



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วารสาร

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 67 ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม 2568 • Vol. 67 No. 4 October - December 2025



ISSN 3057-1286 (Print)

ISSN 3057-1308 (Online)

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 67 ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม 2568

Vol. 67 No. 4 October - December 2025

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์โปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT โดยเทคนิค Flow Cytometry เพื่อระบุเอกลักษณ์ของวัคซีนโควิด 19 ชนิด mRNA
พุดิตา โชคเหรียญสุขชัย อชิระ นามจันทร์ และ วิภาวี วงศ์ชนะ 557
- การสังเคราะห์และคุณสมบัติการป้องกันรังสีเอกซ์ของพอลิเมอร์ผสมระหว่าง โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ และโพลีไวนิลไพโรลิโดนกับบิสฟัทออกไซด์
ไพฑูรย์ บุญส่ง 567
- การทดสอบความคงตัวของตัวอย่างทดสอบความชำนาญในอาหารทางจุลชีววิทยา ภายใต้สภาวะจำลองการขนส่งและอุณหภูมิห้อง
อัจฉรา อยู่คง กมลวรรณ กันแต่่ง และ สุตารัตน์ ศรีน้อยเมือง 584
- ภาวะท้องเสียเฉียบพลันและเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารในผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง โรงพยาบาลรามธิบดี
ตรีวัฒน์ วัฒนะโชคชัย กิ่งกาญจน์ รักษ์มณี พิเชฐ ยุทธนาการวิกรม และ เอกวัฒน์ ผสมทรัพย์ 596
- รูปแบบของเชื้อก่อโรคติดเชื้อทางเดินหายใจเฉียบพลัน โรงพยาบาลรามธิบดี สิบปีย้อนหลัง
กิ่งกาญจน์ รักษ์มณี ตรีวัฒน์ วัฒนะโชคชัย พิเชฐ ยุทธนาการวิกรม และ เอกวัฒน์ ผสมทรัพย์ 611
- การวิเคราะห์ดีเอ็นเอบาร์โคดในการตรวจยืนยันอาหารเป็นพิษจากเห็ดสกุล *Amanita* ที่ไม่สร้างสารพิษอะมานิติน
พรพรรณา ชลนาทิจกุล สิทธิพร ปานเม่น ญัฐกานต์ หนูรุ่ม ชิดกมล ทูลคำรักษ์ ศรีประภา ภัสรพงษ์กุล อัญชลี นิตมา สุจิตรา สิกพันธ์ ชุตินญชู่ อุตวิชัย รุ่งแสง จันทร์คุณาสุชะ นิสากร ปาละกุล และ ดุษฎี พลภัทรพิเศษกุล 625
- การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 144 ชนิด ในผักและผลไม้ด้วยเทคนิค LC-QTOF/MS
อคราพิชญ์ ศรีประภารัตน์ และ วีรุฒิ วิทยานันท์ 638

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การประเมินความสามารถห้องปฏิบัติการผ่านการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชกลุ่มควอตโนนินฝรั้ง 660
 รัตติยากร ศรีโคตร ภรพวรรณ ส่งศรี และ วีรุฒิ วิทยานันท์
- การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ Alliin ในกระเทียมโดยวิธี Ultra Performance Liquid Chromatography 677
 ณิชภัทร ปัตตะพงษ์ อภิรักษ์ ศักดิ์เพ็ชร วิไลลักษณ์ ชื่นนางซี สิริกาญจน์ ธนอริยโรจน์ และ นุจรี ศรีสนาม

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

- การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเทคนิคการตรวจเชิงปริมาณทางจุลชีววิทยาในอาหาร 699
 กมลวรรณ กันแต่่ง และ อัจฉรา อยู่คง
- การวิเคราะห์กระบวนการ โครงสร้างพื้นฐาน และสิ่งไม่สอดคล้องที่พบในกระบวนการรับรองความสามารถของธนาคารชีวภาพในประเทศไทย ตามมาตรฐาน ISO 20387:2018 709
 นัฐกาญจน์ ละเอียดดี สิริชมา ดุลยากร สิริพรรณ แสงอรุณ เสาวนีย์ อารมย์สุข และ สุรศักดิ์ หมั่นพล

บทความทั่วไป

- การพัฒนาหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติเพื่อการยอมรับร่วมของข้อมูลการประเมินทางเคมี Good Laboratory Practice กับองค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา (OECD) 723
 ธัญญารัตน์ สุขสมบูรณ์ สารินี เลนะพันธ์ และ สุรศักดิ์ หมั่นพล

CONTENTS

Page

Original Articles

- Development for Analysis of the SARS-CoV-2 Spike Protein in 293FT Cells by Flow Cytometry for Identity Determination of the mRNA COVID-19 Vaccines** 557
Puthita Chokreansukchai, Achira Namjan, and Wipawee Wongchana
- Fabrication and Characterization for X-Ray Radiation Shielding of PVA/PVP: Bi₂O₃ Composites** 567
Paitoon Boonsong
- Stability Testing of Food Microbiological Proficiency Testing Samples under Simulated Transportation and Room Temperature Conditions** 584
Atchara Ukong, Kamonwan Kantaeng, and Sudarat Srinoimueang
- Acute Diarrhea and Gastrointestinal Pathogens in Diarrheal Patients at Ramathibodi Hospital, Thailand** 596
Treewat Watthanachokchai, Kingkan Rakmanee, Pichet Yutthanakarnwikom, and Ekawat Pasomsub
- A Ten-Year Retrospective Study on Patterns of Pathogens in Acute Respiratory Tract Infection at Ramathibodi Hospital, Thailand** 611
Kingkan Rakmanee, Treewat Watthanachokchai, Pichet Yutthanakarnwikom, and Ekawat Pasomsub

