให้ sensitivity เพิ่มขึ้นจึงทำให้สัญญาณที่ได้มี intensity สูง แยกสาร 17 α -estradiol และ 17 β -estradiol ได้ อย่างชัดเจน รวมถึงสามารถตรวจวัดได้ระดับต่ำที่ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม นอกจากนี้ได้ดำเนินการควบคุม คุณภาพภายใน (internal quality control) เพื่อความ มั่นใจผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องในผลการวิเคราะห์ ตัวอย่างทุก batch โดยกำหนดไว้ไม่เกิน 10 ตัวอย่าง ทำการทดสอบ method blank, matrix blank, duplicate analysis และ spiked sample การศึกษา นี้สามารถขยายผลโดยนำวิธีไปใช้เพื่อสำรวจการตกค้าง ของฮอร์โมนเพศในเนื้อปลาที่วางจำหน่ายในท้องตลาด เป็นการเฝ้าระวังความปลอดภัยในการบริโภคเนื้อปลา ในประเทศไทย

สรุป

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการตรวจ สารกลุ่มฮอร์โมนเพศทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ 17 α -estradiol, 17 β -estradiol และ testosterone ในเนื้อปลา โดย เทคนิค UPLC-MS/MS มีค่า LOD และ LOQ เป็น 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ช่วง การวิเคราะห์อยู่ระหว่าง 2-100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพดี มีค่าความถูกต้อง แม่นยำ มีความไว และความจำเพาะต่อสารที่ต้องการทดสอบ เหมาะกับการใช้งานตามวัตถุประสงค์ และให้บริการ ในการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นการ ควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมายและสำรวจติดตาม ปริมาณการตกค้างของสารกลุ่มฮอร์โมนเพศ สร้างความ มั่นใจในความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค ป้องกันการกีดกัน ทางการค้า และการผลิตที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมสำหรับ เกษตรกรต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบดำเนินงานจาก สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ผ่านทางอาจารย์ หัวหน้าชุดโครงการของมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา ขอขอบคุณนางเลขา ปราสาททอง ผู้อำนวยการสำนัก คุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ให้การสนับสนุน โครงการศึกษานี้ และนางลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ สำหรับการเป็นที่ปรึกษาด้านวิชาการ จนการศึกษาสำเร็จ ลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Ferretti G, Ferranti C, Crovella T, Fiori M, Civitareale C, Marchiafava C, et al. Simultaneous analysis of 17 α -estradiol and 17 β -estradiol in bovine serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B 2008; 871(1): 135-40.
2. มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์. ฮอร์โมน. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 2 ส.ค. 2564]; [20 หน้า]. เข้าถึงได้: URL: <https://www.shorturl.asia/6cYUK>.
3. เจนนุช ว่องธวัชชัย, พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์, นีร วิสารักษ์วงศ์. ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนตกค้างใน ปลานิลหลังจากการกินฮอร์โมนในระยะสั้น. [ออนไลน์]. 2556; [สืบค้น 2 ส.ค. 2564]; [83 หน้า]. เข้าถึง ได้ที่: URL: <http://cuir.car.chula.ac.th/handle/123456789/56651>.
4. สุชาติ จุลอดุง, กฤษณพันธ์ โกเมนไพรินทร์. ศึกษา การใช้ฮอร์โมน 17 β -estradiol ในการแปลงเพศ ปลาหมอให้เป็นเพศเมีย. เอกสารวิชาการฉบับที่

- 7/2550. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์; 2550.
5. วีรพล เรืองศรี. ผลของฮอร์โมนเอสโตรเจน 2 ชนิดต่อการผลิตลูกปลาหมอแปลงเพศ. ว การประมงอิเล็กทรอนิกส์ 2563; 3(3): 37-55.
6. สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีประมง กรมประมง. การเพาะเลี้ยงปลานิล. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด; 2553.
7. ธงชัย เย็นเป้ง, ธราพันธ์ วัฒนะมหาตม์, วรวิทย์ พรหมปากดี, สมศรี งามวงศ์ชน. การศึกษาระดับของฮอร์โมน (17 alpha methyltestosterone) ที่ตกค้างในการผลิตลูกปลานิลแปลงเพศ ระบบน้ำหมุนเวียน. กรุงเทพฯ: ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง; 2554.
8. จอมสุตา ดวงวงษา. การแปลงเพศปลาหมอไทยด้วยเอสโตรเจนชนิดธรรมชาติ (Premarin) ให้ได้เพศเมียล้วน. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้; 2555.
9. พรศักดิ์ มัทวงศ์, ศิริภาวี เจริญวัฒนศักดิ์, บัณฑิต ยวงสร้อย, สุธี วงศ์มณีประทีป. ผลของ 17 β -estradiol ต่อการเปลี่ยนแปลงเพศปลาหมอไทยในระยะไซโคโดยวิธการแช่. ว แก่นเกษตร 2556; 41(พิเศษ 1): 110-5.
10. เสาวนีย์ ตีมูล, จรูญ สารินทร์, กนกทิพย์ จักขุ, Guang-Guo Ying, ชาญยุทธ กฤตสุนันท์กุล, สริน ศรีปรังค์. สารบบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในน้ำ ตะกอนและปลา ในแม่น้ำน่าน จังหวัดพิษณุโลก. ว วิชาการสาธารณสุข 2562; 28(1): 69-80.
11. Ocharoen Y, Boonphakdee C, Boonphakdee T, Shinn AP, Moonmangmee S. High levels of the endocrine disruptors bisphenol-A and 17 β -estradiol detected in populations of green mussel, *Perna viridis*, culture in the Gulf of Thailand. *Aquac* 2018; 497: 348-56.
12. Samy Abu-Taleb SM, Osman TA, Faisal RA. Detection of Testosterone hormone and 17 α -Methyltestosterone residues in some fish products at retailed markets. *Egypt J Chem Environ Health* 2016; 2(2): 292-7.
13. Ying GG, Kookana SR, Ru YJ. Occurrence and fate of hormone steroids in environment. *Environ Int* 2002; 28(6): 545-51.
14. Rubin BS. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011(1-2); 127: 27-34.
15. ปรีศนา เพียรจริง. การใช้สเตียรอยด์ฮอร์โมนในการเกษตร การตกค้างในอาหาร และสิ่งแวดล้อม. ว สหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา 2564; 6(1): 90-110.
16. World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization (FAO). Maximum residues limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in food CX/MRL 2-2021. Rome, Italy: Codex Alimentarius International Food Standard; 2021.
17. The European Parliament and The Council of The European Union. Directive 2003/74/EC of european parliament and of the council of 22 september 2003: amending council directive 96/22/EC concerning the prohibition on the use in stock farming of certain substance having a homonal or thyostatic action and beta agonist. *Official Journal of the European Union* 2003; L262: 17-21.
18. Li ZM, Kannan K. Determination of 19 steroid hormones in human serum and urine using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Toxics* 2022; 10: 1-15.
19. Adlercreutz H, Kiuru P, Rasku S, Wahala K, Fotsis T. An isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the simultaneous assay of estrogens and phytoestrogens in urine. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 92: 399-411.
20. Bhawani S, Sulaiman O, Hashim R, Mohamad Ibrahim MN. Thin-layer chromatographic analysis of steroids: a review. *Trop J Pharm Res* 2010; 9(3): 301-13.
21. Musharraf SG, Gulzar U. Effective separation and simultaneous analysis of anabolic androgenic steroids (AAS) in their phar-

- maceutical formulations by a validated TLC-densitometry method. *Chem Cent J* 2012; 6: 54. (7 pages).
22. Elder PA, Lewis JG. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma testosterone. *J Steroid Biochem* 1985; 22(5): 635-8.
23. Hanquez C, Urios P, Desfosses B, Samake H, Lince E, Rajkowski KM, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for steroid hormones with polyclonal and monoclonal antibodies: an assay for urinary aldosterone. *Clin Chim Acta* 1987; 164(1): 71-82.
24. เฉลิมพร ควรหา, ทองสุข ปายะนันท์, ลัดดา แก้วกล้า ปัญญาเจริญ. การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างกลุ่มฮอร์โมนในเนื้อสัตว์ โดย LC-MS/MS. *ว กรมวิทย์ พ* 2561; 60(2): 54-68.
25. Magnusson B, Ömemark U, editors. *Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods a laboratory guide to method validation and related topics*. 2nd ed. United Kingdom: Eurachem; 2014.
26. สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์. คู่มือการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ตามแนวมติคณะกรรมการยุโรป 2002/657/EC สำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสารตกค้างยา สัตว์วิสัยยืนยผลและวิธีคัดกรอง. ปทุมธานี: สำนักตรวจ สอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์; 2555.
27. Pihlström T, Fernández-Alba AR, Amate CF, Poulsen ME, Hardebusch B, Anastassiades M, et al. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed SANTE 11312/2021. *Sante* 2021; 11312: v2. (55 pages).
28. Ferrer C, Lozano A, Agüera A, Girón AJ, Fernández-Alba AR. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *J Chromatogr A* 2011; 1218(42): 7634-9.
29. World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization (FAO). *Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals*; CAC/GL 71-2009. Adopted 2009, Revision 2012, 2014. Rome, Italy: Codex Alimentarius International Food Standard; 2014.
30. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวง สาธารณสุข; 2549.
31. Ellison SLR, Williams A, editors. *Eurachem/CITAC guide CG 4: Quantifying uncertainty in analytical measurement*. 3rd ed. United Kingdom: Eurachem; 2012.
32. Shao B, Zhao R, Meng J, Xue Y, Wu G, Hu J, et al. Simultaneous determination of residual hormonal chemicals in meat, kidney, liver tissues and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2005; 548: 41-50.
33. Blasco C, Van Poucke C, Van Peteghem C. Analysis of meat samples for anabolic steroids residues by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2007; 1154(1-2): 230-9.
34. Matraszek-Zuchowska I, Kłopot A, Witek S, Pekala-Safinska A, Posyniak A. Development of analytical procedure for the determination of 17 β -testosterone, 11-ketotestosterone and 17 β -estradiol in the sea trout (*Salmo trutta L.*) gonads. *Separations* 2022; 9(10): 293. (15 pages).

Method Development and Validation for 17 α -Estradiol, 17 β -Estradiol and Testosterone Hormones Determination by UPLC-MS/MS

Suwimol Muadmah, Wannaporn Payao, Atcharee Inkaew, Withawat Wangkaewhiran,
Kanyarat Chuakunchat, Sakulrat Somsuntisuk, and Thongsuk Payanan

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

ABSTRACT 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, and testosterone are sex hormones mainly regulating the development of reproductive system and the expression of male and female characteristics. Presently, the synthetic hormones have been used for aquaculture, especially the monosex farming of tilapia and climbing perch. Testosterone has been employed to induce tilapia to become male fish, while 17 β -estradiol has been used with climbing perch to obtain the female fish. However, the use of hormones in feed can contribute to the residues in meat and environment, which may have adverse effects on consumer health. The EU has regulation to ban the use of these hormones in livestock farming and aquaculture. Therefore, this study aimed to develop and validate the method for analyzing sex hormones, including 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, and testosterone in fish meat using UPLC-MS/MS, and the analysis results were derived from procedural mixed standard calibration curve. The results showed that the method had LOD and LOQ at 1 and 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively, and the working range were between 2–100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ with coefficient of determination (R^2) more than 0.999. The accuracy showed by %recoveries were between 89.7–114.0%, and the precision illustrated by %RSD were during 3.5–26.5%. So, this analysis method was specific, accurate, reliable, and proper for using in the laboratory.

Keywords: 17 α -Estradiol, 17 β -Estradiol, Testosterone, Hormones, UPLC-MS/MS

การพัฒนาวิธีและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ N-nitrosodimethylamine ในผลิตภัณฑ์ยาเม็ด Metformin

ศศิดา อยู่สุข และ ปิยะมาศ กิจชนะพานิชย์

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ nitrosamines ถูกตรวจพบปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ยาหลายชนิด ได้แก่ angiotensin II receptor blocker (ARB) ranitidine และ metformin มีเพียง N-nitrosodimethylamine (NDMA) ชนิดเดียวเท่านั้นที่เป็นสารปนเปื้อน nitrosamines ที่พบในยา metformin สาเหตุของการเกิดการปนเปื้อน nitrosamines ในผลิตภัณฑ์ยาอาจมาจากวัตถุดิบ สารช่วยในตำรับ น้ำ ตัวทำละลาย กระบวนการผลิต และวัสดุบรรจุภัณฑ์ เนื่องจาก nitrosamines เป็นสารที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมปริมาณ nitrosamines ให้ไม่เกินค่า acceptance daily intake (ADI) สำหรับ ADI ของ NDMA เท่ากับ 96 นาโนกรัมต่อวัน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วย gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ที่มีความไวในการตรวจวัดปริมาณสาร NDMA ซึ่งมีปริมาณน้อยมากในผลิตภัณฑ์ยาเม็ด metformin โดยพัฒนาจากวิธีที่หน่วยงานกำกับดูแลด้านยาของต่างประเทศเผยแพร่ การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เป็นไปตาม International Council for Harmonisation (ICH) guideline พบว่าพีคของ NDMA และ NDMA-d₆ ไม่ถูกรบกวนจาก N-nitrosodiethylamine (NDEA) metformin สารช่วยในตำรับ และตัวทำละลาย ชีตจำกัดของการตรวจพบเป็น 0.8 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมของผลิตภัณฑ์ยาเม็ด metformin ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์ของ NDMA ที่ยอมให้มีได้ในผลิตภัณฑ์ยาเม็ด metformin วิธีนี้มีความเป็นเส้นตรง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) มากกว่า 0.999 ความแม่นยำแสดงด้วยค่า %recovery อยู่ในช่วง 87.4–103.4% ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของ repeatability และ intermediate precision น้อยกว่า 8% และ 11% ตามลำดับ ดังนั้นวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นนี้เหมาะสมสำหรับใช้ควบคุมปริมาณ NDMA ในผลิตภัณฑ์ยาเม็ด metformin

คำสำคัญ: การปนเปื้อนไนโตรซามีน, N-nitrosodimethylamine, Metformin, NDMA, GC-MS

Corresponding author E-mail: sasida.y@dmsc.mail.go.th

Received: 21 September 2023

Revised: 6 March 2024

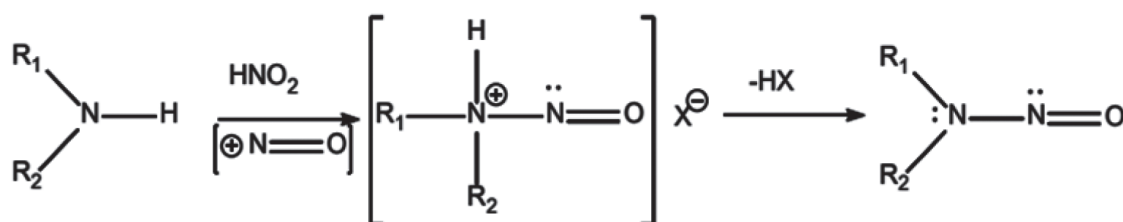
Accepted: 25 April 2024

บทนำ

สถานการณ์การปนเปื้อน nitrosamine ในผลิตภัณฑ์ยาเริ่มเมื่อปี ค.ศ. 2018 มีรายงานพบการปนเปื้อน N-nitrosodimethylamine (NDMA) ในวัตถุดิบตัวยาสสำคัญของยา valsartan ของบริษัท Zhejiang Huahai Pharmaceuticals สาธารณรัฐประชาชนจีน โดย valsartan เป็นยาในกลุ่ม angiotensin receptor blockers (ARB) ใช้รักษาโรคความดันโลหิตสูง ต่อมาในเดือนกันยายน ค.ศ. 2019 มีการรายงานพบการปนเปื้อนของ NDMA ในยา ranitidine ที่ใช้เป็นยารักษาโรคแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้น ในเดือนธันวาคม ค.ศ. 2019 มีรายงานการพบ NDMA ในผลิตภัณฑ์ยา metformin ที่ใช้รักษาเบาหวาน ทำให้หน่วยงานกำกับดูแลในประเทศต่างๆ อาทิ องค์การอาหารและยาสหรัฐ (U.S. Food and Drug Administration; USFDA) หน่วยงานกำกับดูแลด้านยาของสหภาพยุโรป (European Medicines

Agency; EMA) มีการดำเนินการเพื่อควบคุมปริมาณ nitrosamine ที่พบปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ยา เรียกเก็บคืนยาจากท้องตลาด กำหนดแนวทางให้กับผู้ผลิตวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ยาสำเร็จรูปประเมินความเสี่ยงของการปนเปื้อนของสารกลุ่ม nitrosamine ตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยันปริมาณที่ตรวจพบและกำหนดแนวทางการป้องกันหรือลดการปนเปื้อน nitrosamines⁽¹⁻³⁾ โดยการปนเปื้อน nitrosamines อาจมีสาเหตุจากวัตถุดิบตัวยาสสำคัญ สารช่วยในตำรับ (excipient) น้ำและตัวทำละลายที่ใช้ กระบวนการผลิต และวัสดุบรรจุ^(4,5)

nitrosamines มีโครงสร้างทางเคมีเป็น nitroso group จับกับ amine ดังนั้นปัจจัยที่ทำให้เกิด nitrosamine ต้องมี amines ได้แก่ secondary, tertiary หรือ quaternary amines และ nitrite salts ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ซึ่งในสภาวะดังกล่าวทำให้ nitrite salts เปลี่ยนเป็น nitrous acid และทำปฏิกิริยากับ amines ได้เป็น nitrosamines ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาแสดงการเกิด nitrosamines⁽¹⁾

จากปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้เกิด nitrosamine impurities 7 ชนิด ได้แก่ NDMA, N-nitrosodiethylamine (NDEA), N-nitroso-N-methyl-4-amino-butyric acid (NMBA), N-nitrosoisopropylethylamine (NIPEA), N-nitrosodiisopropylamine (NDIPA), N-nitrosodibutylamine (NDBA) และ N-nitrosomethylphenylamine (NMPA)^(1,5) แต่ชนิดที่พบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ยา metformin และ ranitidine คือ NDMA เท่านั้น ขณะที่ยาในกลุ่ม ARB พบการปนเปื้อนของ NDMA, NDEA และ NMBA⁽¹⁾ โดย nitrosamines เป็นพิษต่อพันธุกรรม (genotoxic agent) ในสัตว์หลายชนิด International

Agency for Research on Cancer (IARC) จัดให้ nitrosamines อยู่ในกลุ่มของสารที่อาจก่อมะเร็ง (carcinogen) ในมนุษย์ ซึ่งต้องควบคุมให้มีปริมาณต่ำกว่าระดับที่อาจเกิดความเสี่ยงก่อมะเร็งหากได้รับเข้าไป^(2,6) ดังนั้นจึงกำหนดค่า acceptance daily intake (ADI) ของสาร nitrosamine โดยใช้หลักการของ Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogen Risk ICH M7(R1) คือ ปริมาณที่ทำให้เกิดความเสี่ยงก่อมะเร็งในมนุษย์ประมาณ 1: 100,000 คน เมื่อได้รับสารต่อเนื่องทุกวัน เป็นระยะเวลา 70 ปี ซึ่งค่า ADI ของ NDMA เป็น

96 นาโนกรัมต่อวัน^(1,2) คนทั่วไปหากได้รับ NDMA ในปริมาณที่เท่ากับหรือต่ำกว่า 96 นาโนกรัม ทุกวันเป็นเวลา 70 ปี คาดว่ายังไม่มีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง⁽⁷⁾

ในประเทศไทยยา metformin เป็นยารักษาโรคเบาหวานอันดับแรกที่สูงจ่ายให้ผู้ป่วยและบรรจุอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2565⁽⁸⁾ จากข้อมูลการขึ้นทะเบียนตำรับยากับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาพบว่ามีการขึ้นทะเบียนตำรับยา metformin จำนวน 100 ตำรับ แบ่งเป็นยาผลิตในประเทศจำนวน 75 ตำรับ และนำเข้าจำนวน 25 ตำรับ⁽⁹⁾ เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคจึงจำเป็นต้องมีการสำรวจการปนเปื้อนของ NDMA ในยาเม็ด metformin ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย แต่เนื่องจากค่า ADI ของสาร NDMA มีปริมาณต่ำมากวิธีตรวจวิเคราะห์ที่ใช้ต้องมีความไวสูง จากการสืบค้นพบว่าวิธีวิเคราะห์ในตำราฟาร์มาโคเปียของสหรัฐอเมริกา (The United States Pharmacopoeia; USP) เป็นการวิเคราะห์ nitrosamine impurities ในวัตถุดิบของยากลุ่ม ARB โดยใช้เทคนิค LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS และ GC-MS/MS ซึ่งมีการใช้ NDMA-d6 เป็น internal standard และใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย⁽⁵⁾ ส่วนตำรายุโรปเฟีย (The European Pharmacopoeia) เป็นวิธีวิเคราะห์ nitrosamine impurities ในวัตถุดิบของยากลุ่ม ARB ด้วยเทคนิค GC-MS/MS และใช้ N-nitrosoethyl-methylamine (NEMA) เป็น internal standard⁽¹⁰⁾ ดังนั้นจึงยังไม่มีวิธีวิเคราะห์ nitrosamine impurities สำหรับผลิตภัณฑ์ยา metformin ในตำรายาใดๆ ส่วนหน่วยงานกำกับดูแลทางด้านยาของประเทศต่างๆ เผยแพร่วิธีการตรวจวิเคราะห์ nitrosamines ในผลิตภัณฑ์ยาดังนี้ USFDA วิเคราะห์ NDMA ในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ยา metformin ด้วยเทคนิค LC-MS มีขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เป็น 0.01 ppm และ 0.03 ppm ตามลำดับ⁽¹¹⁾ หน่วยงาน Health Sciences Authority ของสิงคโปร์ได้เผยแพร่วิธีวิเคราะห์ 2 วิธี ได้แก่ การวิเคราะห์ NDMA ในผลิตภัณฑ์ยา metformin และ ranitidine ด้วยเทคนิค LC-MS/MS และใช้ NDMA-d6 เป็น internal standard โดยมีวัตถุประสงค์ให้เป็น

ทางเลือกและใช้แนวทางในการตรวจวิเคราะห์ พร้อมระบุให้มีการตรวจสอบความถูกต้องก่อนนำไปใช้⁽¹²⁾ และการวิเคราะห์ NDMA ในผลิตภัณฑ์ยา metformin ด้วย GC-MS เตรียมตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย dichloromethane และสกัดด้วย 0.1 N hydrochloric acid ก่อนนำสารละลายชั้น dichloromethane มาวิเคราะห์ด้วย GC-MS⁽¹³⁾ ส่วนหน่วยงาน Swissmedic ของสวิตเซอร์แลนด์ได้เผยแพร่การวิเคราะห์ nitrosamines ในผลิตภัณฑ์ยากลุ่ม ARB ด้วย GC-MS/MS⁽¹⁴⁾ จากการสืบค้นดังกล่าว พบว่าวิธีวิเคราะห์ NDMA ในผลิตภัณฑ์ยา metformin มีทั้งเทคนิค LC และ GC ชนิดของตัวทำละลายและ internal standard และขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ใช้มีความหลากหลาย ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ NDMA ในผลิตภัณฑ์ยาเม็ด metformin ด้วย GC-MS โดยพัฒนาจากวิธีที่หน่วยงานกำกับดูแลด้านยาของต่างประเทศเผยแพร่ เพื่อใช้ในการสำรวจการปนเปื้อนของ nitrosamine impurities ในยาเม็ด metformin ที่มีการขึ้นทะเบียนยาในประเทศไทย และทำให้ทราบสถานการณ์การปนเปื้อน NDMA ในผลิตภัณฑ์ยา metformin ในประเทศไทย

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐาน: N-nitrosodimethylamine (NDMA) (Chem Service Inc., USA, สารละลายใน methanol ความเข้มข้น (certified concentration) 104.0 ug/ml $\pm$ 2.0% (k = 2) Lot No. 7979000), nitrosodimethylamine-d6 solution (NDMA-d6) (Chem Service Inc., USA, สารละลายใน dichloromethane ความเข้มข้น (certified concentration) 1,010.9 ug/ml $\pm$ 2.0% (k = 2) Lot No. 12628700) และ N-nitrosodiethylamine (NDEA) (Chem Service Inc., USA, สารละลายใน methanol ความเข้มข้น (certified concentration) 100.9 ug/ml $\pm$ 2.0% (k = 2) Lot No. 14609000)

สารเคมี: methanol (HPLC grade: Merck, Germany), dichloromethane (HPLC grade:

Carlo Erba, Germany), povidone K30 (Pharmaceutical grade, Ashland, USA), magnesium stearate (Pharmaceutical grade, Italmatch Chemicals, Spain), hydroxypropyl methylcellulose E15 (Pharmaceutical grade, Lotte Fine Chemical Co., Ltd., Korea) และ polyethylene glycol 6000 (Pharmaceutical grade, Liaoning Oxiranphex Inc., China)

เครื่องมือและอุปกรณ์

gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (Thermo Scientific™ TRACE 1310 Gas Chromatograph, Thermo Fisher Scientific Inc., USA), detector (ISQ™ 7000 single quadrupole mass spectrometer, Thermo Fisher Scientific Inc, USA), เครื่องชั่งความละเอียด 0.0001 กรัม รุ่น XPE204 (Mettler Toledo, Switzerland), เครื่องชั่ง ความละเอียด 0.01 มิลลิกรัม รุ่น XP205 (Mettler Toledo, Switzerland), เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 มิลลิกรัม รุ่น XP6 (Mettler Toledo, Switzerland) volumetric flask ขนาด 1, 10, 25 และ 500 มิลลิลิตร, ปิเปต ขนาด 10 มิลลิลิตร, micropipette ขนาด 25, 100 และ 250 ไมโครลิตร (Microman, Gilson S.A.S., France), eppendorf tube ขนาด 2.0 มิลลิลิตร, centrifuge (Hermle® Z306, Hermle, Germany) และ shaker (Gerhardt® Laboshake, Germany)

ตัวอย่างยาเม็ด metformin

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบความถูกต้องของวิธี Glucophage XR ชนิด extended release 1,000 mg ผลิตโดย Merck Sante S.A.S. รุ่นผลิต Y07802 วันผลิต 01/2020 วันหมดอายุ 12/2022

ตัวอย่างที่ใช้ในการสำรวจปริมาณ NDMA ในยาเม็ด metformin ตั้งแต่ตุลาคม พ.ศ. 2563 ถึงกันยายน พ.ศ. 2565 รวมทั้งสิ้น 794 ตัวอย่าง แบ่งเป็น ตัวอย่างจากผู้ผลิตในประเทศ 40 ราย 62 ทะเบียนตำรับยา ตัวอย่าง

จากผู้นำเข้า 11 ราย 22 ทะเบียนตำรับยา โดยทั้งหมดเป็นตัวอย่างที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) เก็บจากผู้ผลิตและผู้นำเข้า

วัตถุดิบ metformin ผลิตโดย Merck Sante S.A.S. รุ่นผลิต M11601

placebo (matrix blank)

ในยาเม็ด metformin ขนาด 500 มิลลิกรัม ประกอบด้วย povidone K30 27 มิลลิกรัม magnesium stearate 5 มิลลิกรัม hydroxypropyl methylcellulose E15 9.76 มิลลิกรัม และ polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) 0.24 มิลลิกรัม ใช้ทั้งหมด 50 เม็ด

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน NDMA ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน NDMA 104.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 20 ไมโครลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย internal standard (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน NDMA ความเข้มข้น 1, 3, 5, 10, 30, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน NDMA ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 5, 15, 25, 50, 150, 250 และ 500 ไมโครลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย internal standard (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

การเตรียมสารละลาย internal standard ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรใน dichloromethane

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน NDMA-d6 1,010.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 25 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย dichloromethane ให้ครบ 500 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

บดเม็ดยา metformin จำนวน 20 เม็ด ซึ่งผงยาให้มีปริมาณ metformin 1,000 มิลลิกรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิตร ปิดเต็สารละลาย internal standard (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อ มิลลิตร) 10.0 มิลลิตร เขย่าด้วย shaker เป็นเวลา

50 นาที เทสารละลายตัวอย่างลงใน eppendorf tube ขนาด 2.0 มิลลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น ปิดเต็เฉพาะส่วนใสไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS

สภาวะของระบบโครมาโตกราฟ (chromatographic condition) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะของระบบโครมาโตกราฟของ GC-MS

สภาวะของ GC	
injection volume	2 μ l
inlet temperature	250°C
carrier gas (ml/min)	Helium (1 ml/min)
injection mode	Splitless Splitless time: 1 min Splitless flow: 50 ml/min
GC column	DB-WAX ขนาด 30 m length $\times$ 0.25 mm ID $\times$ 0.25 μ m film thickness
oven temperature program	45°C (hold 1 min), 15°C/min to 180°C, 20°C/min to 250°C, 250°C (hold 1 min)
retention time	NDMA: 6.20 min NDMA-d6: 6.19 min
สภาวะของ mass spectrometry detector	
transfer line	250°C
ion source	300°C
acquisition mode	SIM
target SIM	NDMA: quantified ion เป็น m/z 74 qualifier ions เป็น m/z 43 42 NDMA-d6: quantified ion เป็น m/z 80

การตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability)

สัมประสิทธิ์การตัดลิไน (R²) ของ calibration curve ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995 ร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ของสารละลาย QC (สารละลายมาตรฐาน NDMA ที่ความเข้มข้น 4 นาโนกรัมต่อมิลลิตร) ต้องอยู่ระหว่าง 80–120%

การทดสอบความถูกต้องของวิธี^(15,16)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานใน placebo (matrix blank) สำหรับความจำเพาะเจาะจงของวิธี (specificity) ดังนี้

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน NDMA

เปิดสารละลายมาตรฐาน NDMA 104.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จำนวน 250 ไมโครลิตร ใส่ใน

volumetric flask ขนาด 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย dichloromethane จากนั้นปิเปตสารละลายที่ได้ 40 ไมโครลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย placebo ให้ได้ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน NDMA-d6

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน NDMA-d6 1010.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 50 ไมโครลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย dichloromethane จากนั้นปิเปตสารละลายที่ได้ 40 ไมโครลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย placebo ให้ได้ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน NDEA

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน NDEA 100.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 250 ไมโครลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย dichloromethane จากนั้นปิเปตสารละลายที่ได้ 40 ไมโครลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย placebo ให้ได้ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย metformin

ชั่งวัตถุดิบ metformin 2 กรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปิเปต dichloromethane 20 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask และเขย่าด้วย shaker เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ก่อนปิเปตเฉพาะส่วนใส และวิเคราะห์ด้วย GC/MS

การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง NDMA, NDMA-d6 และ NDEA

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม NDMA, NDMA-d6 และ NDEA ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรต่อชนิดสาร ตามขั้นตอนข้างต้น แต่ให้เจือจางในชั้นสุดท้ายใน volumetric flask

เดียวกัน ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลาย placebo

การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง NDMA, NDMA-d6, NDEA และ metformin

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม NDMA, NDMA-d6 และ NDEA ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรต่อชนิดสาร ตามขั้นตอนข้างต้น แต่ให้เจือจางในชั้นสุดท้ายใน volumetric flask เดียวกัน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลาย metformin ใน placebo

การเตรียมสารละลาย internal standard ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ใน dichloromethane สำหรับความเป็นเส้นตรง (linearity), LOD และ LOQ

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน NDMA-d6 1,010.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 25 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย dichloromethane ให้ครบ 500 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย internal standard ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย placebo สำหรับ linearity, LOD และ LOQ

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน NDMA-d6 1,010.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 25 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย placebo ให้ครบ 500 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย placebo (matrix blank solution)

ผสม povidone K30 1,350 มิลลิกรัม magnesium stearate 250 มิลลิกรัม hydroxypropyl methylcellulose E15 488 มิลลิกรัม polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) 12 มิลลิกรัม ให้เข้ากันละลายใน dichloromethane 250 มิลลิลิตร และเขย่าด้วย shaker เป็นเวลา 50 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 3 (LOQ), 10, 50 และ 90 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และการทดสอบความเที่ยง (precision)

ซึ่งผงยาให้มีปริมาณ metformin 1,000 มิลลิกรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 4 ขวด เติมสารละลายมาตรฐาน NDMA ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการปิเปต 0.15, 0.5, 2.5, 4.5 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ตามลำดับ เติมสารละลาย internal standard (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ให้ได้ปริมาตรรวม 10.0 มิลลิลิตร โดยการปิเปต 9.85, 9.5, 7.5 และ 5.5 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ตามลำดับ เขย่าด้วย shaker เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นเทสารละลายตัวอย่างใส่ใน eppendorf tube ขนาด 2.0 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ก่อนปิเปตเฉพาะส่วนใสและวิเคราะห์ด้วย GC-MS

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (specificity)

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน NDMA ใน placebo สารละลายมาตรฐาน NDMA-d6 ใน placebo สารละลายมาตรฐาน NDEA ใน placebo สารละลาย metformin ใน placebo สารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง NDMA, NDMA-d6 และ NDEA ใน placebo สารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง NDMA, NDMA-d6, NDEA และ metformin ใน placebo วิเคราะห์ด้วย GC-MS เกณฑ์ยอมรับต้องไม่พบสัญญาณที่มีค่า retention time และ m/z ที่ตรงกับ NDMA และ NDMA-d6

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity)

ศึกษาความเป็นเส้นตรงในสภาวะที่มีและไม่มี placebo effect ดังนี้

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน NDMA ความเข้มข้น 1, 3, 5, 10, 30, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย internal standard (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน dichloromethane

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน NDMA ในสารละลาย placebo เตรียมเช่นเดียวกับใน dichloro-

methane โดยเตรียมความเข้มข้นละ 3 ข้าง นำไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ซึ่งต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995⁽¹⁵⁾

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

วิเคราะห์สารมาตรฐาน NDMA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 0.8, 1.0 และ 3.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนความเข้มข้นละ 10 ข้าง คำนวณหา signal to noise (S/N) ซึ่ง LOD ต้องมี S/N เท่ากับ 3 ส่วน LOQ ต้องมี S/N เท่ากับ 10⁽¹⁵⁾ โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน NDMA ใน dichloromethane และใน dichloromethane ที่มีการ spike placebo นอกจากนี้ยังหาค่า LOD และ LOQ จากการคำนวณด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; s) จากสูตร LOD = 3s และ LOQ = 10s

การทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน NDMA ที่ 4 ระดับความเข้มข้น คือ 3 (LOQ), 10, 50 และ 90 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ระดับละ 6 ข้าง จากนั้นหาค่าร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ที่แต่ละระดับความเข้มข้น โดยเกณฑ์ยอมรับความแม่นยำ %recovery 80–120%⁽¹⁷⁾

การทดสอบความเที่ยง (precision)

การทดสอบ repeatability วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน NDMA ที่ 4 ระดับความเข้มข้น คือ 3 (LOQ), 10, 50 และ 90 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ระดับละ 6 ข้าง

การทดสอบ intermediate precision วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน NDMA ที่ความเข้มข้น 3 (LOQ) นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 6 ข้าง ต่างวันและต่างนักวิเคราะห์

เกณฑ์ยอมรับความเที่ยง: ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบน
มาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation;
%RSD) ไม่เกิน 20⁽¹⁷⁾

การศึกษาความคงสภาพของสารละลายตัวอย่าง

วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่อยู่ภายใต้สภาวะ
การเก็บใน autosampler แบ่งสารละลายตัวอย่างใส่ใน
vial จำนวน 30 ขวด โดยฉีดสารละลายตัวอย่างในแต่ละ
ขวดทุก ๆ 20 นาที (ขวดละ 1 เข็ม) จากนั้นคำนวณปริมาณ
NDMA ในแต่ละช่วงเวลา

เกณฑ์ยอมรับ: ค่าร้อยละของความแตกต่างของ
ปริมาณ NDMA ที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับเวลาที่ 0
ต้องไม่เกิน 20

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Uncertainty)

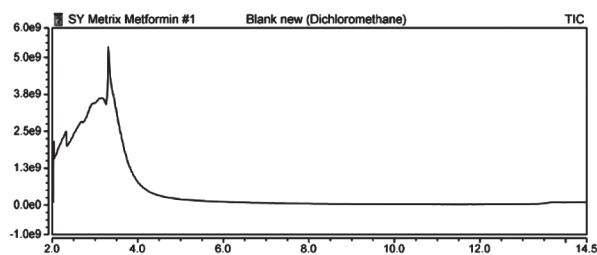
คำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัดตามแนวทาง
ของ EURACHEM⁽¹⁸⁾ โดยคำนึงถึงแหล่งความ
ไม่แน่นอนทุกแหล่ง รวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด

จากนั้นคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความ
เชื่อมั่น 95% ($k = 2$)

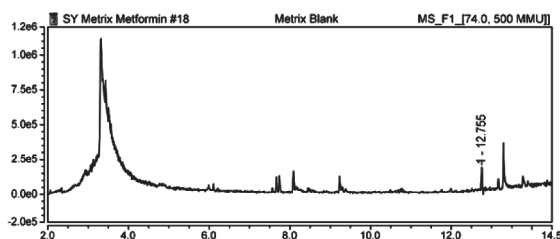
ผล

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี

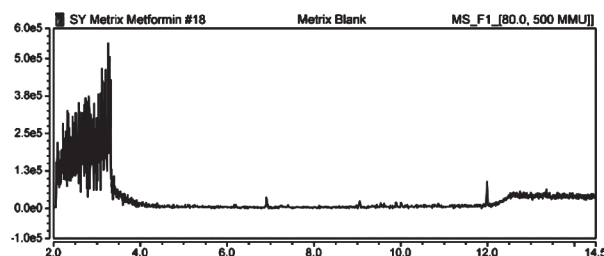
จากการฉีดสารมาตรฐานผสมในสารละลาย
placebo และในสารละลาย placebo กับ metformin
พบว่าไม่มี peak รบกวนจาก NDEA metformin
สารอื่นๆ ในตัวรับ และ solvent ที่ใช้ ที่ตำแหน่ง
retention time, m/z ของ NDMA และ NDMA-d6
นอกจากนี้ไม่พบ m/z 129 ของ metformin ดังแสดง
ในภาพที่ 2-5 สำหรับ retention time ของ NDMA,
NDMA-d6 และ NDEA ที่เวลา 6.20, 6.19 และ 7.0
ตามลำดับ การแตก mass ของ NDMA มีค่า m/z 74.0,
43.1 และ 42.1 NDMA-d6 มีค่า m/z 80.1, 48.1
และ 46.1 NDEA มีค่า m/z 102.1, 56.1 และ 42.1
ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 6 ดังนั้นวิธีนี้สามารถแยก
NDMA และ NDMA-d6 ออกจาก NDEA metformin
สารอื่นๆ ในตัวรับ และ solvent ที่ใช้ได้