Original Articles

- DNA Barcoding in Confirmation of Foodborne Poisoning Caused by Amanitin Non-Producing *Amanita* Species** 625
Pornpanna Chonnakijkul, Sittiporn Parnmen, Nattakarn Nooron, Chidkamon Thunkhamrak, Sriprapa Phatsarapongkul, Unchalee Nitma, Sujitra Sikaphan, Chutimon Uttawichai, Rungsaeng Chankunasuka, Nisakorn Palakul, and Dutsadee Polputpisatkul
- Development and Validation for Analysis of 144 Pesticides in Vegetables & Fruits by LC-QTOF/MS Technique** 638
Akarapitch Siripraparat and Weerawut Wittayanan
- Laboratory Performance Assessment via Interlaboratory Comparison on Analysis of Quat Herbicides in Potatoes** 660
Rattiyakorn Srikote, Phornphan Songsri, and Weerawut Wittayanan
- Method Development of Determination of Alliin in Garlic Using Ultra Performance Liquid Chromatographic Technique** 677
Nichapat Pattapong, Apirak Sakpetch, Vilailuk Chuennangchee, Sirikarn Thana-ariyaroj, and Nuchjaree Seesanam

Laboratory Finding

- Estimation of Measurement Uncertainty in Food Quantitative Microbiological Techniques** 699
Kamonwan Kantaeng and Atchara Ukong
- Analysis of Workflows, Infrastructure, and Nonconformities in the Accreditation Process of Biobanks in Thailand According to ISO 20387:2018** 709
Nattakarn Laieddee, Siratcha Dulyakorn, Siriphan Saeng-aroon, Saovanee Aromsook, and Surasak Muenphon

General Article

- Development of National Compliance Monitoring Authority to OECD GLP Mutual Acceptance of Data on Chemical Assessment** 723
Thunyarat Sooksomboon, Sarinee Lenapun, and Surasak Muenphon

การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์โปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT โดยเทคนิค Flow Cytometry เพื่อระบุเอกลักษณ์ของวัคซีนโควิด 19 ชนิด mRNA

พุดิตา โชคเหรียญสุขชัย อชิระ นามจันทร์ และ วิภาวี วงศ์ชนะ

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์เอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 ชนิด mRNA โดยมีสมมติฐานว่า วัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 ชนิด mRNA สามารถทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ผลิตโปรตีนหนามของไวรัส SARS-CoV-2 ที่สามารถตรวจติดตามได้ด้วยการใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะโดยเทคนิค Flow cytometry ผลการศึกษาพบว่าวัคซีนสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงผลิตโปรตีนหนามได้ โดยปริมาณ mRNA แปรผันกับจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดโปรตีนหนาม และแอนติบอดีที่ใช้มีความจำเพาะต่อโปรตีนหนามเมื่อเปรียบเทียบกับแอนติบอดีควบคุม โดยเมื่อทดสอบวัคซีน mRNA ที่มีปริมาณ 30 ไมโครกรัม สามารถทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงมีการแสดงออกของโปรตีนหนามที่มีค่าเฉลี่ยประมาณร้อยละ 47 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีการเติมวัคซีนหรือกลุ่มควบคุมที่มีร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีโปรตีนหนามน้อยกว่าร้อยละ 1 ทั้งนี้ผู้วิจัยมีเป้าหมายที่จะพัฒนาวิธีดังกล่าวให้เป็นวิธีมาตรฐานที่สามารถใช้ได้กับทุกผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปแบบวัคซีน mRNA ในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ: วัคซีนโควิด 19, วัคซีน mRNA, โปรตีนหนาม, Flow cytometry, 293FT cells

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

Received: 26 December 2024

Revised: 21 May 2025

Accepted: 19 August 2025

บทนำ

โรคโควิด 19 (COVID-19) เกิดจากเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 (Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2; SARS-CoV-2) แพร่ระบาดครั้งแรกเมื่อปลายปี ค.ศ. 2019 ที่เมืองอู่ฮั่น สาธารณรัฐประชาชนจีน จากนั้นจึงได้มีการแพร่ระบาดไปทั่วโลก⁽¹⁾ เชื้อไวรัส SARS-CoV-2 มีส่วนประกอบสำคัญ คือ โปรตีนหนาม (Spike protein) ที่อยู่บนผิวของไวรัส มีบทบาทสำคัญในการจับกับโปรตีน Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) บนผิวของเซลล์เจ้าบ้านและทำให้ไวรัสสามารถเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้ นอกจากนี้โปรตีนหนามยังเป็นโปรตีนหลักที่ใช้เป็นเป้าหมายในการพัฒนาวัคซีน เนื่องจากสามารถกระตุ้นให้ร่างกายผลิต Neutralizing antibodies เพื่อยับยั้งการติดเชื้อไวรัสได้^(1,2)

การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 ที่ผ่านมามีการพัฒนาในหลายรูปแบบ ไม่ว่าจะเป็นวัคซีนรูปแบบเดิม ได้แก่ วัคซีนเชื้อตาย (Inactivated-virus vaccine) วัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (Live-attenuated vaccine) วัคซีนโปรตีนซับยูนิต (Protein subunit vaccine) และวัคซีนอนุภาคไวรัสเสมือน (Virus-like particle vaccine) หรือวัคซีนรูปแบบใหม่ (Next-generation vaccine platform) ได้แก่ วัคซีนที่ใช้ไวรัสเป็นพาหะ (Viral vector vaccine) วัคซีนรหัสพันธุกรรม (DNA or RNA vaccine) และวัคซีน Antigen-presenting cell (APC vaccine)⁽³⁾ ในบรรดาวัคซีนเหล่านี้ วัคซีนชนิด mRNA เป็นวัคซีนที่ได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีข้อได้เปรียบในการผลิตหลายประการ เช่น ใช้เวลาในผลิตน้อยกว่าวัคซีนทั่วไป มีกระบวนการผลิตที่ซับซ้อน ไม่ต้องใช้เซลล์เพาะเลี้ยงหรือไวรัสในการผลิตเหมือนกับวัคซีนรูปแบบเดิม ทำให้ลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนที่มาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ สามารถปรับปรุงวัคซีนเพื่อรองรับสายพันธุ์หากไวรัสมีการกลายพันธุ์ รวมถึงมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูง^(4,5) วัคซีนชนิด mRNA เป็นวัคซีนที่ถูกนำมาใช้งานเป็นครั้งแรกในการป้องกันโรคโควิด 19 โดยมีตัวยาที่สำคัญ (Drug substance) คือ mRNA ที่มีการปรับปรุงให้มีความเสถียรมากขึ้น