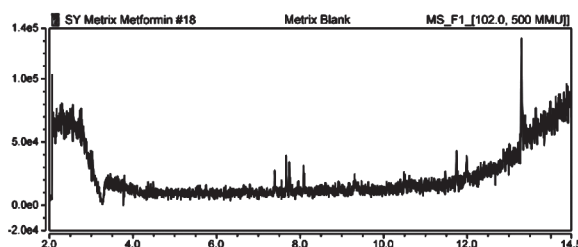
dichloromethane



สารละลาย placebo ที่ m/z 74

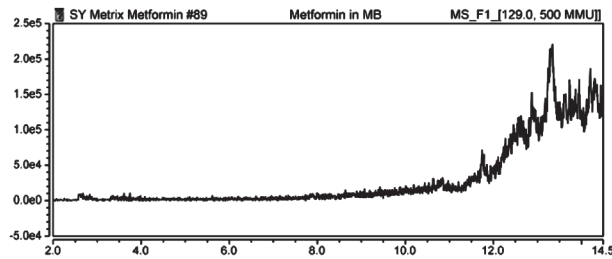


สารละลาย placebo ที่ m/z 80

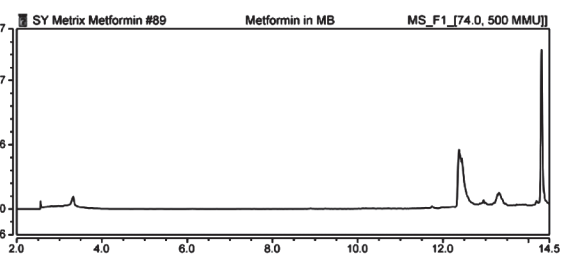


สารละลาย placebo ที่ m/z 102

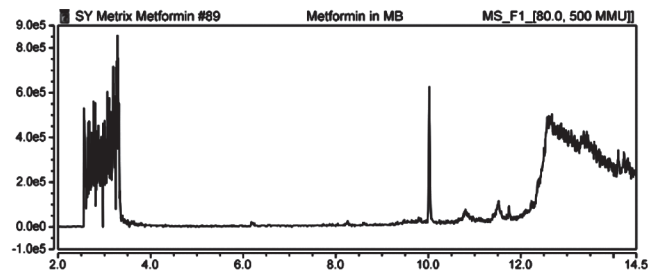
ภาพที่ 2 chromatogram ของ dichloromethane และสารละลาย placebo



สารละลาย metformin ใน placebo ที่ m/z 129

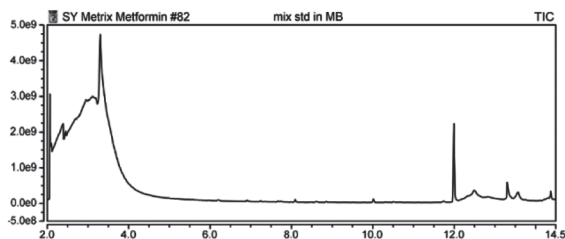


สารละลาย metformin ใน placebo ที่ m/z 74

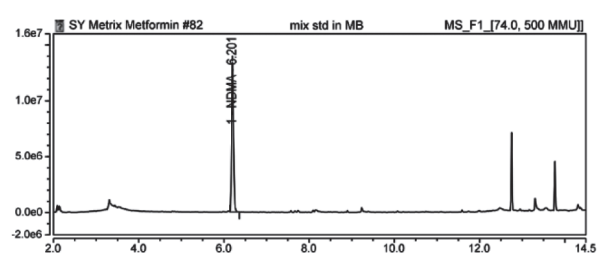


สารละลาย metformin ใน placebo ที่ m/z 80

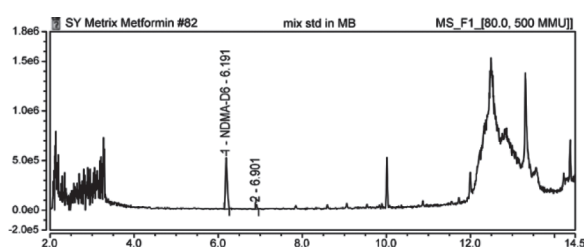
ภาพที่ 3 chromatogram ของสารละลาย metformin ใน placebo



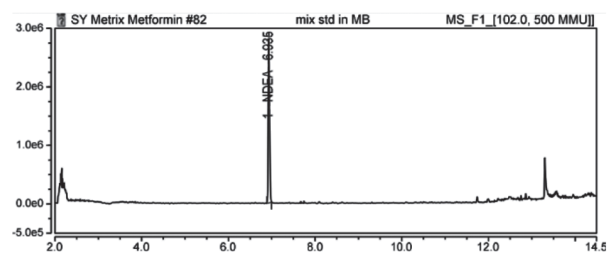
NDMA, NDMA-d6 และ NDEA



NDMA ที่ m/z 74

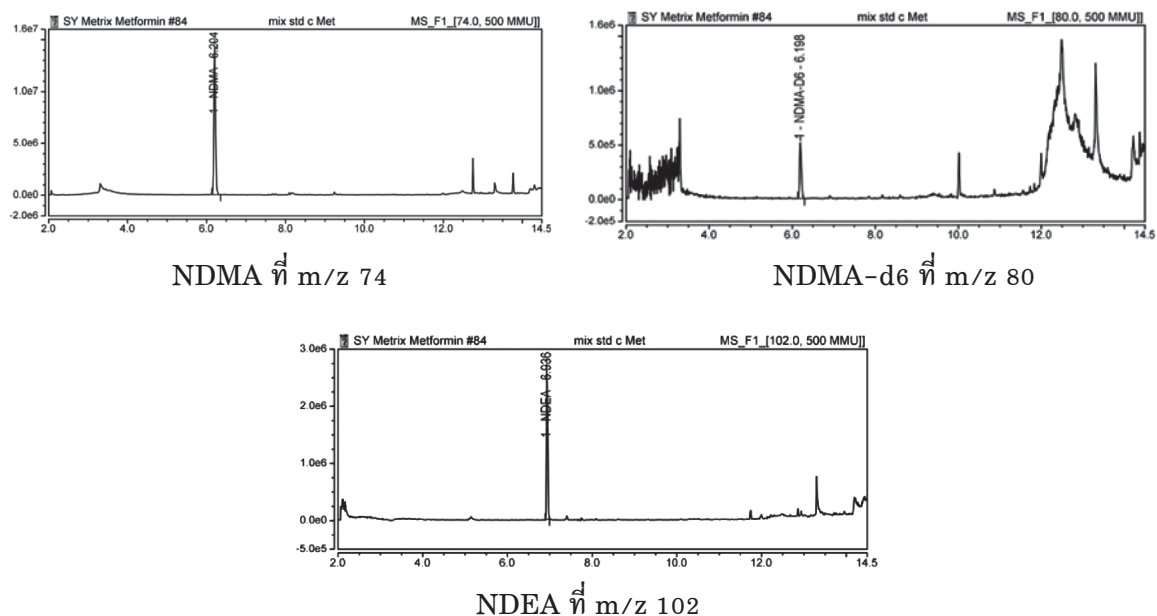


NDMA-d6 ที่ m/z 80

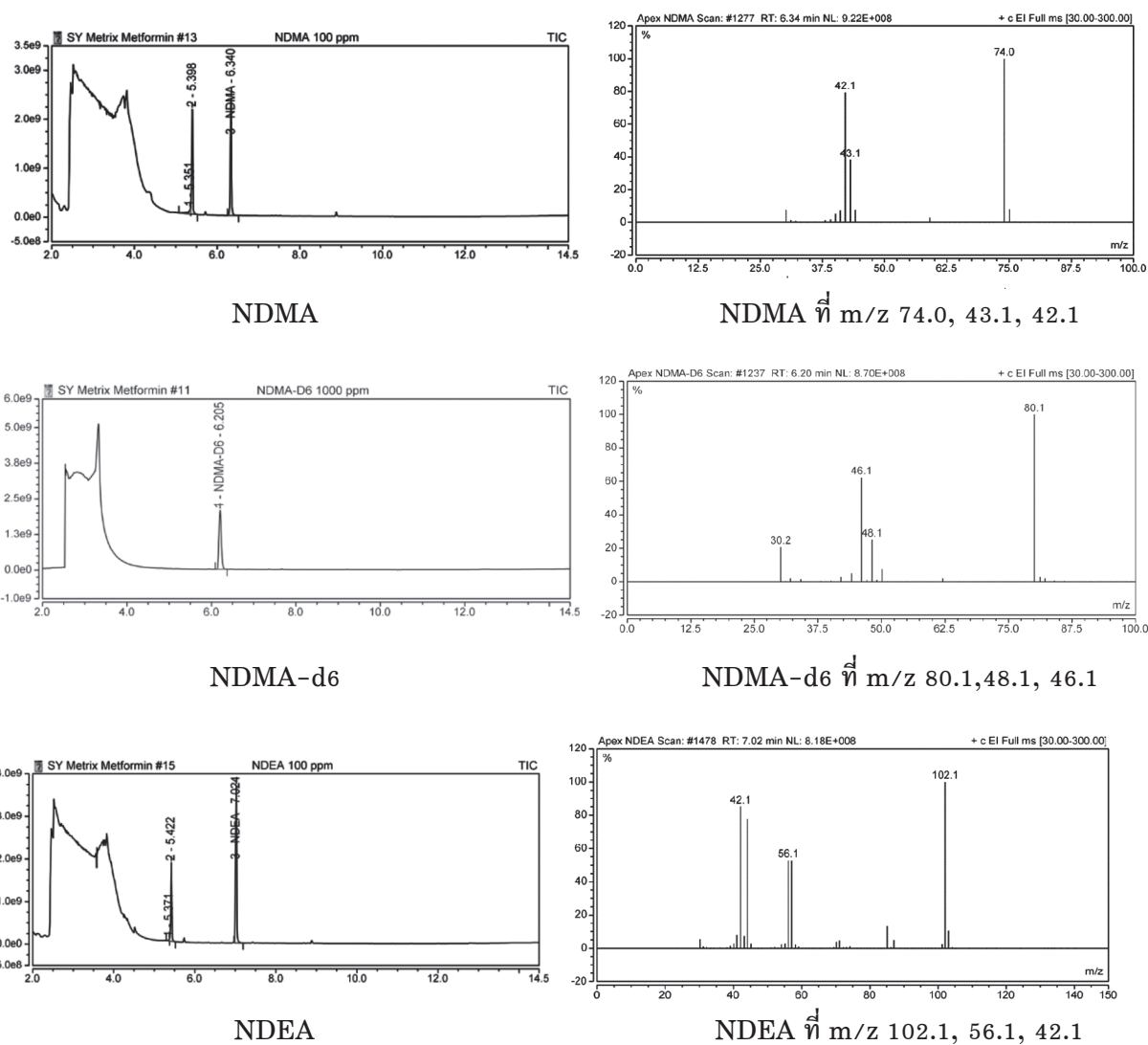


NDEA ที่ m/z 102

ภาพที่ 4 chromatogram ของสารละลายผสมระหว่าง NDMA, NDMA-d6 และ NDEA ใน placebo



ภาพที่ 5 chromatogram ของสารละลายผสมระหว่าง NDMA, NDMA-d6 และ NDEA ใน placebo + metformin

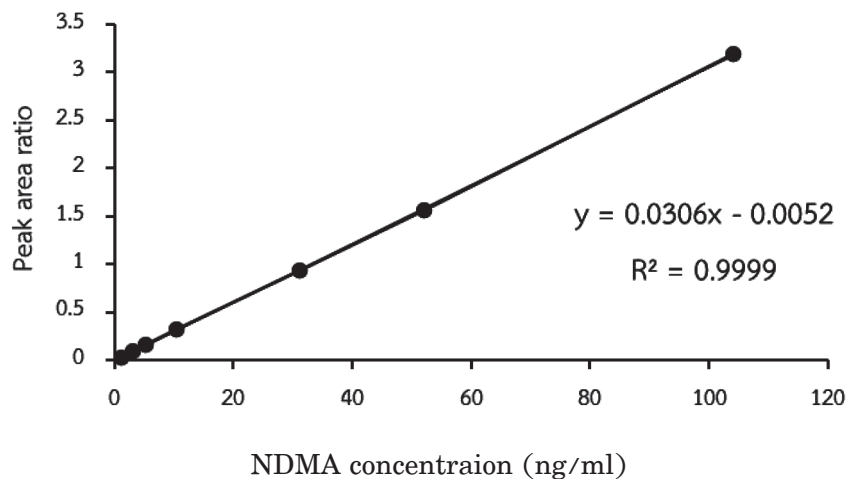


ภาพที่ 6 chromatogram และ mass spectrum ของ NDMA, NDMA-d6 และ NDEA ใน dichloromethane

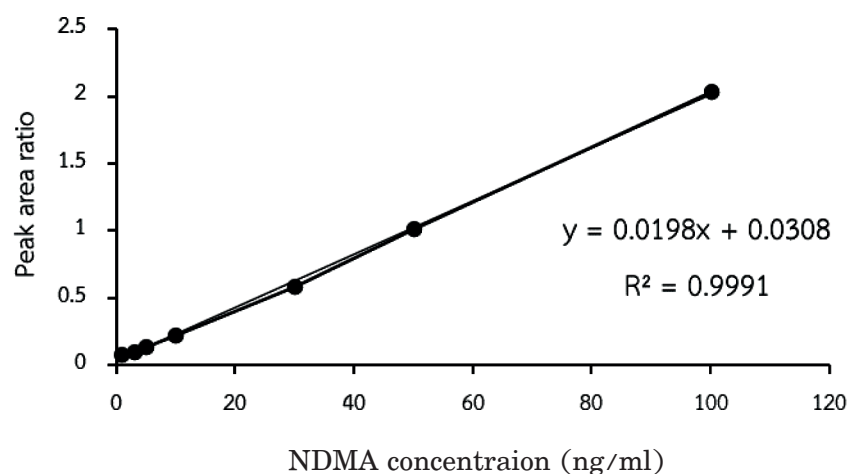
การทดสอบความเป็นเส้นตรง

ผลการฉีดสารละลายมาตรฐาน NDMA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 1–100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับความเข้มข้นละ 3 ขั้ว สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า peak area ratio ของ NDMA และ NDMA-d₆ (แกน Y) กับความเข้มข้นของ NDMA (แกน X) ซึ่งทำการศึกษาความเป็นเส้นตรง 2 แบบ คือ การเตรียม

สารละลายมาตรฐาน NDMA ใน dichloromethane และใน dichloromethane ที่มีการ spike placebo พบว่ากราฟมาตรฐานที่สร้างจากสารละลายมาตรฐาน NDMA ใน dichloromethane และใน dichloromethane ที่มีการ spike placebo เป็นเส้นตรงตลอดช่วงการทดสอบ และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9999 และ 0.9991 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 7 และ 8



ภาพที่ 7 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน NDMA ใน dichloromethane



ภาพที่ 8 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน NDMA ใน dichloromethane ที่ spike placebo

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ

ผลวิเคราะห์สารมาตรฐาน NDMA ที่ความเข้มข้น 0.8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามี S/N มากกว่า 3 ทั้ง 10 ครั้ง ซึ่งเป็นขีดจำกัดของการตรวจพบ ส่วนขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มี S/N มากกว่า 10 ทั้ง 10 ครั้ง โดยให้ผลเหมือนกัน แม้ว่าจะเตรียมสารละลายมาตรฐาน NDMA ใน dichloromethane หรือใน dichloromethane ที่มีการ spike placebo

จากการวิเคราะห์สารมาตรฐาน NDMA เตรียมใน dichloromethane โดยการ spike placebo ที่ระดับความเข้มข้น 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณค่า s ได้ 0.166 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า LOD เท่ากับ 0.50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ LOQ 1.66 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้มี LOQ เท่ากับ 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งที่ความเข้มข้นนี้มีความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ส่วน LOD เท่ากับ 0.8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง

ผลการฉีดสารละลายตัวอย่างยาเม็ดที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน NDMA ที่ 4 ระดับความเข้มข้น คือ 3, 10, 50 และ 90 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ พบความแม่นยำที่ประเมินจาก %recovery ทั้ง 4 ระดับผ่านเกณฑ์ %recovery 80–120 และความเที่ยง (repeatability) ซึ่งมีค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 2.9, 7.2, 2.1 และ 2.5 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การทดสอบความแม่นยำ (%recovery) และความเที่ยง (repeatability; %RSD) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ NDMA ในยาเม็ด metformin

	ระดับความเข้มข้น (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	3	10	50	90
1	98.1	94.2	91.1	91.8
2	106.9	86.0	86.4	91.6
3	104.8	88.9	87.0	86.8
4	102.7	102.3	87.0	92.6
5	103.9	84.3	86.8	91.9
6	103.9	90.5	86.2	92.9
%recovery	103.4	91.0	87.4	91.3
%RSD เฉลี่ย	2.9	7.2	2.1	2.5

ผลการทดสอบ intermediate precision โดยทำการวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างยาเม็ดที่มีการเติม

สารละลายมาตรฐาน NDMA ที่ความเข้มข้น 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร วันละ 6 ซ้ำ 3 วัน โดยวิเคราะห์ต่างวันและต่างนักวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 3

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณ NDMA (ng)} = \frac{\text{ความเข้มข้นที่อ่านจากกราฟมาตรฐาน (ng/ml)} \times 10 \text{ ml} \times \text{น้ำหนักเม็ดยาเฉลี่ย (g)}}{\text{น้ำหนักผงยา (g)}}$$

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบ intermediate precision (%RSD) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ NDMA ในยาเม็ด metformin

	ปริมาณ NDMA (นาโนกรัม)		
	Day 1 Analyst 1	Day 2 Analyst 1	Day 3 Analyst 2
1	30.5964	29.2171	31.9915
2	33.3469	26.4462	28.1155
3	32.7019	24.7714	29.2640
4	32.0559	26.4845	29.7587
5	32.4250	28.6440	28.1716
6	32.4252	23.0087	27.2074
ปริมาณ NDMA เฉลี่ย (n = 18)		29.2573	
%RSD		10.08	

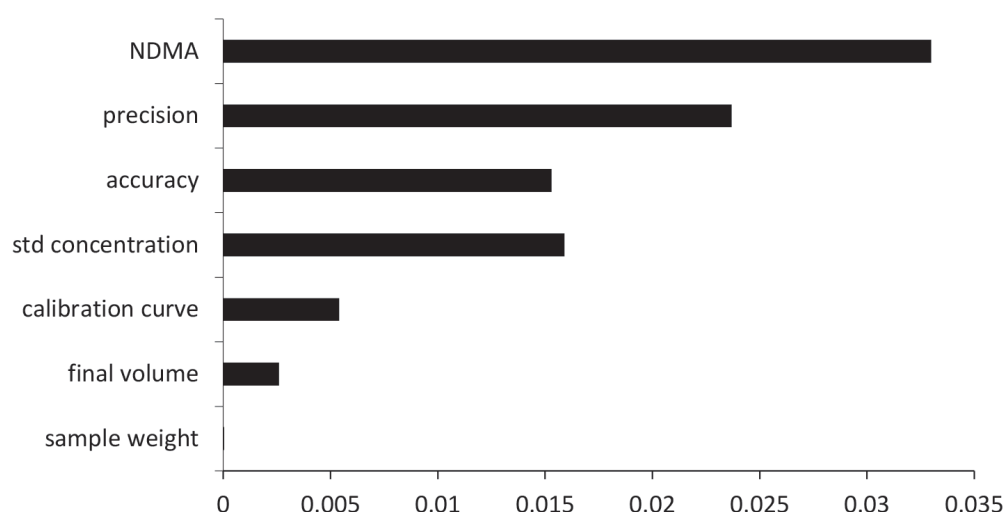
การศึกษาคงสภาพของสารละลายตัวอย่าง

ผลการศึกษาพบว่าสารละลายตัวอย่างที่อยู่ภายใต้สภาวะการเก็บใน autosampler มีความคงสภาพ 3 ชั่วโมง ดังนั้นต้องฉีดวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างภายหลังจากการเตรียมเสร็จภายใน 3 ชั่วโมง

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด

โดยคำนวณค่าความไม่แน่นอนที่เกิดขึ้นจากแต่ละแหล่ง คำนวณความไม่แน่นอนรวม (combined standard

uncertainty) และคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (k = 2) ค่าความไม่แน่นอนขยายของการวิเคราะห์ NDMA ในยาเม็ด metformin มีค่า 0.0330 ± 0.0022 ppm เมื่อคำนวณสัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ NDMA ในยาเม็ด metformin ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ NDMA ในยาเม็ด metformin

นำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีมาตรฐานวิเคราะห์ตัวอย่างในการสำรวจปริมาณการปนเปื้อน NDMA ในยาเม็ด metformin รวม 794 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างของผู้ผลิตในประเทศ 40 ราย 62 ทะเบียนตำรับยา และตัวอย่างจากผู้นำเข้า 11 ราย 22 ทะเบียนตำรับยา พบว่าตรวจไม่พบ NDMA จำนวน 108 ตัวอย่าง ตรวจพบ NDMA น้อยกว่า 0.03 ppm จำนวน 523 ตัวอย่าง พบ NDMA เกิน 0.03 ppm แต่ไม่เกิน 0.048 ppm จำนวน 113 ตัวอย่าง และมีเพียง 50 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบ NDMA เกิน 0.048 ppm ซึ่งเป็นตัวอย่างจาก 6 บริษัท 8 ทะเบียนตำรับยา

วิจารณ์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ NDMA ในยาเม็ด metformin โดยเลือกเทคนิคการวิเคราะห์เป็น gas chromatography และ detector เป็น mass spectrometry เนื่องจาก NDMA เป็นสารปนเปื้อนที่มีปริมาณน้อยมากในระดับ ppb และมีการใช้ internal standard เพื่อเป็นการควบคุมและลดความผิดพลาดในขั้นตอนการวิเคราะห์ การเลือก internal standard สำหรับเทคนิค mass spectrometry ควรใช้สารที่มีโครงสร้างเหมือนสารที่ตรวจวิเคราะห์ แต่มีมวลโมเลกุลมากกว่าโดยการแทนที่บางอะตอมด้วยสาร isotope⁽²⁾ ดังนั้นจึงเลือกใช้ NDMA-d6 เป็น internal standard เนื่องจากเป็น isotope ของ NDMA ที่สามารถแยกได้ด้วย m/z และมีคุณสมบัติทางด้านเคมีและฟิสิกส์เหมือนกับ NDMA นอกจากนี้มีการใช้เทคนิค selected ion monitoring (SIM) เป็นการเลือกวัดเฉพาะไอออนของสารที่สนใจ โดย mass analyzer จะคัดเลือกเฉพาะ precursor ion ของสารที่สนใจผ่านเข้าสู่ detector เพื่อลดปริมาณประจุที่ไม่ต้องการเข้าสู่ mass detector ทำให้ตัวรับกวนลดลงมาก วิธีนี้จึงเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารปริมาณน้อย (trace analysis) เนื่องจากมีความไวในการวิเคราะห์ที่ค่อนข้างสูง วิธีนี้เลือก precursor ion เป็น m/z 74 และ 80 สำหรับ NDMA และ NDMA-d6 ตามลำดับ ส่วนคอลัมน์เลือกใช้ DB-Wax มี stationary phase เป็น polyethylene glycol มีคุณสมบัติ polarity สูง

เหมาะสำหรับใช้แยกสารที่ polar ซึ่ง NDMA มีหมู่ amine จึงจัดเป็นสาร polar การเลือกตัวทำละลายพิจารณาจากค่าการละลายของ NDMA พบว่ามีการละลายใน alcohol และ ether ได้ดี และละลายใน organic solvent รวมถึง dichloromethane⁽¹⁹⁾ สารมาตรฐาน NDMA-d6 มีอยู่ในรูปสารละลายใน dichloromethane ดังนั้นจึงเลือกใช้ dichloromethane เป็นสารสกัด เนื่องจากทั้ง NDMA และ NDMA-d6 ละลายได้ใน dichloromethane ในขณะที่ metformin ซึ่งอยู่รูปเกลือ hydrochloride จะไม่ละลายใน dichloromethane (practically insoluble)⁽²⁰⁾ นอกจากนี้วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นนี้มีการเตรียมตัวอย่างด้วยการละลายใน dichloromethane แล้วฉีดวิเคราะห์ ซึ่งเป็นวิธีที่มีขั้นตอนการเตรียมการตัวอย่างที่ไม่ยุ่งยากและลดความผิดพลาดในขั้นตอนการดูดซับสารละลาย dichloromethane ซึ่งอยู่ชั้นล่างออกมาวิเคราะห์ เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีเป็นจำนวนมาก เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีในตำรายา USP ที่เป็นวิธี GC/MS เหมือนกันแต่เป็นชนิด headspace มีตัวทำละลายเป็น methanol และการเตรียมตัวอย่างมีขั้นตอนที่ยุ่งยากกว่า โดยมีการเติม imidazole acetronitrile นอกเหนือจากสารละลาย internal standard ในขณะวิธีที่พัฒนานี้เป็นการฉีดสารละลายเข้าสู่เครื่อง GC/MS โดยตรง จะมีความเที่ยงในการวิเคราะห์มากกว่า การเลือกใช้ dichloromethane เป็นตัวทำละลายเนื่องจากตัวอย่างยา metformin บางตำรับโดยเฉพาะที่เป็นชนิด extended release เมื่อใช้ตัวทำละลายเป็น methanol จะกลายเป็นเจลไม่ได้เป็นสารละลาย ดังนั้น methanol จึงไม่เหมาะใช้เป็นตัวทำละลาย ซึ่งสอดคล้องกับวิธีตำรายา USP ที่ระบุไว้สำหรับการหาปริมาณ NDMA ในวัตถุดิบเท่านั้นไม่ครอบคลุมถึงในผลิตภัณฑ์ ดังนั้นวิธีที่พัฒนานี้จึงดีกว่าวิธีในตำรายา USP ในการใช้วิเคราะห์ปริมาณ NDMA ในผลิตภัณฑ์ยาเม็ด metformin

การทดสอบความถูกต้องของวิธีดำเนินการตาม ICH Guideline^(15,16) พบว่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 1–100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ขีดจำกัดของการตรวจพบเท่ากับ 0.8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ความแม่นยำในเกณฑ์โดยมี %recovery อยู่ในช่วง 87.4–103.4% สำหรับความเที่ยงทำการศึกษาทั้งแบบ repeatability และ intermediate precision พบว่า %RSD น้อยกว่า 8% และ 11% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ เนื่องจากเป็นการวิเคราะห์สารปนเปื้อนในปริมาณน้อยมากระดับ ppb ดังนั้นการวิเคราะห์ในงานประจำจะต้องเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างใหม่ทุกวัน จึงศึกษาความคงสภาพของสารละลายตัวอย่างที่อยู่ใน autosampler เท่านั้น โดยพบว่าจะต้องฉีดตัวอย่าง หลังจากการเตรียมเสร็จภายใน 3 ชั่วโมง ดังนั้นวิธี ที่พัฒนาผ่านการทดสอบความถูกต้องมีความเหมาะสมกับการนำไปใช้ในการหาปริมาณ NDMA ในยาเม็ด metformin ที่มีการกำหนดเกณฑ์การยอมรับปริมาณ NDMA ในยา metformin ไม่เกิน 0.048 ppm โดยคำนวณจากค่า maximum daily dose ของ metformin มีค่าเท่ากับ 2,000 มิลลิกรัม และ ADI ของ NDMA ไม่เกิน 96 ng/day(1,2) ผลการวิเคราะห์ NDMA ในยาเม็ด metformin ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย พบว่ามี 50 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบ NDMA เกิน 0.048 ppm จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 794 ตัวอย่าง สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยามีการเรียกเก็บคืนยาในรุ่นผลิตที่มีปริมาณ NDMA เกิน 0.048 ppm และมีมาตรการให้ผู้ผลิตยาหาสาเหตุของการปนเปื้อน NDMA และควบคุมปริมาณ NDMA ไม่ให้เกินเกณฑ์ นอกจากนี้การวิเคราะห์ปริมาณ NDMA ต้องใช้ detector เป็น mass spectrometry ผู้ผลิตยาในประเทศส่วนใหญ่ยังไม่มีเครื่องมือชนิดนี้เนื่องจากมีราคาค่อนข้างสูงและค่าบำรุงรักษาสูง ดังนั้นวิธีนี้จึงใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ NDMA ที่ส่งตรวจโดยผู้ผลิตยาในประเทศ

การปนเปื้อน NDMA ในผลิตภัณฑ์ยาเม็ด metformin อาจมีสาเหตุจากวัตถุดิบ excipient และ ภาชนะบรรจุ⁽²⁾ เมื่อพิจารณาขั้นตอนการสังเคราะห์ metformin มีการใช้สารตั้งต้นเป็น dimethylamine ซึ่งเป็น secondary amine เมื่อมี dimethylamine ตกค้างอยู่ในวัตถุดิบจะสามารถทำปฏิกิริยากับ nitrosating

agent ที่ปนเปื้อนอยู่ทำให้เกิด NDMA ได้ ในตำรา British Pharmacopoeia มีการควบคุมปริมาณ dimethylamine ในวัตถุดิบไม่ให้เกิน 0.05%⁽²¹⁾ ขณะที่ nitrosating agent อาจปนเปื้อนมาจาก excipient ได้แก่ hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), polyvinylcholoride (PVP) หรือจากภาชนะบรรจุ ซึ่งมี nitrocellulose เป็นส่วนประกอบของหมึกพิมพ์⁽²²⁾ ดังนั้นการควบคุมปริมาณ NDMA ในยาเม็ด metformin ผู้ผลิตจำเป็นต้องมีการประเมินความเสี่ยงถึงปัจจัยที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน NDMA ในผลิตภัณฑ์และต้องมีการดำเนินการกำจัดหรือลดความเสี่ยงนั้น เพื่อเป็นการควบคุมปริมาณการปนเปื้อนของ NDMA ที่มีประสิทธิภาพ

สรุป

การตรวจวิเคราะห์ NDMA ในผลิตภัณฑ์ยาเม็ด โดยใช้วิธี GC/MS ที่พัฒนาดีกว่าวิธีในตำราที่ระบุใช้วิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็นวัตถุดิบเท่านั้นไม่สามารถนำมาใช้วิเคราะห์กับผลิตภัณฑ์ยา metformin ได้ เนื่องจาก การเตรียมตัวอย่างที่ไม่เหมาะสม วิธีที่ได้พัฒนามีข้อดี คือ มีการเตรียมตัวอย่างที่ไม่ยุ่งยากและมีความไวในการวิเคราะห์ สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณ NDMA ได้ในระดับที่ต่ำกว่าเกณฑ์ที่ยอมรับ คือ 0.048 ppm โดยมีความถูกต้อง แม่นยำ และความจำเพาะต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ เหมาะกับการตรวจวิเคราะห์ในงานประจำ รวมทั้งกรณีที่มีปริมาณตัวอย่างจำนวนมาก ดังนั้นวิธีนี้สามารถนำไปใช้สำหรับการปนเปื้อนของ NDMA ในผลิตภัณฑ์ยา metformin ที่มีจำหน่ายในประเทศ เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายเคมี-ฟิสิกส์ 2 และ ฝ่ายวัตถุดิบ 1 สำนักยาและวัตถุดิบ ที่อนุเคราะห์ วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ รวมทั้งให้คำแนะนำทำให้ การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Control of nitrosamine impurities in human drugs; Guidance for industry. [online]. 2021; [cited 2023 Apr 1]: [24 screens]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/media/141720/download>.
2. European Medicines Agency. Nitrosamine impurities in human medicinal products. [online]. 2020; [cited 2023 Dec 1]: [90 screens]. Available from: URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-assessment-report_en.pdf.
3. European Medicines Agency. Nitrosamine impurities. [online]. [cited 2023 Dec 1]: [20 screens]. Available from: URL: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/post-authorisation/pharmacovigilance-post-authorisation/referral-procedures-human-medicines/nitrosamine-impurities#ema-inpage-item-13203>.
4. Sedlo I, Kolonić T, Tomić S. Presence of nitrosamine impurities in medicinal products. Arh Hig Rada Toksikol 2021; 72(1): 1-5.
5. General chapter <1469> Nitrosamines impurities. In: The United States Pharmacopeia - National Formulary. Rockville, MD: United States Pharmacopeia; 2021.
6. European Medicines Agency. Lessons learnt from presence of N-nitrosamine impurities in sartan medicines. [online]. 2020; [cited 2023 Dec 1]: [98 screens]. Available from: URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/lessons-learnt-presence-n-nitrosamine-impurities-sartan-medicines_en.pdf.
7. European Medicines Agency. ICHM7(R2) Guideline on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk. [online]. 2023; [cited 2023 Dec 1]: [31 screens]. Available from: URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-m7r2-guideline-assessment-and-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit-potential-carcinogenic-risk-step-5_en.pdf.
8. ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2565. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 139 ตอนพิเศษ 182 ง (วันที่ 5 สิงหาคม 2565). หน้า 11.
9. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. ระบบค้นหาข้อมูลผลิตภัณฑ์ยา. [ออนไลน์]. [สืบค้น 1 เม.ย. 2566]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://pertento.fda.moph.go.th/FDA_SEARCH_DRUG/SEARCH_DRUG/FRM_SEARCH_DRUG.aspx.
10. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare. 2.5.42. N-Nitrosamines in active substances. [online]. 2020; [cited 2023 Dec 1]: [8 screens]. Available from: URL: <https://www.edqm.eu/documents/52006/66284/european-pharmacopoeia-n-nitrosamines-active-substances.pdf>.
11. U.S. Food and Drug Administration. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) method for the determination of NDMA in metformin drug substance and drug product. [online]. 2020; [cited 2023 Apr 1]: [7 screens]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/media/134914/download>.
12. Health Sciences Authority. Determination of NDMA in metformin and ranitidine products by LC-MS/MS. [online]. 2021; [cited 2023 Apr 1]: [7 screens]. Available from: URL: https://www.hsa.gov.sg/docs/default-source/announcements/safety-alerts/determination-of-ndma-in-metformin-and-ranitidine-by-lcmsms_pl_hsa_2021mar01.pdf.

13. Health Sciences Authority. Determination of NDMA in metformin products by HRAM-GCMS. [online]. 2021; [cited 2023 Apr 1]: [6 screens]. Available from: URL: https://www.hsa.gov.sg/docs/default-source/announcements/safety-alerts/determination-of-ndma-in-metformin-by-hram-gcms_pl_hsa_2021mar01.pdf.
14. Swissmedic. Nitrosamines by GC-MS/MS. [online]. 2021; [cited 2023 Apr 1]: [7 screens]. Available from: URL: <https://www.edqm.eu/documents/52006/71923/Ad-hoc-projects-OMCL-Network-Swissmedic.pdf/76853d6b-4c19-c054-5bb7-ee4e77232cdf?t=1628667616159>.
15. European Medicines Agency. ICH Q2(R2) Guideline on validation of analytical procedures. [online]. 2023; [cited 2024 Jan 3]. Available from: URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical-procedures-step-5-revision-1_en.pdf.
16. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
17. U.S. Food and Drug Administration. Guidance for industry bioanalytical method validation. [online]. 2021; [cited 2023 Dec 1]: [25 screens]. Available from: URL: https://www.moh.gov.bw/Publications/drug_regulation/Bioanalytical%20Method%20Validation%20FDA%202001.pdf.
18. EURACHEM / CITAC Guide CG 4. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. EURACHEM; 2012.
19. PubChem. Compound N-nitrosodimethylamine. [online]. [cited 2023 Apr 1]: [54 screens]. Available from: URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosodimethylamine#section=Clinical-Laboratory-Methods>.
20. PubChem. Compound metformin. [online]. [cited 2023 Apr 1]: [44 screens]. Available from: URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metformin#section=Other-Experimental-Properties>.
21. British Pharmacopoeia Commission. British pharmacopoeia 2023. Vol. 2. London: The Stationery Office; 2022. p. 249-251.
22. Schlingemann J, Boucley C, Hickert S, Bourasseau L, Walker M, Celdran C, et al. Avoiding N-nitrosodimethylamine formation in metformin pharmaceuticals by limiting dimethylamine and nitrite. Int J Pharm 2022; 620: 121740. (15 pages).

Method Development and Validation for Determination of N-nitrosodimethylamine in Metformin Tablets

Sasida Yoosook and Piyamas Kitchanapanich

Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Nitrosamines have been detected in several drug products such as angiotensin II receptor blockers (ARB), ranitidine and metformin. However, N-nitrosodimethylamine (NDMA) is the only nitrosamine impurity found in metformin. Nitrosamines impurities in drug products may be occurred by raw materials, excipients, water, solvents, manufacturing process, and packaging materials. Since Nitrosamines are probably human carcinogen, quantity of nitrosamines impurity must be controlled to not exceeded the acceptance daily intake (ADI). The ADI of NDMA is 95 nanogram per day. The objective of this study was to develop an analytical method using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for the determination of low-level NDMA in metformin tablets. This method was developed from the method available from oversea drug regulation authorities. The method validation was performed according to International Council for Harmonisation (ICH) guideline which found that NDMA and NDMA-d6 peaks were not interfered by N-nitrosodiethylamine (NDEA) metformin excipient and solvent. The limit of detection was 0.8 ng/mL and the limit of quantification was 3 ng/mL which was less than the NDMA acceptance limit for metformin tablets. The method showed linearity with a coefficient of determination (R^2) greater than 0.999. The accuracy as expressed by %recovery was between 87.4 to 103.4%. The relative standard deviation values of repeatability and intermediate precision were less than 8% and 11%, respectively. Therefore, the developed method was suitable for monitoring NDMA quantity in metformin tablets.