เมื่อนำ mRNA เข้าไปในเซลล์จะทำให้เกิดการแปลรหัสให้สร้างโปรตีนหนามของไวรัส SARS-CoV-2 ที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายได้⁽⁵⁾ เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ยาสำเร็จรูป (Drug product) mRNA จะถูกนำมาห่อหุ้มด้วย Lipid nanoparticle (LNP) ซึ่งจะช่วยให้ mRNA มีความคงตัวและสามารถขนส่งเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้⁽⁴⁾

แนวทางการควบคุมคุณภาพวัคซีนชนิด mRNA ที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) ได้กล่าวถึงการควบคุมคุณภาพด้านความเป็นเอกลักษณ์ (Identity) ในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปของวัคซีนชนิด mRNA ที่สามารถใช้วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mRNA ได้โดยตรงหรือวิเคราะห์จากการเปลี่ยนรหัสนิวคลีโอไทด์ของ mRNA ที่เป็น complementary DNA หรือการทำ High-throughput sequencing ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนได้เช่นกัน⁽⁶⁾ ซึ่งสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ทำการพัฒนาวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing และการระบุเอกลักษณ์ด้วยวิธี Reverse-transcription PCR ในการตรวจสอบคุณภาพด้านความเป็นเอกลักษณ์ของวัคซีนโควิด 19 ชนิด mRNA แล้ว ซึ่งตัวอย่างวัคซีนมีคุณลักษณะของลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตามที่บริษัทผู้ผลิตระบุไว้ แต่วิธีนี้ไม่ได้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ได้จากการแปลรหัส mRNA สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนหนามที่ต้องการได้จริง ในการศึกษาการแสดงผลของโปรตีนนั้นมีหลายวิธี เช่น การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Western Blot ซึ่งสามารถทราบขนาดของโปรตีนที่ได้ตามน้ำหนักโมเลกุล⁽⁷⁾ วิธี Immunostaining ซึ่งเป็นการย้อมเซลล์ด้วยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเพื่อดูว่ามีการผลิตโปรตีนดังกล่าวในเซลล์หรือไม่⁽⁸⁾ แต่ทั้งสองวิธีนี้ไม่สามารถหาในเชิงปริมาณได้ และมีการนำวิธี Flow cytometry มาศึกษาผลผลิตโปรตีนหนามดังกล่าวในเซลล์ ซึ่งสามารถนำมาวิเคราะห์ในเชิงปริมาณได้⁽⁹⁾ คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการทดสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนโควิด 19 ชนิด mRNA โดยการแสดงผลของโปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 บนผิวเซลล์

293FT ด้วยเทคนิค Flow cytometry เพื่อการหาเอกลักษณ์ของโปรตีนหนามที่แปลรหัสมาจากวัคซีนชนิด mRNA และทดสอบความถูกต้องของวิธีดังกล่าวว่าสามารถนำมาใช้ทดสอบในห้องปฏิบัติการได้จริง โดยคาดหวังให้วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้เป็นต้นแบบวิธีในการควบคุมคุณภาพในการวิเคราะห์เอกลักษณ์ของวัคซีนชนิด mRNA และนำไปต่อยอดเพื่อพัฒนาเป็นการหาค่าความแรงในเชิงปริมาณของวัคซีนได้ต่อไปในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ 293FT

เพาะเลี้ยงเซลล์ 293FT (Cat. no. 11625, 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) ในการทำให้เซลล์หลุดออกจากภาชนะเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน ใช้ 0.05% Trypsin-EDTA (Gibco, USA) และ Phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco, USA)

วัคซีนตัวอย่างและการเตรียม

วัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 ชนิด mRNA ที่มีการนำเข้ามาทดสอบคุณภาพทางห้องปฏิบัติการระหว่างปี พ.ศ. 2564-2565 ได้แก่ วัคซีน Comirnaty™ ของบริษัทไฟเซอร์ (Pfizer-BioNTech)

เตรียมวัคซีนเพื่อนำมาใช้ในการศึกษา โดยเจือจางวัคซีนด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM high/glucose ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มเติม เพื่อให้ได้ปริมาณ mRNA ที่ 15, 30 และ 60 ไมโครกรัม

แอนติบอดีและสารละลาย

แอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 clone CR3022 (Cat no. NBP2-90980, Novus Biologicals Inc, USA) เจือจางก่อนใช้งานในอัตราส่วน 1:100 เป็นแอนติบอดีที่ใช้ในการย้อมเซลล์

เพื่อตรวจหาโปรตีนหนามของวัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 ชนิด mRNA โดยมีแอนติบอดี Human IgG1 Kappa Isotype Antibody Control (Cat no. NBP3-06872-0.1 MG, Novus Biologicals Inc, USA) เจือจางก่อนใช้งานในอัตราส่วน 1:50 เป็นแอนติบอดีควบคุม และแอนติบอดี Goat Anti-Human IgG-PE, Cat no. STBT-2040-09 (Southern Biotech, USA) ที่เจือจางก่อนใช้งานในอัตราส่วน 1:200 เป็นแอนติบอดีสำหรับการตรวจติดตาม

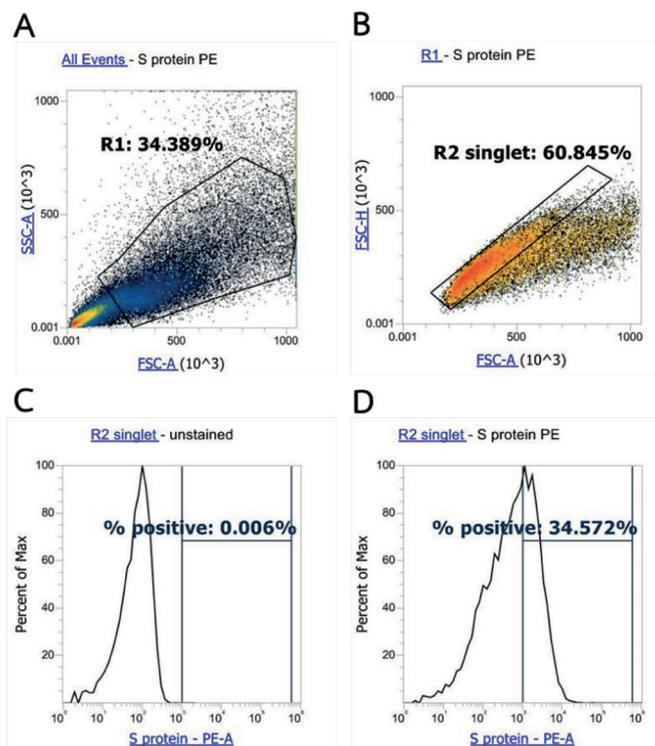
FACs staining buffer ประกอบด้วย 1% FBS ใน 1 × PBS ใช้ในการเจือจางแอนติบอดีและกระบวนการย้อมเซลล์สำหรับการทดสอบ Flow cytometry

การวิเคราะห์โปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 ที่แสดงออกบนผิวเซลล์ 293FT ด้วยวิธี Flow cytometry

เติมเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT จำนวน 1×10^6 เซลล์ต่อหลอดทดสอบ ลงไปในจานสำหรับเพาะเลี้ยงแบบ 6 หลุม (Costar, China) โดยให้มีปริมาตรหลุมละ 3 มิลลิลิตร ทุกหลุม แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้บ่มเพาะเชื้อที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ (Binder, Germany) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเติมตัวอย่างวัคซีนที่มีปริมาณ mRNA ที่ต้องการศึกษา ลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยงในหลุมที่กำหนด แล้วบ่มต่อที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่ม ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและล้างเซลล์ด้วย PBS แชนเย็น ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร 2 ครั้ง โดยระวังไม่ให้กระทบกับเซลล์ จากนั้นเติม PBS แชนเย็น ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ลงไปทุกหลุม ตามด้วยการดูดปล่อยด้วยปิเปตหรือใช้ cell lifter เพื่อลอกเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงอย่างเบามือ ย้ายเซลล์ในของเหลวใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Eppendorf, Centrifuge 5430, Eppendorf, Germany) ปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที และดูดส่วนของเหลวใสทิ้งเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ ก่อนเติมแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 หรือแอนติบอดี Human IgG1 Kappa Isotype Control หรือ FACs staining buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในตัวอย่าง

ที่กำหนด จากนั้นนำเซลล์ไปปั่นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์และปั่นล้างเซลล์ด้วยการเติม FACs staining buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที 1 ครั้ง ดูดส่วนใสทิ้งเติม Goat anti-human IgG-PE หรือ FACs staining buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่างที่กำหนด บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที ในที่มืด จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์และปั่นล้างเซลล์ 2 ครั้ง หลังจากดูดส่วนใสทิ้ง เติม FACs staining buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และนำเซลล์แขวนลอยไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer

(Attune NxT Acoustic Focusing, Thermo Fisher, USA) โดยใช้โปรแกรม Attune™ NxT Software ปรับตั้งค่าพารามิเตอร์ในการใช้งานโปรแกรมและเครื่องตามคู่มือเหมือนกันทุกการทดสอบ สำหรับเกณฑ์การวิเคราะห์เซลล์ เลือกกลุ่มประชากร R1 (R1 cell population gate) จากประชากรเซลล์ทั้งหมด (All events หรือ Acquired cell count) และเลือกประชากร R2 จากประชากร R1 โดยคัดเลือกจากเกณฑ์ที่เป็นเซลล์เดี่ยว (R2 singlet cell gate) โดยที่กลุ่มประชากรใน R2 จะต้องมีจำนวนเท่ากับ 10,000 events (cells) และปรับตั้งเกณฑ์สำหรับ Antigen positive cell (% Positive cells) จากเซลล์ที่ไม่มีการเติมวัคซีนและใช้เกณฑ์เดียวกันในทุกตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 1