Keywords: Nitrosamine impurity, N-nitrosodimethylamine, Metformin, NDMA, GC-MS

การประเมินคุณภาพและตรวจติดตามสายพันธุ์ย่อยของ วัคซีนบีซีจีสายพันธุ์ Tokyo 172-1 ที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564

ชลดา เพ็ชรไทย¹ สุภาภรณ์ ชุมพล¹ สุกัลยาณี ไชยมี¹ อภิชัย ศุภสารสาทร¹ และ สุภาพร ภูมิอมร²

¹ สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

² สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ประเทศไทยกำหนดให้วัคซีนบีซีจีเป็นวัคซีนพื้นฐานสำหรับเด็กแรกเกิดทุกราย จึงต้องมีการตรวจคุณภาพวัคซีนในทุกกระบวนการผลิตเพื่อให้มั่นใจในคุณภาพและประสิทธิภาพของวัคซีน ผู้วิจัยได้ทำการประเมินความเสี่ยงคุณภาพและความปลอดภัยของวัคซีนบีซีจีสายพันธุ์ Tokyo 172-1 ที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 จำนวน 133 รุนการผลิต ผลการวิเคราะห์พบว่าทุกกระบวนการผลิตมีคุณลักษณะทางกายภาพ เอกลักษณะ ปริมาณความชื้น ความแรง และความคงตัว เป็นไปตามข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์และข้อกำหนดมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก ผลการตรวจติดตามสายพันธุ์ย่อย subtype II ในวัคซีนบีซีจีสายพันธุ์ Tokyo 172-1 จำนวน 109 รุนการผลิต พบว่าส่วนใหญ่มีปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II น้อยกว่า 10% จำนวน 65 รุนการผลิต (59.63%) ในขณะที่ 44 รุนการผลิต (40.37%) มีมากกว่า 10% เปรียบเทียบกับวัคซีนบีซีจีที่ผลิตจากประเทศญี่ปุ่นที่มีค่าไม่เกิน 5% และประเทศไต้หวันมีค่าประมาณ 40% เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II กับค่าความแรง พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95% มีค่า r เท่ากับ -0.287 ซึ่งมีค่าต่ำมาก แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์กันแต่มีแนวโน้มเป็นความสัมพันธ์แบบแปรผกผัน ทั้งนี้ไม่มีผลต่อคุณภาพของวัคซีนเนื่องจากผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพเป็นไปตามข้อกำหนด ข้อมูลจากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาคุณภาพการผลิตของวัคซีนบีซีจีที่ใช้ในประเทศต่อไป

คำสำคัญ: วัคซีนบีซีจี, คุณภาพวัคซีน, บีซีจีสายพันธุ์ Tokyo 172-1

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

Received: 23 August 2023

Revised: 5 February 2024

Accepted: 27 March 2024

บทนำ

วัคซีนเป็นชีววัตถุที่ใช้เพื่อกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกัน คุณภาพและความปลอดภัยของวัคซีนจึงมีความสำคัญ เนื่องจากวัคซีนมีโอกาสเกิดการเบี่ยงเบนในคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตในแต่ละครั้งได้สูง เมื่อเปรียบเทียบกับยาสังเคราะห์หรือยาเคมีทั่วไปและการตรวจพิสูจน์ในประสิทธิภาพทำได้ยาก องค์การอนามัยโลกจึงกำหนดให้มีการรับรองรุ่นการผลิตวัคซีนทุกรุ่นโดยหน่วยงานภาครัฐก่อนนำไปสู่ผู้บริโภค สำหรับประเทศไทยกำหนดให้การผลิต นำหรือส่งเข้าในราชอาณาจักร ซึ่งยาแผนปัจจุบันที่เป็นยาชีววัตถุต้องได้รับหนังสือรับรองรุ่นการผลิตยาชีววัตถุก่อนนำออกจำหน่ายหรือส่งมอบให้ผู้ซื้อ⁽¹⁾ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) ระบุให้มีกระบวนการตรวจสอบรับรองรุ่นการผลิตวัคซีนก่อนจำหน่ายทุกกระบวนการผลิต โดยพิจารณาเอกสารสรุปกระบวนการผลิต (summary production protocol) ซึ่งมีข้อมูลรายละเอียดเกี่ยวกับกระบวนการผลิตและการตรวจสอบคุณภาพตั้งแต่เริ่มต้นการผลิตจนถึงผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป ข้อมูลการเก็บรักษาและขนส่งผลิตภัณฑ์ในระบบลูกโซ่ความเย็น และผลการวิเคราะห์คุณภาพตัวอย่างที่ตรวจโดยสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽²⁾ โดยในแต่ละรายการวิเคราะห์ต้องได้มาตรฐานตามเกณฑ์การยอมรับที่กำหนด หากพบการเบี่ยงเบน หรือเปลี่ยนแปลงไป หรือมีข้อสงสัยที่อาจกระทบต่อคุณภาพ ต้องทำการตรวจสอบก่อนรับรองรุ่นการผลิต

วัคซีนบีซีจี (Bacillus Calmette-Guérin vaccine; BCG vaccine) หรือวัคซีนป้องกันวัณโรค เป็นวัคซีนชนิดเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ ถูกบรรจุในแผนงานการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันแห่งชาติตั้งแต่ปี พ.ศ. 2520⁽³⁾ ใช้ฉีดเข้าชั้นผิวหนังเด็กแรกเกิดทุกรายเพื่อป้องกันวัณโรค วัคซีนนี้ผลิตจากเชื้อ *Mycobacterium bovis* BCG ซึ่งปัจจุบันมีหลายสายพันธุ์แตกต่างกันไปตามแต่ละประเทศและห้องปฏิบัติการ วัคซีนบีซีจีที่ผลิตในประเทศไทยโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ซึ่งเป็นผู้ผลิตรายเดียว ผลิตจาก *Mycobacterium bovis* BCG สายพันธุ์ Tokyo 172-1 เช่นเดียวกับวัคซีนบีซีจีที่ผลิตในประเทศไต้หวันและประเทศญี่ปุ่น⁽⁴⁾ โดยเชื่อที่

ใช้ในการผลิตวัคซีนบีซีจีในประเทศไทยได้รับจากประเทศญี่ปุ่นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2531⁽⁵⁾ มีการผลิตในรูปแบบผงแห้ง (lyophilized) ขนาด 10 โดส (dose) มีปริมาณเชื้อ 0.05 มิลลิกรัม และมีอายุยานาน 4 ปี การรับรองรุ่นการผลิตพิจารณาจากเอกสารสรุปกระบวนการผลิตของผู้ผลิตและตรวจวิเคราะห์คุณภาพตัวอย่างวัคซีนบีซีจี โดยรายการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่ตรวจโดยสถาบันชีววัตถุ ประกอบด้วย การตรวจวิเคราะห์ความปลอดภัย ความแรง ความคงตัว ลักษณะทางกายภาพ ปริมาณความชื้น และเอกลักษณ์ของวัคซีน⁽⁶⁻⁸⁾

ปี พ.ศ. 2550-2559 คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล ได้ติดตามอาการไม่พึงประสงค์ภายหลังจากการได้รับวัคซีนบีซีจี อาการที่พบส่วนใหญ่ คือ ต่อมมน้ำเหลืองอักเสบ (lymphadenitis), BCG osteitis และ disseminated BCG disease ทำให้ผู้ผลิตและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องร่วมกันตรวจสอบเพื่อหาสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการดังกล่าว ปัจจัยที่คาดว่าเป็นสาเหตุอาการไม่พึงประสงค์ได้แก่ เทคนิคการฉีด ปริมาณการฉีด ภาวะสุขภาพของผู้ได้รับวัคซีน หรือคุณภาพวัคซีนที่อาจเปลี่ยนแปลงไป โดยเรื่องคุณภาพวัคซีนมีการตรวจสอบและยืนยันว่ายังคงมีคุณภาพคงเดิม ในปี พ.ศ. 2558 มีรายงานการศึกษาปริมาณ subtype I และ subtype II ซึ่งเป็นสายพันธุ์ย่อยในวัคซีนบีซีจี พบว่าวัคซีนบีซีจีที่ผลิตในประเทศไทยตรวจพบเป็น subtype II ทั้งหมด และไม่พบ subtype I⁽⁹⁾ ซึ่งต่างจากวัคซีนบีซีจีที่ผลิตจากประเทศไต้หวันและญี่ปุ่นที่พบทั้ง 2 สายพันธุ์ย่อย⁽¹⁰⁾ ทำให้เกิดข้อสงสัยในคุณภาพวัคซีนเกี่ยวกับปริมาณสายพันธุ์ย่อยในวัคซีนบีซีจีที่ผลิตในประเทศไทย มีสัดส่วนของ subtype II ต่างจากวัคซีนบีซีจีที่ผลิตจากประเทศอื่นหรือไม่ และเป็นสาเหตุของอาการไม่พึงประสงค์ดังกล่าวหรือไม่ ในปี พ.ศ. 2562 มีการตรวจสอบและยืนยันว่าวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย มีสายพันธุ์ย่อยทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ subtype I และ subtype II เช่นเดียวกับวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยประเทศอื่น และพบว่ารุ่นการผลิตส่วนใหญ่มีปริมาณ subtype II น้อยกว่า 10%⁽¹¹⁾ แสดงว่าสัดส่วน subtype II ไม่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์หลังการได้รับวัคซีน ทั้งนี้เพื่อ

ให้เกิดความมั่นใจในคุณภาพของวัคซีนบีซีจี สถาบันชีววัตถุ จึงทำการตรวจหาสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 โดยวิธี real-time polymerase chain reaction (real time-PCR)⁽⁹⁾ เพื่อติดตามปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II ในวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย และใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบกับวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยต่างประเทศ ถึงแม้ว่าการตรวจสอบคุณภาพของวัคซีนบีซีจีตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลกไม่ได้กำหนดให้ตรวจหาปริมาณสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG⁽¹²⁾ ก็ตาม

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเสี่ยงคุณภาพและความปลอดภัยของวัคซีนบีซีจีสายพันธุ์ Tokyo 172-1 ที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 ที่ตรวจโดยสถาบันชีววัตถุ เพื่อนำไปเป็นข้อมูลให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องและผู้บริโภคใช้ประโยชน์ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างวัคซีน

วัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ซึ่งเป็นผู้ผลิตรายเดียวในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 จำนวน 133 รุ่นการผลิต เป็นวัคซีนที่ผลิตปี พ.ศ. 2558 จำนวน 21 รุ่นการผลิต พ.ศ. 2559 จำนวน 22 รุ่นการผลิต พ.ศ. 2560 จำนวน 18 รุ่นการผลิต พ.ศ. 2561 จำนวน 3 รุ่นการผลิต พ.ศ. 2562 จำนวน 33 รุ่นการผลิต พ.ศ. 2563 จำนวน 14 รุ่นการผลิต และ พ.ศ. 2564 จำนวน 22 รุ่นการผลิต

การตรวจสอบคุณภาพวัคซีนบีซีจี

รวบรวมข้อมูลผลการตรวจสอบคุณภาพวัคซีนบีซีจี โดยการประเมินความเสี่ยงคุณภาพและความปลอดภัย แบ่งเป็น การพิจารณาเอกสารสรุปกระบวนการผลิต (summary production protocol) ของผู้ผลิต และผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการโดยสถาบันชีววัตถุ ซึ่งรายการทดสอบประกอบด้วย

การตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ (appearance) ด้วยวิธีการมองด้วยตาเปล่า (visual inspection) ภายใต้ viewing station ที่มีความเข้มแสงอยู่ในช่วง 2,000–3,750 ลักซ์

ปริมาณความชื้น (moisture content) ด้วยวิธี volumetric Karl Fischer titration เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างสารไทแทรนต์ (titrant solution) กับน้ำที่อยู่ในตัวอย่าง

การตรวจเอกลักษณ์ (identity) โดยดูลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง Lowenstein Jensen media (LJ media) และลักษณะของเชื้อแบบ bacilli บน stained smear ด้วยวิธีการย้อมสีทนกรด (acid fast staining) ที่ปรากฏภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, model CK2, Olympus Optical Co., Ltd., Japan)

ความแรงและความคงตัว (potency and stability) ด้วยการตรวจนับ number of culturable particles ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LJ

การตรวจหาสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 โดยวิธี real time-PCR⁽¹¹⁾ ใช้ความต่างของลำดับดีเอ็นเอระหว่าง 2 subtypes ใน RD16 region โดยใช้ primer และ probe 2 ชุด คือ ชุดที่ตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของ subtype II ตรวจวัดโดย RD 16-probe ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FAM และชุดที่ตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ BCG ทั้งหมดประกอบด้วย subtype I และ subtype II โดยใช้ murB-probe ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง NED

การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ BCG subtype II ทำโดยเจือจางดีเอ็นเอของ BCG subtype II ด้วย TE buffer pH 8.0 ให้มีความเข้มข้น 1,000, 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 พิกोगรามต่อไมโครลิตร และเจือจางดีเอ็นเอของ BCG subtype I และ subtype II ให้มีสัดส่วน % ดีเอ็นเอของ BCG subtype I : BCG subtype II เป็น 95:5 (5% BCG subtype II) เพื่อเป็น positive control จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวมแต่ละหลอด 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย DNA template ของสารมาตรฐาน (DNA subtype II) หรือ DNA ที่สกัดจากวัคซีนตัวอย่าง หลอดละ 2 ไมโครลิตร โดยในแต่ละหลอด (reaction) ประกอบด้วยไพรเมอร์ BCG I/II-Fw และ BCG II-Rv (อย่างละ 12 pM) murB-Fw และ murB-Rv (อย่างละ 6 pM) RD16-probe (3 pM) murB-probe (1.5 pM) 2×qPCR master mix 7.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น

จนครบปริมาตร 15 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยตั้งค่าที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำนวน 40 รอบ

ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที คำนวณปริมาณดีเอ็นเอ ของ BCG subtype II และปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดของตัวอย่าง BCG โดยเปรียบเทียบค่า cycle threshold (Ct) กับกราฟมาตรฐาน และคำนวณ %BCG subtype II ดังสมการ

$$\%BCG \text{ subtype II} = \frac{\text{ปริมาณดีเอ็นเอของ BCG subtype II (พิโคกรัมต่อไมโครลิตร)}}{\text{ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดของ BCG (พิโคกรัมต่อไมโครลิตร)}} \times 100$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

รวบรวมข้อมูลผลการตรวจสอบคุณภาพวัคซีน บีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 นำผลการตรวจวิเคราะห์เปรียบเทียบกับเกณฑ์ข้อกำหนด จัดทำแนวโน้ม (trend) ของแต่ละรายการทดสอบ และใช้สถิติสหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson's correlation) ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนของสายพันธุ์ย่อย subtype II กับความแรงของวัคซีนบีซีจีที่ตรวจโดยสถาบันชีววัตถุ

ผล

จากการพิจารณาเอกสารสรุปกระบวนการผลิตของผู้ผลิตร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ สถาบันชีววัตถุ ประกอบด้วย การตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ ปริมาณความชื้น การตรวจเอกลักษณ์

ความแรง และความคงตัวของวัคซีนตัวอย่าง ที่ผลิตระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 จำนวน 133 รุ่นการผลิต รายละเอียดจำนวนรุ่นการผลิตในแต่ละรายการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 1

การตรวจสอบคุณภาพวัคซีนแต่ละรายการทดสอบของการตรวจวิเคราะห์

ลักษณะทางกายภาพ ก่อนการละลายมีลักษณะเป็นของแข็งจับตัวเป็นก้อนสีขาว เมื่อละลายมีลักษณะเป็นสารละลายสีขาวขุ่น การตรวจเอกลักษณ์ พบว่าโคโลนีที่ปรากฏบน LJ มีสีเหลืองอ่อนหรือสีเนื้อ รูปร่างกลมหรือรีรูปแบบ ขอบหยักค่อนข้างแบน ขนาดประมาณ 2–5 มิลลิเมตร และมีลักษณะเป็นแบคทีเรียรูปแท่งภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เมื่อย้อมสีทึบกรด ดังแสดงในภาพที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนรุ่นการผลิตของตัวอย่างวัคซีนที่ใช้ในการทดสอบในแต่ละปีที่ผลิต

รายการทดสอบ	ปีที่ผลิต (จำนวนตัวอย่างวัคซีน)							รวม (รุ่นการผลิต)
	2558	2559	2560	2561	2562	2563	2564	
การตรวจลักษณะทางกายภาพ	21	22	18	3	33	14	22	133
ปริมาณความชื้น	21	22	18	3	33	14	ND	111
การตรวจเอกลักษณ์	21	22	18	3	33	14	22	133
ความแรง*	21	22	18	3	15*	3*	3*	85
ความคงตัว*	21	22	18	3	15*	3*	3*	85
การตรวจหาสายพันธุ์ย่อย**	6**	14**	18	3	33	14	21**	109

หมายเหตุ: ND = ไม่มีการตรวจปริมาณความชื้นจากสถานการณ์โควิด 19

* = ตั้งแต่กลางปี พ.ศ. 2562 มีการปรับความถี่การตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างส่งตรวจเพื่อรองรับรุ่นการผลิต

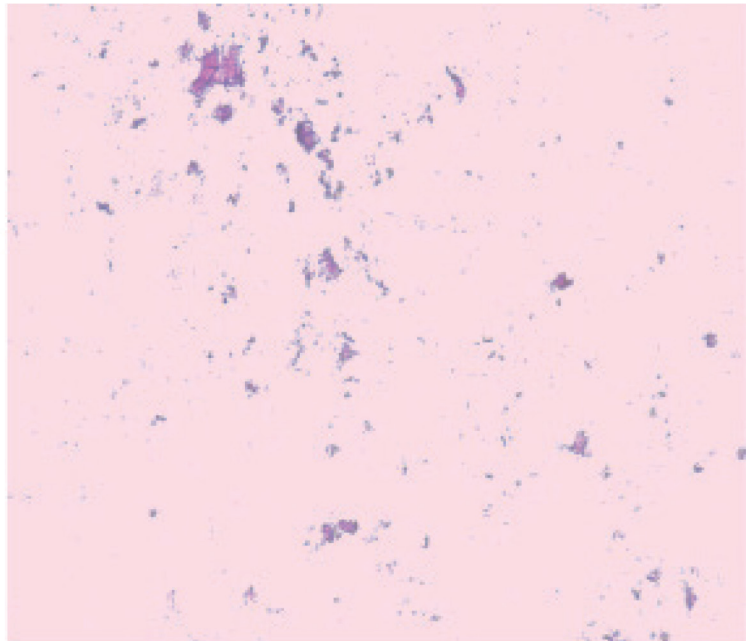
** = จำนวนตัวอย่างคงเหลือจากการตรวจวิเคราะห์เพื่อรับรองรุ่นการผลิต

ปริมาณความชื้นของตัวอย่างวัคซีนที่ผลิต
ระหว่างปี พ.ศ. 2558-2563 พบว่าทุกรุ่นการผลิตมีค่า

อยู่ในเกณฑ์การยอมรับของผลิตภัณฑ์ไม่เกิน 3% โดย
มีความชื้นอยู่ระหว่าง 0.28-2.47% ดังแสดงในภาพที่ 2

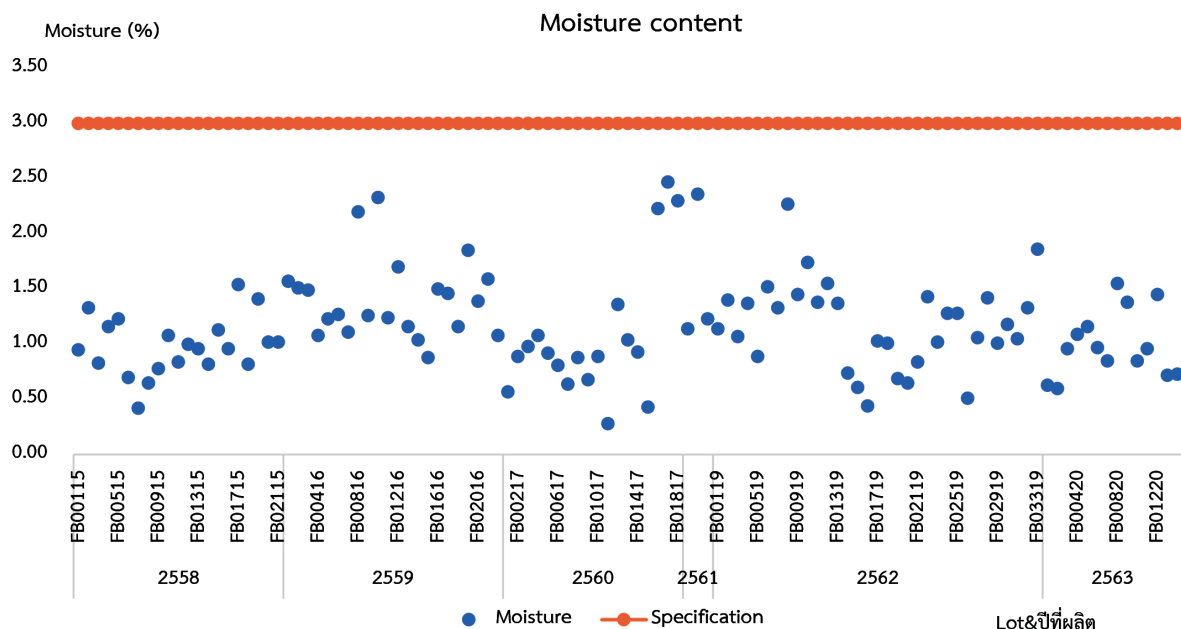


(1A)



(1B)

ภาพที่ 1 การตรวจเอกลักษณ์ของตัวอย่างวัคซีนที่ผลิตระหว่างปี พ.ศ. 2558-2564 1A คือ โคโลนีที่ปรากฏบน
มีเดีย LJ และ 1B คือ ลักษณะแบคทีเรียรูปแท่งหลังจากการย้อมสีทึบกรด (acid fast staining)
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

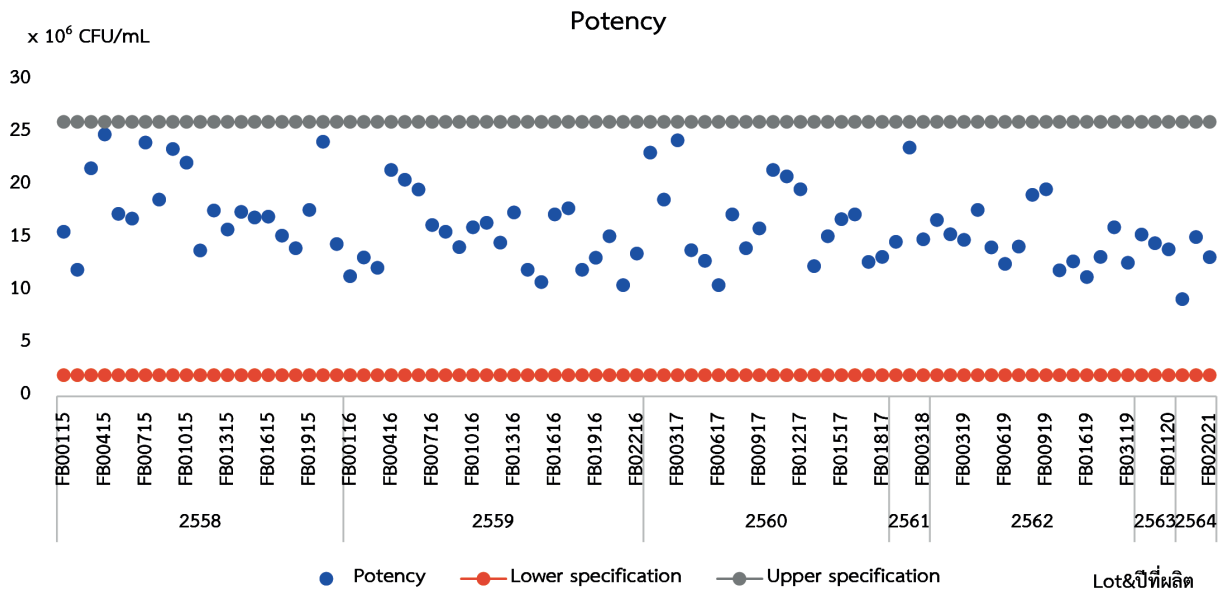


หมายเหตุ: พ.ศ. 2564 ไม่มีการตรวจปริมาณความชื้นเนื่องจากสถานการณ์โควิด 19

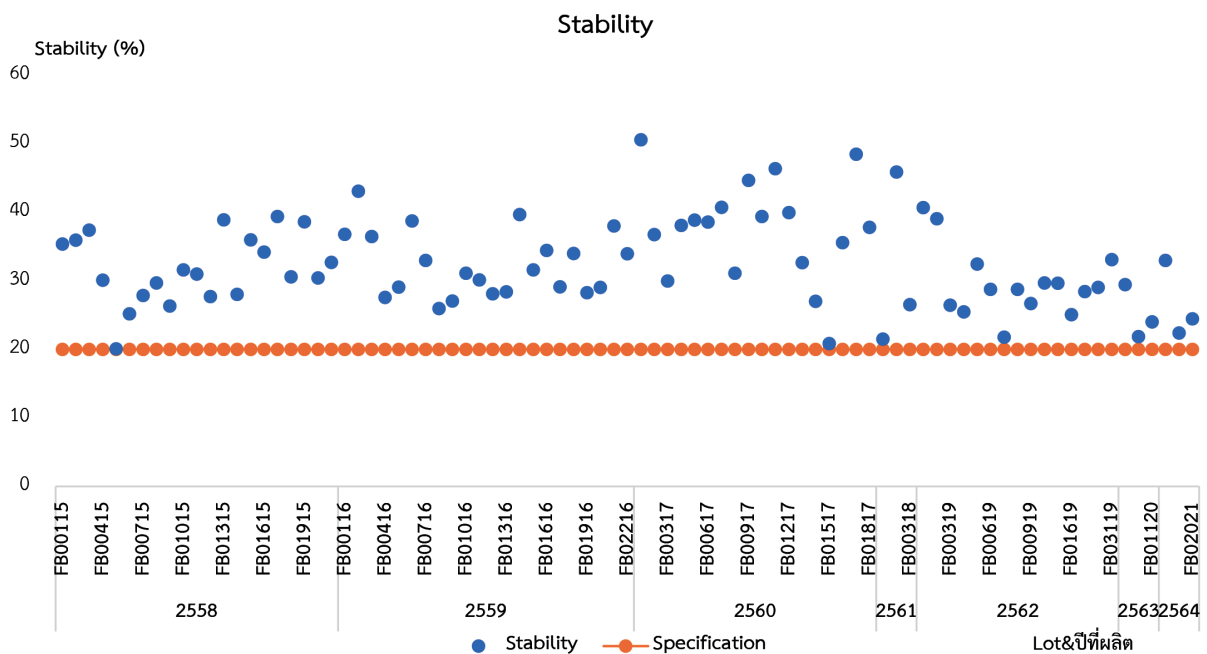
ภาพที่ 2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณความชื้นด้วยวิธี Karl Fischer titration ในวัคซีนบีซีจีที่ผลิตระหว่างปี
พ.ศ. 2558-2563 เกณฑ์การยอมรับของผลิตภัณฑ์ไม่เกิน 3%

ค่าความแรงของตัวอย่างวัคซีนที่ผลิตระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 พบว่าทุกกระบวนการผลิตมีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของผลิตภัณฑ์ คือ $2-26 \times 10^6$ CFU/mL โดยมีปริมาณเชื้ออยู่ระหว่าง $9.22-24.83 \times 10^6$ CFU/mL ดังแสดงในภาพที่ 3

ค่าความคงตัวของตัวอย่างวัคซีนที่ผลิตระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 พบว่าทุกกระบวนการผลิตมีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของผลิตภัณฑ์ คือ $\geq 20\%$ ของเชื้อที่รอดชีวิต ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 3 การตรวจวิเคราะห์ความแรง (potency) ด้วยการตรวจนับ number of culturable particles ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LJ ในวัคซีนบีซีจีที่ผลิตระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 ช่วงค่ายอมรับได้ $2-26 \times 10^6$ CFU/mL

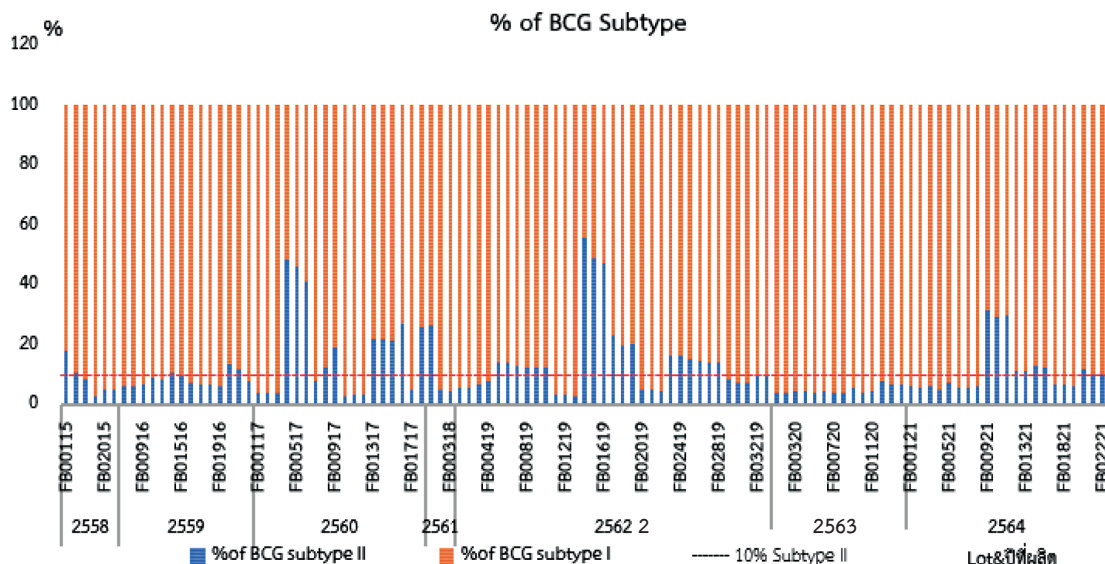


ภาพที่ 4 การตรวจวิเคราะห์ความคงตัว (stability) ด้วยการตรวจนับ number of culturable particles ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LJ ในวัคซีนบีซีจีที่ผลิตระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564

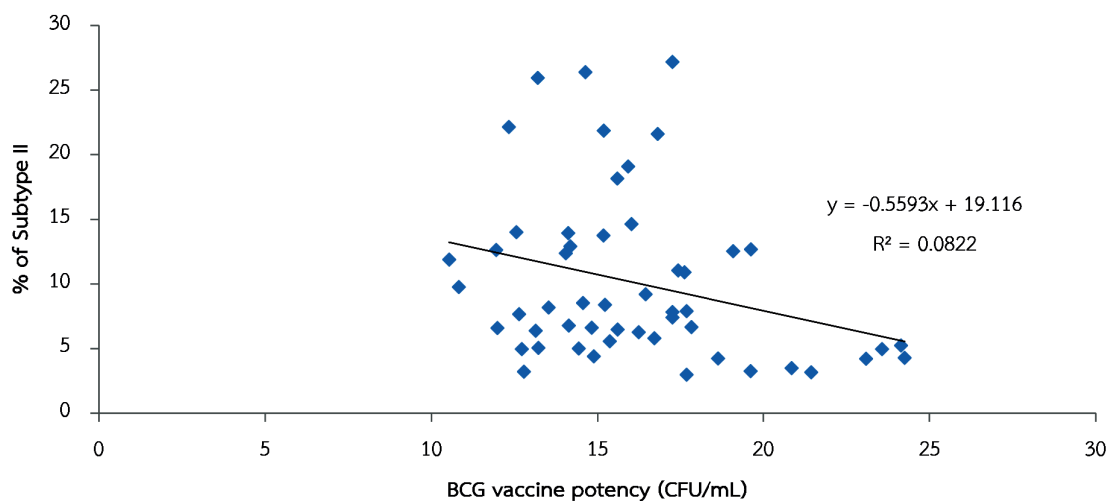
การตรวจหาสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1
ตรวจโดยวิธี real time-PCR เพื่อติดตามปริมาณ
สายพันธุ์ย่อย subtype II ในวัคซีนบีซีจีที่ผลิต
โดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย รวม 109 รุ่นการผลิต
พบว่าจำนวน 65 รุ่นการผลิต (59.63%) มีปริมาณ
สายพันธุ์ย่อย subtype II ในวัคซีนไม่เกิน 10% และ
จำนวน 44 รุ่นการผลิต (40.37%) ที่ผลิตในปี พ.ศ. 2560,
2562 และ 2564 มีปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II
ในวัคซีนเกิน 10% ดังแสดงในภาพที่ 5

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสายพันธุ์ย่อย
subtype II กับความแรงของวัคซีนบีซีจี

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ จำนวน 62 รุ่น
การผลิต ที่ผ่านการตรวจสอบทั้งปริมาณสายพันธุ์ย่อย
subtype II และความแรง ด้วยสถิติสหสัมพันธ์เพียร์สัน
(Pearson's correlation) พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น
95% มีค่า r เท่ากับ -0.287 ซึ่งมีค่าต่ำมาก แสดงว่าไม่มี
ความสัมพันธ์กันแต่มีแนวโน้มแปรผกผันกัน ดังแสดงใน
ภาพที่ 6 กล่าวคือหากวัคซีนบีซีจีมีปริมาณสายพันธุ์ย่อย
subtype II สูงขึ้น จะมีแนวโน้มทำให้ค่าความแรงของ
วัคซีนลดต่ำลง แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความ
เชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 5 การตรวจหาสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 โดยวิธี real time-PCR ในวัคซีนบีซีจี



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II กับความแรงของวัคซีนบีซีจี

วิจารณ์

วัคซีนบีซีจีมีการใช้งานมานานกว่า 80 ปี และบรรจุในแผนงานการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันแห่งชาติตั้งแต่ปี พ.ศ. 2520⁽³⁾ เป็นวัคซีนทั้งแบบที่ผลิตภายในประเทศและแบบนำเข้าโดยหน่วยงานต่างๆ จึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบคุณภาพเพื่อรับรองรุ่นการผลิตก่อนจำหน่ายทุกครั้ง สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ดำเนินการรับรองรุ่นการผลิตมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541 โดยกระบวนการตรวจสอบคุณภาพเพื่อรับรองรุ่นการผลิตสำหรับวัคซีนนำเข้า โดยพิจารณาเอกสารสรุปกระบวนการผลิตและการควบคุมคุณภาพของผู้ผลิตร่วมกับผลการตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพโดยสถาบันชีววัตถุ ส่วนวัคซีนที่ผลิตในประเทศพิจารณาเอกสารสรุปกระบวนการผลิตและการควบคุมคุณภาพของผู้ผลิต ร่วมกับผลการตรวจวิเคราะห์โดยสถาบันชีววัตถุตามรายการทดสอบที่ระบุในข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ สำหรับวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย เป็นวัคซีนที่ผลิตในประเทศ จึงมีการตรวจสอบคุณภาพเพื่อรับรองรุ่นการผลิตตามเกณฑ์ที่ระบุข้างต้น การศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาในวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 จำนวน 133 รุ่นการผลิต ผลการพิจารณาเอกสารสรุปกระบวนการผลิต พบว่าทุกรุ่นการผลิตมีการผลิตและการควบคุมคุณภาพเป็นไปตามมาตรฐานตามที่ได้รับ การขึ้นทะเบียนไว้ นอกจากนี้ผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการโดยสถาบันชีววัตถุ ประกอบด้วย การตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ ปริมาณความชื้น เอกลักษณ์ ความแรง และความคงตัวของวัคซีน พบว่ามีคุณภาพและความปลอดภัยผ่านเกณฑ์การยอมรับของผลิตภัณฑ์ทุกรุ่นการผลิต ในปี พ.ศ. 2564 ไม่มีการตรวจปริมาณความชื้นเนื่องจากสถานการณ์โควิด 19 และตั้งแต่มิถุนายน พ.ศ. 2562 มีการปรับความถี่การตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างส่งตรวจเพื่อขอรับรองรุ่นการผลิตในการตรวจวิเคราะห์ความแรงและความคงตัว เนื่องจากผลการตรวจวิเคราะห์โดยสถาบันชีววัตถุที่ผ่านมาไม่มีความสม่ำเสมอและมีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ เมื่อนำค่าของผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทั้งของสถาบันชีววัตถุและผู้ผลิตที่ระบุอยู่ในเอกสารสรุปกระบวนการผลิต

มาวิเคราะห์แนวโน้มของผลิตภัณฑ์ (trend analysis) พบว่าปริมาณความชื้น ความแรง และความคงตัวของวัคซีน ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงค่าเฉลี่ย $\pm 3SD$ สำหรับบางรุ่นการผลิตมีค่าอยู่นอกช่วงค่าเฉลี่ย $\pm 3SD$ แต่ยังอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของผลิตภัณฑ์และมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก⁽¹²⁾ คือ ปริมาณความชื้นมีค่าไม่เกิน 3% ความแรงมีค่าอยู่ระหว่าง $2-26 \times 10^6$ CFU/mL และความคงตัวมีค่า $\geq 20\%$ ของเชื้อที่รอดชีวิต จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย มีคุณภาพสม่ำเสมอ

การตรวจหาสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 โดยวิธี real time-PCR เพื่อติดตามปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II ในวัคซีน พบว่าส่วนใหญ่มีปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II ไม่เกิน 10% และบางรุ่นการผลิตมีปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II มากกว่า 10% เช่นเดียวกับผลการตรวจหาสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG ในวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ในปี พ.ศ. 2555, 2557 และ 2558 โดยวิริยามัตย์ เจริญคุณธรรม และคณะ⁽¹¹⁾ ที่ตรวจปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II ได้สูงสุดที่ประมาณ 15% อีกทั้งพบว่าบางรุ่นการผลิตของวัคซีนที่ผลิตในปี พ.ศ. 2560 และ 2562 มีปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II มากกว่า 10% เปรียบเทียบกับวัคซีนที่ผลิตจากต่างประเทศที่มีความแปรผันของสายพันธุ์ย่อย เช่น วัคซีนบีซีจีของประเทศญี่ปุ่นมีปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II ไม่เกิน 5% ขณะที่วัคซีนจากประเทศไต้หวันมีปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II ประมาณ 40%⁽¹⁰⁾ ซึ่งความแปรผันของปริมาณสายพันธุ์ย่อยในวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย อาจเกิดจากขั้นตอนการเลือกลักษณะโคลนของเชื้อเพื่อนำไปใช้เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในกระบวนการผลิตวัคซีน⁽¹¹⁾ ปัจจุบันไม่มีการรายงานอาการไม่พึงประสงค์ภายหลังได้รับวัคซีนบีซีจีในรุ่นการผลิตที่มีปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II มากกว่า 10% จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II กับความแรงของวัคซีนบีซีจีที่ตรวจโดยสถาบันชีววัตถุด้วยสถิติสหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson's correlation)

พบว่าความเชื่อมั่น 95% มีค่า r เท่ากับ -0.287 ซึ่งมีค่าต่ำมาก แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์กันแต่มีแนวโน้มแปรผกผัน พบงานวิจัยที่รายงานว่าสายพันธุ์ย่อย subtype I มีความสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในอวัยวะหนุทตลงได้ดีกว่าสายพันธุ์ย่อย subtype II^(13,14) แต่เนื่องจากปริมาณสายพันธุ์ย่อยในวัคซีนไม่ได้กำหนดให้ตรวจในการตรวจสอบคุณภาพของวัคซีนบีซีจีตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก และผลการตรวจสอบคุณภาพของวัคซีนบีซีจีตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลกผ่านเกณฑ์การยอมรับของผลิตภัณฑ์ทุกรุ่นการผลิต แสดงว่าวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย มีคุณภาพและความปลอดภัย สามารถนำไปใช้ในการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคในเด็กแรกเกิดได้ ผลวิเคราะห์ที่พบความแปรผันของอัตราส่วนสายพันธุ์ย่อยดังกล่าวจึงเป็นข้อมูลให้ผู้ผลิตเพิ่มความเข้มงวดในการเลือกลักษณะโคโลนีของเชื้อเพื่อนำไปใช้เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในกระบวนการผลิตวัคซีนต่อไป

สรุป

คุณภาพของวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 จำนวน 133 รุ่นการผลิต จากการพิจารณาเอกสารสรุปกระบวนการผลิตของผู้ผลิตและผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ สถาบันชีววัตถุ ประกอบด้วย การตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ ปริมาณความชื้น เอกลักษณะความแรง และความคงตัวของวัคซีน มีคุณภาพตามเกณฑ์การทดสอบทุกรายการ ซึ่งแสดงว่าวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย มีคุณภาพและความปลอดภัย สามารถนำไปใช้ในการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคในเด็กแรกเกิดได้ และการตรวจหาสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 โดยวิธี real time-PCR พบว่าวัคซีนบีซีจีที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 มีปริมาณสายพันธุ์ย่อย subtype II ส่วนใหญ่ไม่เกิน 10%

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นสพ.กรพงศ์ ภิญโญสุ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ สถาบันชีววัตถุ ที่ให้คำแนะนำการคำนวณทางสถิติ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สถาบันชีววัตถุที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบคุณภาพวัคซีนบีซีจี การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี และการตรวจหาสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 โดยวิธี real time-PCR จนสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. กฎกระทรวงว่าด้วยการรับรองรุ่นการผลิตยาแผนปัจจุบันที่เป็นยาชีววัตถุ พ.ศ. 2553. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 127 ตอนที่ 66 ก (วันที่ 3 พฤศจิกายน 2553). หน้า 7.
2. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์และวิธีการขอรับหนังสือรับรองรุ่นการผลิตยาชีววัตถุ และกำหนดแบบคำขอและแบบหนังสือรับรองรุ่นการผลิตยาชีววัตถุ. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 131 ตอนพิเศษ 216 ง (วันที่ 29 ตุลาคม 2557). หน้า 50.
3. กุลกัญญา โชคไพบูลย์กิจ, เกษวดี ลาภพระ, จุฑารัตน์ เมฆมัลลิกา, จิตติร นาคบุญนำ, อัจฉรา ตั้งสถาพรพงษ์, บรรณาธิการ. การขยายการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค (Expanded Program on Immunization, EPI). ใน: ตำราวัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคปี 2556. นนทบุรี: สำนักโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรค; 2556. หน้า 15–16.
4. Cernuschi T, Malvoti S, Nickels E, Friede M. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine: a global assessment of demand and supply balance. Vaccine 2018; 36(4): 498–506.
5. คณะศึกษาดูงานศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการผลิตและควบคุมคุณภาพวัคซีนบีซีจี. เอกสารรายงานการหาสาเหตุและแก้ไขปัญหากการเกิดอาการข้างเคียงหลังได้รับวัคซีนบีซีจีของประเทศ. วันที่ 1–2 มิถุนายน 2560. กรุงเทพฯ: Japan BCG Laboratory; 2560.
6. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 1. กรุงเทพฯ: FULL FORSE; 2558.

7. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 2. กรุงเทพฯ: FULL FORSE; 2558.
8. กระทรวงสาธารณสุข. ข้อกำหนดชีววัตถุ เล่ม 1. นนทบุรี: เอสอาร์พรีนติ้ง แมสโปรดักส์; 2541.
9. เอกสารรายงานการประชุมหรือโครงการวิจัยและพัฒนาเกี่ยวกับวัคซีนบีซีจี. วันที่ 3 พฤษภาคม 2559. นนทบุรี: สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข; 2559.
10. Wada T, Maruyama F, Iwamoto T, Maeda S, Yamamoto T, Nakagawa I, et al. Deep sequencing analysis of the heterogeneity of seed and commercial lots of the bacillus Calmette-Guérin (BCG) tuberculosis vaccine substrain Tokyo-172. *Sci Rep* 2015; 5: 17827. (9 pages).
11. วิริยามัตย์ เจริญคุณธรรม, สมปอง ทรัพย์สุทธิภาสณ, นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา, สุภาพร ภูมิอมร. การตรวจสอบสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 ในวัคซีนป้องกันวัณโรคที่ผลิตในประเทศไทย โดยวิธี Real-Time PCR. ว. กรมวิทย พ [วารสารออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 16 ก.พ. 2566]; 61(1): [17 หน้า]. เข้าถึงจาก: URL: <https://he02.tci-thaijo.org/index.php/dmssc/article/view/240888/164170>.
12. World Health Organization. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccine. WHO Technical report series 2013; 979: 137-85.
13. Honda I, Seki M, Ikeda N, Yamamoto S, Yano I, Koyama A, et al. Identification of two subpopulations of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tokyo172 substrain with different RD16 regions. *Vaccine* 2006; 24(23): 4969-74.
14. Gheorghiu M, Lagrange PH. Viability, heat stability and immunogenicity of four BCG vaccines prepared from four different BCG strains. *Ann Immunol (Inst Pasteur)* 1983; 134(1): 125-47

Quality Assessment and Subtype Monitoring of BCG Tokyo 172-1 Vaccine Produced by Queen Saovabha Memorial Institute During 2015–2021

Chonlada Petthai¹, Supaporn Chumpol,¹ Sukanlayanee Chaimee,¹
Apichai Supasansatorn,¹ and Supaporn Phumiamorn²

¹ Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

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

ABSTRACT BCG vaccine has been included in Thailand's Expanded Program on Immunization (EPI) for all Thai newborns. Therefore, quality control must be determined in every production batch to ensure the quality and efficacy of the vaccines. The quality assessment and safety of BCG Tokyo 172-1 vaccine were investigated on 133 lots of vaccines manufactured by Queen Saovabha Memorial Institute during 2015–2021. The testing results of appearance, identity, moisture content, potency and stability revealed that all lots of BCG vaccines met the product specifications and the standard requirements of the World Health Organization. In addition, the subpopulations monitoring of BCG Tokyo 172-1 vaccine were investigated on 109 lots and the results revealed that 65 lots (59.63%) contained less than 10% of BCG subtype II, whereas 44 lots (40.37%) contained more than 10% of BCG subtype II. These results compared with the BCG vaccine manufactured by Japan, which contained no more than 5% of BCG subtype II, and the vaccine manufactured by Taiwan, contained 40% of BCG subtype II. The correlation between the potency test and %BCG subtype II was analyzed, the results presented that the data has a very low value ($r = -0.287$) at 95% confidence level, revealing no correlation. Although, the trend varied inversely, there was no effect on the quality of the BCG vaccine because the testing results met the product specification. This study can be used as a guideline for further improving quality in the manufacturing of BCG vaccines used in the country.

Keywords: BCG vaccine, Quality control of vaccine, BCG Tokyo 172-1

การผลิต Pseudovirion ของ HPV สายพันธุ์ 16 เพื่อการพัฒนาวิธี Pseudovirion-Based Neutralization Assay (PBNA)

วิภาวี วงศ์ชนะ¹ สกลิน ไตรศิริวานิชย์¹ และ สุภาพร ภูมิอมร²

¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

²สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ การติดเชื้อ human papillomavirus (HPV) มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปากมดลูก มาตรการในการลดความเสี่ยง คือ การฉีดวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อ HPV ทั้งนี้วิธี pseudovirion-based neutralization assay (PBNA) ถูกนำมาใช้ในการทดสอบระดับ neutralizing antibody ในผู้รับวัคซีน บทความนี้รายงานการผลิต pseudovirion สายพันธุ์ 16 (HPV-16 pseudovirion) ซึ่งได้รับการถ่ายทอดวิธีการจาก National Institutes for Food and Drug Control (NIFDC) สาธารณรัฐประชาชนจีน โดยพบว่าหลังเหนี่ยวนำพลาสมิด p16sheLL และ pcDNA3.1 eGFP เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT สามารถผลิต pseudovirion ที่มีโปรตีนเรืองแสง eGFP ได้ภายใน 48 ชั่วโมง และสามารถติดเชื้อเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ได้ เมื่อนับเซลล์เรืองแสงด้วยเครื่อง ELSPOT จะได้ระดับไตเตอร์ของ pseudovirion ที่ทำให้เซลล์เรืองแสง 300 เซลล์ ต่อ 0.1 มิลลิลิตร เป็น 4.37 ค่าความเชื่อใจที่สามารถนำไปใช้ในการทดสอบ PBNA ได้เท่ากับ 11,771 เท่า และมีระดับไตเตอร์ที่ทำให้ร้อยละ 50 ของเซลล์มีการติดเชื้อ (TCID₅₀) ต่อ 0.1 มิลลิลิตร เป็น 6.67 ค่าความเชื่อใจที่สามารถใช้ในการทดสอบ PBNA เป็น 11,585 เท่า สรุปว่าวิธีนี้สามารถนำมาใช้ในการผลิต HPV-16 pseudovirion ที่สามารถทำให้เซลล์ติดเชื้อและคำนวณค่าไตเตอร์ได้ การผลิต HPV-16 pseudovirion จึงเป็นต้นแบบในการผลิต pseudovirion ของ HPV สายพันธุ์อื่น รวมทั้งใช้ถ่ายทอดองค์ความรู้ให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตและพัฒนาวัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูกต่อไป

คำสำคัญ: การผลิต pseudovirion ของ HPV สายพันธุ์ 16 , การเหนี่ยวนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์, Pseudovirion-based neutralization assay (PBNA)

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

Received: 26 July 2023

Revised: 27 March 2024

Accepted: 24 April 2024

บทนำ

human papillomavirus (HPV) เป็นไวรัสที่ไม่มีเปลือกหุ้ม (non-enveloped virus) มีสารพันธุกรรมชนิด DNA อยู่ภายในโปรตีนห่อหุ้ม (capsid protein) ซึ่งประกอบด้วย โปรตีน L1 เป็น major capsid protein มีปริมาณร้อยละ 80 ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด และโปรตีน L2 เป็น minor capsid protein ซึ่งมีบทบาทในการทำให้เซลล์เกิดการติดเชื้อ โดยโปรตีน L1 และ L2 ทำหน้าที่ร่วมกันในการห่อหุ้ม (encapsidate) สารพันธุกรรมของไวรัสไว⁽¹⁾ มีงานวิจัยพบว่าอุบัติการณ์เกิดมะเร็งหลายชนิดสัมพันธ์กับการติดเชื้อ HPV เช่น มะเร็งปากมดลูกและมะเร็งปากช่องคลอด เป็นต้น⁽²⁾ เชื้อ HPV มีมากกว่า 200 สายพันธุ์ เป็นกลุ่ม high risk ที่สัมพันธ์กับมะเร็งปากมดลูก 14 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66, 68 และ 70 และกลุ่ม low risk ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปากมดลูกต่ำ เช่น สายพันธุ์ 6, 11, 42, 43 และ 44^(2,3) ปัจจุบันการเฝ้าระวังมะเร็งปากมดลูกใช้การตรวจคัดกรองการติดเชื้อ HPV บริเวณปากมดลูก และการป้องกันโดยการฉีดวัคซีน⁽⁴⁾

มีงานวิจัยพบว่าโปรตีน L1 สามารถประกอบตัวเอง (self-assemble) เป็นอนุภาคคล้ายไวรัส (virus-like particles; VLPs) ได้^(1,5) ซึ่ง VLPs มีโครงสร้างเหมือนกับเชื้อ HPV ต้นแบบและสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ HPV ทำให้มีการพัฒนาการผลิตวัคซีนชนิด VLPs สำหรับป้องกันมะเร็งปากมดลูกขึ้น เมื่อฉีดวัคซีนดังกล่าวเข้ากล้ามเนื้อ จะสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง neutralizing antibody ต่อเชื้อ HPV สายพันธุ์ที่นำมาผลิตวัคซีนได้⁽⁵⁾ ปัจจุบันทั่วโลกมีวัคซีนมะเร็งปากมดลูกชนิด VLPs 3 แบบ ได้แก่ แบบ 2 สายพันธุ์ คือ 16 และ 18 แบบ 4 สายพันธุ์ คือ 6, 11, 16 และ 18 และแบบ 9 สายพันธุ์ คือ 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 และ 58⁽⁶⁾

การติดตามผลหลังจากการฉีดวัคซีนมะเร็งปากมดลูก จำเป็นต้องมีการประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะการวิเคราะห์ neutralizing antibody แต่เนื่องจากเชื้อ HPV ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงได้^(7,8) ทำให้ไม่สามารถใช้วิธีการตรวจ

neutralizing antibody ที่ใช้ไวรัสจริง จึงมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ antibody-mediated neutralization ที่ไม่ใช้ไวรัสจริงขึ้นหลายวิธี⁽⁹⁾ วิธีที่นิยมคือ pseudovirion-based neutralization assay (PBNA) ที่สามารถประยุกต์เข้ากับเครื่องมือชนิด high-throughput ในการตรวจ neutralizing antibody ต่อหลายสายพันธุ์ได้พร้อมๆ กัน⁽¹⁰⁻¹²⁾ โดยใช้ pseudovirion ของแต่ละสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนติดตาม (reporter protein) เพื่อบ่งชี้ความสามารถการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงได้⁽¹³⁻¹⁵⁾

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวัคซีนแห่งชาติเพื่อรับการถ่ายทอดเทคโนโลยีจาก National Institutes for Food and Drug Control (NIFDC) สาธารณรัฐประชาชนจีน ในการผลิต HPV-16 pseudovirion สำหรับนำมาใช้ในการทดสอบ neutralizing antibody โดยวิธี PBNA^(13,14) HPV-pseudovirion เตรียมได้จากการเหนี่ยวนำ packaging plasmid ชนิด p16sheLL ที่มีชิ้นส่วนยีน capsid ได้แก่ L1 และ L2 ของเชื้อ HPV สายพันธุ์ 16 และ reporter plasmid ชนิด pCDNA3.1 eGFP ที่มีชิ้นส่วนยีนโปรตีนเรืองแสง ในพลาสมิด pCDNA3.1 vector เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง⁽¹⁰⁾ ทั้งนี้ HPV-pseudovirion ที่ได้มีคุณสมบัติทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงติดเชื้อเหมือน HPV ตามธรรมชาติแต่ไม่สามารถก่อโรค เนื่องจากไม่มีองค์ประกอบสารพันธุกรรมที่เป็นจีโนมของไวรัส เมื่อนำซีรัมของผู้ที่ได้รับวัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูกที่ระดับเจือจางต่างๆ (titer) มาบ่มกับ pseudovirion จะสามารถหาระดับของ neutralizing antibody ที่ทำให้ pseudovirion หมดความสามารถในการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงได้

บทความนี้เป็นรายงานการผลิต HPV-16 pseudovirion และการวิเคราะห์ระดับไตเตอร์ของ pseudovirion ตามวิธีที่ได้รับการถ่ายทอดเทคโนโลยีที่แสดงถึงความสำเร็จในการผลิต HPV-16 pseudovirion สามารถใช้วิธีการนี้เป็นต้นแบบสำหรับการนำไปสู่การขยายผลเพื่อผลิต HPV-pseudovirion สายพันธุ์อื่น และถ่ายทอดองค์ความรู้ให้ผู้ผลิตในประเทศหรือนักวิจัยสำหรับสนับสนุนงานวิจัยและรองรับการผลิตวัคซีนมะเร็งปากมดลูกภายในประเทศไทยต่อไป

วัสดุและวิธีการ

เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT และอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์

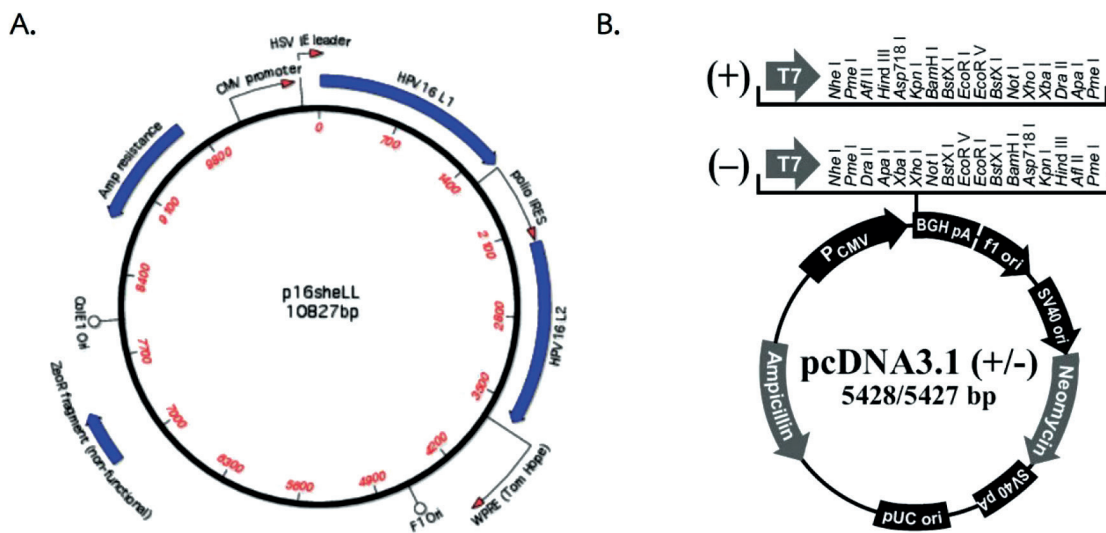
เพาะเลี้ยงเซลล์ 293FT (Invitrogen, USA) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM high/glucose (Gibco, USA) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine Serum (FBS) (Gibco, USA) 1% non-essential amino acid (NEAA) (Gibco, USA) 1% penicillin/streptomycin (Gibco, USA) และ 2% HEPES (Gibco, USA) ในการทำให้เซลล์หลุดออกจากภาชนะเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนหรือนำไปใช้กระบวนการผลิต HPV pseudovirion ใช้ 0.05% trypsin-EDTA (Gibco, USA) และ phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco, USA)

พลาสมิด (plasmid)

packaging plasmid (p16sheLL) มีชิ้นส่วนยีน *HPV16-L1/L2* (ID. No. 37320, Addgene, USA)

reporter plasmid (pcDNA3.1 eGFP) ขนาด 6,148 bp.⁽¹⁰⁾ มีชิ้นของโปรตีนเรืองแสง enhanced green fluorescence protein (*EGFP* gene) แทรกใน pcDNA3.1 vector โดย reporter plasmid ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยงาน NIFDC สาธารณรัฐประชาชนจีน (NIFDC, China)

การเพิ่มจำนวนพลาสมิดทำโดยการนำพลาสมิดเข้าสู่ *E.coli* TOP10 competent cells (Thermo-Fisher Scientific, USA) นำโคลนนี้แบคทีเรียที่ได้มาสกัดพลาสมิดด้วยชุด QIAprep Miniprep (Qiagen) และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HPV16L1* ที่บรรจุอยู่ในพลาสมิด ด้วย BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยใช้ CMV promoter primer และวิเคราะห์ผลโดยเครื่อง ABI PRISM® 3500xL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, USA)⁽¹⁶⁾ ข้อมูลที่ได้ถูกนำมาเทียบกับข้อมูลของพลาสมิดที่ได้จากผู้ผลิต



ภาพที่ 1 โครงสร้างพลาสมิดที่ใช้ในการผลิต HPV-16 pseudovirion

(A) packaging plasmid (*HPV16-L1/L2*) และ (B) pcDNA3.1 vector

สารเคมีและสารละลาย

OptiMEM (Invitrogen, USA) Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) และ Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Hyclone, USA) ใช้ในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์

benzonase nuclease (Sigma, USA) และ plasmid safe ATP-dependent DNase (Epicentre, USA) 1M (NH₄)₂SO₄ เตรียมโดยเติม 1.3 กรัม (NH₄)₂SO₄ (Sigma, USA) ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร 5M NaCl เตรียมโดยเติม 14.6 กรัม NaCl (Sigma, USA)

ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร 10% Triton $\times$ -100 เตรียมโดยเติม 1.0 มิลลิลิตร Triton $\times$ -100 (Sigma, USA) ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (ใช้ในกระบวนการ maturation)

การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ด้วยกระบวนการ transfection

เพาะเลี้ยงเซลล์ 293FT ความเข้มข้น 4×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ 293FT ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ (รุ่น NU-5510E, NUAIRE, UK) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ให้เซลล์มีความหนาแน่น 40-50% จากนั้นเหนี่ยวนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ โดยก่อนครบเวลา 18 ชั่วโมง เตรียมส่วนผสมในหลอดหมุนเหวี่ยงพลาสติกปราศจากเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด หลอดที่ 1 เติม OptiMEM 1.5 มิลลิลิตร พลาสมิด p16sheLL และพลาสมิด pcDNA3.1 eGFP อย่างละ 12 ไมโครกรัม หลอดที่ 2 เติม OptiMEM 1.5 มิลลิลิตร และ Lipofectamine 2000 ปริมาตร 60 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มส่วนผสมที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาให้เติมส่วนผสมจากหลอดที่ 1 ลงในหลอดที่ 2 ที่ละหยดให้หมด และบ่มต่อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารผสมที่ได้ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่เตรียมไว้ บ่มเซลล์เพาะเลี้ยงดังกล่าวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ 15 มิลลิลิตร แล้วบ่มต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ (รุ่น IAXIO, ZIESS, Germany) ที่กำลังขยาย 5X โดยพิจารณาเซลล์ที่เรืองแสง eGFP ภายใต้ fluorescence (FITC) และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ด้วย brightfield (BF)

การเก็บเกี่ยวเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่มี HPV-16 pseudovirion และทำ maturation

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมดโดยระวังไม่ให้กระทบกับเซลล์ เติม DPBS 10 มิลลิลิตร และ

ดูดขึ้น-ลงเบาๆ เพื่อให้เซลล์ที่เกาะอยู่หลุดจากภาชนะเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์แขวนลอย ย้ายเซลล์ในของเหลวใส่หลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (รุ่น CAX-370, TOMY, JAPAN) บ่มเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 210 g อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งเหลือตะกอนเซลล์มีปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติม DPBS 1.0 มิลลิลิตร แล้วดูดตะกอนเซลล์ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 2.0 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 210 g อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ปรับตะกอนเซลล์ให้มีปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติม DPBS ปริมาตร 195 ไมโครลิตร ตามด้วย 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ปริมาตร 12.6 ไมโครลิตร 10% Triton $\times$ -100 ปริมาตร 25.2 ไมโครลิตร ATP buffer ปริมาตร 20.2 ไมโครลิตร benzonase nuclease buffer ปริมาตร 50.4 ไมโครลิตร benzonase nuclease และ plasmid safe ATP-dependent DNase อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร ได้ปริมาตรสุทธิ 504.4 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำ immature HPV-16 pseudovirion ที่ได้แช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที เติม 5M NaCl ปริมาตร 86 ไมโครลิตร (0.17 เท่าของปริมาตรทั้งหมด) บ่มในน้ำแข็งต่อ เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 g เป็นเวลา 5 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส ซึ่งเป็น mature HPV-16 แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร หลอดละ 25-30 ไมโครลิตร และเก็บที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (FORMATM, Thermo Scientific, USA)

การตรวจหาไตเตอร์ของ HPV-16 pseudovirion

เติมเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่ความเข้มข้น 1.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในเพลทเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม จำนวน 2 เพลท บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนครบเวลาให้เตรียมเพลทเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุมสำหรับการเจือจาง pseudodivirion จำนวน 2 เพลท เติมอาหารสำหรับ

เพาะเลี้ยงเซลล์ 293FT ปริมาตร 120 ไมโครลิตรต่อหลุม ในทุกหลุม จากนั้นนำ mature HPV-16 pseudovirion ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ออกมาละลาย ในน้ำแข็งและเจือจางด้วยอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ 293FT ที่อัตราส่วน 1/100 ในหลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร เติม HPV-16 pseudovirion ที่เจือจางไว้ในคอลัมน์ที่ 2 แถว B-G (6 หลุม) ปริมาตร 120 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วเจือจางต่อแบบ serial 2-fold dilution ในเพลท ที่เตรียมไว้สำหรับเจือจางให้ครบ 2 เพลท ตามแนวคอลัมน์ จะได้ HPV-16 pseudovirion ที่มีค่าการเจือจางตั้งแต่ 1/200 ถึง 1/104,857,600 เท่า นำมาเติมลงในเพลทที่มี เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT บ่มครบ 4 ชั่วโมง ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยเว้นการเติม HPV-16 pseudovirion ในคอลัมน์ 1 และ 12 รวมถึงในแถว A และ H เพื่อ ป้องกันการอ่านผลผิดพลาดจากการระเหยของอาหาร เลี้ยงเซลล์ระหว่างการบ่ม จากนั้นบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์เรืองแสงในแต่ละ ระดับความเจือจางด้วยโปรแกรม ImmunoSpot 7.0.23.2

การคำนวณค่าไตเตอร์ของ HPV-16 pseudovirion

ตามคำแนะนำของ NIFDC กำหนดให้จำนวน เซลล์เรืองแสงที่ 300 เซลล์ ต้องมีค่าไตเตอร์มากกว่า 3.0 จึงเหมาะสมต่อการใช้ทดสอบ PBNA⁽¹³⁾ ทำการนับ

จำนวนเซลล์เรืองแสงในแต่ละระดับความเจือจาง ด้วย โปรแกรม ImmunoSpot 7.0.23.2 ที่ติดตั้งในเครื่องอ่าน ELISPOT (CTL ImmunoSpot®, OH, USA) จากนั้น หาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่า log ของจำนวนเซลล์ เรืองแสงที่ได้กับค่า log ของระดับความเจือจาง นำสมการ ที่ได้จากความสัมพันธ์เชิงเส้นมาหาค่าความเจือจางหรือ ไตเตอร์ที่ทำให้ได้จำนวนเซลล์เรืองแสง 300 เซลล์ โดย การแทนค่า X ในสมการด้วย log 300 ทั้งนี้ค่าไตเตอร์ ที่ได้จากการคำนวณด้วยสมการเชิงเส้นนี้มีหน่วยเป็น log ของเซลล์เรืองแสงที่ 300 เซลล์/0.1 มิลลิลิตร [(log 300 เซลล์)/0.1 มิลลิลิตร] การหาค่าไตเตอร์ของ HPV-16 pseudovirion สามารถคำนวณได้ด้วยวิธี Reed-Muench⁽¹⁰⁾ โดยหาค่าความเจือจางหรือไตเตอร์ที่ทำให้ เซลล์เรืองแสงร้อยละ 50 (logTCID₅₀/0.1 มิลลิลิตร) นำข้อมูลที่ได้จากโปรแกรม ImmunoSpot 7.0.23.2 มานับจำนวนหลุมของแต่ละความเจือจางที่มีจำนวนเซลล์ เรืองแสงมากกว่าหรือเท่ากับ 3 เซลล์ เป็นหลุมที่ให้ผลบวก และน้อยกว่า 3 เซลล์ เป็นหลุมที่ให้ผลลบ หาค่าผล รวมสะสมของหลุมที่ให้ค่าเป็นบวก (sum of positive number; SP) ผลรวมสะสมของหลุมที่ให้ค่าเป็นลบ (sum of negative number; SN) ดังแสดงในตารางที่ 1 และหาค่า upper 0.5 และ lower 0.5 จากค่าคำนวณ ด้วยสูตร SP/(SP+SN) จากนั้นคำนวณโดยใช้สูตร

$$A = (\text{upper } 0.5 - 0.5) / (\text{upper } 0.5 - \text{lower } 0.5),$$

$$\text{LogTCID}_{50}/0.1 \text{ มิลลิลิตร} = \log(\text{dilution}) + A \times \log(2)$$

ตารางที่ 1 จำนวนเซลล์ที่มีเรืองแสงในแต่ละหลุมทดสอบและนับด้วยเครื่อง ELISPOT โดยโปรแกรม ImmunoSpot 7.0.23.2 เพื่อใช้ในการหาค่าไตเตอร์ของ HPV-16 pseudovirion

เพลทที่ 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1/200	1/400	1/800	1/1,600	1/3,200	1/6,400	1/12,800	1/25,600	1/51,200	1/120,400		
A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
B	-1	1,360	1,841	1,753	1,789	1,653	1,131	656	271	141	62	-1
C	-1	1,287	1,530	1,664	1,501	1,533	1,069	579	233	120	67	-1
D	-1	1,298	1,567	1,666	1,633	1,543	1,212	605	255	91	61	-1
E	-1	1,258	1,555	1,670	1,799	1,586	1,273	467	122	113	56	-1
F	-1	1,290	1,586	1,836	1,934	1,764	1,241	660	261	89	68	-1
G	-1	1,353	1,686	1,870	1,975	1,842	1,321	673	307	130	76	-1
H	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

ตารางที่ 1 จำนวนเซลล์ที่มีเรืองแสงในแต่หลุมทดสอบและนับด้วยเครื่อง ELISPOT โดยโปรแกรม ImmunoSpot 7.0.23.2 เพื่อใช้ในการหาค่าไตเตอร์ของ HPV-16 pseudovirion (ต่อ)

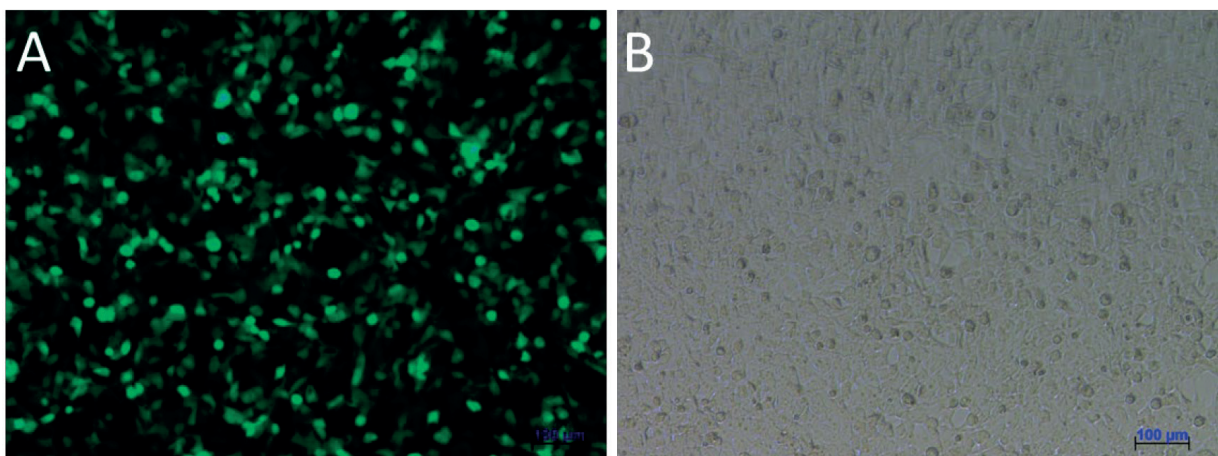
เซลล์	เพลทที่ 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		1/200	1/400	1/800	1/1,600	1/3,200	1/6,400	1/12,800	1/25,600	1/51,200	1/120,400		
↓	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
	B	-1	45	21	10	3	5	3	2	1	1	3	-1
	C	-1	43	11	12	6	2	0	2	0	0	1	-1
	D	-1	33	9	11	3	5	0	0	1	0	2	-1
	E	-1	34	9	4	3	2	1	1	1	0	0	-1
	F	-1	44	18	12	6	3	0	0	2	2	2	-1
	G	-1	45	19	10	9	4	3	1	1	0	1	-1
	H	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

นอกจากค่าไตเตอร์แล้ว สามารถคำนวณค่าเจือจาง (dilution fold) ของ pseudovirion ที่ผลิตได้ เพื่อนำไปใช้ทดสอบ PBNA โดยการคำนวณจากค่าไตเตอร์ต่อปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากการเรืองแสง 300 เซลล์ [(300 เซลล์)/0.05 มิลลิลิตร] หรือคำนวณจาก 200 เท่าของ TCID₅₀ ที่ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร (200TCID₅₀/0.05 มิลลิลิตร) ซึ่งเป็นค่าที่หน่วยงาน NIFDC สาธารณรัฐประชาชนจีน ศึกษาและใช้ในการทดสอบวิธี PBNA เพื่อวิเคราะห์ protective titer ของวัคซีน HPV ที่มีการใช้ในสาธารณรัฐประชาชนจีน⁽¹⁰⁾

ผล

การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ด้วยกระบวนการ **transfection**

หลังนำ packaging plasmid สำหรับผลิต HPV-16 pseudovirion และ reporter plasmid เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT เมื่อครบเวลา 48 ชั่วโมง นำมาตรวจติดตามการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์จาก eGFP ในเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ พบเซลล์เรืองแสง ดังแสดงในภาพที่ 2

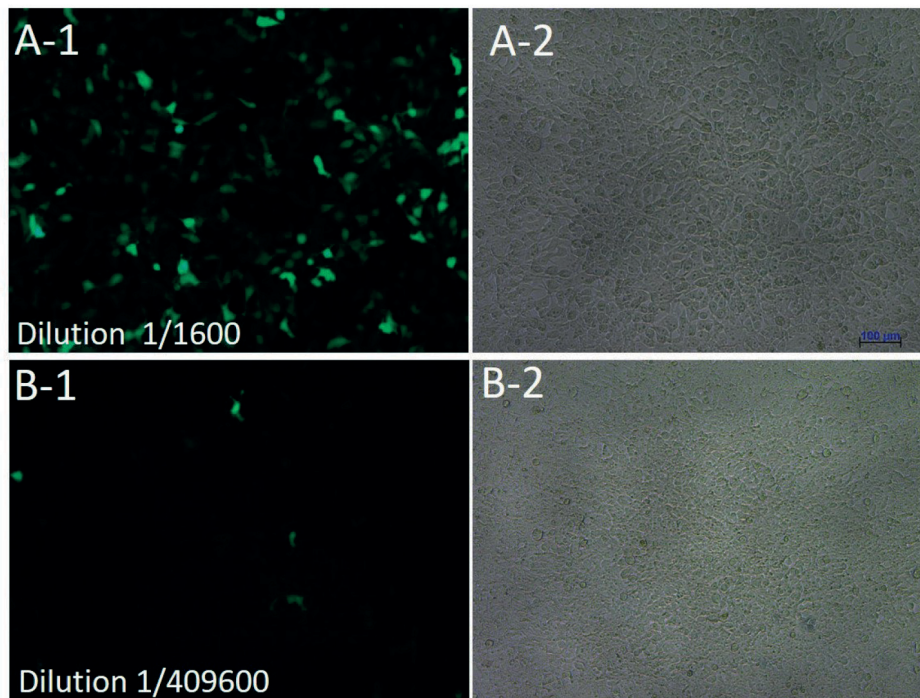


ภาพที่ 2 เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT หลังถูกเหนี่ยวนำด้วย packaging plasmid (HPV16-L1/L2) และ reporter plasmid (eGFP) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์ ภายใต้ (A) fluorescence (FITC) และ (B) brightfield (BF) ที่กำลังขยายเลนส์วัตถุ 5X

HPV-16 pseudovirion ที่ผลิตได้สามารถทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ติดเชื้อ

หลังจากนำ HPV-16 pseudovirion ที่เจือจางแบบ serial 2-fold dilution ตั้งแต่ 1/200 ถึง 1/104,857,600 เท่า มาเติมลงในเซลล์ 293FT โดยไม่มีการเติมน้ำยาสำหรับการ transfection พบว่า pseudovirion ที่ผลิตได้สามารถทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT เรืองแสง ซึ่งเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT เรืองแสงจะมีจำนวนลดน้อยลงเมื่อมีค่าการเจือจางของ pseudovirion

เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นถึงสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ เรืองแสงกับปริมาณ pseudovirion ตัวอย่างเซลล์ เรืองแสงที่ความเจือจางต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 3 เมื่อตรวจติดตามการแสดงออกของ eGFP ในเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนส์ที่เวลา 72 ชั่วโมง เป็นการพิสูจน์ได้ว่ากระบวนการผลิต HPV-16 pseudovirion มีสถานะที่เหมาะสมในการผลิต HPV-pseudovirion ที่มีความสามารถในการทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงติดเชื้อได้

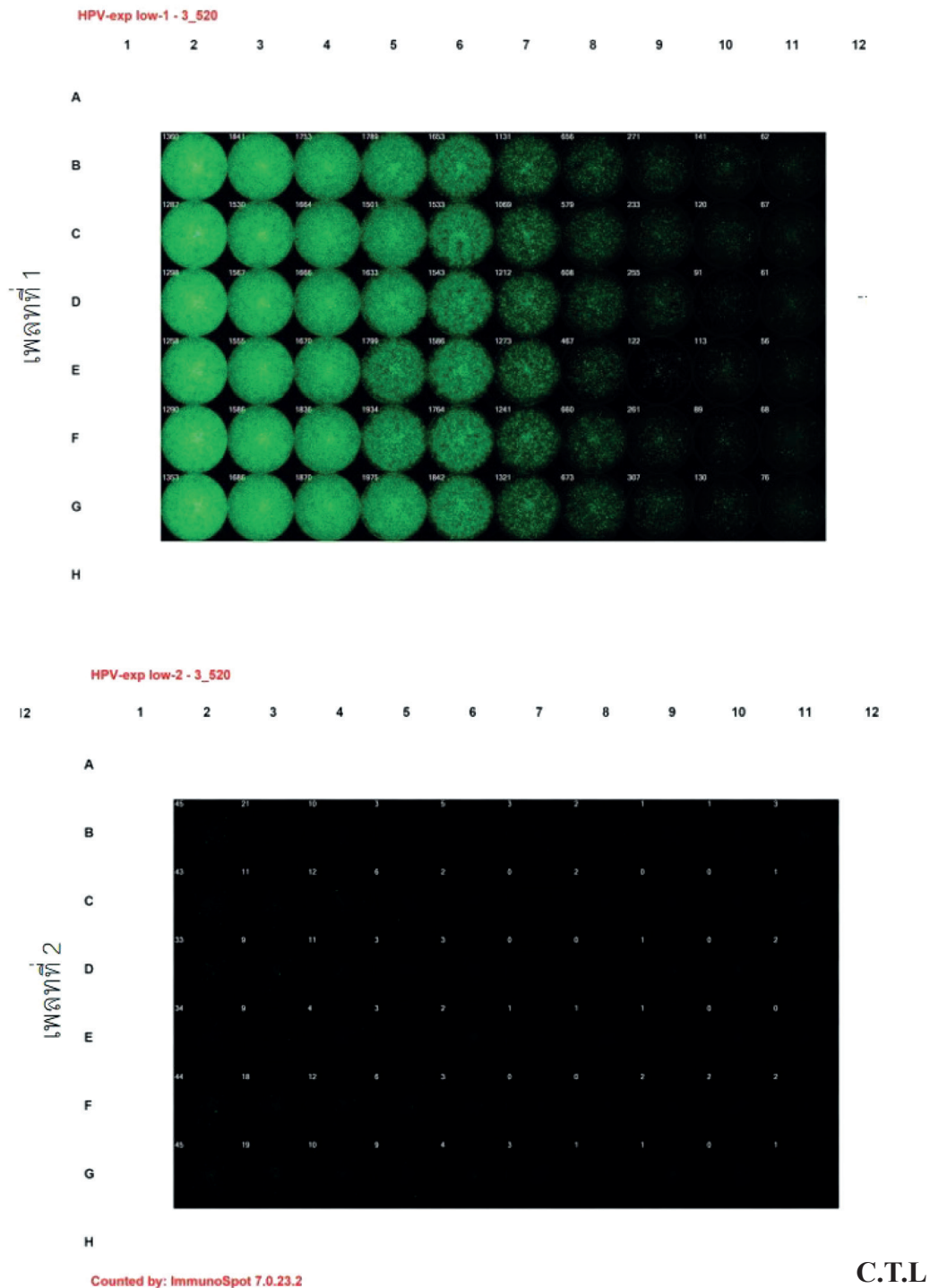


ภาพที่ 3 เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่ติดเชื้อ HPV-16 pseudovirion เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่ระดับความเจือจางของ HPV-16 pseudovirion 1/1,600 และ 1/409,600 เมื่อพิจารณาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนส์ fluorescence (ภาพ A-1 และ B-1) และแบบ brightfield (A-2 และ B-2) ที่กำลังขยายเลนส์วัตถุ 5X