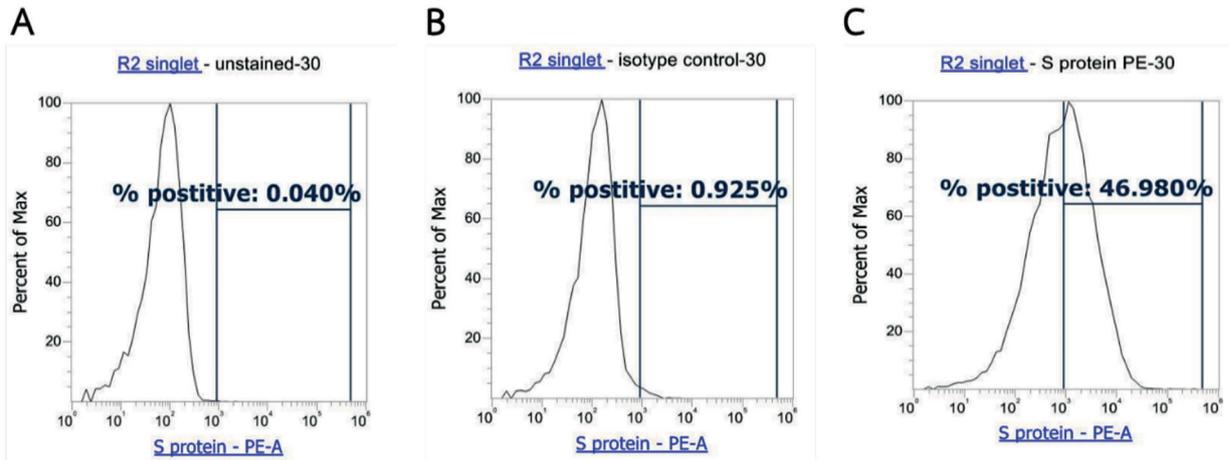


ภาพที่ 1 ผลการวิเคราะห์โปรตีนหนาม (S protein) บนผิวเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ด้วยโปรแกรม Attune™ NxT Software A) แสดงกลุ่มประชากรเซลล์ R1 ที่ได้จากการเลือกประชากรจากภาพการกระจายตัวของเซลล์ตามขนาด (Forward scatter; FSC) และความซับซ้อนภายในเซลล์ (Side scatter; SSC) ของประชากรทั้งหมด, B) แสดงกลุ่มประชากรเซลล์ R2 Singlet ที่ได้จากการเลือกประชากรจากภาพการกระจายตัวของเซลล์ตามขนาดแบบ FSC-H และ FSC-A ของประชากร R1, C) ภาพ Histogram แสดงกลุ่มประชากรที่เป็น % positive ของเซลล์ที่มีโปรตีนหนามแสดงออกบนผิวเซลล์แต่ไม่มีการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม และ D) แสดงกลุ่มประชากรที่เป็น % positive ของเซลล์ที่มีโปรตีนหนามแสดงออกบนผิวเซลล์และถูกย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม

การแปลผลการวิเคราะห์การแสดงออกโปรตีนหนามบนผิวเซลล์ 293FT

การพิจารณาการแสดงออกโปรตีนหนามบนผิวเซลล์ ทำโดยวิเคราะห์จาก ค่า % positive ที่เลือกจาก Singlet (R2) ในการวิเคราะห์กราฟ Histogram ที่สร้างจากโปรแกรมในเครื่อง Flow cytometer โดย

เซลล์ที่เติมวัคซีนและไม่เติมวัคซีน ที่อยู่ในสภาวะที่ไม่ย้อมด้วยแอนติบอดี (unstained) สภาวะที่ย้อมด้วยแอนติบอดีควบคุม (Isotype Control) จะตั้งค่าให้มี % positive น้อยกว่า 1 และถ้า % positive มากกว่าหรือเท่ากับ 1 แสดงว่าเซลล์สามารถผลิตโปรตีนหนามได้ ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 กราฟ Histogram แสดงผลการวิเคราะห์ % positive ที่แสดงถึงจำนวนเซลล์ที่มีการติดสารเรืองแสงที่สภาวะการย้อมแอนติบอดีที่แตกต่างกัน ในเซลล์ที่เติมวัคซีน mRNA ปริมาณ 30 ไมโครกรัม A) สภาวะที่ไม่ย้อมด้วยแอนติบอดี (unstained-30), B) สภาวะที่ย้อมด้วยแอนติบอดีควบคุม (Isotype Control-30) และ C) สภาวะย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม (S protein PE-30)

การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของวิธีการวิเคราะห์โปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 ที่แสดงออกบนผิวเซลล์ 293FT ด้วยเทคนิค Flow cytometry

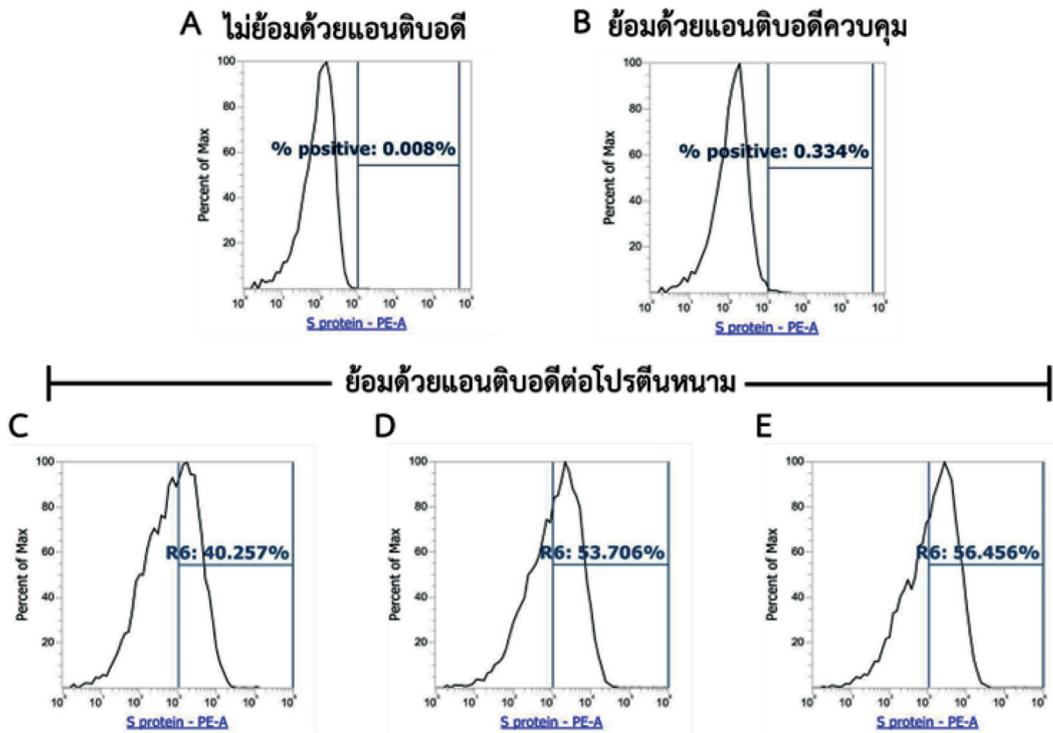
กำหนดให้ใช้ปริมาณ mRNA ในตัวอย่างเท่ากับ 30 ไมโครกรัม ซึ่งเท่ากับปริมาณที่แนะนำใน 1 โดส และมีพารามิเตอร์ในการทดสอบตาม ICH guideline หัวข้อความจำเพาะ (Specificity) ของวิธี⁽¹⁰⁾ โดยพิจารณา % positive ของเซลล์ในแต่ละตัวอย่างจากวัคซีน mRNA จำนวน 1 รุ่นการผลิต ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง เกณฑ์การตัดสินผลกำหนดให้ค่า % positive ของเซลล์ควบคุมหรือการทดสอบที่ย้อมด้วยแอนติบอดีควบคุม (Human IgG1 Kappa Isotype Control Isotype Control) ต้องมีค่าน้อยกว่า 1% เพื่อเป็นการยืนยันว่าวิธีการและ