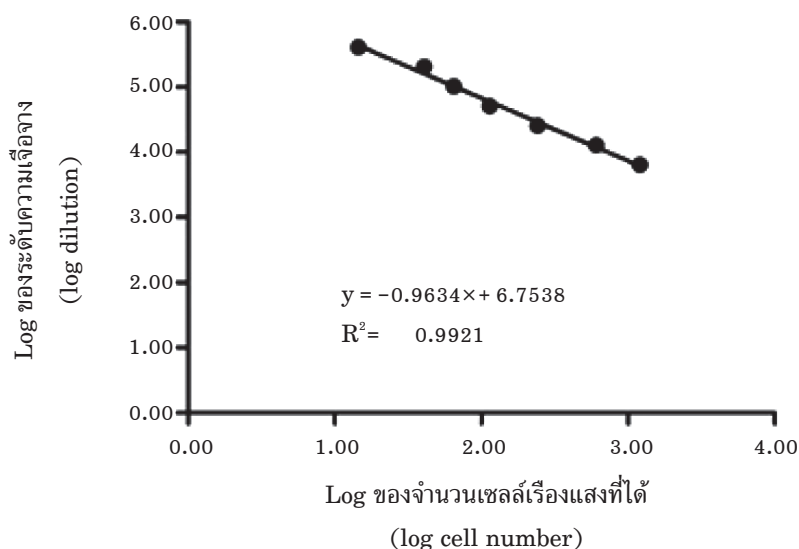
การหาค่าไตเตอร์ของ HPV-16 pseudovirion และการเจือจางที่เหมาะสมของ pseudovirion ที่ผลิตได้เพื่อนำไปใช้ทดสอบ PBNA

จำนวนเซลล์ 293FT เรืองแสงเมื่อติดเชื้อ HPV-16 pseudovirion สามารถทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ELISPOT ดังแสดงในภาพที่ 4 และผลการนับจำนวนเซลล์เรืองแสง ดังแสดงในตารางที่ 1 สามารถนำมาคำนวณหาค่าไตเตอร์ได้จากสมการเส้นตรง ดังแสดงในภาพที่ 5 พบว่า HPV-16 pseudovirion ที่ผลิตได้มีค่าไตเตอร์

[log300 เซลล์]/0.1 มิลลิลิตร เท่ากับ 4.37 มีค่าการเจือจาง (dilution fold)/0.1 มิลลิลิตร คือ 1/23,542 เท่า โดยสามารถเจือจาง pseudovirion ที่ผลิตได้เพื่อนำไปใช้ทดสอบ PBNA เท่ากับ 1/11,771 เท่า ในขณะที่คำนวณค่าไตเตอร์ด้วยวิธี Reed-Muench ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่ามีค่าไตเตอร์ logTCID₅₀/0.1 มิลลิลิตร เท่ากับ 6.67 มีค่าการเจือจาง (dilution fold)/1.0 มิลลิลิตร คือ 1/46,340,950 เท่า และเมื่อรายงานค่าเจือจางตามวิธีการคำนวณของ NIFDC จะมีค่าเท่ากับ 1/11,585 เท่า



ภาพที่ 4 เพลทที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT เรืองแสงเมื่อติดเชื้อ HPV-16 pseudovirion ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เจือจางแบบ 2 เท่า จำนวน 20 ค่า ตั้งแต่ 1/200 ถึง 1/104,857,600 บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อทำการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ด้วยเครื่อง ELISPOT โดยเพลทที่ 1 คอลัมน์ที่ 2-11 แสดงเซลล์เรืองแสงที่ค่าความเจือจางตั้งแต่ 1/200 ถึง 1/102,400 ตามลำดับ และเพลทที่ 2 คอลัมน์ที่ 2-11 แสดงเซลล์เรืองแสงที่ค่าความเจือจางตั้งแต่ 1/204,800 ถึง 1/104,857,600 ตามลำดับ แถว B-G ของเพลทที่ 1 และ 2 เป็นการทำ 6 ซ้ำ ของแต่ละความเจือจาง, คอลัมน์ที่ 1 และ 12 และแถว A และ H ไม่มีเซลล์เพาะเลี้ยง



ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่า log ของจำนวนเซลล์เรืองแสงที่ได้ (log cell number) กับค่า log ของระดับความเจือจาง (log dilution) ของ HPV-16 pseudovirion ที่ผลิตได้จากตารางที่ 1 และการหาค่าการเจือจางสำหรับการทดสอบ PBNA

สมการความสัมพันธ์ $y = -0.9634x + 6.7538$ ที่ $R^2 = 0.9921$ กำหนดให้แทนค่า X ด้วย 2.477121 (= log300) และค่า y คือ log dilution ใช้ในการรายงานค่าไตเตอร์

ตารางที่ 2 การคำนวณค่า $\log_{10} \text{TCID}_{50}/0.1$ มิลลิลิตร โดยวิธี Reed-Muench เพื่อหาค่าไตเตอร์ของ HPV-16 pseudovirion โดยพิจารณาจำนวนเซลล์เรืองแสงที่อ่านได้ด้วยเครื่อง ELISPOT และการหาค่าการเจือจางสำหรับการทดสอบ PBNA

จำนวนเท่าของการเจือจาง	จำนวนเท่าของการเจือจาง (log)	จำนวนหลุมที่แสดงผล		ผลรวมสะสม		SP+SN	SP/(SP+SN)	หมายเหตุ
819,200	5.91	6	0	18	0	18	1	
163,844	6.21	6	0	12	0	12	1	
3,276,800	6.52	4	2	6	2	8	0.750	Upper 0.5
6,553,600	6.82	2	4	2	6	8	0.250	Lower 0.5
13,107,200	7.12	0	6	0	12	12	0.000	
26,214,400	7.42	0	6	0	18	18	0.000	

หมายเหตุ: SP คือ ผลรวมสะสมของหลุมที่ให้ค่าเป็นบวก โดยคิดสะสมจากค่าการเจือจางที่มากที่สุด (ล่างขึ้นบน)
 SN คือ ผลรวมสะสมของหลุมที่ให้ค่าเป็นลบ โดยคิดสะสมจากค่าการเจือจางที่น้อยที่สุด (บนลงล่าง)

วิจารณ์

การผลิตและการหาค่าไตเตอร์ของ HPV-16 pseudovirion พบว่าหลังการเหนี่ยวนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงด้วย lipofectamine สามารถตรวจติดตามการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของโปรตีน eGFP ภายในเซลล์ได้ จากการทดสอบเพิ่มเติมพบว่าเมื่อ

วิเคราะห์เซลล์หลังการเหนี่ยวนำพลาสมิด 48 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง flow cytometer พบเซลล์มากกว่า 80% มีการเรืองแสง eGFP เมื่อเทียบกับเซลล์ 293FT ที่ไม่มีการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ นอกจากนี้พบว่า การเหนี่ยวนำพลาสมิดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ผล

จำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงมีความหนาแน่นที่ประมาณ 60–70% ในขณะเวลาที่เวลา 72 ชั่วโมง เซลล์เพาะเลี้ยงมีความหนาแน่นมากกว่า 99% และเริ่มมีเซลล์ที่หลุดลอยจากพื้นผิวภาชนะ แสดงให้เห็นว่าเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิต HPV-16 pseudovirion คือ 48 ชั่วโมง เนื่องจากจำนวนเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์มีความหนาแน่นที่เหมาะสม คือ ประมาณ 80–90% ตามที่ได้รับการถ่ายทอดวิธีการจาก NIFDC

เมื่อนำ HPV-16 pseudovirion ที่ผลิตได้บ่มกับเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT โดยไม่มีการเติม lipofectamine พบว่า HPV-16 pseudovirion สามารถทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT เรืองแสงได้ แสดงให้เห็นว่ากระบวนการเหนี่ยวนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงทำได้ HPV-16 pseudovirion ที่มี infectivity และสามารถห่อหุ้ม reporter plasmid ที่มียีนของโปรตีนเรืองแสง eGFP เข้าสู่เซลล์ได้ ผลที่ได้เป็นไปตามที่ได้รับการถ่ายทอดวิธีการจาก NIFDC และตามรายงานของ Buck CB และคณะ^(13–15)

เซลล์เรืองแสงสามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ แต่การนับจำนวนเซลล์เรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์มีโอกาสเกิดความผิดพลาดได้มาก เนื่องจากความเข้มของสารเรืองแสงในแต่ละเซลล์มีค่าที่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 2 และกล้องไม่สามารถตั้งค่า cut off ของความเข้มของแสง (intensity) ของโปรตีน eGFP ที่แสดงออกภายในเซลล์ได้ ขณะที่การนับเซลล์เรืองแสงจากเครื่อง ELISPOT ด้วยโปรแกรม ImmunoSpot 7.0.23.2 สามารถตั้งค่าปัจจัยที่มีผลต่อการนับจำนวนของเซลล์เรืองแสงให้เป็นหลักเกณฑ์เดียวกันในทุกการทดสอบได้^(10–12) ซึ่งจะมีผลต่อการคำนวณค่าไตเตอร์ของ pseudovirion ที่ผลิตต่อไปได้ สำหรับการพิจารณาเซลล์เรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ สามารถนำมาคำนวณหาค่าไตเตอร์ด้วยวิธี Reed-Muench แต่ไม่สามารถนำมาคำนวณโดยใช้สมการเส้นตรงเหมือนข้อมูลที่ได้จากเครื่อง ELISPOT เพราะไม่สามารถนับจำนวนเซลล์เรืองแสงในแต่ละความเจือจาง โดยเฉพาะหลุมที่มีปริมาณเซลล์เรืองแสงจำนวนมาก ดังแสดงในภาพที่ 2A พบว่า

ค่าไตเตอร์ $\log TCID_{50}/0.1$ มิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 7.8 และให้ค่าเจือจางเพื่อนำไปใช้ทดสอบ PBNA คือ $1/168,632$ เท่า (ข้อมูลไม่ได้เผยแพร่) ในขณะที่การหาค่าไตเตอร์ด้วยวิธี Reed-Muench ผ่านการวิเคราะห์จากเครื่อง ELISPOT มีค่าไตเตอร์ $\log TCID_{50}/0.1$ มิลลิลิตร เท่ากับ 6.67 ซึ่งค่าเจือจางที่คำนวณได้ คือ $1/11,585$ เท่า ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันประมาณ 15 เท่า ผลจากเครื่อง ELISPOT เมื่อนำมาหาค่าเจือจางสำหรับทดสอบ PBNA ด้วยวิธี Reed-Muench หรือการใช้สมการเส้นตรง พบว่าได้ค่าที่ใกล้เคียงกัน คือ $1/11,585$ เท่า และ $1/11,771$ เท่า ตามลำดับ แสดงว่าการนับจำนวนเซลล์โดยโปรแกรมของเครื่อง ELISPOT แม่นยำมากกว่าการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ และเป็นไปตามคำแนะนำของ NIFDC ดังนั้นในเบื้องต้นจึงนำวิธีการศึกษานี้มาใช้ผลิต HPV-pseudovirion สายพันธุ์ 18 เพิ่มเติม ซึ่งเป็น HPV สายพันธุ์ที่อยู่ในวัคซีนป้องกัน HPV แบบ 2 สายพันธุ์ พบว่าสามารถผลิต pseudovirion ที่มี infectivity ได้เช่นกัน (ข้อมูลไม่ได้เผยแพร่)

ปัจจุบันยังไม่มีตัวอย่าง neutralizing antibody จากการศึกษาทางคลินิกสำหรับนำมาทดสอบร่วมกับ HPV-16 pseudovirion ที่ผลิตขึ้น แต่ได้มีการทดสอบกับแอนติบอดีมาตรฐาน (anti-human papillomavirus type 16 serum (NIBSC 05/134) และแอนติบอดีต่อ HPV-16 จากสัตว์ทดลองที่ได้รับวัคซีน HPV สายพันธุ์ 16 (in-house) ตามวิธีการ NIFDC พบว่า HPV-16 pseudovirion จับกับแอนติบอดีดังกล่าวทำให้เกิด neutralization ได้ (อยู่ระหว่างการเผยแพร่) นอกจากนี้วิธีการผลิต HPV-pseudovirion ได้ถ่ายทอดให้กับผู้ผลิตวัคซีนในประเทศและนักวิจัย เพื่อใช้ในการศึกษาพัฒนาวัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูก สำหรับใช้ในประเทศไทย ตามโครงการถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านการควบคุมคุณภาพวัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธี pseudovirion-based neutralization assay (PBNA) เมื่อปี พ.ศ. 2563 โดยอนาคตหากมีการศึกษาวัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูกทางคลินิก องค์ความรู้ที่ได้จากต้นแบบการผลิต HPV-16 pseudovirion นี้ จะถูกนำมาพัฒนาต่อยอดเพื่อผลิต HPV-pseudovirion

สายพันธุ์อื่นและนำมาใช้ตรวจสอบ protective titer ของผู้ได้รับวัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูกต่อไปได้

สรุป

HPV-16 pseudovirion ที่ผลิตได้ตามวิธีที่ได้รับการถ่ายทอดจากหน่วยงานควบคุมกำกับภาครัฐ ด้านวัคซีนของสาธารณรัฐประชาชนจีน (NIFDC) มีคุณสมบัติทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ติดเชื้อได้โดยมีไคเตอร์ที่สามารถนำมาคำนวณเป็นค่าความเจือจางเพื่อนำไปใช้ทดสอบ PBNA วิธีการผลิตนี้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการผลิต pseudovirion ของ HPV สายพันธุ์อื่น ตลอดจนถ่ายทอดองค์ความรู้วิธีการให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันวัคซีนแห่งชาติ ที่สนับสนุนเงินทุนในโครงการเสริมสร้างศักยภาพของห้องปฏิบัติการในการเตรียม pseudovirions สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดและตรวจวิเคราะห์ความถูกต้องของพลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย ภายใต้โครงการวิจัยเพิ่มศักยภาพและการสนับสนุนอุตสาหกรรมทางการแพทย์ ครอบคลุมและวัคซีน และ Dr. Jianhui Nie จาก Division of HIV/AIDS and Sex-transmitted Virus Vaccines, NIFDC สาธารณรัฐประชาชนจีน ที่อนุเคราะห์ Reporter plasmid (eGFP) รวมทั้งการถ่ายทอดวิธีการผลิต HPV-pseudovirion และให้คำปรึกษาในงานวิจัยนี้สำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Zhang X, Li S, Modis Y, Li Z, Zhang J, Xia N, et al. Functional assessment and structural basis of antibody binding to human papillomavirus capsid. *Rev Med Virol* 2016; 26(2): 115-28.
2. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(1): 1-17.
3. Egawa N, Doorbar J. The low-risk papilloma-viruses. *Virus Res* 2017; 231: 119-27.

4. Brisson M, Kim JJ, Canfell K, Drolet M, Gingras G, Burger EA, et al. Impact of HPV vaccination and cervical screening on cervical cancer elimination: a comparative modelling analysis in 78 low-income and lower-middle-income countries. *Lancet* 2020; 395(10224): 575-90.
5. Wang JW, Roden RB. Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus-associated malignancies. *Expert Rev Vaccines* 2013; 12(2): 129-41.
6. Yang DY, Bracken K. Update on the new 9-valent vaccine for human papillomavirus prevention. *Can Fam Physician* 2016; 62(5): 399-402.
7. Ma B, Roden RB, Hung CF, Wu TC. HPV pseudovirions as DNA delivery vehicles. *Ther Deliv* 2011; 2(4): 427-30.
8. Biryukov J, Meyers C. Papillomavirus infectious pathways: a comparison of systems. *Viruses* 2015; 7(8): 4303-25.
9. Tsang SH, Basu P, Bender N, Herrero R, Kemp TJ, Kreimer AR, et al. Evaluation of serological assays to monitor antibody responses to single-dose HPV vaccines. *Vaccine* 2020; 38(38): 5997-6006.
10. Nie J, Liu Y, Huang W, Wang Y. Development of a triple-color pseudovirion-based assay to detect neutralizing antibodies against human papillomavirus. *Viruses* 2016; 8(4): 107. (12 pages).
11. Sehr P, Rubio I, Seitz H, Putzker K, Ribeiro-Müller L, Pawlita M, et al. High-throughput pseudovirion-based neutralization assay for analysis of natural and vaccine-induced antibodies against human papillomaviruses. *PLoS One* 2013; 8(10): e75677. (11 pages).
12. Nie J, Huang W, Wu X, Wang Y. Optimization and validation of a high throughput method for detecting neutralizing antibodies against human papillomavirus (HPV) based on pseudovirions. *J Med Virol* 2014; 86(9): 1542-55.

13. Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays. *Methods Mol Med* 2005; 119: 445-62.
14. Buck CB, Thompson CD, Pang YY, Lowy DR, Schiller JT. Maturation of papillomavirus capsids. *J Virol* 2005; 79(5): 2839-46.
15. Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. Efficient intracellular assembly of papilloma-viral vectors. *J Virol* 2004; 78(2): 751-7.
16. Prachasuphap A, Jongpitisub K, Saengtong N, Treeyoung P, Chaiya P, Dhepakson P. Cloning and expression of human monoclonal antibody with potent binding to 2019 novel coronavirus. *Bull Dept Med Sci* 2020; 62(3): 155-66.

The Production of HPV Type 16 Pseudovirion for the Development of Pseudovirion-Based Neutralization Assay (PBNA)

Wipawee Wongchana¹, Sakalin Trisiriwanic¹, and Supaporn Phumiamorn²

¹ *Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand*

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

ABSTRACT Human papillomavirus (HPV) is implicated in the majority of cervical cancer cases, which vaccination being a crucial method for preventing infection. The pseudovirion-based neutralization assay (PBNA) has been employed to determine the neutralizing antibody levels in HPV-vaccine immunized recipients. This article introduced the product of HPV-pseudovirion serotype 16 (HPV-16 pseudovirion), a technique transferred from the protocol established by the National Institutes for Food and Drug Control (NIFDC), China. Results following the transfection of p16sheLL and pcDNA3.1 eGFP plasmids into 293FT cell lines showed the production of pseudovirion containing the eGFP protein within 48 hours, with infectivity observed on the 293FT cell line. Fluoresced cells were counted using ELIPOT. The calculated pseudovirion titer, based on 300 eGFP-positive cells per 0.1 milliliter, was 4.37, with a dilution factor of 11,771 for PBNA. Additionally, the pseudovirion titer examined through TCID₅₀ per 0.1 milliliter was 6.67, with a dilution factor of 11,585 for PBNA. Overall, the adopted method successfully produced HPV-16 pseudovirion, serving as a prototype for producing other HPV-pseudovirion serotypes and facilitating their transfer to relevant agencies to support the HPV vaccination campaign

Keywords: HPV-16 pseudovirion production, Plasmid transfection, Pseudovirion-based neutralization assay (PBNA)

สมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนของ อาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน

ณัฐธิดา พงษ์กานนท์¹ และ ยุทธนา แยกคาย²

¹ กลุ่มงานคุ้มครองผู้บริโภคและเภสัชสาธารณสุข สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสุโขทัย สุโขทัย 64000

² วิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร จังหวัดพิษณุโลก คณะสาธารณสุขศาสตร์และสหเวชศาสตร์ สถาบันพระบรมราชชนก
พิษณุโลก 65130

บทคัดย่อ สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสุโขทัย ได้พัฒนาอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน (อสม.) วิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2558 ถึงปัจจุบัน ตามแนวทางของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเสริมสร้างความเข้มแข็งและเพิ่มบทบาทให้ภาคประชาชนในการเป็นผู้นำองค์ความรู้และเทคโนโลยีด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชน เพื่อการคุ้มครองผู้บริโภคและการจัดการสุขภาพในชุมชน รวมถึงการชันสูตรโรคเบื้องต้น การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนามีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนของ อสม. โดยการใช้การประเมินของบุคลากรด้านสุขภาพ จังหวัดสุโขทัย จำนวน 64 คน และ อสม. จังหวัดสุโขทัย จำนวน 64 คน ด้วยแบบสอบถาม เพื่อเก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้สถิติการแจกแจงความถี่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน Paired sample's t-test และ Independent sample's t-test ผลการวิจัยพบว่า อสม. มีสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่คาดหวังอยู่ในระดับมากที่สุด และสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่มีอยู่จริงอยู่ในระดับมาก อสม. มีสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่คาดหวังสูงกว่าสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่มีอยู่จริง และกลุ่ม อสม. ประเมินสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่คาดหวังและสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่มีอยู่จริงสูงกว่ากลุ่มบุคลากรด้านสุขภาพ ดังนั้นหน่วยงานที่เกี่ยวข้องควรฝึกอบรมพัฒนาศักยภาพสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนของ อสม. ให้สามารถปฏิบัติงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนได้อย่างมีประสิทธิภาพและประสิทธิผลมากยิ่งขึ้น

คำสำคัญ: สมรรถนะ, วิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชน, อาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน

Corresponding author E-mail: yutthanaya@scphpl.ac.th

Received: 10 October 2023

Revised: 13 March 2024

Accepted: 24 April 2024

จากความสำคัญของปัญหาดังกล่าวข้างต้น
คณะผู้วิจัยได้ประเมินความสอดคล้องของสมรรถนะ

วิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนกับลักษณะการปฏิบัติงาน วิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนของ อสม. เพื่อนำไป ปรับปรุงและพัฒนาการปฏิบัติงาน รวมถึงการพัฒนา ศักยภาพ อสม. ให้มีความรู้ ทักษะ และคุณลักษณะที่ ดีในการปฏิบัติงาน^(2,3) ก่อให้เกิดผลดีต่อการคุ้มครอง ผู้บริโภคและการจัดการสุขภาพในชุมชน ได้แก่ การใช้ ชุดทดสอบและเทคโนโลยีด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ การวิเคราะห์ชั้นสูตรโรคเบื้องต้น และการเฝ้าระวังและ รับเรื่องร้องเรียนปัญหาสุขภาพ เพื่อช่วยลดความเสี่ยง จากการบริโภคผลิตภัณฑ์สุขภาพที่ไม่ปลอดภัย นำไปสู่ การลดขั้นตอนและระยะเวลาในการส่งตรวจยืนยันทาง ห้องปฏิบัติการ ลดความสูญเสียทรัพยากรของประเทศ และเพิ่มศักยภาพของหน่วยบริการสุขภาพปฐมภูมิให้ สามารถบริหารจัดการปัญหาสุขภาพได้เป็นอย่างดี ก่อให้ เกิดองค์ความรู้ใหม่และนวัตกรรมที่มีคุณค่า ตลอดจน การพัฒนาศักยภาพ อสม. วิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชน ให้มีคุณภาพต่อไป⁽⁴⁾ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา และเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับสมรรถนะ วิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่คาดหวังและที่มีอยู่จริง ของ อสม. เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาศักยภาพ ของ อสม. ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (descriptive research) ได้รับการพิจารณาและรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ สำนักงานสาธารณสุข จังหวัดสุโขทัย โครงการเลขที่ COA No. 23/2023 เอกสาร รับรองเลขที่ IRB No. 16/2023 ลงวันที่ 3 พฤษภาคม พ.ศ. 2566 วิธีทบทวนแบบยกเว้น (exemption review)

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

บุคลากรด้านสุขภาพ จังหวัดสุโขทัย จำนวน 3,361 คน⁽⁷⁾ และ อสม. จังหวัดสุโขทัย จำนวน 12,835 คน⁽⁸⁾ ซึ่งคำนวณขนาดตัวอย่างด้วยโปรแกรม G*Power version 3.1.9.4 (Universität Kiel, Germany)⁽⁹⁾ โดยกำหนดให้

test family	=	t-tests
statistical test	=	means: difference between two independent means (two groups)
type of power analysis	=	a priori: compute required sample size-given α , power, and effect size
tail(s)	=	two
effect size d	=	0.50
α err prob	=	0.05
power (1- β err prob)	=	0.80
allocation ratio N2/N1	=	1

ได้ขนาดตัวอย่างเป็นบุคลากรด้านสุขภาพ และ อสม. จำนวน 128 คน แบ่งเป็นกลุ่มบุคลากรด้านสุขภาพ จำนวน 64 คน และกลุ่ม อสม. จำนวน 64 คน ในจำนวน ที่เท่ากันหรือในอัตราส่วน 1:1 เพื่อเพิ่มความแม่นยำ ของผลลัพธ์หรือประสิทธิภาพของการประมาณค่า⁽¹⁰⁾ โดยมีเกณฑ์การคัดเข้า (inclusion criteria) คือ กลุ่มตัวอย่างมีอายุ 20 ปีบริบูรณ์ขึ้นไป ที่ปฏิบัติงาน เกี่ยวกับวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนและยินดีให้ ข้อมูล เกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria) คือ กลุ่มตัวอย่างมีอาการเจ็บป่วยรุนแรง กระทั่งห็น ไม่สามารถ ให้ข้อมูลได้ และปฏิเสธหรือถอนตัวจากโครงการวิจัย ใช้ การสุ่มแบบเป็นระบบ (systematic random sampling technique) โดยเรียงลำดับรายชื่อบุคลากรด้านสุขภาพ และ อสม. จังหวัดสุโขทัย กำหนดหมายเลขประจำตัวให้ แก่กลุ่มตัวอย่างทุกหน่วยประชากร คำนวณหาอัตราส่วน ระหว่างประชากรและขนาดตัวอย่าง การจับฉลากหา กลุ่มตัวอย่างคนแรก และกลุ่มตัวอย่างคนต่อไปจะ ถูกสุ่มอย่างเป็นระบบตามระยะห่างของช่วงที่คำนวณได้ จนครบจำนวนกลุ่มตัวอย่าง ตามลำดับ

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

แบบสอบถาม (questionnaire) ผู้วิจัยสร้างขึ้น จากการทบทวนวรรณกรรม แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัย ที่เกี่ยวข้อง แบ่งออกเป็น 2 ชุด ได้แก่

ชุดที่ 1 สำหรับ อสม. เป็นแบบสอบถามสมรรถนะ วิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่คาดหวังและที่มีอยู่จริง

ของ อสม. ประกอบด้วย 2 ส่วน ดังนี้ ส่วนที่ 1 คุณลักษณะทางประชากรของ อสม. จำนวน 7 ข้อ ได้แก่ เพศ อายุ สถานภาพ ระดับการศึกษา อาชีพ รายได้เฉลี่ยต่อเดือน และระยะเวลาในการเป็น อสม. โดยมีค่าดัชนีความตรงตามเนื้อหา (index of item-objective congruence: IOC)⁽¹¹⁾ อยู่ระหว่าง 0.67–1.00 และส่วนที่ 2 สมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่คาดหวังและที่มีอยู่จริงของ อสม. พัฒนาขึ้นจากหลักเกณฑ์และวิธีการคัดเลือก อสม. ดีเด่นด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชน พ.ศ. 2566⁽⁴⁾ จำนวน 102 ข้อ เป็นแบบสอบถามชนิดมาตราส่วนประมาณค่า (rating scale) 5 ระดับ คือ มากที่สุด มาก ปานกลาง น้อย และน้อยที่สุด โดยมีเกณฑ์การให้คะแนน คือ 5, 4, 3, 2 และ 1 คะแนน ตามลำดับ การแปลความหมายคะแนนสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนของ อสม. แบ่งออกเป็น 5 ระดับ โดยใช้เกณฑ์ของ Best⁽¹²⁾ คือ 1) คะแนนเฉลี่ย 1.00–1.80 หมายถึง สมรรถนะอยู่ในระดับน้อยที่สุด 2) คะแนนเฉลี่ย 1.81–2.60 หมายถึง สมรรถนะอยู่ในระดับน้อย 3) คะแนนเฉลี่ย 2.61–3.40 หมายถึง สมรรถนะอยู่ในระดับปานกลาง 4) คะแนนเฉลี่ย 3.41–4.20 หมายถึง สมรรถนะอยู่ในระดับมาก และ 5) คะแนนเฉลี่ย 4.21–5.00 หมายถึง สมรรถนะอยู่ในระดับมากที่สุด โดยมีค่า IOC⁽¹¹⁾ อยู่ระหว่าง 0.67–1.00 และค่าความเชื่อมั่นด้วยสูตรสัมประสิทธิ์อัลฟาของครอนบาค (cronbach's alpha coefficient)⁽¹³⁾ เท่ากับ 0.973

ชุดที่ 2 สำหรับบุคลากรด้านสุขภาพ เป็นแบบสอบถามสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่คาดหวังและที่มีอยู่จริงของ อสม. ประกอบด้วย 2 ส่วน ดังนี้ ส่วนที่ 1 คุณลักษณะทางประชากรของบุคลากรด้านสุขภาพ จำนวน 9 ข้อ ได้แก่ เพศ อายุ สถานภาพ ระดับการศึกษา ลักษณะงาน ระดับการปฏิบัติงาน สถานภาพการจ้างงาน ระยะเวลาที่ปฏิบัติงานในองค์กร และรายได้เฉลี่ยต่อเดือน โดยมีค่า IOC⁽¹¹⁾ อยู่ระหว่าง 0.67–1.00 และส่วนที่ 2 สมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่คาดหวังและที่มีอยู่จริงของ อสม. พัฒนาขึ้นจากหลักเกณฑ์และวิธีการคัดเลือก อสม. ดีเด่นด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชน พ.ศ. 2566⁽⁴⁾ เหมือนกัน

กับชุดที่ 1 ส่วนที่ 2 โดยมีค่า IOC⁽¹¹⁾ อยู่ระหว่าง 0.67–1.00 และค่า cronbach's alpha coefficient⁽¹³⁾ เท่ากับ 0.992

ขั้นตอนการเก็บรวบรวมข้อมูล

ทำหนังสือขอความอนุเคราะห์เก็บรวบรวมข้อมูลจากสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสุโขทัยถึงเทศบาลเมืองสุโขทัยธานี เทศบาลเมืองสวรรคโลก โรงพยาบาลทั่วไป (รพท.) โรงพยาบาลชุมชน (รพช.) และสำนักงานสาธารณสุขอำเภอ (สสอ.) และลงพื้นที่เก็บข้อมูลเริ่มจากแนะนำตัวกับกลุ่มตัวอย่าง ชี้แจงวัตถุประสงค์การวิจัย ขั้นตอนการเก็บรวบรวมข้อมูล การวิเคราะห์ข้อมูล และนำเสนอผลการวิจัยในภาพรวม โดยไม่มีการเชื่อมโยงถึงตัวบุคคลและสิทธิของกลุ่มตัวอย่างในการตอบแบบสอบถาม หรือปฏิเสธการเข้าร่วมวิจัย โดยไม่มีผลกระทบใดๆ ต่อกลุ่มตัวอย่าง หากกลุ่มตัวอย่างยินยอมให้ลงนามในหนังสือแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย ซึ่งแบบสอบถามและข้อมูลเก็บไว้ที่ผู้วิจัยเท่านั้น โดยไม่นำมาเปิดเผย ไม่ระบุชื่อของกลุ่มตัวอย่างลงในแบบสอบถาม และทำลายแบบสอบถามเมื่อสิ้นสุดการรับรองโครงการวิจัย โดยให้กลุ่ม อสม. และกลุ่มบุคลากรด้านสุขภาพตอบแบบสอบถามด้วยตนเอง ระหว่างวันที่ 4 พฤษภาคม ถึง 30 มิถุนายน พ.ศ. 2566 เมื่อเก็บรวบรวมข้อมูลได้ครบถ้วนตามจำนวนที่กำหนด ทำการตรวจสอบความสมบูรณ์ ครบถ้วน ระบุรหัส บันทึกลงคอมพิวเตอร์ และนำข้อมูลไปวิเคราะห์ผลการวิจัยในลำดับต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 (SPSS: An IBM Company, USA)⁽¹⁴⁾ จำแนกเป็นข้อมูลทั่วไปโดยใช้สถิติจำนวน ร้อยละ ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าต่ำสุด และค่าสูงสุด ข้อมูลสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่คาดหวังและที่มีอยู่จริงของ อสม. โดยใช้สถิติค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน Paired sample's t-test และ Independent sample's t-test

ผล

ข้อมูลคุณลักษณะทางประชากรของอาสาสมัคร สาธารณสุขประจำหมู่บ้าน

กลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นเพศหญิง ร้อยละ 92.2 อายุเฉลี่ย 51.91 ปี ต่ำสุด 28 ปี และสูงสุด 67 ปี สถานภาพสมรสมากที่สุด ร้อยละ 70.3 รองลงมา คือ โสด ร้อยละ 17.2 และน้อยที่สุด คือ หย่า/แยกกันอยู่ ร้อยละ 6.3 และหม้าย/ร้าง ร้อยละ 6.3 สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษามากที่สุด ร้อยละ 37.4 รองลงมา คือ มัธยมศึกษาตอนต้น ร้อยละ 31.3 และมัธยมศึกษาตอนปลาย/ประกาศนียบัตรวิชาชีพ (ปวช.) ร้อยละ 31.3 ประกอบอาชีพเกษตรกรรมมากที่สุด ร้อยละ 50.0 รองลงมา คือ รับจ้าง 39.1 และน้อยที่สุด คือ ค้าขาย/ธุรกิจส่วนตัว ร้อยละ 10.9 รายได้ต่อเดือนเฉลี่ย 4,204.69 บาท ต่ำสุด 2,000 บาท และสูงสุด 12,000 บาท ระยะเวลาในการเป็น อสม. เฉลี่ย 13.31 ปี ต่ำสุด 1 ปี และสูงสุด 40 ปี

ข้อมูลคุณลักษณะทางประชากรของบุคลากรด้าน สุขภาพ

กลุ่มตัวอย่างส่วนมากสังกัดสถานีนานามัยเฉลิมพระเกียรติ 60 พรรษา นวมินทราชินี (สอน.) หรือโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล (รพ.สต.) ร้อยละ 53.0 รองลงมา คือ สสอ. ร้อยละ 31.3 และน้อยที่สุดคือ รพท. หรือ รพช. ร้อยละ 1.6 กลุ่มตัวอย่างส่วนมากเป็นเพศหญิง ร้อยละ 65.6 อายุเฉลี่ย 40.80 ปี อายุต่ำสุด 24 ปี และอายุสูงสุด 60 ปี สถานภาพสมรสมากที่สุด ร้อยละ 54.7 รองลงมา คือ โสด ร้อยละ 37.5 และน้อยที่สุดคือ หม้าย/ร้าง ร้อยละ 3.1 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีมากที่สุด ร้อยละ 73.4 รองลงมา คือ สูงกว่าปริญญาตรี ร้อยละ 20.3 และน้อยที่สุดคือ อนุปริญญา/ประกาศนียบัตรวิชาชีพชั้นสูง (ปวส.) ร้อยละ 6.3 ลักษณะงานเป็นสายวิชาการมากที่สุด ร้อยละ 57.8 รองลงมา คือ

สายบริการ ร้อยละ 18.8 และน้อยที่สุด คือ สายสนับสนุน ร้อยละ 6.3 ระดับการปฏิบัติงานอยู่ในระดับปฏิบัติงานมากที่สุด ร้อยละ 70.3 รองลงมา คือ ระดับหัวหน้าฝ่าย/หัวหน้ากลุ่ม/หัวหน้างาน ร้อยละ 18.8 และน้อยที่สุด คือ ระดับผู้บริหารองค์กร ร้อยละ 10.9 สถานภาพการจ้างงานเป็นข้าราชการมากที่สุด ร้อยละ 78.1 รองลงมา คือ พนักงานกระทรวงสาธารณสุข ร้อยละ 12.5 และน้อยที่สุด คือ ลูกจ้างชั่วคราว ร้อยละ 4.7 และพนักงานราชการ ร้อยละ 4.7 ระยะเวลาในการทำงานเฉลี่ย 17.28 ปี ต่ำสุด 2 ปี และสูงสุด 40 ปี รายได้ต่อเดือนเฉลี่ย 34,760.78 บาท ต่ำสุด 10,000 บาท และสูงสุด 70,000 บาท

เมื่อประเมินสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่คาดหวังและที่มีอยู่จริงของ อสม. โดยรวมคะแนนประเมินจากกลุ่มบุคลากรด้านสุขภาพและกลุ่ม อสม. พบว่า อสม. มีสมรรถนะที่คาดหวังสูงกว่าที่มีอยู่จริงในทุกตัวแปร โดยภาพรวมมีสมรรถนะที่คาดหวังอยู่ในระดับมากที่สุด ($\bar{X} = 4.59$, $SD = 0.45$) ในขณะที่มีภาพรวมสมรรถนะที่มีอยู่จริงอยู่ในระดับมาก ($\bar{X} = 3.82$, $SD = 0.92$) รายละเอียดคะแนนเฉลี่ยของแต่ละตัวแปรได้ดังแสดงในตารางที่ 1

การเปรียบเทียบสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่คาดหวังกับที่มีอยู่จริงของ อสม. ทั้งภายในกลุ่มบุคลากรด้านสุขภาพและกลุ่ม อสม. พบว่าทุกตัวแปรมีค่าคาดหวังสูงกว่าค่าที่มีอยู่จริงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยภาพรวมมีสมรรถนะที่คาดหวังสูงกว่าที่มีอยู่จริง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รายละเอียดของแต่ละตัวแปร ดังแสดงในตารางที่ 2 และเมื่อเปรียบเทียบประเมิระหว่างกลุ่มบุคลากรด้านสุขภาพและกลุ่ม อสม. พบว่ากลุ่ม อสม. ประเมินสมรรถนะที่คาดหวังและที่มีอยู่จริงสูงกว่ากลุ่มบุคลากรด้านสุขภาพทุกตัวแปร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รายละเอียดของคะแนนประเมินแต่ละตัวแปร ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 1 ข้อมูลสมรรถนะวิทยาการแพทยชุมชนที่คาดหวังและที่มีอยู่จริงของ อสม.

ตัวแปร	สมรรถนะที่คาดหวัง		สมรรถนะที่มีอยู่จริง	
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD
ด้านการครองตน				
1. การเป็นผู้มีสุขภาพดี	4.66	0.44	มากที่สุด	3.96
2. การเป็นแบบอย่างที่ดี	4.65	0.46	มากที่สุด	3.83
3. การพัฒนาตนเอง	4.66	0.48	มากที่สุด	3.84
4. ครอบคลุมอ่อน	4.61	0.54	มากที่สุด	3.88
5. มนุษย์สัมพันธ์และสัมพันธภาพที่ดี	4.70	0.47	มากที่สุด	4.16
6. ครอบคลุมมีทัศนคติที่ดีต่อการเป็น อสม. และการเสียสละเพื่อส่วนรวม	4.70	0.48	มากที่สุด	4.10
	4.65	0.51	มากที่สุด	4.03
ด้านการครองคน				
1. เป็นแกนนำจัดกิจกรรมสุขภาพ มีความสามารถทำงานเป็นทีม	4.64	0.46	มากที่สุด	4.07
2. มีความสามารถในการสร้างศรัทธา เพื่อนบ้านให้การยอมรับ เชื่อมในตนเองและผู้อื่นกระตือรือร้นและเสียสละ	4.66	0.40	มากที่สุด	4.02
	4.65	0.43	มากที่สุด	4.03
3. มีความการเป็นประชาธิปไตย	4.70	0.39	มากที่สุด	4.21
4. มีความสามารถในการประสานงาน	4.69	0.40	มากที่สุด	3.97
ด้านการครองงาน				
1. ความรู้ที่จำเป็นของ อสม.	4.59	0.40	มากที่สุด	3.70
2. การปฏิบัติตัวของ อสม. ในการนำองค์ความรู้ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อใช้ในการเฝ้าระวัง ป้องกัน สุขภาพประชาชนในชุมชน	4.58	0.32	มากที่สุด	3.60
	4.68	0.41	มากที่สุด	3.79
3. ความสามารถในการดำเนินการถ่ายทอดความรู้เชิงเทคนิคและการบริหารจัดการของ อสม. วิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชน	4.66	0.43	มากที่สุด	3.76
4. ความสามารถในการบริหารจัดการแบบบูรณาการ	4.59	0.53	มากที่สุด	3.78
5. กิจกรรมของ อสม. วิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชน	4.55	0.56	มากที่สุด	3.76
6. ผลงาน ความสำเร็จ และนวัตกรรมด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชน	4.53	0.58	มากที่สุด	3.71
ภาพรวมสมรรถนะวิทยาการแพทยชุมชน	4.59	0.45	มากที่สุด	3.82
				0.92
				มาก

ตารางที่ 2 ความแตกต่างระหว่างสมรรถนะวิทยาการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นที่มีอยู่จริงของ อสม. ภายในกลุ่มบุคลากรด้านสุขภาพและกลุ่ม อสม.

ตัวแปร	กลุ่มบุคลากรด้านสุขภาพ					กลุ่ม อสม.					
	สมรณะ	$\bar{X}$	SD	t	df	p-value	$\bar{X}$	SD	t	df	p-value
ด้านการครองตน	คาดหวัง มีอยู่จริง	4.51 3.55	0.46 0.57	11.497	63	< 0.001	4.81 4.37	0.36 0.78	6.526	63	< 0.001
	คาดหวัง มีอยู่จริง	4.52 3.52	0.48 0.58	10.372	63	< 0.001	4.78 4.14	0.39 0.72	9.539	63	< 0.001
	คาดหวัง มีอยู่จริง	4.52 3.54	0.50 0.62	11.163	63	< 0.001	4.81 4.13	0.42 0.74	9.629	63	< 0.001
	คาดหวัง มีอยู่จริง	4.45 3.37	0.57 0.66	11.055	63	< 0.001	4.77 4.40	0.48 0.95	4.482	63	< 0.001
	คาดหวัง มีอยู่จริง	4.54 3.75	0.53 0.73	8.157	63	< 0.001	4.86 4.58	0.33 0.85	3.462	63	0.001
	คาดหวัง มีอยู่จริง	4.59 3.66	0.51 0.75	8.916	63	< 0.001	4.82 4.54	0.41 0.86	3.473	63	0.001
ด้านการครองคน	คาดหวัง มีอยู่จริง	4.48 3.51	0.59 0.68	9.735	63	< 0.001	4.82 4.55	0.34 0.82	3.584	63	0.001
	คาดหวัง มีอยู่จริง	4.54 3.64	0.33 0.64	10.743	63	< 0.001	4.78 4.50	0.43 0.87	3.980	63	< 0.001
	คาดหวัง มีอยู่จริง	4.53 3.54	0.42 0.71	10.347	63	< 0.001	4.76 4.51	0.47 0.88	3.631	63	0.001
	คาดหวัง มีอยู่จริง	4.52 3.57	0.38 0.68	10.136	63	< 0.001	4.79 4.48	0.43 0.89	3.980	63	< 0.001
	คาดหวัง มีอยู่จริง	4.56 3.86	0.40 0.77	7.203	63	< 0.001	4.84 4.57	0.33 0.81	3.686	63	< 0.001
	คาดหวัง มีอยู่จริง	4.56 3.52	0.39 0.66	11.305	63	< 0.001	4.81	0.37	4.574	63	< 0.001

ตารางที่ 2 ความแตกต่างระหว่างสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่คาดหวังและที่มีอยู่จริงของ อสม. ภายในกลุ่มบุคลากรด้านสุขภาพและกลุ่ม อสม. (ต่อ)

ตัวแปร	สมรรถนะ	กลุ่มบุคลากรด้านสุขภาพ					กลุ่ม อสม.					
		$\bar{X}$	SD	t	df	p-value	$\bar{X}$	SD	t	df	p-value	
ด้านการครองงาน	1. ความรู้ที่จำเป็นของ อสม.	คาดหวัง	4.46	0.37	16.540	63	< 0.001	4.71	0.39	5.069	63	< 0.001
		มีอยู่จริง	3.19	0.62				4.22	1.08			
		คาดหวัง	4.51	0.39	13.077	63	< 0.001	4.65	0.21	6.509	63	< 0.001
		มีอยู่จริง	3.20	0.82				3.99	0.96			
		คาดหวัง	4.54	0.40	15.984	63	< 0.001	4.83	0.36	4.479	63	< 0.001
		มีอยู่จริง	3.23	0.67				4.35	1.08			
	2. การปฏิบัติตัวของ อสม. ในการนำองค์ความรู้ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์เพื่อใช้ในการเฝ้าระวัง ป้องกัน สุขภาพประชาชนในชุมชน	คาดหวัง	4.51	0.45	13.898	63	< 0.001	4.81	0.36	4.781	63	< 0.001
		มีอยู่จริง	3.22	0.69				4.30	1.17			
		คาดหวัง	4.44	0.46	14.780	63	< 0.001	4.74	0.56	4.004	63	< 0.001
		มีอยู่จริง	3.24	0.67				4.33	1.14			
		คาดหวัง	4.42	0.45	13.999	63	< 0.001	4.68	0.63	3.834	63	< 0.001
		มีอยู่จริง	3.20	0.64				4.32	1.16			
ภาพรวมสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชน	3. ความสามารถในการดำเนินการถ่ายทอดความรู้เชิงเทคนิคและการบริหารจัดการของ อสม. วิทยาศาสตร์ การแพทย์ชุมชน	คาดหวัง	4.38	0.48	14.526	63	< 0.001	4.68	0.64	3.246	63	0.002
		มีอยู่จริง	3.08	0.68				4.35	1.19			
		คาดหวัง	4.48	0.37	15.337	63	< 0.001	4.69	0.51	4.963	63	< 0.001
		มีอยู่จริง	3.34	0.56				4.30	0.97			
		คาดหวัง	4.42	0.45	13.999	63	< 0.001	4.68	0.63	3.834	63	< 0.001
		มีอยู่จริง	3.20	0.64				4.32	1.16			
	4. ผลงาน ความสำนึก และนวัตกรรมด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชน	คาดหวัง	4.38	0.48	14.526	63	< 0.001	4.68	0.64	3.246	63	0.002
		มีอยู่จริง	3.08	0.68				4.35	1.19			
		คาดหวัง	4.48	0.37	15.337	63	< 0.001	4.69	0.51	4.963	63	< 0.001
		มีอยู่จริง	3.34	0.56				4.30	0.97			
		คาดหวัง	4.42	0.45	13.999	63	< 0.001	4.68	0.63	3.834	63	< 0.001
		มีอยู่จริง	3.20	0.64				4.32	1.16			

ตารางที่ 3 ความแตกต่างของสมรรถนะวิทยาการแพทย์ชุมชนที่คาดหวังและที่มีอยู่จริง ระหว่างกลุ่มบุคลากรด้านสุขภาพและกลุ่ม อสม.

ตัวแปร	กลุ่ม	สมรรถนะที่คาดหวัง				สมรรถนะที่มีอยู่จริง					
		$\bar{X}$	SD	t	df	p-value	$\bar{X}$	SD	t	df	p-value
ด้านการครองตน	บุคลากร	4.51	0.46	-4.088	126	< 0.001	3.55	0.57	-6.807	126	< 0.001
	อสม.	4.81	0.36				4.37	0.78			
	บุคลากร	4.52	0.48	-3.321	126	0.001	3.52	0.58	-5.376	126	< 0.001
	อสม.	4.78	0.39				4.14	0.72			
	บุคลากร	4.52	0.50	-3.550	126	0.001	3.54	0.62	-4.911	126	< 0.001
	อสม.	4.81	0.42				4.13	0.72			
ด้านการครองคน	บุคลากร	4.45	0.57	-3.380	126	0.001	3.37	0.66	-7.147	126	< 0.001
	อสม.	4.77	0.48				4.40	0.95			
	บุคลากร	4.54	0.53	-4.190	126	< 0.001	3.75	0.73	-5.894	126	< 0.001
	อสม.	4.86	0.33				4.58	0.85			
	บุคลากร	4.59	0.51	-2.866	126	0.005	3.66	0.75	-6.129	126	< 0.001
	อสม.	4.82	0.41				4.54	0.86			
ด้านจิตวิทยา	บุคลากร	4.48	0.59	-4.026	126	< 0.001	3.51	0.68	-7.785	126	< 0.001
	อสม.	4.82	0.34				4.55	0.82			
	บุคลากร	4.54	0.33	-3.504	126	0.001	3.64	0.64	-6.358	126	< 0.001
	อสม.	4.78	0.43				4.50	0.87			
	บุคลากร	4.53	0.42	-2.993	126	0.003	3.54	0.71	-6.880	126	< 0.001
	อสม.	4.76	0.47				4.51	0.88			
ด้านพฤติกรรม	บุคลากร	4.52	0.38	-3.642	126	< 0.001	3.57	0.68	-6.563	126	< 0.001
	อสม.	4.79	0.43				4.48	0.89			
	บุคลากร	4.56	0.40	-4.308	126	< 0.001	3.86	0.77	-5.034	126	< 0.001
	อสม.	4.84	0.33				4.57	0.81			
	บุคลากร	4.56	0.39	-3.674	126	< 0.001	3.52	0.66	-6.139	126	< 0.001
	อสม.	4.81	0.37				4.43	0.98			

ตารางที่ 3 ความแตกต่างของสมรรถนะวิทยาการศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่คาดหวังและที่มีอยู่จริง ระหว่างกลุ่มบุคลากรด้านสุขภาพและกลุ่ม อสม. (ต่อ)

ตัวแปร	กลุ่ม	สมรรถนะที่คาดหวัง				สมรรถนะที่มีอยู่จริง					
		$\bar{X}$	SD	t	df	p-value	χ	SD	t	df	p-value
ด้านการครองงาน	บุคลากร	4.46	0.37	-3.588	126	< 0.001	3.19	0.62	-6.618	126	< 0.001
	อสม.	4.71	0.39				4.22	1.08			
	บุคลากร	4.51	0.39	-2.572	126	0.011	3.20	0.82	-5.040	126	< 0.001
	อสม.	4.65	0.21				3.99	0.96			
	บุคลากร	4.54	0.40	-4.252	126	< 0.001	3.23	0.67	-7.017	126	< 0.001
	อสม.	4.83	0.36				4.35	1.08			
	บุคลากร	4.51	0.45	-4.165	126	< 0.001	3.22	0.69	-6.400	126	< 0.001
	อสม.	4.81	0.36				4.30	1.17			
	บุคลากร	4.44	0.46	-3.291	126	0.001	3.24	0.67	-6.534	126	< 0.001
	อสม.	4.74	0.56				4.33	1.14			
	บุคลากร	4.42	0.45	-2.671	126	0.009	3.20	0.64	-6.790	126	< 0.001
	อสม.	4.68	0.63				4.32	1.16			
บุคลากร	4.38	0.48	-3.070	126	0.003	3.08	0.68	-7.391	126	< 0.001	
อสม.	4.68	0.64				4.35	1.19				
ภาพรวมสมรรถนะวิทยาาสตร์การแพทย์ชุมชน	บุคลากร	4.48	0.37	-2.666	126	0.009	3.34	0.56	-6.853	126	< 0.001
	อสม.	4.69	0.51				4.30	0.97			

วิจารณ์

การประเมินสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนของ อสม. พัฒนขึ้นจากหลักเกณฑ์และวิธีการคัดเลือก อสม. ตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง หลักเกณฑ์และวิธีการคัดเลือกอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้านดีเด่นด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชน พ.ศ. 2566⁽⁴⁾ ประกอบด้วย 3 องค์ประกอบ ได้แก่ 1) ด้านการครองตน หมายถึง การมีพฤติกรรมและการปฏิบัติส่วนตนประกอบด้วย คุณธรรมที่ควรแก่การยกย่องโดยมีการดูแลสุขภาพตนเองและเป็นแบบอย่างที่ดีด้านสุขภาพต่อสมาชิกในครอบครัวและชุมชน มีจิตอาสา มีความเสียสละ ชยันต์นเพียร ประหยัด และเก็บออมตามหลักเศรษฐกิจพอเพียง มีทัศนคติที่ดีต่อการเป็น อสม. และพัฒนาตนเองเสมอ 2) ด้านการครองคน หมายถึง การมีความสามารถในการติดต่อสัมพันธ์กับผู้อื่นสามารถจูงใจให้เกิดการยอมรับและให้ความร่วมมือโดยมีความสามารถในการสานสัมพันธ์สร้างความสามัคคีและสร้างความเข้าใจ มีความสามารถในการทำงานเป็นทีมและเครือข่าย การให้บริการแก่ประชาชนและผู้มาติดต่องานด้วยความเป็นธรรมเสมอภาคสามารถจูงใจให้เกิดยอมรับ ให้การสนับสนุนและมีส่วนร่วมในการดำเนินการ มีส่วนร่วมในกิจกรรมของชมรม อสม. และ 3) ด้านการครองงาน หมายถึง การมีความสามารถปฏิบัติงานบทบาทหน้าที่และงานที่ได้รับมอบหมายอย่างดีโดยความรู้ที่จำเป็นของอสม. เกี่ยวกับวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนสามารถถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์สู่ชุมชน มีส่วนร่วมในการบริหารจัดการแผนสุขภาพชุมชนอย่างบูรณาการ กิจกรรมของ อสม. เกี่ยวกับวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชน ผลงานความสำเร็จในด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชน และผลงานเด่น/นวัตกรรมเพื่อประเมินผลการปฏิบัติงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนของ อสม. ที่เป็นการดำเนินงานของ อสม. มีความรู้ ทักษะ และประสบการณ์ที่สามารถนำองค์ความรู้ เทคโนโลยีด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์และการดำเนินการใดๆ ใช้สนับสนุนการป้องกัน ควบคุม เฝ้าระวังการคุ้มครองผู้บริโภคด้านสาธารณสุข รวมถึง

ภัยสุขภาพด้านต่าง ๆ ในชุมชน โดยมีการทำงานร่วมกันกับ อสม. สาขาอื่น ๆ อย่างเป็นระบบ และเป็นเครือข่ายดำเนินการร่วมกันในชุมชน⁽⁴⁾

จากผลการศึกษาสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่คาดหวังของ อสม. เมื่อประเมิน โดยกลุ่มบุคลากรด้านสุขภาพ และกลุ่ม อสม. พบว่า อสม. มีสมรรถนะที่คาดหวังอยู่ในระดับมากที่สุด ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนดอย่างน้อย 1 ครั้งต่อสัปดาห์ หรือไม่น้อยกว่า 4 ครั้งต่อเดือน⁽¹⁵⁾ สอดคล้องกับสมรรถนะการบริหารจัดการองค์กรสร้างเสริมสุขภาพของ อสม. ที่คาดหวังอยู่ในระดับมากที่สุด⁽¹⁶⁾ แต่ไม่สอดคล้องกับสมรรถนะการคุ้มครองผู้บริโภคด้านสุขภาพของ อสม. อยู่ในระดับมาก⁽¹⁷⁾ แสดงให้เห็นว่าสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนของ อสม. ที่คาดหวังเป็นไปตามความคาดหวังของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽⁴⁾ ที่มุ่งหวังให้ อสม. วิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่กระจายอยู่ในชุมชนต้นแบบมีความเข้มแข็งด้านการแจ้งเตือนภัย การวิเคราะห์ชั้นสูตรโรคเบื้องต้น เฝ้าระวังและรับเรื่องร้องเรียนปัญหาสุขภาพในนาม “ศูนย์แจ้งเตือนภัย เฝ้าระวัง และรับเรื่องร้องเรียนปัญหาผลิตภัณฑ์สุขภาพในชุมชน หรือ ศูนย์แจ้งเตือนภัยสุขภาพในชุมชน” ซึ่งจัดตั้งในหน่วยบริการสุขภาพปฐมภูมิ เพื่อให้ อสม. วิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนใช้เป็นห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนสำหรับตรวจคัดกรอง รวบรวมข้อมูลวิเคราะห์ปัญหาที่อาจเกิดอันตรายและโรคต่อสุขภาพของประชาชน เป็นศูนย์กลางข้อมูลเบื้องต้นในการประสานงานผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องก่อนนำส่งตรวจยืนยัน หรือส่งตัวผู้ป่วยเข้ารับการรักษาตามขั้นตอนต่อไป⁽⁴⁾

สมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่มีอยู่จริงของ อสม. เมื่อประเมินโดยกลุ่มบุคลากรด้านสุขภาพ และกลุ่ม อสม. พบว่าสมรรถนะที่มีอยู่จริงอยู่ในระดับมาก ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดอย่างน้อย 1 ครั้งต่อสัปดาห์หรือไม่น้อยกว่า 4 ครั้งต่อเดือน⁽¹⁵⁾ สอดคล้องกับสมรรถนะการคุ้มครองผู้บริโภคด้านสุขภาพของ อสม. อยู่ในระดับมาก⁽¹⁷⁾ แต่ไม่สอดคล้องกับสมรรถนะการบริหารจัดการองค์กรสร้างเสริมสุขภาพของ อสม. ที่มีอยู่จริงอยู่ในระดับปานกลาง⁽¹⁶⁾ แสดงให้เห็นว่า อสม. มีความ

เป็นผู้นำองค์ความรู้และเทคโนโลยีด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนเพื่อดำเนินการคุ้มครองผู้บริโภคและการจัดการสุขภาพในชุมชน รวมถึงการวิเคราะห์ชั้นสูตรโรคเบื้องต้นและการสาธารณสุข โดยมีปลอกแซนลีเซียวติตแซนชัยเป็นสัญลักษณ์ซึ่งการรับรองคุณภาพการปฏิบัติงานของ อสม. ที่มีความรู้ความสามารถในการใช้ชุดทดสอบและเทคโนโลยีด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽⁴⁾ นอกจากนี้ผลการประเมินสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่มีอยู่จริงเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาศักยภาพ อสม. วิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชน เนื่องจากการประเมินสมรรถนะเป็นเครื่องมือหรือองค์ประกอบที่สำคัญช่วยในการพัฒนาศักยภาพ อสม. ให้สามารถปฏิบัติงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและประสิทธิผล ช่วยให้หน่วยบริการสุขภาพรับทราบศักยภาพของ อสม. แต่ละคน และสามารถหาแนวทางการพัฒนาการฝึกอบรม ปรับปรุงจุดด้อย และพัฒนาจุดเด่นของ อสม. วิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนได้อย่างถูกต้องเหมาะสมต่อไป⁽²⁾

สมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนของ อสม. พบว่า อสม. มีสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่คาดหวังสูงกว่าที่มีอยู่จริง และกลุ่ม อสม. ประเมินสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่คาดหวังและที่มีอยู่จริงสูงกว่ากลุ่มบุคลากรด้านสุขภาพ สอดคล้องกับสมรรถนะการบริหารจัดการองค์กรสร้างเสริมสุขภาพที่คาดหวังสูงกว่าที่มีอยู่จริง และกลุ่ม อสม. ประเมินสมรรถนะการบริหารจัดการองค์กรสร้างเสริมสุขภาพที่คาดหวังและที่มีอยู่จริงสูงกว่ากลุ่มบุคลากรด้านสุขภาพ⁽¹⁶⁾ แสดงให้เห็นว่าสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนของ อสม. มีความสอดคล้องลักษณะการปฏิบัติงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนของ อสม. โดยการประเมินสมรรถนะเป็นกระบวนการประเมินความรู้ ความสามารถ ทักษะ และการปฏิบัติงานของ อสม. ในขณะนั้น เปรียบเทียบกับระดับสมรรถนะที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์คาดหวังในบทบาทหน้าที่ อสม. วิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนได้ตามที่คาดหวังหรือมีความแตกต่างกันเล็กน้อยเพียงใด⁽⁶⁾ เพื่อนำผลการประเมินสมรรถนะไปปรับปรุงและพัฒนาผลการปฏิบัติงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนของ

อสม. รวมถึงการพัฒนาศักยภาพ อสม. วิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนให้มีความรู้ ทักษะ และคุณลักษณะที่ดีในการปฏิบัติงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชน⁽⁴⁾

ข้อจำกัดของการศึกษานี้ คือ ประชากรที่ศึกษาเป็น อสม. ที่ผ่านการฝึกอบรมหลักสูตร อสม. วิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนและปฏิบัติงานด้านนี้อย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2558 ถึงปัจจุบัน ในแต่ละจังหวัดมีจำนวนน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวน อสม. ที่ขึ้นทะเบียนเป็น อสม. ภาพรวมทั้งจังหวัด ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการเก็บรวบรวมข้อมูลจาก อสม. และบุคลากรด้านสุขภาพที่ปฏิบัติงานด้านนี้ในพื้นที่ที่มีจำนวนน้อยมากเช่นกัน

สรุป

อสม. มีสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่คาดหวังอยู่ในระดับมากที่สุด ในขณะที่มีสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่มีอยู่จริงอยู่ในระดับมาก โดยมีสมรรถนะที่คาดหวังสูงกว่าสมรรถนะจริงในทุกตัวแปรและในภาพรวม นอกจากนี้การประเมินสมรรถนะโดย อสม. มีค่าสูงกว่าการประเมินด้วยบุคลากรด้านสุขภาพทั้งสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนที่คาดหวังและที่มีอยู่จริง ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าหน่วยงานที่เกี่ยวข้องควรฝึกอบรมพัฒนาศักยภาพสมรรถนะวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนของ อสม. ให้สามารถปฏิบัติงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนได้ตามความคาดหวังให้มากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บุคลากรด้านสุขภาพและอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน จังหวัดสุโขทัย ที่ให้ข้อมูลที่ประโยชน์ในการวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. ระเบียบกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน พ.ศ. 2554. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 128, ตอนพิเศษ 33 ง (วันที่ 20 มีนาคม 2554). หน้า 1.

2. อลงกรณ์ มีสุทธา, สมิต สัจฉกร. การประเมินผล การปฏิบัติงาน: แนวความคิด หลักการ วิธีการ และ กระบวนการ (ฉบับปรับปรุง). กรุงเทพฯ: สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น); 2551.
3. สำนักงานคณะกรรมการข้าราชการพลเรือน. คู่มือสมรรถนะราชการพลเรือนไทย. กรุงเทพฯ: พี.เอ.ลิฟวิ่ง; 2548.
4. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง หลักเกณฑ์และวิธีคัดเลือกอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้านดีเด่นด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ พ.ศ. 2566. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2565.
5. กองสนับสนุนสุขภาพภาคประชาชน กรมสนับสนุนบริการสุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข. หนังสือที่ระลึกวันอาสาสมัครสาธารณสุขแห่งชาติ ประจำปีพุทธศักราช 2560. นนทบุรี: กองสนับสนุนสุขภาพภาคประชาชน; 2560.
6. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง ผลการคัดเลือกอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้านด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ชุมชนระดับชาติ ประจำปีพุทธศักราช 2566. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2566.
7. สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสุโขทัย. รายงานผลการบริหารและพัฒนาทรัพยากรบุคคล ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564. สุโขทัย: สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสุโขทัย; 2564.
8. กรมสนับสนุนบริการสุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข. อาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน. [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 15 พ.ค. 2564]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://www.thaiphc.net/new2020/>.
9. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG. Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. Behav Res Methods 2009; 41(4): 1149-60.
10. Hennessy S, Bilker WB, Berlin JA, Strom BL. Factors influencing the optimal control-to-case ratio in matched case-control studies. Am J Epidemiol 1999; 149(2): 195-7.
11. Rovinelli RJ, Hambleton RK. On the use of content specialists in the assessment of criterion-referenced test item validity. Tijdschrift Voor Onderwijs Research 1977; 2(2): 49-60.
12. Best JW. Research in education. 3rd ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall; 1977.
13. Cronbach LJ. Essentials of psychology and education. New York: McGraw-Hill; 1984.
14. SPSS: an IBM company. IBM SPSS statistics 20, VeriSign Class 3 Code Signing 2010 CA. Chicago, IL: International Business Machines Corporation; 2010.
15. ยุทธนา แยกคาย, ปราโมทย์ วงศ์สวัสดิ์. การปฏิบัติงานตามบทบาทที่สำคัญของอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน. ว.วิทยาลัยพยาบาลพระปกเกล้า จันทบุรี 2563; 31(2): 269-79.
16. มหาชาติ โสภณนิธินาท, ยุทธนา แยกคาย. สมรรถนะการบริหารจัดการองค์การสร้างเสริมสุขภาพของอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน อำเภอสุวรรณคูหา จังหวัดสุโขทัย. ว. สาธารณสุขมูลฐานภาคเหนือ 2567; 34(1): 28-37.
17. อรธิดา พลจร. สมรรถนะอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้านในการดำเนินงานคุ้มครองผู้บริโภค [วิทยานิพนธ์]. สาขาวิชาสาธารณสุขศาสตร์, คณะวิทยาการสุขภาพและการกีฬา. สงขลา: มหาวิทยาลัยทักษิณ; 2563.

Competencies in Community Medical Sciences of Village Health Volunteers

Nattiga Prucksikanont¹ and Yutthana Yaebkai²

¹ *Pharmaceutical and Health consumer Protection Subdivision, Sukhothai Provincial Public Health Office, Sukhothai 64000, Thailand*

² *Sirindhorn College of Public Health Phitsanulok, Faculty of Public Health and Allied Health Sciences, Praboromarajchanok Institute, Phitsanulok 65130, Thailand*

ABSTRACT The Sukhothai Provincial Public Health Office has been continuously developing community medical sciences (CMS) capacity for village health volunteers (VHVs) since 2015, according to the guidelines of the Department of Medical Sciences under the Ministry of Public Health (MOPH). VHVs promote, support, empower, and enhance the public sector's leadership in the body of CMS knowledge and technology for consumer protection and community health management. In addition, VHVs provide preliminary medical diagnoses and primary health care. This descriptive research aimed to study the competencies in CMS among VHVs in Sukhothai. The study sample involved 64 health-care providers (HCPs) and 64 VHVs in the province. Data were collected using a questionnaire and then analyzed to determine the frequency distribution, percentage, mean, standard deviation, paired sample's t-test, and independent sample's t-test. The results revealed that VHVs had the highest level of expected CMS competencies as well as the high level of actual CMS competencies. VHVs had higher expected CMS competencies than their actual CMS competencies. As per both groups comparison, VHVs expected and actual CMS competencies were higher than HCPs. Therefore, relevant agencies should further develop or train VHVs to enhance their CMS competencies so as to perform CMS tasks more efficiently and effectively.

Keywords: Competencies, Community medical sciences, Village health volunteers

การพัฒนาระบบบริหารคุณภาพหน่วยรับรองระบบงาน สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017

สิตาไพสิฐ เอกะจัมปะกะ และ ปิยะวรรณ ชัยณรงค์เกื้อกูล

สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ ระบบ ISO/IEC 17011:2017 ถูกประกาศใช้โดยองค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน (ISO) และคณะกรรมการระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรฐานสาขาอิเล็กทรอนิกส์ (IEC) แทนฉบับเดิม ISO/IEC 17011:2004 เมื่อเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2560 เป็นความท้าทายระดับประเทศของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ (สมป.) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นหน่วยรับรองระบบงานระดับชาติด้านการแพทย์และสาธารณสุข ซึ่งเป็นสมาชิกสามัญที่ลงนามความร่วมมือระหว่างประเทศกับองค์กรระดับภูมิภาคกับ APAC และระดับสากลระหว่างประเทศ ILAC จึงศึกษาเพื่อปรับเปลี่ยนระบบการบริหารงานคุณภาพให้สอดคล้องกับมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017 เพื่อเตรียมรับการตรวจประเมินการเปลี่ยนผ่านภายในระยะเวลา 3 ปี โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างข้อกำหนดตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017 กับระบบคุณภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2004 ที่หน่วยงานใช้ดำเนินงานอยู่เดิม วิเคราะห์ข้อมูลสถานะภาพของหน่วยงาน จากนั้นปรับปรุงเอกสารคู่มือคุณภาพ หลักเกณฑ์ เงื่อนไขการรับรองต่าง ๆ และดำเนินการพัฒนาศักยภาพบุคลากร การพัฒนาระบบสารสนเทศ การประเมินความเสี่ยงด้านผลประโยชน์ทับซ้อน และการวิเคราะห์ข้อมูลสิ่งที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนดจากกระบวนการรับรองและความคาดหวังของลูกค้า เพื่อกำหนดกิจกรรมที่ต้องวางแผนพัฒนาปรับปรุงให้เติบโตอย่างต่อเนื่อง การดำเนินงานดังกล่าวนี้ได้ส่งผลให้สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการได้รับการยอมรับจาก APAC ว่ามีระบบบริหารคุณภาพสอดคล้องกับข้อกำหนด ISO/IEC 17011:2017 เป็นผลสำเร็จ เมื่อวันที่ 28 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2563 และสามารถรักษาสถานภาพการเป็นสมาชิกสามัญที่ลงนามความร่วมมือในการตรวจต่ออายุแบบเต็มรูปแบบ ในปี พ.ศ. 2565 ทั้งนี้ข้อมูลที่ศึกษาสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางเพื่อวางแผนดำเนินการปรับปรุงองค์กรให้มีระบบคุณภาพเป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติ รวมทั้งส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาเศรษฐกิจชีวภาพของประเทศต่อไป

คำสำคัญ: ISO/IEC 17011:2017, APAC, ILAC, หน่วยรับรองระบบงาน, สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ

Corresponding author E-mail: sitaphaisith.e@dmasc.mail.go.th

Received: 21 August 2023

Revised: 19 April 2024

Accepted: 25 April 2024

บทนำ

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ เป็นหน่วยรับรองระบบงานของประเทศด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพ อาหาร ยา วัตถุเสพติด เครื่องสำอาง วัตถุอันตราย ชีววัตถุ สมุนไพร และการชันสูตรโรค ซึ่งสอดคล้องกับสถานการณ์และนโยบายของประเทศที่มุ่งเน้นให้ภาครัฐและเอกชนมีส่วนร่วมในการพัฒนาห้องปฏิบัติการของตนเอง ให้ได้รับการรับรองตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025, ISO 15189 และหน่วยผลิตหรือจัดเตรียมวัสดุอ้างอิง ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO 17034 ผลของการได้รับการรับรองส่งเสริมให้เกิดการส่งออกผลิตภัณฑ์ได้ง่ายขึ้น รวมถึงการทำความตกลงเขตการค้าเสรี (Free Trade Area; FTA) กับต่างประเทศและบริการของไทยในตลาดโลก เนื่องจากมีการยอมรับร่วมกันของผลการทดสอบในประเทศสมาชิกและทำให้การบริการทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุขมีคุณภาพในระดับเท่าเทียมกับประเทศสมาชิก

การปฏิบัติการกิจดังกล่าวสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องรักษาไว้ซึ่งการเป็นสมาชิกสามัญที่ลงนามความร่วมมือระหว่างประเทศระดับภูมิภาค (Mutual Recognition Arrangement; MRA) Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC) และระดับสากล International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) โดยลงนามข้อตกลงระหว่างประเทศกับองค์กรระดับภูมิภาค APAC เมื่อวันที่ 14 พฤศจิกายน พ.ศ. 2545 และระดับสากลระหว่างประเทศ ILAC เมื่อวันที่ 4 เมษายน พ.ศ. 2546 มีกระบวนการดำเนินงานที่สอดคล้องกับมาตรฐานสากล ISO/IEC 17011 และ APAC MRA-001 เพื่อให้ผู้ใช้ผลการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองได้รับการยอมรับในลักษณะ Tested once accepted everywhere คือ ตรวจสอบทีเดียวยอมรับทั่วโลก ลดการตรวจสอบซ้ำ ช่วยลดต้นทุนให้แก่ผู้ประกอบการ เน้นการใช้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์แสดงถึงสินค้าที่มีคุณภาพมาตรฐาน ทำให้ได้รับการยอมรับและเชื่อถืออันเป็นธรรมกับผู้ผลิตและผู้บริโภค ก่อให้เกิด

ประโยชน์และส่งผลดีต่อการดูแลสุขภาพของประชาชน ในปี พ.ศ. 2560 องค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน (International Organization for Standardization; ISO) และคณะกรรมการมาตรฐานระหว่างประเทศ ว่าด้วยมาตรฐานสาขาอิเล็กทรอนิกส์ (International Electrotechnical Commission; IEC) ได้ปรับปรุงมาตรฐานของหน่วยรับรองระบบงานใหม่เป็นฉบับ ISO/IEC 17011:2017⁽¹⁾ โดยมีการแก้ไขปรับปรุงมาจากมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2004⁽²⁾ และประกาศใช้อย่างเป็นทางการเมื่อเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2560 และ IAF/ILAC ได้กำหนดระยะเวลาเปลี่ยนผ่าน 3 ปี⁽³⁾ ให้หน่วยรับรองระบบงานที่ได้รับการยอมรับร่วม APAC MRA ต้องปรับเปลี่ยนระบบการบริหารงานคุณภาพให้สอดคล้องกับมาตรฐานฉบับใหม่ ISO/IEC 17011:2017 เป็นข้อกำหนดสำหรับหน่วยรับรองระบบงานในการรับรอง หน่วยตรวจสอบรับรอง ซึ่งครอบคลุม กิจกรรม การทดสอบ การสอบเทียบ การตรวจ การรับรองระบบการจัดการ การรับรองบุคคล การรับรองผลิตภัณฑ์ กระบวนการและบริการ การให้บริการทดสอบความชำนาญ การผลิตวัสดุอ้างอิง การตรวจสอบความใช้ได้ และการทวนสอบ โดยมาตรฐานฉบับล่าสุดมีการปรับปรุงโครงสร้างและเนื้อหาเป็นไปตาม ISO Committee on Conformity Assessment (CASCO)

กรณีสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการไม่ผ่านการประเมินจาก APAC ตาม ISO/IEC 17011:2017 จะส่งผลกระทบต่อทำให้การรับรองห้องปฏิบัติการทั้งในประเทศและต่างประเทศมากถึง 606 แห่ง⁽⁴⁾ ในทุกระบบที่ทำให้การรับรองในขอบเขตของการทดสอบด้านเทคนิค ได้แก่ การทดสอบด้านฟิสิกส์ การทดสอบด้านเคมี การทดสอบด้านชีววิทยา และอื่นๆ ที่มีผลกระทบต่อห้องปฏิบัติการในต่างประเทศ 5 ประเทศ ทั้ง 8 แห่ง ได้แก่ สาธารณรัฐมัลดีฟส์ สาธารณประชาชนบังกลาเทศ สาธารณรัฐแห่งสหภาพพม่า สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว และสาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม เพื่อให้สามารถรักษาสถานะการรับรองตามมาตรฐานสากลได้

อย่างต่อเนื่อง จึงเร่งศึกษาและเตรียมการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการทดสอบตามข้อกำหนดใหม่ ISO/IEC 17025:2017⁽⁵⁾ ที่ประกาศใช้เมื่อเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2560 และอยู่ในช่วงเปลี่ยนผ่านเช่นกัน ซึ่งยังไม่มีหน่วยงานใดได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 มาก่อน รวมทั้งต้องศึกษาระบบที่เหมาะสมสำหรับการให้การรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการด้านการแพทย์และด้านสาธารณสุข หน่วยผลิตหรือจัดเตรียมวัสดุอ้างอิงเพื่อใช้เป็นหลักเกณฑ์ เงื่อนไขการดำเนินงานที่เป็นมาตรฐานและตัดเทียบกับหน่วยรับรองระบบงานที่เป็นสมาชิก APAC และ ILAC มาใช้กำกับดูแลห้องปฏิบัติการ หน่วยผลิตหรือจัดเตรียมวัสดุอ้างอิง และทันตามประกาศของ ILAC และ International Accreditation Forum (IAF)

สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ได้ศึกษาวิธีดำเนินการจัดระบบการบริหารจัดการด้านคุณภาพให้สอดคล้องกับข้อกำหนดใหม่ ISO/IEC 17011:2017 ที่มีการเปลี่ยนแปลงและเพิ่มเติม เพื่อให้ได้รับการยอมรับร่วมจากองค์กรระหว่างประเทศ APAC และ ILAC ตามระยะเวลาการเปลี่ยนผ่านของ ILAC/IAF เพื่อคงสถานะหน่วยรับรองระบบงานที่ได้รับการยอมรับจากประเทศสมาชิก APAC และ ILAC ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การดำเนินการพัฒนาปรับปรุงระบบคุณภาพหน่วยรับรองระบบงานและกระบวนการรับรองให้มีความสอดคล้องตาม ISO/IEC 17011:2017 ประกอบด้วย 7 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องทั้งในและต่างประเทศ โดยศึกษาด้วยตนเอง (self-learning) จากแหล่งข้อมูลนานาชาติที่ตีพิมพ์ในสื่อสิ่งพิมพ์ต่างๆ ได้แก่ หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และกฎระเบียบ APAC⁽⁶⁾, ILAC⁽⁷⁾ และเข้าร่วมประชุมประจำปีในฐานะสมาชิกของ APAC และ ILAC

ส่วนที่ 2 การวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อกำหนดตาม ISO/IEC 17011:2004 และ ISO/IEC 17011:2017 โดยศึกษาข้อกำหนดทั้งสองฉบับและจัดเรียงตาม

หมายเลขข้อกำหนด จัดกลุ่มเปรียบเทียบข้อแตกต่างตามรายละเอียดที่ปรากฏในข้อกำหนดหลักข้อกำหนดย่อยและภาคผนวกของมาตรฐานทั้งสองฉบับ

ส่วนที่ 3 การจัดระบบคุณภาพหน่วยรับรองระบบงานตาม ISO/IEC 17011:2017 โดยปรับปรุงนโยบาย โครงสร้าง องค์ประกอบ และหน้าที่ของคณะกรรมการที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรับรองห้องปฏิบัติการ

ส่วนที่ 4 การพัฒนาระบบและจัดทำเอกสารที่สอดคล้องกับ ISO/IEC 17011:2017

ส่วนที่ 5 การพัฒนาศักยภาพบุคลากร ตาม ISO/IEC 17011:2017

ส่วนที่ 6 การประเมินตนเองเพื่อเข้าสู่กระบวนการประเมินการเปลี่ยนผ่านจาก APAC

ส่วนที่ 7 การรับการตรวจประเมินจาก APAC แบบ on-site evaluation

ส่วนที่ 8 การวิเคราะห์และดำเนินการแก้ไขโดยรวบรวม วิเคราะห์ข้อบกพร่องและข้อเสนอแนะที่พบ และดำเนินการแก้ไข