แอนติบอดีที่ใช้สามารถตรวจหาและมีความจำเพาะต่อโปรตีนหนาม ซึ่งเป็นโปรตีนเป้าหมายของวัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 ชนิด mRNA เพื่อให้สามารถระบุเอกลักษณ์ของวัคซีนดังกล่าวได้

ผล

ผลการศึกษาปริมาณ mRNA ที่เหมาะสมที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนหนามบนผิวของเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT

จากการตรวจวิเคราะห์โปรตีนหนามบนผิวของเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่มีการเติมวัคซีนโควิด 19 ชนิด mRNA ที่มีปริมาณ mRNA 15, 30 และ 60 ไมโครกรัม พบว่ามี % Positive cells เฉลี่ยเท่ากับ 40.26, 53.71 และ 56.46 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 กราฟ Histogram แสดงผลการวิเคราะห์ % positive ที่แสดงจำนวนเซลล์ที่มีการติดสารเรืองแสง A) เซลล์ที่เติมวัคซีน 30 ไมโครกรัม ที่ไม่ย้อมด้วยแอนติบอดี, B) เซลล์ที่เติมวัคซีน 30 ไมโครกรัม ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีควบคุม, C) เซลล์ที่เติมวัคซีน 15 ไมโครกรัม ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม, D) เซลล์ที่เติมวัคซีน 30 ไมโครกรัม ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม และ E) เซลล์ที่เติมวัคซีน 60 ไมโครกรัม ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม

ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของวิธีการวิเคราะห์โปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 ที่แสดงออกบนผิวเซลล์ 293FT ด้วยเทคนิค Flow cytometry

ผลวิเคราะห์โปรตีนหนามที่แสดงออกในเซลล์ 293FT พบว่าเซลล์ที่มีการเติมวัคซีนโรคโควิด 19 ชนิด mRNA ปริมาณ 30 ไมโครกรัม และย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม มีค่า % Positive cells เฉลี่ยเท่ากับ 47.045% ในขณะที่เซลล์ที่ไม่มีการเติมวัคซีนและย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม แสดงค่า % Positive

cells เฉลี่ยเท่ากับ 0.808% ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ตัดสิน (น้อยกว่า 1%)

ผลที่ได้จากเซลล์ที่มีการเติมวัคซีนแต่ไม่มีการย้อมด้วยแอนติบอดีหรือย้อมด้วยแอนติบอดีควบคุม ให้ค่า % Positive cells น้อยกว่า 1% เหมือนกับผลที่ได้จากเซลล์ที่ไม่มีการเติมวัคซีนในทุกสภาวะการย้อม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาและแอนติบอดีต่อโปรตีนหนามมีความจำเพาะในการตรวจติดตามเซลล์ที่มีโปรตีนหนามเท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ % Positive cell ของเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่มีการแสดงออกของโปรตีนหนามในแต่ละกลุ่มทดสอบที่สภาวะต่าง ๆ

กลุ่มทดสอบ	ตัวอย่าง	เกณฑ์การตัดสิน (% Positive cell)	(% Positive cell)			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
			1	2	3		
เซลล์ที่เติมวัคซีน	ไม่ย้อมด้วยแอนติบอดี	< 1%	0.118	0.009	0.070	0.066	0.055
โรคโควิด 19 ชนิด mRNA	ย้อมด้วยแอนติบอดีควบคุม	< 1%	0.112	0.159	0.429	0.233	0.171
	ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม	> 1%	57.756	33.938	49.442	47.045	12.089
เซลล์ที่ไม่เติมวัคซีน	ไม่ย้อมด้วยแอนติบอดี	< 1%	0.518	0.035	0.097	0.217	0.263
โรคโควิด 19 ชนิด mRNA	ย้อมด้วยแอนติบอดีควบคุม	< 1%	0.287	0.445	0.554	0.429	0.134
	ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม	< 1%	0.939	0.705	0.781	0.808	0.119

วิจารณ์

การใช้เทคนิค Flow cytometry ในศึกษาการแสดงผลของโปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 ที่ได้จากการแปลรหัส mRNA ในเซลล์เพาะเลี้ยงนั้น มีการนำเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิดมาใช้ในการวิจัยต่างๆ ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของงาน รวมทั้งแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษา ต้องมีความจำเพาะต่อโปรตีนหนาม มีการรายงานการใช้แอนติบอดี โคลน CR3022 ในการศึกษาของ Corbett KS และคณะ โดยเป็นการศึกษาสารพันธุกรรมดัดแปลงชนิด mRNA (mRNA-1273) ซึ่งนำมาใช้ในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคโควิด 19 พบว่าเมื่อเหนี่ยวนำ mRNA ดัดแปลงดังกล่าวเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง HEK293T และวิเคราะห์โปรตีนหนามบนผิวเซลล์โดยเครื่อง Flow cytometer พบว่าเซลล์สามารถผลิตโปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 ได้ และโปรตีนที่ได้มีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้⁽¹¹⁾ นอกจากนี้มีรายงานการใช้แอนติบอดี โคลน CR3022 ในงานวิจัยของ Rauch S และคณะ ที่ศึกษาตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีนหนามที่ได้จากการแปลรหัส mRNA ที่พัฒนาขึ้น โดยศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง HeLa และทำการวิเคราะห์การแสดงผลของโปรตีนทั้งภายในเซลล์และบนผิวเซลล์ด้วยเครื่อง Flow cytometer ผลการศึกษาพบว่าโปรตีนหนามส่วนใหญ่ที่ผลิตจาก mRNA ที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้นนั้นมีการแสดงออกบนผิวเซลล์⁽¹²⁾ จากการทบทวนข้อมูล พบว่าแอนติบอดี โคลน CR3022 เป็นแอนติบอดีที่ทำให้เกิด Neutrali-