ผล

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องทั้งในและต่างประเทศ

จากการทบทวนหลักเกณฑ์ เงื่อนไข และกฎระเบียบ APAC, ILAC พบว่ามีการปรับเปลี่ยนข้อกำหนดที่สำคัญมาตรฐานห้องปฏิบัติการต้องดำเนินการ ได้แก่ APAC MRA 009⁽⁸⁾ เป็นข้อกำหนดใหม่และเป็นแนวทางการวางแผน จัดการตรวจประเมินทางไกล โดยใช้เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร APAC TEC0-001⁽⁹⁾ เป็นแนวทางปฏิบัติในการตรวจประเมินทางไกล APAC TEC1-001⁽¹⁰⁾ เป็นแนวทางการกำหนดขอบข่ายการรับรองด้านธนาคารทรัพยากรชีวภาพ APAC TEC4-003⁽¹¹⁾ เป็นแนวทางการให้การรับรองแบบ flexible scope ตามข้อกำหนดที่ 7.8.4 ของ ISO/IEC 17011:2017 ซึ่งหน่วยรับรองระบบงานต้องนำมาศึกษาและประยุกต์ใช้ให้สอดคล้องกันและต้องปฏิบัติตาม APAC MRA 001⁽¹²⁾ เป็นนโยบายและขั้นตอน

การปฏิบัติงานที่หน่วยรับรองระบบงานรักษาสถานภาพ การยอมรับร่วมกับองค์กรรับรองระบบงานในระดับ ภูมิภาคและระดับสากลระหว่างประเทศ ในส่วนของ ILAC ที่หน่วยรับรองระบบงานต้องนำไปประยุกต์ใช้ ได้แก่ ILAC G3:08/2020⁽¹³⁾ เป็นแนวทางการจัด หลักสูตรการฝึกอบรมผู้ตรวจประเมินสำหรับหน่วย รับรองระบบงาน ILAC G8:09/2019⁽¹⁴⁾ เป็นแนวทาง ใช้เกณฑ์การตัดสินใจ (decision rule) เมื่อมี การตัดสินใจสอดคล้องกับข้อกำหนดเฉพาะ และ การรายงานความสอดคล้อง (statements of conformity) ตามข้อกำหนดที่ 7.8.6.1 ของ ISO/IEC 17025:2017 ILAC G17:01/2021⁽¹⁵⁾ เป็นแนวทาง การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบ ILAC G18:12/2021⁽¹⁶⁾ เป็นแนวทางกำหนดขอบข่ายการรับรอง ILAC G19:06/2022⁽¹⁷⁾ เป็นแนวทางสำหรับห้องปฏิบัติการ นิติวิทยาศาสตร์ และ ILAC G26:11/2018⁽¹⁸⁾ เป็นแนวทางการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ตามมาตรฐาน ISO 15189 ซึ่งผู้วิจัยต้องทบทวน กระบวนการรับรอง และตรวจสอบสถานภาพที่ดำเนินงาน ในปัจจุบัน เพื่อนำมาจัดวางระบบให้เป็นไปตามเกณฑ์ ดังกล่าวตามขอบข่ายสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ให้การรับรอง

การวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง ข้อกำหนด ISO/IEC 17011:2004 และข้อกำหนด ISO/IEC 17011:2017

วิเคราะห์เนื้อหาสำคัญของแต่ละข้อกำหนดหลัก ที่กำหนดในมาตรฐาน ทั้งหมด 9 ข้อ ข้อกำหนด 3 ข้อแรก เป็นข้อกำหนด เรื่อง ขอบข่าย เอกสารอ้างอิง คำศัพท์ และนิยาม โดยมาตรฐานฉบับเดิมระบุเป็นข้อกำหนดทั่วไปสำหรับหน่วยรับรองระบบงานในการรับรองหน่วย ตรวจสอบรับรอง แต่มาตรฐานฉบับใหม่ระบุเป็น ข้อกำหนดความสามารถ ความเป็นกลาง และการดำเนินการ อย่างคงที่และสม่ำเสมอของหน่วยรับรองระบบงาน ในการรับรองหน่วยตรวจสอบรับรอง โดยเพิ่มนิยาม ศัพท์ใหม่ ได้แก่ ข้อ 3.7 flexible scope of accreditation ข้อ 3.8 accreditation scheme ข้อ 3.26 remote assessment และข้อ 3.27 assessment programme รวมทั้งเน้นเรื่องความเป็นกลาง โดยนำ แนวความคิดเกี่ยวกับความเสี่ยงมาใช้ ทั้งนี้ข้อกำหนด มาตรฐานที่มีการเปลี่ยนแปลงสามารถวิเคราะห์และ เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลง โดยใช้ gap analysis ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความแตกต่างที่สำคัญระหว่าง ISO/IEC 17011:2017, ISO/IEC 17011:2004 และข้อกำหนดที่จำเป็น ต้องนำไปประยุกต์ใช้ให้สอดคล้องกับมาตรฐานสากล

ข้อกำหนดของ ISO/IEC 17011:2017	ข้อกำหนดของ ISO/IEC 17011:2004	ข้อกำหนด ที่แตกต่าง	รายละเอียด
1. ขอบข่าย	1. ขอบข่าย	1	- เพิ่มรายละเอียดเกี่ยวกับความสามารถ ความเป็นกลาง และการดำเนินการอย่างคงที่ สม่ำเสมอของหน่วยรับรองระบบงาน - เพิ่มขอบข่าย ผู้จัดโปรแกรมการทดสอบ ความชำนาญหน่วยผลิตหรือจัดเตรียมวัสดุอ้างอิง และหน่วยตรวจสอบความใช้ได้และทวนสอบ
2. เอกสารอ้างอิง	2. เอกสารอ้างอิง	2	อ้างอิง ISO/IEC 17000 ฉบับปัจจุบัน
3. คำศัพท์และบทนิยาม	3. คำศัพท์และบทนิยาม	3.7, 3.8, 3.26, 3.27	มีคำศัพท์เพิ่มขึ้นใหม่ 3.7, 3.8, 3.26 และ 3.27
4. ข้อกำหนดทั่วไป			
4.1 ความเป็นนิติบุคคล	4.1 ความรับผิดชอบตามกฎหมาย	-	
4.2 ข้อตกลงการรับรอง	8.1 ข้อปฏิบัติของห้องปฏิบัติการ (8.1.1& 8.1.2)	4.2 e), 4.2 k)	เพิ่มข้อตกลงเรื่องการยินยอมให้หน่วยรับรอง ระบบงานเข้าไปตรวจประเมินความสามารถของ ห้องปฏิบัติการในการทดสอบ ณ สถานที่ของลูกค้า

ตารางที่ 1 ความแตกต่างที่สำคัญระหว่าง ISO/IEC 17011:2017, ISO/IEC 17011:2004 และข้อกำหนดที่จำเป็นต้องนำไปประยุกต์ใช้ให้สอดคล้องกับมาตรฐานสากล (ต่อ)

ข้อกำหนดของ ISO/IEC 17011:2017	ข้อกำหนดของ ISO/IEC 17011:2004	ข้อกำหนดที่แตกต่าง	รายละเอียด
			- เพิ่มข้อตกลงเรื่องการให้ความร่วมมือกับหน่วยรับรองระบบงาน สอบสวนหาสาเหตุเรื่องร้องเรียนจากบุคคลที่สามที่เกี่ยวข้องกับการรับรอง
4.3 การใช้สัญลักษณ์การรับรอง และการอ้างอิงถึงการรับรอง	8.3 การอ้างอิงถึงการรับรอง และการใช้สัญลักษณ์การรับรอง	4.3.1 e	- เพิ่มรายละเอียดข้อปฏิบัติของห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรอง เมื่อถูกระงับ หรือลดขอบข่าย หรือถูกเพิกถอนการรับรอง ต้องยุติการกล่าวอ้างหรือใช้เครื่องหมายรับรอง และต้องแจ้งให้ผู้รับบริการทราบข้อเท็จจริงดังกล่าว
4.4 ข้อกำหนดความเป็นกลาง	4.3 ความเป็นกลาง	4.4.3, 4.4.6, 4.4.11	- นโยบายความเป็นกลาง (ใหม่) - การจัดการความเสี่ยงที่ส่งผลกระทบต่อความเป็นกลาง (ใหม่) - เพิ่มกิจกรรมที่หน่วยรับรองระบบงานไม่สามารถดำเนินการได้
4.5 การเงินและการยอมรับผิด	4.5 การเงินและการยอมรับผิด	-	-
4.6 การกำหนดรูปแบบการตรวจสอบ และรับรองความสามารถ	4.6 กิจกรรมการรับรองคุณภาพ	4.6.3, 4.6.5	- นโยบายการทบทวนความเหมาะสมของรูปแบบการตรวจสอบและรับรองให้สอดคล้องกับมาตรฐานที่ใช้สำหรับการรับรองระบบงาน (ใหม่) - การเลือกประกอบกิจการการรับรองความสามารถ (ใหม่)
5. ข้อกำหนดเรื่องโครงสร้าง	4.2 โครงสร้าง	5.7 k)	- เพิ่มหน้าที่ความรับผิดชอบของผู้บริหารสูงสุดเรื่องการปกป้องความเป็นกลาง
6. ข้อกำหนดด้านทรัพยากร	6. ทรัพยากรมนุษย์	-	
6.1 ความสามารถของบุคลากร	6.2 บุคลากรที่เกี่ยวข้องกับการรับรอง 6.3 การติดตามและเฝ้าระวัง	6.1.2, 6.1.3	- เพิ่มรายละเอียดเกณฑ์ความสามารถในด้านต่าง ๆ ที่ต้องการในแต่ละหน้าที่ (ใหม่) - เพิ่มการพิจารณาความถี่ของการเข้าร่วมกิจกรรมตรวจประเมินและความเสี่ยง ซึ่งมีผลต่อการติดตามความสามารถ (ใหม่)
6.2 บุคลากรที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรับรอง	6.1 บุคลากรที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรับรอง	-	-
6.3 บันทึบบุคลากร	6.4 บันทึบบุคลากร	-	-
6.4 การใช้บริการภายนอก	7.4 การจ้างเหมาช่วงการตรวจประเมิน	-	-
7. ข้อกำหนดด้านกระบวนการ	7. กระบวนการรับรองความสามารถ		-
7.1 ข้อกำหนดการตรวจสอบรับรอง	7.1 เกณฑ์กำหนดการตรวจสอบรับรองและข้อมูลเอกสาร	-	-
7.2 การสมัครขอการรับรอง	7.2 การสมัครขอการรับรอง 7.5 การเตรียมการตรวจประเมิน	7.2.4	- เพิ่มเรื่องการยกเลิกคำขอ กรณีพบว่าห้องปฏิบัติการมีพฤติกรรมหรือเจตนาให้ข้อมูลหรือปกปิดข้อมูลอันเป็นเท็จ (ใหม่)
7.3 การทบทวนทรัพยากร	7.3 การทบทวนทรัพยากร	-	
7.4 การเตรียมการก่อนการตรวจประเมิน	7.5 การเตรียมการก่อนการตรวจประเมิน	7.4.6, 7.4.7	- การเลือกกิจกรรมที่ผู้ตรวจต้องพิจารณาความเสี่ยงของสถานที่และบุคลากร ให้ครอบคลุมขอบข่ายที่ให้การรับรอง (ใหม่) - เพิ่มรายละเอียดการจัดทำแผนการตรวจประเมิน

ตารางที่ 1 ความแตกต่างที่สำคัญระหว่าง ISO/IEC 17011:2017, ISO/IEC 17011:2004 และข้อกำหนดที่จำเป็นต้องนำไปประยุกต์ใช้ให้สอดคล้องกับมาตรฐานสากล (ต่อ)

ข้อกำหนดของ ISO/IEC 17011:2017	ข้อกำหนดของ ISO/IEC 17011:2004	ข้อกำหนดที่แตกต่าง	รายละเอียด
7.5 การทบทวนข้อมูลเอกสาร	7.6 การทบทวนเอกสารและบันทึก	-	-
7.6 การตรวจประเมิน	7.7 การตรวจประเมิน ณ สถานที่จริง 7.8 การวิเคราะห์สิ่งที่ตรวจพบและรายงานการตรวจประเมิน	7.6.2	- เพิ่มการตรวจประเมินทางไกล (ใหม่)
7.7 การตัดสินผลการรับรอง	7.8 การวิเคราะห์สิ่งที่ตรวจพบและรายงานการตรวจประเมิน 7.9 การตัดสินผลและการให้การรับรอง	-	-
7.8 ข้อมูลการรับรอง	7.9 การตัดสินผลและการให้การรับรอง	7.8.3 e), 7.8.3 f), 7.8.3 g), 7.8.4	- เพิ่มข้อมูลการรับรองของหน่วยทดสอบความชำนาญ หน่วยผลิตหรือจัดเตรียมวัสดุอ้างอิง และหน่วยตรวจความใช้ได้และทวนสอบ (ใหม่) - ขอบข่ายการรับรองแบบ flexible (ใหม่)
7.9 วงรอบการรับรอง	7.11 การต่ออายุใบรับรอง และการเฝ้าระวัง	7.9.2, 7.9.3	- เพิ่มโปรแกรมการตรวจประเมิน (ใหม่) - เพิ่มการใช้เทคนิคการประเมินอื่น ๆ แทนการตรวจประเมินจริง ได้แก่ การตรวจประเมินทางไกล (ใหม่)
7.10 การขยายขอบข่ายการรับรอง	7.12 การขยายขอบข่ายการรับรอง	-	-
7.11 การระงับชั่วคราว การเพิกถอน การลดขอบข่าย	7.13 การระงับชั่วคราว การเพิกถอน การลดขอบข่าย	7.11.2, 7.11.3	- เพิ่มการเพิกถอนการรับรอง กรณีพบว่าห้องปฏิบัติการที่ขอการรับรองให้ข้อมูลที่ไม่เป็นจริงในการขอการรับรอง (ใหม่) - เพิ่มขั้นตอนการปฏิบัติงานยกเลิกการถูกระงับการรับรอง (ใหม่)
7.12 การร้องเรียน	5.9 การร้องเรียน	7.12.5, 7.12.8	- เพิ่มรายละเอียดของกระบวนการจัดการเรื่องร้องเรียน โดยผู้ที่ไม่มีส่วนได้ส่วนเสีย และต้องแจ้งความก้าวหน้าในการจัดการให้ผู้ร้องเรียนทราบ
7.13 การอุทธรณ์	7.10 การอุทธรณ์	7.13.7, 7.13.8	- เพิ่มรายละเอียดของกระบวนการอุทธรณ์ในการรายงานความก้าวหน้าให้ผู้อุทธรณ์ทราบ
7.14 บันทึกของหน่วยงานที่ขอการรับรอง	7.14 บันทึกของหน่วยงานที่ขอการรับรอง	7.14.2	- กำหนดระยะเวลาการเก็บบันทึกอย่างน้อยเท่ากับวงรอบการรับรองปัจจุบันบวกกับวงรอบการรับรองที่ผ่านมา
8. ข้อกำหนดด้านข้อมูลข่าวสาร			
8.1 ข้อมูลที่เป็นความลับ	4.4 ความลับ	8.1.3	- เพิ่มการจัดการข้อมูลที่ได้มาจากแหล่งอื่น นอกเหนือจากหน่วยงานที่ขอการรับรอง ได้แก่ หน่วยงานที่ร้องเรียน หรือหน่วยงานกำกับดูแลตามกฎหมาย
8.2 ข้อมูลที่เผยแพร่สู่สาธารณะ	8.2 ข้อปฏิบัติของหน่วยรับรองระบบงาน	8.2.1 b), 8.2.2	- การเปิดเผยกระบวนการอุทธรณ์สู่สาธารณะ - การเปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับห้องปฏิบัติการที่ถูกระงับและเพิกถอนสู่สาธารณะ

ตารางที่ 1 ความแตกต่างที่สำคัญระหว่าง ISO/IEC 17011:2017, ISO/IEC 17011:2004 และข้อกำหนดที่จำเป็นต้องนำไปประยุกต์ใช้ให้สอดคล้องกับมาตรฐานสากล (ต่อ)

ข้อกำหนดของ ISO/IEC 17011:2017	ข้อกำหนดของ ISO/IEC 17011:2004	ข้อกำหนดที่แตกต่าง	รายละเอียด
9. ข้อกำหนดระบบบริหารจัดการ	5. ข้อกำหนดระบบบริหารจัดการ	-	-
9.1 ทั่วไป	5.1 ทั่วไป	9.1.4, 9.1.5	- กำหนดระบบการบริหารงานหน่วยรับรองระบบงานเป็น 2 ทางเลือก คือ ทางเลือก ก และ ข (ISO 9001) ไปใช้ปฏิบัติ (ใหม่)
9.2 ระบบบริหารจัดการ	5.2 ระบบบริหารจัดการ	-	-
9.3 การควบคุมเอกสาร	5.3 การควบคุมเอกสาร	-	-
9.4 การควบคุมบันทึก	5.4 บันทึก	-	-
9.5 งานที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนด และการปฏิบัติแก้ไข	5.5 งานที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนด และการปฏิบัติแก้ไข	-	-
9.6 การปรับปรุง	5.6 การป้องกันไม่ให้เกิดซ้ำ	9.6	- การนำความเสี่ยงมาใช้ในการปรับปรุง
9.7 การตรวจติดตามภายใน	5.7 การตรวจติดตามภายใน	-	-
9.8 การทบทวนระบบบริหาร	5.8 การทบทวนระบบบริหาร	9.8.2 d), 9.8.2 i)	- เพิ่มเนื้อหาสาระที่ต้องนำมาประชุมทบทวนเรื่อง การปกป้องความเป็นกลาง และเรื่องการแข่งขัน ความเสี่ยงและโอกาส
ภาคผนวก ก ความรู้และความชำนาญในการดำเนินกิจกรรมรับรองความสามารถ	ไม่มี	ภาคผนวก ก	ข้อกำหนดใหม่

การจัดระบบคุณภาพหน่วยรับรองระบบงาน ตาม ISO/IEC 17011:2017 ระหว่าง พ.ศ. 2560 – 2565 ตามข้อกำหนดที่มีการเปลี่ยนแปลง

ข้อกำหนดความเป็นกลาง (4.4)

ข้อกำหนดที่ 4.4.6 ได้เพิ่มหน้าที่คณะกรรมการที่ปรึกษา เกี่ยวกับการพิจารณาความเป็นกลางและให้ข้อเสนอแนะ/แนวทางการลดความเสี่ยงต่างๆ โดยเพิ่มองค์ประกอบของผู้มีส่วนได้ส่วนเสียในคณะกรรมการประกอบด้วย ผู้แทนสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ผู้แทนสถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ ผู้แทนสมาคมไทยอุตสาหกรรมผลิตยาแผนปัจจุบัน และผู้แทนคณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี โดยผู้อำนวยการสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการเป็นเลขานุการ

ข้อกำหนดที่ 4.4.11 ได้ปรับปรุงโครงสร้างของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ไม่ให้มีหน่วยงานภายในให้บริการ กิจกรรมทดสอบ การผลิตหรือจัดเตรียมของ

หน่วยผลิตวัสดุอ้างอิง การทดสอบความชำนาญ และกิจกรรมของธนาคารทรัพยากรชีวภาพที่จะมีอิทธิพลต่อความเป็นกลาง โดยมีการโอนย้ายกลุ่ม ประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ซึ่งอยู่ภายใต้โครงสร้างเดียวกันกับสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ จัดตั้งเป็นองค์กรใหม่คือ ศูนย์ทดสอบความชำนาญ เป็นหน่วยงานภายใน ขึ้นตรงกับอธิบดีหรือรองอธิบดีที่ได้รับมอบหมายตามคำสั่งปรับปรุงโครงสร้างการแบ่งส่วนราชการภายในของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ 154/2563 ประกาศ ณ วันที่ 14 มกราคม พ.ศ. 2563

ข้อกำหนดวงจรรอบการรับรอง (7.9)

ข้อกำหนดที่ 7.9.3 กำหนดระยะเวลาการตรวจประเมินจริง 2 ครั้งติดต่อกัน ต้องไม่เกิน 2 ปี รายละเอียดสอดคล้องกับมาตรฐานฉบับเดิม จึงได้มีการปรับเปลี่ยนกระบวนการรับรองใหม่โดยกำหนดวงจรการรับรองจากเดิม 2 ปี เป็น 4 ปี และจัดให้มีระบบการ

ตรวจเฝ้าระวังจากเดิมเป็นการตรวจสอบเอกสารด้านคุณภาพในปีต่อไป เป็นการตรวจประเมินจริงในปีที่สอง นับจากการตรวจประเมินครั้งแรก เพื่อให้สามารถดำเนินการได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยระยะเวลาการยื่นขอต่ออายุการรับรองเป็น 120 วัน ก่อนกำหนดวันตรวจประเมินต่ออายุครั้งต่อไป และกำหนดระยะเวลาการแก้ไขข้อบกพร่องการขยายขอบข่ายการรับรองจากเดิม 90 วัน ขยายได้อีก 30 วัน รวมระยะเวลา 120 วัน เหลือเพียง 30 วัน ขยายได้อีก 30 วัน รวมระยะเวลา 60 วัน เพื่อกำกับระยะเวลาการตรวจประเมินให้ไม่เกิน 2 ปี และทำให้การดำเนินการรับรองเร็วขึ้นกว่าเดิม 2 เท่า

นอกจากนี้ได้จัดทำระบบสำหรับการรับรองธนาคารทรัพยากรชีวภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 20387:2018⁽¹⁹⁾ และสอดคล้องกับ APAC TEC1-001 รวมทั้งเปิดให้บริการในปี พ.ศ. 2565 เพื่อขับเคลื่อนการวิจัยและพัฒนาการนำทรัพยากรชีวภาพไปใช้ประโยชน์สูงสุด และการพัฒนาเศรษฐกิจฐานชีวภาพ

การพัฒนาระบบและจัดทำเอกสารที่สอดคล้องกับ ISO/IEC 17011:2017

ปรับปรุงแก้ไขคู่มือคุณภาพการรับรอง ตามข้อกำหนดที่ 4.4.3, 4.4.6, 4.6.3, 4.6.5, 5.7 k) และ 7.6.2 จัดทำเป็นเอกสารภาษาไทยและภาษาอังกฤษ เพื่อใช้เป็นบทบัญญัติสำหรับการบริหารระบบคุณภาพของการรับรอง อธิบายถึงนโยบายการรับรอง นโยบายความเป็นกลาง สถานะทางกฎหมาย โครงสร้างองค์กรที่เกี่ยวข้อง หน้าที่ความรับผิดชอบ รูปแบบการตรวจสอบและรับรอง แนวทางปฏิบัติ และข้อกำหนดทั่วไปในการดำเนินการให้มีระบบบริหารคุณภาพในกระบวนการรับรอง สำหรับรายละเอียดวิธีดำเนินการจะอ้างอิงเอกสารอื่นๆ ที่เฉพาะเจาะจง เช่น มาตรฐานการปฏิบัติงาน แนวทางการดำเนินงานต่างๆ จำนวน 208 ฉบับ ได้รับการปรับปรุงรายละเอียดให้ครบถ้วน ประกอบด้วยนโยบาย ข้อกำหนด เงื่อนไขการรับรองห้องปฏิบัติการทดสอบด้านการแพทย์และสาธารณสุข หน่วยผลิตหรือจัดเตรียมวัสดุอ้างอิง และธนาคารทรัพยากรชีวภาพ (รหัส R) จำนวน 4 ฉบับ แนวทางปฏิบัติ (รหัส G) จำนวน

22 ฉบับ ข้อกำหนดเฉพาะด้านวิชาการ (รหัส N) จำนวน 29 ฉบับ มาตรฐานการปฏิบัติงาน (SOP) จำนวน 24 ฉบับ Worksheet (รหัส WS) จำนวน 50 ฉบับ และแบบฟอร์ม (F) 79 ฉบับ จำแนกเป็นเอกสารที่ได้จัดทำใหม่จำนวน 35 ฉบับ เป็นเอกสารที่ได้ปรับแก้ไขเนื้อหาสาระจำนวน 168 ฉบับ และเป็นเอกสารที่ทบทวนแล้วไม่แก้ไขจำนวน 6 ฉบับ เพื่อให้มีการพัฒนาระบบคุณภาพหน่วยรับรองระบบงานและการให้บริการของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการครบถ้วนตามข้อกำหนดของ ISO/IEC 17011:2017 และกฎระเบียบของ APAC, ILAC ดังรายละเอียดดังนี้

ข้อกำหนดที่ 4 ทั่วไป

ข้อกำหนดที่ 4.2e) และ 4.2k) มีการเพิ่มกฎเกณฑ์และข้อบังคับให้ห้องปฏิบัติการต้องปฏิบัติตามนโยบายเงื่อนไข ข้อกำหนด การรับรองห้องปฏิบัติการทดสอบด้านการแพทย์และสาธารณสุข หน่วยผลิตหรือจัดเตรียมวัสดุอ้างอิง และธนาคารทรัพยากรชีวภาพ กำหนดให้ห้องปฏิบัติการต้องทำสัญญาหรือข้อตกลงกับลูกค้าในการยินยอมให้เข้าตรวจประเมินในการทดสอบ ณ สถานที่ของลูกค้า และยินยอมให้ความร่วมมือให้ข้อมูลที่เป็นจริงที่เกี่ยวข้องกับการร้องเรียนจากหน่วยงานอื่นที่อาจทำให้เกิดการมีส่วนได้ส่วนเสียหรือผลประโยชน์ทับซ้อน ในการสอบสวนหาสาเหตุและการจัดการข้อร้องเรียน ทั้งนี้ห้องปฏิบัติการต้องลงนามในบันทึกข้อตกลงในคำขอรับรองที่จะปฏิบัติตามนโยบาย เงื่อนไขข้อกำหนดการรับรอง

ข้อกำหนดที่ 4.3.1 e) ได้มีการเพิ่มกฎเกณฑ์และข้อบังคับให้ห้องปฏิบัติการต้องแจ้งให้ผู้รับบริการทราบข้อเท็จจริงเมื่อถูกระงับ หรือลดขอบข่าย หรือถูกเพิกถอนการรับรอง ในนโยบาย เงื่อนไข ข้อกำหนด การรับรอง

ข้อกำหนดที่ 4.4.3, 4.4.6 และ 4.4.11 ได้จัดทำนโยบายความเป็นกลางเป็นลายลักษณ์อักษร ลงนามโดยผู้อำนวยการสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ เผยแพร่แก่ลูกค้าและผู้มีส่วนได้ส่วนเสียบนเว็บไซต์ ระบุให้สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ต้องดำเนินการด้วยความเป็นกลาง เป็นธรรม และโปร่งใส โดยให้การรับรองอย่างเท่าเทียมกัน ทั้งนี้บุคลากรที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรับรอง คณะกรรมการ ผู้ตรวจประเมิน และผู้เชี่ยวชาญ

วิชาการยึดมั่นต่อความเป็นกลางและถือปฏิบัติตามประกาศนโยบายความเป็นกลางอย่างเคร่งครัด และจัดทำข้อกำหนดการจัดการความเป็นกลางที่จะไม่ให้บริการในกิจกรรมทดสอบ การผลิตหรือจัดเตรียมของหน่วยผลิตวัสดุอ้างอิง การทดสอบความชำนาญและกิจกรรมของธนาคารทรัพยากรชีวภาพและไม่ใช่หน่วยงานที่ปรึกษาให้กับหน่วยงานที่ขอรับรอง นอกจากนี้ได้จัดทำมาตรฐานการปฏิบัติงานเรื่องการจัดการความเสี่ยงและโอกาสการดำเนินงานเพื่อการรับรองตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17011 โดยนำเสนอผลการดำเนินการต่อคณะกรรมการที่ปรึกษาอย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง เพื่อพิจารณาประเมินประสิทธิผลของการจัดการความเสี่ยงด้านต่าง ๆ

ข้อกำหนดที่ 4.6.5 ได้เพิ่มขั้นตอนการปฏิบัติงาน “การเลิกกิจการการรับรองความสามารถ” กำหนดให้มีการสอบถามความคิดเห็นจากผู้มีส่วนได้ส่วนเสีย

ข้อกำหนดที่ 5 โครงสร้าง

ข้อกำหนดที่ 5.7 k) กำหนดหน้าที่ผู้อำนวยการสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการเพิ่มเติมในการมอบนโยบายด้านความเป็นกลางของการรับรองห้องปฏิบัติการ และหน้าที่บริหารจัดการดูแลให้ความเสี่ยงที่เหลือที่อาจเกิดความไม่เป็นกลางต่อการรับรองให้อยู่ในระดับยอมรับได้

ข้อกำหนดที่ 6 ทรัพยากร

ข้อกำหนดที่ 6.1.2 และ 6.1.3 จัดทำมาตรฐานการปฏิบัติงาน เรื่อง การฝึกอบรมเจ้าหน้าที่ด้านการรับรอง ระบุถึงหลักสูตรการอบรม โดยกำหนดให้บุคลากรใหม่ต้องผ่านการประเมินไม่น้อยกว่าร้อยละ 70 ก่อนการปฏิบัติงานและต้องถูกประเมินซ้ำทุกปี รวมถึงได้กำหนดเกณฑ์ความสามารถผู้ตรวจประเมินและคณะกรรมการต่าง ๆ ให้สอดคล้องตามภาคผนวก ก ของ ISO/IEC 17011

ข้อกำหนดที่ 7 กระบวนการ

ข้อกำหนดที่ 7.2.4 กำหนดเกณฑ์การเพิกถอนการรับรอง เมื่อห้องปฏิบัติการมีพฤติกรรมหรือเจตนาให้ข้อมูลหรือปกปิดข้อมูล อันเป็นเท็จ ในนโยบาย เงื่อนไขข้อกำหนด การรับรองห้องปฏิบัติการทดสอบด้านการแพทย์และสาธารณสุข หน่วยผลิตหรือจัดเตรียมวัสดุ

อ้างอิง และธนาคารทรัพยากรชีวภาพโดยเผยแพร่ทางเว็บไซต์

ข้อกำหนดที่ 7.4.6 จัดทำแนวทางปฏิบัติงาน เรื่อง การเลือกขอบข่ายการรับรองสำหรับการตรวจประเมินความสามารถห้องปฏิบัติการและกำหนดเกณฑ์การสุ่มตรวจจุดเก็บตัวอย่างภายนอกหน่วยงาน (specimen collection site) ให้กับผู้ตรวจประเมินใช้ในการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ สำหรับข้อกำหนดที่ 7.4.7 เป็นข้อกำหนดใหม่ โดยสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการได้มีการจัดทำแผนการตรวจประเมินระบุ วัน เวลา กำหนดการ และรายชื่อคณะผู้ตรวจประเมินส่งให้ห้องปฏิบัติการทราบล่วงหน้า

ข้อกำหนดที่ 7.6.2 จัดทำข้อกำหนด เรื่อง การตรวจประเมินทางไกล โดยจัดให้มีการทดสอบความสมบูรณ์ ความพร้อมของเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสารของห้องปฏิบัติการ และผู้ตรวจประเมิน ดำเนินการประเมินความเสี่ยงตามแบบประเมินความพร้อมและการประเมินความเสี่ยงของการตรวจประเมินทางไกล หากพบความเสี่ยงระดับสูงจะไม่สามารถตรวจประเมินทางไกลได้ ทั้งนี้ข้อกำหนดดังกล่าวสอดคล้องกับข้อกำหนดของ APAC MRA 009 และ APAC TEC 0-001

ข้อกำหนดที่ 7.8.3 f) จัดทำรายละเอียดใบรับรองหน่วยผลิตและจัดเตรียมวัสดุอ้างอิง ระบุถึงประเภท คุณสมบัติ/ค่ากำหนด/การบ่งชี้/ขอบเขต คุณสมบัติของวัสดุอ้างอิง สำหรับข้อกำหนดที่ 7.8.3 e), 7.8.3 g) และ 7.8.4 เป็นขอบข่ายการรับรองที่สำคัญมาตรฐานห้องปฏิบัติการไม่ได้เปิดให้บริการจึงไม่ต้องจัดทำเอกสารเพิ่มเติม

ข้อกำหนดที่ 7.9.2 ได้จัดทำโปรแกรมการตรวจประเมินตามวงจรการรับรอง 4 ปี สำหรับข้อกำหนดที่ 7.9.3 ดำเนินการใช้เทคนิคการประเมินทางไกลแทนการตรวจประเมินจริง

ข้อกำหนดที่ 7.11.2 เหมือนข้อ 7.2.4 และดำเนินการเพิกถอนการรับรอง ตามมาตรฐานการปฏิบัติงาน เรื่อง การระงับ การเพิกถอน การลดขอบข่าย จากการที่หน่วยงานที่ขอการรับรองไม่ปฏิบัติตามนโยบาย เงื่อนไขข้อกำหนด การรับรอง

ข้อกำหนดที่ 7.12.5 และ 7.12.8 เพิ่มรายละเอียด เรื่อง การตอบกลับเมื่อได้รับเรื่องร้องเรียนและการ รายงานความก้าวหน้าให้ผู้ร้องเรียนทราบทุกขั้นตอน กำหนดไว้ในมาตรฐานการปฏิบัติงาน เรื่อง การจัดการ ข้อร้องเรียนการรับรองห้องปฏิบัติการ โดยกำหนดให้ ผู้จัดการคุณภาพซึ่งไม่มีส่วนได้ส่วนเสียในกระบวนการ รับรองเป็นผู้ดำเนินการสืบสวนหาสาเหตุ

ข้อกำหนดที่ 7.13.7 และ 7.13.8 เพิ่มรายละเอียด ให้ชัดเจนขึ้นในการรับเรื่องอุทธรณ์ โดยต้องมีการรายงาน ความก้าวหน้าให้ผู้อุทธรณ์ทราบทุกขั้นตอน กำหนดไว้ใน แนวทางการรับเรื่องอุทธรณ์ ทั้งนี้ต้องกระทำการ โดยผู้ที่ไม่มีส่วนเกี่ยวข้อง

ข้อกำหนดที่ 7.14.2 ปรับเปลี่ยนระยะเวลาการเก็บ บันทึกลงเป็น 8 ปี (2 เท่าของวงรอบการรับรอง) กำหนดไว้ใน มาตรฐานการปฏิบัติงาน เรื่อง การควบคุมเอกสาร และบันทึกการรับรองห้องปฏิบัติการ

ข้อกำหนดที่ 8 ข้อมูลข่าวสาร

ข้อกำหนดที่ 8.1.3 กำหนดให้มีการจัดการข้อมูล ที่เป็นความลับจากการร้องเรียนจากบุคคลที่สามถึง ห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรอง กำหนดไว้ในคู่มือ คุณภาพการรับรอง โดยสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ สวทช.ไม่เปิดเผยถึงผู้ร้องเรียน

ข้อกำหนดที่ 8.2.1 b) และ 8.2.2 เพิ่มช่องทางการ สื่อสาร/การเข้าถึงข้อมูลการรับข้อร้องเรียนและการ อุทธรณ์บนหน้าเว็บไซต์ และเผยแพร่ข้อมูลห้องปฏิบัติการ ที่ถูกระงับและถูกเพิกถอนบนหน้าเว็บไซต์ เพื่อให้ ผู้ประกอบการ ผู้มีส่วนได้ส่วนเสีย และหน่วยกำกับดูแล การขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ตามกฎหมายได้รับทราบข้อมูล ที่เป็นปัจจุบัน

ข้อกำหนดที่ 9 ระบบบริหารจัดการ

ข้อกำหนดที่ 9.1.4 สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ เลือกระบบบริหารจัดการตามทางเลือก ก โดย ดำเนินการตามข้อกำหนดของมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017 ทุกหัวข้อตั้งแต่ 9.2-9.8

ข้อกำหนดที่ 9.6 ดำเนินการเช่นเดียวกับ ข้อกำหนดที่ 4.4 โดยนำผลการจัดการความเสี่ยงและ

โอกาสการดำเนินงานเพื่อการรับรองมาจัดทำแผน ปรับปรุงพัฒนาและรักษาระบบบริหารคุณภาพการเป็น องค์การรับรอง ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011:2017 และ APAC MRA 001 ประจำปี และแผนการป้องกัน

ข้อกำหนดที่ 9.8.2 d) และ 9.8.2 i) กำหนดวาระ การประชุมเพิ่มเติม เรื่อง การปกป้องความเป็นกลาง และ เรื่อง การประเมินความเสี่ยงและโอกาส ในการประชุม ทบทวนระบบบริหารซึ่งจัดปีละ 1 ครั้ง โดยมีผู้อำนวยการ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการเป็นประธาน

การพัฒนาศักยภาพบุคลากร ตาม ISO/IEC 17011:2017

ได้จัดทำคุณสมบัติที่สำคัญและจำเป็นของ เจ้าหน้าที่กลุ่มรับรอง ผู้ตรวจประเมิน และคณะกรรมการ โดยกำหนดให้บุคลากรดังกล่าวมีความรอบรู้ ในข้อกำหนดของมาตรฐานหน่วยรับรอง ISO/IEC 17011 มาตรฐานที่ให้การรับรอง ได้แก่ ISO 15189, ISO/IEC 17025, ISO 17034, ISO 20387 นโยบาย และหลักเกณฑ์ของหน่วยรับรอง รวมทั้งข้อกำหนด ตามกฎหมาย และความรู้ด้านวิชาการต่างๆ ทั้งนี้ ได้ส่ง เจ้าหน้าที่ระดับเชี่ยวชาญเข้าอบรม ISO/IEC 17011:2017 หลักสูตรที่ ISO จัดขึ้น ในปี พ.ศ. 2561 ได้จัดการอบรมข้อกำหนด ISO/IEC 17011:2017 ขึ้น เป็นครั้งแรก เพื่อพัฒนาความรู้ ข้อกำหนด เงื่อนไขการ รับรอง และกระบวนการรับรองที่ต้องมีการปรับเปลี่ยน จากเดิม ทางด้านวิชาการต่างๆ จากการปรับเปลี่ยน ข้อกำหนดขึ้นมาใหม่เป็น ISO/IEC 17025:2017 ได้แก่ วิธีการระบุข้อความของความเป็นไปตาม ข้อกำหนดและการตัดสินผลการวิเคราะห์ ตาม ILAC-G8:09/2019: ILAC Guidelines on Decision Rules and Statements of Conformity การจัดการ ความเสี่ยงและโอกาสตามมาตรฐาน ISO 31000: 2018 เป็นต้น และจัดประชุมสัมมนาต่อเนื่องเป็นประจำทุกปี และเปิดบริการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 เมื่อปี พ.ศ. 2561 โดย เจ้าหน้าที่กลุ่มรับรองต้องมีการเรียนรู้วิทยาการใหม่

อย่างเร่งด่วน ได้แก่ เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร (ICT) เพื่อใช้ตรวจประเมินทางไกลครั้งแรกของประเทศไทยให้เป็นผลสำเร็จในปี พ.ศ. 2564 เนื่องจากการประกาศสถานการณ์จากการระบาด COVID-19⁽²⁰⁾ ทำให้ไม่สามารถเดินทางได้แต่ต้องปฏิบัติหน้าที่ให้คำปรึกษาแก่ผู้ตรวจประเมินและหน่วยงานที่ขอการรับรองให้สามารถเชื่อมต่อกับ internet และ audio ที่เหมาะสม ได้แก่ microphone, headphone, camera และ wearable technology เป็นต้น รวมทั้งแนะนำการใช้งาน application ที่เกี่ยวข้องกับการตรวจประเมินทางไกล และการใช้โปรแกรมการรับรองห้องปฏิบัติการด้วยระบบอิเล็กทรอนิกส์ (e-Accreditation)