zation โดยจำเพาะต่อโปรตีนหนามตำแหน่ง S1⁽¹³⁾ ซึ่งเหมาะแก่การนำมาวิเคราะห์เอกลักษณ์และความเป็นไปได้ของโปรตีนหนามที่พัฒนาขึ้นว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ วัคซีน mRNA ที่ผลิตในระหว่าง ปี พ.ศ. 2564-2565 ยังเป็นวัคซีนที่ผลิตขึ้นต่อโปรตีนหนามแบบ full-length ของสายพันธุ์ดั้งเดิม ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยทดสอบการแสดงผลของโปรตีนหนามเฉพาะบนผิวเซลล์เท่านั้น โดยตำแหน่งโปรตีนหนามสามารถอยู่บนผิวเซลล์หรือภายในเซลล์ได้ขึ้นกับการออกแบบ mRNA ที่ผู้ผลิตพัฒนาขึ้น ทั้งนี้วิธีที่พัฒนาขึ้นเป็นการวิเคราะห์เอกลักษณ์ของวัคซีน ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ ในอนาคตสามารถพัฒนาต่อยอดเพื่อวิเคราะห์ปริมาณการแสดงผลของโปรตีนหนามทุกตำแหน่งของเซลล์ได้ โดยสามารถเพิ่มขึ้นตอนในการเจาะเซลล์และย้อมภายในเซลล์

ในการหาปริมาณ mRNA ที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดสอบ ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบโดยใช้ mRNA ปริมาณต่างกันตั้งแต่ 0.004-60.0 ไมโครกรัม ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT เพื่อให้ครอบคลุมโดสที่แนะนำของวัคซีนที่ใช้ในการศึกษา พบจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดโปรตีนหนามแปรผันโดยตรงกับปริมาณ mRNA ที่เติมลงไป โดยปริมาณ mRNA ที่ 30 ไมโครกรัม สามารถให้ผลการทดสอบที่สม่ำเสมอและให้ผลที่ไม่แตกต่างจากปริมาณ mRNA ที่ 60 ไมโครกรัม และที่ปริมาณ mRNA เท่ากับ 30 ไมโครกรัม เป็นปริมาณที่แนะนำใน 1 โดส ของวัคซีนที่ใช้ในการวิจัยนี้

การศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดีมีความสำคัญต่อการระบุเอกลักษณ์ ตัวอย่างที่ย้อมด้วยแอนติบอดีควบคุม (Human IgG1 Kappa Isotype Antibody Control) ถูกนำมาใช้ในการพิจารณาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีนหนาม เพื่อเป็นการยืนยันว่า % Positive cell ที่ได้เกิดขึ้นเกิดจากการจับกันแบบจำเพาะระหว่างโปรตีนกับแอนติบอดี ไม่ได้เกิดจากการเรืองแสงของพื้นหลัง (background fluorescence)⁽¹⁴⁾ Isotype Antibody Control เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่จำเพาะกับโปรตีนหนาม แต่มี isotype เดียวกันกับแอนติบอดีจำเพาะที่ใช้ในการทดสอบ โดยเป็นการยืนยันว่าเซลล์กับแอนติบอดีไม่มีการจับกันแบบไม่จำเพาะที่เกิดจาก Fc receptor ของเซลล์จับกับบริเวณ Fc domain ของแอนติบอดี^(15,16) โดยเมื่อพิจารณาภาวะที่เซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับวัคซีน เมื่อย้อมด้วยแอนติบอดีจำเพาะเปรียบเทียบกับแอนติบอดีควบคุม พบว่ามีค่า % Positive cells ต่างกัน 201.62 เท่า แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ใช้มีความจำเพาะต่อโปรตีนหนาม

เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT สามารถผลิตโปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 ได้ เมื่อได้รับวัคซีน mRNA เท่านั้น เนื่องจากโปรตีนหนามเป็นโปรตีนของไวรัสและไม่พบในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมตามธรรมชาติ ดังนั้นเมื่อพิจารณาภาวะที่มีการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนหนาม พบว่า % Positive cells ที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงที่เติมวัคซีนเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติมวัคซีนซึ่งเป็นเซลล์ควบคุม มีค่าต่างกัน 58.20 เท่า แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการผลิตและแสดงออกของโปรตีนหนามบนผิวเซลล์ได้เมื่อได้รับวัคซีน mRNA เท่านั้น

จากการศึกษาข้างต้น วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้ในการระบุเอกลักษณ์ของวัคซีนโควิด 19 ชนิด mRNA โดยการพิสูจน์โปรตีนหนามได้อย่างมีความจำเพาะวิธีดังกล่าวสามารถนำมาตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์เพื่อยืนยันเอกลักษณ์วัคซีนโควิด 19 ชนิด mRNA ที่นำมาขึ้นทะเบียนหรือเพื่อวัตถุประสงค์อื่น ๆ โดยไม่จำเป็นต้องมีสารมาตรฐานอ้างอิงหรือวิธีการของผู้ผลิต ซึ่งเป็นข้อจำกัดในช่วงที่เกิดการระบาดของโรคโควิด 19 ในช่วงที่ผ่านมา นอกจากนี้วิธีดังกล่าวยังมีแนวโน้มที่จะขยายขอบข่ายในการนำมาพิจารณาคุณลักษณะด้านความแรงของวัคซีน

ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยเพิ่มการทวนสอบวิธีในพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องตามแนวทาง ICH Q2 ได้ และสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้จากการพัฒนาวิธีนี้มาประยุกต์และเป็นแนวทางในการตรวจสอบเอกลักษณ์และค่าความแรงของวัคซีน mRNA ที่ใช้ป้องกันโรคชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ระหว่างการวิจัยและพัฒนาได้ต่อไปในอนาคต