การประเมินตนเองเพื่อเข้าสู่กระบวนการประเมินการเปลี่ยนผ่านจาก APAC

ได้จัดทำรายงาน Self-completed IAF-ILAC A3:10/2018 Transition report for the peer evaluation ประกอบด้วยบทต่าง ๆ ตามข้อกำหนดที่ 4 ถึง 9 รวมถึงข้อมูลการมีส่วนร่วมในกิจกรรมระดับสากลตามข้อกำหนดองค์กรการรับรองระดับภูมิภาค แบบประเมินตนเองตาม APAC FMRA-019 Accreditation body evaluation documentation checklist และหลักฐานในการนำระบบคุณภาพมาสู่การปฏิบัติ ยื่นต่อองค์กร APAC ภายในวันที่ 31 ตุลาคม พ.ศ. 2562 ตามประกาศของ ILAC/IAF จากการตรวจประเมินจาก APAC แบบ document review ในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2563 สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการได้รับการยอมรับว่ามีการบริหารงานคุณภาพสอดคล้องกับข้อกำหนด ISO/IEC 17011:2017 เมื่อ วันที่ 28 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2563 โดยไม่พบข้อบกพร่องใดๆ และมีข้อแนะนำที่ต้องดำเนินการแก้ไข 4 ข้อ ดังแสดงในตารางที่ 2

การรับการตรวจประเมินจาก APAC แบบ on-site evaluation

ตามข้อกำหนดของ APAC-MRA-001 กำหนดให้หน่วยรับรองระบบงานที่ได้รับการยอมรับความเท่าเทียม

จาก APAC ต้องมีการตรวจประเมินใหม่ (re-evaluation) โดยในปี พ.ศ. 2565 สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการเข้ารับการตรวจเพื่อต่ออายุการยอมรับความเท่าเทียมจาก APAC โดย APAC ทำการตรวจประเมินความสามารถสำนักงาน (office evaluation) และตรวจสังเกตการณ์ความสามารถผู้ตรวจประเมิน ณ สถานประกอบการ (witnessing of assessment) ประกอบด้วยห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสาธารณสุข ห้องปฏิบัติการด้านการแพทย์ และหน่วยผลิตหรือจัดเตรียมวัสดุอ้างอิง เมื่อวันที่ 21-25 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2565 และ 21-23 มีนาคม พ.ศ. 2565 โดยพบข้อบกพร่อง 8 ข้อ และข้อแนะนำ 4 ข้อ รายละเอียด ดังแสดงในตารางที่ 3

การวิเคราะห์และการดำเนินการแก้ไข

จากการศึกษาข้อบกพร่องและข้อแนะนำ APAC ระหว่าง พ.ศ. 2563-2565 จำนวน 16 ข้อ พบความไม่สอดคล้องกับข้อกำหนด ISO/IEC 17011:2017 มากที่สุด คือ ข้อ 7 ด้านกระบวนการรับรองห้องปฏิบัติการ จำนวน 7 ข้อ คิดเป็นร้อยละ 43.75 รองลงมา คือ ข้อ 4 ข้อกำหนดทั่วไป ข้อ 6 ข้อกำหนดทรัพยากร ข้อ 8 ข้อกำหนดด้านข้อมูลข่าวสาร พบเรื่องละ 3 ข้อ คิดเป็นร้อยละ 18.8 สำหรับข้อ 9 ข้อกำหนดระบบบริหารจัดการ และข้อ 5 ข้อกำหนดโครงสร้างการบริหารมีการดำเนินการครบถ้วนตามข้อกำหนดใหม่ทุกประการ เมื่อลงรายละเอียดความไม่สอดคล้องมากที่สุดแยกตามข้อกำหนดย่อย 3 ลำดับแรก เป็นข้อกำหนดที่มีนัยสำคัญทางสถิติและเกิดขึ้นใหม่ คือ ข้อกำหนดที่ 6.1 เรื่องความสามารถบุคลากร จำนวน 3 ข้อ สาเหตุเกิดจากไม่พบหลักฐานความเชี่ยวชาญเฉพาะผู้ตรวจประเมิน รวมถึงไม่ได้พิจารณาความเสี่ยงต่อความพร้อมการปฏิบัติงานของผู้ตรวจประเมิน ข้อกำหนดที่ 7.4 เรื่องการเตรียมการก่อนการตรวจประเมิน จำนวน 2 ข้อ สาเหตุเกิดจากขาดความเข้าใจในการจัดแผนการตรวจประเมินที่ต้องเป็นตัวแทนของสิ่งที่ถูกสุ่มตรวจ และความไม่ชัดเจนของขั้นตอนการปฏิบัติงาน สำหรับข้อกำหนดที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ ข้อกำหนดที่ 8.2 เรื่อง ข้อมูลที่หน่วยรับรองต้อง

ตารางที่ 2 ข้อเสนอแนะที่พบจากการตรวจประเมินจาก APAC แบบ document review

ข้อกำหนด	ข้อเสนอแนะ	การแก้ไขและปรับปรุง
4.4	กลุ่มประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ซึ่งอยู่ภายใต้โครงสร้างเดียวกันกับสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ได้ถูกจัดตั้งเป็นศูนย์ทดสอบความชำนาญขึ้นตรงกับอธิบดีหรือรองอธิบดี ที่ได้รับมอบหมาย ตามคำสั่งปรับปรุง โครงสร้างการแบ่งส่วนราชการภายในของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ 154/2563 ประกาศ ณ วันที่ 14 มกราคม พ.ศ. 2563 และโครงสร้างองค์กรที่อยู่ในคู่มือคุณภาพ ยังไม่ถูกทบทวนให้เป็นปัจจุบัน (ISO/IEC 17011; 4.4.11 a)	แก้ไขโครงสร้างองค์กรในคู่มือคุณภาพให้เป็นปัจจุบัน
7.4	หนังสือแจ้งคณะผู้ตรวจประเมินที่ส่งให้ห้องปฏิบัติการทราบ ไม่ได้ระบุถึงหน่วยงานที่ผู้ตรวจประเมินสังกัด (ISO/IEC 17011; 7.4.2)	กำหนดให้มีการแจ้งชื่อหน่วยงานผู้ตรวจประเมิน และสังกัดให้ห้องปฏิบัติการทราบ เพื่อแสดงถึงความไม่มีส่วนได้ส่วนเสียของผู้ตรวจประเมินที่ถูกแต่งตั้ง
7.12	มาตรฐานการปฏิบัติงาน เรื่อง การจัดการข้อร้องเรียน กำหนดให้ผู้จัดการคุณภาพซึ่งเป็นผู้ที่ไม่มีส่วนได้ส่วนเสียทำหน้าที่สอบสวนเรื่องร้องเรียน แต่เป็นเรื่องที่สำคัญที่ต้องระบุให้ชัดเจนในเอกสารการปฏิบัติงานต้องกระทำโดยผู้ที่ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับเรื่องร้องเรียน (ISO/IEC 17011; 7.12.8)	กำหนดให้ผู้ทำหน้าที่สอบสวนเรื่องร้องเรียน ต้องไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับเรื่องร้องเรียน
8.2	ไม่พบการจัดทำระเบียบวิธีปฏิบัติการรับฟังความคิดเห็นของห้องปฏิบัติการหรือหน่วยงานผู้มีส่วนได้ส่วนเสีย เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงข้อกำหนด ทำให้เกิดความไม่มั่นใจในกระบวนการว่าจะดำเนินการครบถ้วนจริง แม้ว่าข้อกำหนดไม่ได้กำหนดให้มีการจัดทำ (ISO/IEC 17011; 8.2.3)	จัดทำขั้นตอนการปฏิบัติงาน เรื่อง การรับฟังความคิดเห็นของผู้มีส่วนได้ส่วนเสีย ในการออกข้อกำหนด เงื่อนไขการรับรอง

ตารางที่ 3 ข้อบกพร่องข้อเสนอแนะจากการตรวจประเมินเพื่อต่ออายุการยอมรับความเท่าเทียมจาก APAC

ข้อกำหนด	ข้อบกพร่อง/ข้อเสนอแนะ	การแก้ไขและปรับปรุง
ข้อบกพร่อง		
4.3	พบการใช้สัญลักษณ์การรับรองในรายงานผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองแตกต่างกัน บางฉบับระบุถึงมาตรฐานการรับรอง บางฉบับมีเพียงสัญลักษณ์การรับรองและหมายเลขทะเบียนห้องปฏิบัติการ แต่ไม่ปรากฏมาตรฐานที่ได้รับการรับรอง (ISO/IEC 17011; 4.3.4)	1) เพิ่มวิธีปฏิบัติเรื่องการแสดงมาตรฐานการรับรอง (ISO/IEC 17025 หรือ ISO 15189 หรือ ISO 17034) ในช่องหมายเหตุด้านท้าย หรือที่อื่น ๆ ของรายงานผลการทดสอบ 2) สื่อสารวิธีปฏิบัติให้ลูกค้าทางจดหมาย และชี้แจงผู้ตรวจประเมิน คณะกรรมการ ลูกค้า และหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ผ่านการสัมมนาฟื้นฟูความรู้ประจำปีและบนเว็บไซต์
4.6	ไม่ได้กำหนดนโยบายและขั้นตอนการปฏิบัติงานการทบทวนความเหมาะสมของโปรแกรมการรับรอง (ISO/IEC 17011; 4.6.3)	กำหนดนโยบายและเพิ่มวิธีปฏิบัติ เรื่อง การทบทวนความเหมาะสมของโปรแกรมการรับรอง ประกอบด้วย 1) การสอบถามความคิดเห็นผู้มีส่วนได้ส่วนเสียในการออกข้อกำหนด 2) การสอบถามเพื่อประเมินผลการดำเนินการรับรอง 3) การแต่งตั้งคณะทำงานวิชาการเฉพาะด้านเพื่อทบทวนข้อกำหนดเฉพาะด้านต่าง ๆ 4) การทบทวนความเหมาะสมของโปรแกรมถึงความสอดคล้องกับข้อกำหนดอื่น ๆ และกฎหมายที่เกี่ยวข้อง และ 5) คณะกรรมการที่ปรึกษาพิจารณาความเหมาะสมของโปรแกรมและให้คำแนะนำในการปรับปรุง

ตารางที่ 3 ข้อบกพร่องข้อแนะนำจากการตรวจประเมินเพื่อต่ออายุการยอมรับความเท่าเทียมจาก APAC (ต่อ)

ข้อกำหนด	ข้อบกพร่อง/ข้อแนะนำ	การแก้ไขและปรับปรุง
7.4	แผนการตรวจประเมินไม่ครอบคลุมถึงกิจกรรม สถานที่ และการทดสอบที่ถูกรวบรวม (ISO/IEC 17011; 7.4.7)	จัดทำแบบฟอร์มแผนการตรวจประเมิน มีรายละเอียดจำนวนรายการทดสอบที่ถูกรวบรวม รายละเอียดรายการทดสอบที่ถูกรวบรวม ชื่อผู้ตรวจประเมินในแต่ละรายการทดสอบ และสถานที่เก็บตัวอย่างที่ถูกรวบรวม เพื่อแสดงถึงตัวแทนของสิ่งที่ถูกรวบรวมที่ทำการตรวจประเมิน
7.6	รายงานการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการไม่มีรายละเอียดข้อบกพร่องที่ถูกรวบรวม นอกจากนี้รายงานการตรวจประเมินหน่วยผลิตหรือจัดเตรียมวัสดุอ้างอิงไม่มีรายละเอียดว่าเป็นวัสดุอ้างอิงหรือวัสดุอ้างอิงรับรอง ทำให้ไม่ชัดเจนในการให้การรับรอง (ISO/IEC 17011; 7.6.6 b)	1) เพิ่มข้อบกพร่องที่ถูกรวบรวมในแบบฟอร์มรายงานการตรวจประเมิน 2) ระบุประเภทของวัสดุอ้างอิงว่าเป็นวัสดุอ้างอิงหรือวัสดุอ้างอิงรับรอง และวิธีการที่ใช้ในการกำหนดค่าของวัสดุอ้างอิงในรายงานการตรวจประเมินหน่วยผลิตหรือจัดเตรียมวัสดุอ้างอิง
7.8	ใบรับรองความสามารถของหน่วยผลิตหรือจัดเตรียมวัสดุอ้างอิงไม่ได้ระบุถึงวิธีการที่ใช้ในการกำหนดค่าของวัสดุอ้างอิง (ISO/IEC 17011; 7.8.3 f)	1) เพิ่มรายละเอียดการวัด เรื่อง วิธีการที่ใช้ในการกำหนดค่าของวัสดุอ้างอิง ได้แก่ single laboratory เป็นต้น ในขั้นตอนการปฏิบัติงาน เรื่อง การจัดทำใบรับรอง 2) แก้ไขข้อบกพร่องการรับรองในเอกสารแนบท้ายใบรับรอง ส่งให้ลูกค้า
7.9	โปรแกรมการตรวจประเมินตามวงรอบการรับรอง ยังไม่ถูกนำไปประยุกต์ใช้ครบถ้วนตามข้อกำหนด (ISO/IEC 17011; 7.9.2)	กำหนดวิธีปฏิบัติให้ครบถ้วน โดยเพิ่มการลงบันทึกข้อมูลรายการทดสอบที่ถูกรวบรวม รายละเอียดห้องปฏิบัติการ และสถานที่เก็บตัวอย่างที่ถูกรวบรวม ตามวงรอบพิจารณาและวงรอบการต่ออายุ
7.11	ไม่พบการจัดทำเป็นเอกสารขั้นตอนการยกเลิกการรับการรับรอง (ISO/IEC 17011; 7.11.3)	จัดทำวิธีปฏิบัติการยกเลิกการรับการรับรอง ให้ยกเลิกเมื่อห้องปฏิบัติการได้แก้ไขและได้ปฏิบัติตามนโยบายข้อกำหนด และเงื่อนไขการรับรองฯ เป็นที่เรียบร้อยแล้ว โดยเจ้าหน้าที่รับรองต้องตรวจสอบหลักฐานและกรอกแบบฟอร์มเสนอถอนการรับชั่วคราวต่อหัวหน้ากลุ่มรับรองและผู้อำนวยการเพื่ออนุมัติ
8.2	ข้อมูลห้องปฏิบัติการที่ถูกระงับและถูกเพิกถอนที่เผยแพร่บนเว็บไซต์ยังขาดรายละเอียด วันที่ และข้อบกพร่องที่ถูกระงับและถูกเพิกถอน (ISO/IEC 17011; 8.2.2)	แก้ไขเว็บไซต์โดยเพิ่มรายละเอียด วันที่ถูกระงับ ประเภทการระงับ ข้อบกพร่องที่ถูกระงับ และกำหนดให้เก็บบันทึกข้อมูลห้องปฏิบัติการถูกเพิกถอนในเว็บไซต์เป็นเวลา 8 ปี
ข้อแนะนำ		
6.1	ผู้ตรวจประเมินไม่ได้สังเกตเห็นมาตรฐานที่ไม่ตรงกันในใบรับรองวัสดุอ้างอิง โดยหัวหน้ากระดาน ระบุมมาตรฐาน ISO Guide 34 ซึ่งเป็นฉบับยกเลิก แต่ท้ายกระดานระบุมมาตรฐาน ISO 17034 ซึ่งเป็นฉบับปัจจุบันระหว่างการตรวจประเมิน (ISO/IEC 17011; 6.1.2.3)	1) แจ้งหน่วยผลิตหรือจัดเตรียมวัสดุอ้างอิงออกใบรับรองวัสดุอ้างอิงให้ถูกต้อง 2) จัดฟื้นฟูความรู้ผู้ตรวจประเมิน คณะกรรมการและเจ้าหน้าที่รับรอง 3) ตรวจสอบความถูกต้องใบรับรองวัสดุอ้างอิง เมื่อพิจารณาให้การรับรอง โดยคณะกรรมการรับรองหน่วยผลิตหรือจัดเตรียมวัสดุอ้างอิง
6.1	ไม่พบบันทึกความเชี่ยวชาญเฉพาะด้านการตรวจวิเคราะห์ในประวัติของผู้ตรวจประเมิน ISO 15189 บางท่าน (ISO/IEC 17011; 6.1.2.3)	1) ทบทวนขั้นตอนการปฏิบัติงาน โดยระบุประวัติให้ชัดเจนถึงประสบการณ์เกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์ 2) สร้างความตระหนักถึงความสำคัญที่ต้องมีหลักฐานเพื่อแสดงถึงความสามารถ และขอความร่วมมือเพื่อจัดทำประวัติให้ครบถ้วน

ตารางที่ 3 ข้อบกพร่องข้อแนะนำจากการตรวจประเมินเพื่อต่ออายุการยอมรับความเท่าเทียมจาก APAC (ต่อ)

ข้อกำหนด	ข้อบกพร่อง/ข้อแนะนำ	การแก้ไขและปรับปรุง
6.1	ไม่พบการประเมินสมรรถนะผู้ตรวจประเมินเพิ่มเติมจากที่กำหนด (3 ปีครั้ง) กรณีที่มีการทบทวนให้ออกตรวจความถี่สูงกว่าผู้ตรวจประเมินท่านอื่น อาจเกิดความเสี่ยงต่อกิจกรรมที่ดำเนินการ (ISO/IEC 17011; 6.1.3.4)	กำหนดมาตรการการแต่งตั้งผู้ตรวจประเมินคนเดิมตรวจไม่เกิน 2 ครั้งต่อเดือน และกำหนดให้มีการเฝ้าระวัง โดยประเมินสมรรถนะผู้ตรวจประเมินเพิ่มเติม กรณีตรวจประเมินมากกว่า 2 ครั้งต่อเดือน
8.2	ข้อมูลห้องปฏิบัติการที่ถูกระงับและเผยแพร่บนเว็บไซต์ ระบุสถานะ (status column) 3 สถานะ คือ ได้รับการรับรอง ถูกระงับ และอยู่ระหว่างดำเนินการ ทำให้เกิดความสับสนว่าข้อมูลใดดังกล่าวจะอยู่ในรายชื่อข้อมูลห้องปฏิบัติการที่ถูกระงับ (ISO/IEC 17011; 8.2.2)	ปรับปรุงเว็บไซต์โดยยกเลิกสถานะที่ได้รับการรับรอง และอยู่ระหว่างดำเนินการคงเหลือเฉพาะถูกระงับ กำหนดให้มีวันที่และขอบข่ายถูกระงับ

วิจารณ์

เผยแพร่สู่สาธารณชน จำนวน 3 ข้อ สาเหตุเกิดจากการกำหนดข้อมูลห้องปฏิบัติการที่ถูกระงับและเพิกถอนบนเว็บไซต์ไม่ชัดเจน ซึ่งข้อบกพร่องและข้อแนะนำดังกล่าวนี้ได้มีการวิเคราะห์หาสาเหตุและการแก้ไขซึ่งปรับปรุงเป็นที่เรียบร้อยแล้ว ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3

ผลการดำเนินการทำให้สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการประสบผลสำเร็จอย่างชัดเจนและผ่านการตรวจประเมินจาก APAC-peer evaluation มีห้องปฏิบัติการผ่านการรับรองตามมาตรฐานสากลเพิ่มขึ้น 429, 451, 476, 502, 541 และ 575 แห่ง ในปี พ.ศ. 2560-2565 ตามลำดับ โดยให้การรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ครบถ้วนร้อยละ 100 (296 แห่ง) ภายในวันที่ 1 มิถุนายน 2564 ตามที่ประกาศ ILAC Resolution GA 20.15 กำหนด⁽²¹⁾ เป็นผลสำเร็จ โดยได้เพิกถอนการรับรอง 1 แห่ง เนื่องจากห้องปฏิบัติการไม่สามารถดำเนินการครบถ้วนตามข้อกำหนด จากการพัฒนาปรับปรุงกระบวนการรับรองอย่างต่อเนื่อง พบว่าผู้ใช้บริการและผู้มีส่วนได้ส่วนเสียมีความพึงพอใจต่อกระบวนการรับรองสูงขึ้น ร้อยละ 81.4, 81.8, 82.0, 82.8 และ 90.8 ในปี พ.ศ. 2561-2565 ตามลำดับ สำหรับความต้องการและความคาดหวังของผู้ใช้บริการ พบว่าต้องการให้กระบวนการรับรองมีความสะดวกรวดเร็ว มีการชำระอัตราค่าธรรมเนียมการรับรองโดยผ่านทาง e-banking และโปรแกรมการรับรองห้องปฏิบัติการด้วยระบบอิเล็กทรอนิกส์ให้เข้าถึงได้ง่ายมากยิ่งขึ้น

เมื่อเริ่มนำระบบคุณภาพสากล ISO/IEC 17011:2017 มาใช้ในปี พ.ศ. 2560 พบว่ามีปัญหาการสร้างความเข้าใจในระบบให้กับเจ้าหน้าที่และบุคลากรทุกระดับ รวมถึงการตีความและการทำความเข้าใจในข้อกำหนดของ ISO/IEC 17011:2017 เนื่องจากมาตรฐานดังกล่าวเน้นผลของกระบวนการแทนคำอธิบายในรายละเอียดของงานและขั้นตอน จำเป็นต้องศึกษาความแตกต่างระหว่างข้อกำหนด ISO/IEC 17011:2004 และข้อกำหนด ISO/IEC 17011:2017 เพื่อใช้เป็นแนวทางการจัดแผนการปรับปรุงและพัฒนาระบบบริหารการเป็นองค์กรรับรองให้สอดคล้องกับ ISO/IEC 17011:2017 รวมถึงการเรียนรู้จากการลงมือปฏิบัติจริงในการปรับปรุงอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะข้อกำหนดใหม่ที่ไม่พบในมาตรฐานฉบับก่อน มี 3 ประเด็น ได้แก่ 1) ความเป็นกลาง 2) การปฏิบัติการจัดการความเสี่ยงและโอกาส และ 3) การทบทวนความเหมาะสมของรูปแบบการตรวจสอบและรับรอง โดยมีการระบุชัดเจนถึงความรู้ความสามารถของบุคลากรทุกหน้าที่ตลอดกิจกรรมการรับรองความสามารถ โดยเฉพาะผลกระทบของผลประโยชน์ทับซ้อนการให้บริการ การรับรองทั้งหน่วยงานภายในและภายนอก ที่ผู้บริหารสูงสุดต้องมีความมุ่งมั่นและบุคลากรทั้งหมดต้องปฏิบัติด้วยความเป็นกลาง ซึ่งสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการได้นำความเสี่ยงและโอกาสสู่การปฏิบัติในการจัดการตามระดับความรุนแรงของผลกระทบ ระบุผู้รับผิดชอบหลักเป็นผู้อำนวยการสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ในฐานะ

เลขานุการคณะกรรมการที่ปรึกษาที่ต้องร่วมกันพิจารณาความเป็นกลางและแนวทางลดความเสี่ยง โดยมีผู้มีส่วนได้ส่วนเสียทุกภาคส่วนเข้ามามีส่วนร่วมและมีการนำโอกาสการพัฒนาจากการระบุความเสี่ยงที่ได้ดำเนินการตามข้อกำหนดที่ 4.4 มากำหนดกิจกรรมที่วางแผนปรับปรุงและแผนการป้องกันในข้อกำหนดที่ 9.6 เป็นอย่างดี ร่วมกับการสำรวจความพึงพอใจต่อการดำเนินการรับรอง ทั้งนี้จากการตรวจประเมินจาก APAC พบข้อบกพร่องที่เป็นข้อกำหนดใหม่และข้อกำหนดเดิมที่เป็นปัญหาสำคัญ ต้องติดตามเฝ้าระวังเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดขึ้นซ้ำ และเป็นเรื่องสำคัญที่ต้องจัดอบรมให้ความรู้ข้อกำหนดและการเปลี่ยนแปลงมาตรฐานต่างๆ ที่เกิดขึ้นในการพัฒนาขีดความสามารถบุคลากร และสร้างความตระหนักแก่เจ้าหน้าที่ในขั้นตอนการเตรียมการก่อนการตรวจประเมินที่เป็นข้อบกพร่องที่เกิดขึ้น โดยเฉพาะการจัดทำแผนการตรวจประเมิน การเลือกกิจกรรมที่สุ่มตรวจที่ต้องถูกบันทึกในรายงานการตรวจประเมิน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดทำโปรแกรมการตรวจประเมินตามวงจรการรับรองที่มีประสิทธิภาพ สำหรับข้อกำหนดใหม่ที่ 4.6 จำเป็นที่ต้องเร่งสำรวจความคิดเห็นจากห้องปฏิบัติการและผู้มีส่วนได้ส่วนเสียทั้งภาครัฐและเอกชน ถึงข้อกำหนดที่จำเป็นที่ห้องปฏิบัติการต้องปฏิบัติตาม รวมทั้งกฎหมายที่บังคับใช้เพื่อนำมาปรับปรุงข้อกำหนดเฉพาะสำหรับการให้การรับรองให้มีความทันสมัยมากยิ่งขึ้น ปัจจุบันมีทั้งหมด 12 ฉบับ ได้แก่ ข้อกำหนดเฉพาะด้านห้องปฏิบัติการสัตวแพทย์ ด้านนิติวิทยาศาสตร์ ด้านรังสีและเครื่องมือแพทย์ ด้านประสาทสัมผัส เป็นต้น เพื่อรักษาไว้ซึ่งการเป็นสมาชิกสามัญที่ลงนามความร่วมมือระหว่างประเทศ ต้องถูกประเมินจาก peer evaluator ซ้ำทุก 4 ปี ซึ่งสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการตั้งเป้าหมายที่จะขยายการยอมรับร่วมในโปรแกรมรับรองระบบงานธนาคารทรัพยากรชีวภาพในปี พ.ศ. 2569 โดยต้องมีห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO 20387:2018 อย่างน้อย 1 แห่งเพื่อรับการตรวจประเมินจาก APAC ครั้งต่อไป

สรุป

ปัจจัยความสำเร็จเกิดจากการมีนโยบายที่ชัดเจนจากผู้บริหารระดับสูง การสร้างความเชื่อมโยงกับภาครัฐและภาคเอกชนผู้มีส่วนได้ส่วนเสีย และการมีความหลากหลายของบุคลากรทางห้องปฏิบัติการที่มีความสามารถและมีองค์ความรู้ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ตามมาตรฐานสากล เข้ามามีส่วนร่วมในคณะกรรมการรับรองความสามารถ คณะที่ปรึกษาการรับรอง คณะทำงานวิชาการต่างๆ และผู้ตรวจประเมิน รวมทั้งการวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อกำหนดตาม ISO/IEC 17011:2004 และข้อกำหนดตาม ISO/IEC 17011:2017 มีส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดความเข้าใจและใช้เป็นแนวทางการพัฒนาระบบบริหารการเป็นองค์กรรับรอง สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการของประเทศอย่างมีประสิทธิภาพ ตลอดจนความสำเร็จในการพัฒนาด้านกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการกิจของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ หน่วยรับรองระบบงานของประเทศตามข้อกำหนดที่ 4.4.11 ในการแสดงความโปร่งใสและความไม่ลำเอียง การเรียนรู้จากกรอบและการประชุมประจำปีในฐานะสมาชิกของ APAC และ ILAC การมีแผนการปรับปรุงและแผนป้องกันที่ดี การพัฒนาระบบสารสนเทศเพื่อใช้ตรวจประเมินทางไกลได้อย่างครบถ้วน ส่งผลให้สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการสามารถรักษาสถานภาพการเป็นสมาชิกสามัญที่ลงนามความร่วมมือในการตรวจต่ออายุแบบเต็มรูปแบบและไม่พบข้อบกพร่องด้านระบบบริหารจัดการหน่วยรับรองระบบงาน และสิ่งที่สำคัญ คือ การรักษาระบบและการพัฒนาต่อยอดไปสู่การได้รับการยอมรับร่วม APAC MRA ในการขยายขอบข่ายการรับรองระบบงานธนาคารทรัพยากรชีวภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 20387:2018 Biotechnology-Biobanking-General requirements for biobanking เพื่อตอบสนองการพัฒนาทางอุตสาหกรรมและพัฒนาเศรษฐกิจชีวภาพของประเทศ ซึ่งต้องร่วมมืออย่างจริงจังจากทุกฝ่ายที่เกี่ยวข้อง ในการขับเคลื่อนยุทธศาสตร์ชาติในประเด็นการสร้างความสามารถในการแข่งขันของประเทศได้อย่างยั่งยืน

ทั้งนี้ควรพัฒนาดำเนินงานในระยะต่อไป ได้แก่

- 1) ด้านระบบบริหารคุณภาพ ต้องมีการเปิดโปรแกรมการรับรองแบบ flexible scope เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและลดระยะเวลารับรอง และ 2) ด้านเทคโนโลยีสารสนเทศ ที่ต้องมีการนำระบบการทำงานแบบดิจิทัลมาประยุกต์ใช้อย่างคุ้มค่า โดยต้องมีการยกระดับโปรแกรมการรับรองห้องปฏิบัติการด้วยระบบอิเล็กทรอนิกส์เปรียบเทียบกับมาตรฐานสากล ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาในการให้บริการรองรับขอขยายใหม่ๆ ได้แก่ โปรแกรมการรับรองธนาคารทรัพยากรชีวภาพที่เปิดให้บริการในปี พ.ศ. 2565 โปรแกรมการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ออนไลน์ตามมาตรฐาน ISO 15189:2022 ที่ประกาศใช้เมื่อธันวาคม พ.ศ. 2565⁽²²⁾

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และผู้บริหารสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ให้การสนับสนุนด้านนโยบายและงบประมาณในการดำเนินงานรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุข และบุคลากรกลุ่มรับรองห้องปฏิบัติการที่มุ่งมั่นทำงานให้เกิดผลสำเร็จของงานนี้อย่างต่อเนื่อง

เอกสารอ้างอิง

1. ISO/IEC 17011:2017. Conformity assessment-requirements for accreditation bodies accrediting conformity assessment bodies. 2nd ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.
2. ISO/IEC 17011:2004. Conformity assessment-general requirements for accreditation bodies accrediting conformity assessment bodies. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2004.
3. International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC). ISO/IEC 17011:2017 transition plan published. [online]. 2019; [cited 2023 Aug 2]; [1 screen]. Available from: URL: https://ilac.org/latest_ilac_news/isoiec-17011-2017-transition-plan-published.
4. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายชื่อห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรอง [ออนไลน์]. 2566; [สืบค้น 2 ส.ค. 2566]; [66 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://blqs.dmsc.moph.go.th/page-view/83#>.
5. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 3rd ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.
6. Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC). Publications. [online]. 2023; [cited 2024 Jan 6]; [1 screen]. Available from: URL: <https://www.apac-accreditation.org/publications>.
7. International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC). Publications and resources. [online]. 2023; [cited 2024 Jan 6]; [1 screen]. Available from: URL: <https://ilac.org/publications-and-resources>.
8. Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC). APAC MRA-009 performing remote evaluations-requirements and guidance Ver 1.3 (20230325). [online]. 2023; [cited 2023 Aug 2]; [11 screens]. Available from: URL: <https://www.apac-accreditation.org/publications/mra-series/apac-mra-009-performing-remote-evaluations-ver-1-3-20230325>.
9. Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC). APAC TEC0-001 guidance on remote assessments by accreditation bodies Ver 1.1 (20210611). [online]. 2021; [cited 2023 Aug 2]; [12 screens]. Available from: URL: <https://www.apac-accreditation.org/publications/tec0-series>.
10. Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC). APAC TEC1-001 guidance on scopes of accreditation for biobanks Vers 1.0 (20210610). [online]. 2021; [cited 2023 Aug 2]; [7 screens]. Available from: URL: <https://www.apac-accreditation.org/publications/tec1-series/apac-tec1-001-apac-guidance-on-scopes-of-accreditation-for-biobanks-vers-1-0-20210610>.

11. Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC). APAC TEC4-003 guidance on flexible scopes of accreditation Ver 1.0 (20201020). [online]. 2020; [cited 2023 Aug 2]; [8 screens]. Available from: URL: <https://www.apac-accreditation.org/publications/tec4-series/apac-tec4-003-guidance-on-flexible-scopes-of-accreditation-ver-1-0-20201020>.
12. Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC). APAC MRA-001 APAC mutual recognition arrangement procedures Ver 1.18 (20230727). [online]. 2023; [cited 2023 Aug 2]; [47 screens]. Available from: URL: <https://www.apac-accreditation.org/publications/mra-series/apac-mra-001-procedures-for-establishing-and-maintaining-mutual-recognition-ver-1-18-20230727>.
13. International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC). ILAC-G3:08/2020 guidelines for training courses for assessors used by accreditation bodies. [online]. 2020; [cited 2023 Aug 2]; [16 screens]. Available from: URL: <https://ilac.org/?ddownload=123277>.
14. International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC). ILAC-G8:09/2019 guidelines on decision rules and statements of conformity.[online]. 2019; [cited 2023 Aug 2]; [20 screens]. Available from: URL: <https://ilac.org/?ddownload=122722>.
15. International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC). ILAC-G17:01/2021 ILAC guidelines for measurement uncertainty in testing. [online]. 2021; [cited 2023 Aug 2]; [12 screens]. Available from: URL: <https://ilac.org/?ddownload=123528>.
16. International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC). ILAC-G18:12/2021 guideline for describing scopes of accreditation. [online]. 2021; [cited 2023 Aug 2]; [13 screens]. Available from: URL: https://nab.lrv.lt/uploads/nab/documents/files/ILAC_G18_12_2021.pdf.
17. International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC). ILAC-G19:06/2022 modules in a forensic science process. [online]. 2022; [cited 2023 Aug 2]; [52 screens]. Available from: URL: <https://ilac.org/?ddownload=124605>.
18. International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC). ILAC-G26:11/2018 guidance for the implementation of a medical accreditation scheme. [online]. 2018; [cited 2023 Aug 2]; [14 screens]. Available from: URL: <https://ilac.org/?ddownload=819>.
19. ISO 20387:2018. Biotechnology-biobanking general requirements for biobanking. 1st ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2018.
20. ประกาศสถานการณ์ฉุกเฉินในทุกเขตท้องที่ทั่วราชอาณาจักร. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 69ง (วันที่ 25 มีนาคม 2563). หน้า 1.
21. International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC). The transition period for ISO/IEC 17025:2017. [online]. 2020; [cited 2023 Aug 2]; [1 screen]. Available from: URL: https://ilac.org/latest_ilac_news/transition-period-for-iso-iec-17025-extended.
22. ISO 15189:2022. Medical laboratories-requirements for quality and competence. 4th ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2022.

Development of the Management Systems of Accreditation Body of Bureau of Laboratory Quality Standards in Accordance with ISO/IEC 17011:2017

Sitaphaisith Ekachampaka and Piyawan Chainarongkuekul

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

ABSTRACT ISO/IEC 17011:2017 has been announced to replace the original edition (ISO/IEC 17011:2004) by International Organization for Standardization (ISO) and International Electrotechnical Commission (IEC) since November 2017. The Bureau of Laboratory Quality Standards (BLQS) of the Department of Medical Sciences is approved to be a full member and signatory to the Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC) Mutual Recognition Arrangement (MRA) and becomes a signatory to the International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC). Facing national challenges, BLQS needs to strengthen the capacity to provide accreditation of conformity assessment bodies in accordance with the new version standard ISO/IEC 17011:2017, and a peer evaluation process must be carried out by the APAC Evaluator within 3 years of the announcement date. By comparing the contrasting requirements between ISO/IEC 17011:2017 and ISO/IEC 17011:2004, BLQS was able to conduct a comprehensive analysis. With this information, BLQS could effortlessly incorporate the gap analysis, taking into account its current status. In doing so, BLQS could strategically devise a transition plan to ensure the maintenance of the APAC MRA across Accreditation Bodies. One notable accomplishment was the revision of the quality manual, which included updated requirements, and processes. BLQS had also succeeded for a significant development in competence, information, and risk managements. Nonconformities gained from accreditation process and views of interested parties were also discussed to identify opportunities for continuous improvement. Finally, our efforts had been acknowledged by the APAC, who had approved our comprehensive report of ISO/IEC 17011:2017 on February 28, 2020. In addition, BLQS was also re-evaluated and approved to be a full member and signatory to APAC MRA and ILAC MRA in 2022. This information can be used as a guideline to plan the improvement of the organization to have a quality system that is accepted internationally as well as promoting the further development of the country's bioeconomy.

Keyword: ISO/IEC 17011:2017, APAC, ILAC, Accreditation body, Bureau of Laboratory Quality Standards

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	Phichet Banyati
	Ballang Uppapong	Piya Sirilak
Technical Advisor	Pimjai Naigowit	Sumol Pavitranon
	Panadda Silva	Duanthanorm Promkhatkaew
	Busarawan Sriwanthana	
Executive Editor	Prapai Wongsinkongman	
Editor	Nuanjan Wichukchinda	
Assistant Editor	Apiwat Tawatsin	Siripakorn Sangkitporn
	Supaporn Phumiamorn	
Editorial Board	Pilaipan Puthavathana	Mahidol University
	Prasert Auewarakul	Mahidol University
	Danai Tiwawech	Naresuan University
	Padet Siriyasatien	Chulalongkorn University
	Pornpimol Kongtip	Mahidol University
	Srisurang Tantimavanich	Mahidol University
	Sunee Sirivichayakul	Chulalongkorn University
	Chanitra Thuwajit	Mahidol University
	Pintip Pongpech	Independent Scholar
	Suwanna Charunut	Independent Scholar
	Salakchit Chutipongvivate	Independent Scholar
	Usavadee Thavara	Independent Scholar
	Suthon Vongsheree	Independent Scholar
	Wichuda Chittangkura	Independent Scholar
	Supanee Duangteraprecha	Independent Scholar
	Nuanchawee Wetprasit	Independent Scholar
	Wantana Paveenkittiporn	Independent Scholar
	Uruyakorn Chansang	Independent Scholar
Administration	Numfon Noiprasert	Department of Medical Sciences
	Prasan Julwong	Department of Medical Sciences
	Aphimon Jiraphongsathorn	Department of Medical Sciences
	Navy Srivarom	Department of Medical Sciences
	Pawinee Sukcharoen	Department of Medical Sciences
	Apisara Khomduean	Department of Medical Sciences
Office	Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences 88/7 Soi Tiwanond 14, Tiwanond Rd., Nonthaburi 11000, Thailand. Tel. 0-2951-0000 ext. 99662 Fax: 0-2951-1297 E-mail : bull.dmssc@dmssc.mail.go.th	
Acknowledgment	Mr. Sakwichai Ontong from Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences for generosity and permission to use the image of <i>Mitragyna speciosa</i> (Korth.) Havil. leaves as cover illustration	
Printed by	Thanaaroonkarnpim Co., Ltd. 457/6-7 Phra Sumen Road, Bangkok 10200 Tel. 0-2282-6033-4	



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

ค่านิยม

D

Discovery

นำความรู้มาประยุกต์ใช้ในการทำงานได้เหมาะสม



M

Moral

ปฏิบัติงานด้วยความซื่อสัตย์สุจริต มีความโปร่งใส ตรวจสอบได้



S

Sciences/Standard

ทำงานอย่างมีมาตรฐานตามหลักวิชาการ



C

Change

ยอมรับฟังความคิดเห็นของผู้อื่นอย่างสร้างสรรค์ ทำงานเป็นทีม



<https://bit.ly/BullDmsc>