สรุป

จากผลการศึกษาพบว่าวิธี Flow cytometry ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจติดตามเซลล์ 293FT ที่ผลิตโปรตีนหนามของไวรัส SARS-CoV-2 ได้ จึงอาจใช้เป็นวิธีในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีน COVID-19 ชนิด mRNA โดยมีความจำเพาะต่อโปรตีนหนามในตัวอย่างวัคซีน ทั้งนี้ผู้วิจัยมีเป้าหมายที่จะพัฒนาวิธีดังกล่าวให้เป็นวิธีมาตรฐานที่สามารถใช้ได้กับทุกผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปแบบวัคซีน mRNA ในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.สุภาพร ภูมิอมร ผู้ทรงคุณวุฒิด้านวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้คำปรึกษา และขอขอบคุณท่านสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ในการสนับสนุนงานวิจัยนี้ ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Al-Jighefee HT, Najjar H, Ahmed MN, Qush A, Awwad S, Kamareddine L. COVID-19 vaccine platforms: challenges and safety contemplations. *Vaccines* 2021; 9(10): 1196. (38 pages).
2. Martínez-Flores D, Zepeda-Cervantes J, Cruz-Reséndiz A, Aguirre-Sampieri S, Sampieri A, Vaca L. SARS-CoV-2 vaccines based on the spike glycoprotein and implications of new viral variants. *Front Immunol* 2021; 12: 701501. (21 pages).

3. van Riel D, de Wit E. Next-generation vaccine platforms for COVID-19. *Nat Mater* 2020; 19(8): 810-2.
4. Fang E, Liu X, Li M, Zhang Z, Song L, Zhu B, et al. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development. *Signal transduct Target Ther* 2022; 7(1): 94. (31 pages).
5. Wadhwa A, Aljabbari A, Lokras A, Foged C, Thakur A. Opportunities and challenges in the delivery of mRNA-based vaccines. *Pharmaceutics* 2020; 12(2): 102. (27 pages).
6. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations. WHO Technical Report Series No. 1039. Geneva: World Health Organization; 2022. p. 85-154.
7. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 2012; 4(9): 429-34.
8. Maity B, Sheff D, Fisher RA. Immunostaining: detection of signaling protein location in tissues, cells and subcellular compartments. *Methods Cell Biol* 2013; 113: 81-105.
9. Mizrahi O, Ish Shalom E, Baniyash M, Klieger Y. Quantitative flow cytometry: concerns and recommendations in clinic and research. *Cytometry B Clin Cytom* 2018; 94(2): 211-8.
10. International Conference on Harmonization Guideline on validation of analytical procedures: text and methodology (ICH Q2(R1)). In: *European pharmacopoeia*. 11th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2023. p. 723-726.
11. Corbett KS, Edwards DK, Leist SR, Abiona OM, Boyoglu-Barnum S, Gillespie RA, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature* 2020; 586(7830): 567-71.
12. Rauch S, Roth N, Schwendt K, Fotin-Mleczek M, Mueller SO, Petsch B. mRNA-based SARS-CoV-2 vaccine candidate CVnCoV induces high levels of virus-neutralising antibodies and mediates protection in rodents. *NPH Vaccines* 2021; 6(1): 57. (9 pages).
13. Huo J, Zhao Y, Ren J, Zhou D, Duyvesteyn HM, Ginn HM, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 by destruction of the prefusion spike. *Cell Host Microbe* 2020; 28(3): 445-54.
14. Hulspas R, O’Gorman MR, Wood BL, Gratama JW, Sutherland DR. Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2009; 76(6): 355-64.
15. มงคล เหล่าอารยะ. การใช้ flow cytometry ในงานวิจัยด้านการแพทย์และทางคลินิก. *เชียงใหม่เวชสาร* 2557; 53(2): 99-109.
16. Maciorowski Z, Chattopadhyay PK, Jain P. Basic multicolor flow cytometry. *Curr Protoc Immunol* 2017; 117(1): 5.4.1-38.

Development for Analysis of the SARS-CoV-2 Spike Protein in 293FT Cells by Flow Cytometry for Identity Determination of the mRNA COVID-19 Vaccines

Puthita Chokreansukchai, Achira Namjan, and Wipawee Wongchana

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

ABSTRACT Regarding national quality control of vaccines and biological products, the Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Thailand, developed a method to determine the identity of the mRNA COVID-19 vaccine. In this study, it was demonstrated that treating the mRNA COVID-19 vaccine in 293FT cell cultures induced the expression of the SARS-CoV-2 spike protein, which could be detected by a specific antibody using flow cytometry. The amount of mRNA added varied with the number of cells containing the spike protein. Additionally, the antibody used was specific to the spike protein compared to the antibody control. The method demonstrated that 30 micrograms of mRNA vaccine increased the percentage of cell-expressed spike protein to approximately 47%, compared to untreated cells or the control group, which showed less than 1% positive cell expression. This method was successful in determining the identity of the mRNA COVID-19 vaccine. It is also expected that this developed method will be a standardized assay that can be used with other products in the form of mRNA vaccines in the future.

Keywords: COVID-19 vaccine, mRNA vaccine, Spike protein, Flow cytometry, 293FT cells

การสังเคราะห์และคุณสมบัติการป้องกันรังสีเอกซ์ของ พอลิเมอร์ผสมระหว่างโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ และโพลีไวนิลไพโรลิโดนกับบิสมัทออกไซด์

ไพฑูรย์ บุญส่ง

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอแมริม เชียงใหม่ 50180

บทคัดย่อ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาพอลิเมอร์ผสมระหว่างโพลีไวนิลแอลกอฮอล์และโพลีไวนิลไพโรลิโดน (PVA/PVP) ที่มีการเติมบิสมัทออกไซด์ (Bi_2O_3) ในสัดส่วนร้อยละ 0-50 โดยน้ำหนัก เพื่อใช้เป็นวัสดุป้องกันรังสีเอกซ์ที่ปราศจากตะกั่ว ได้ศึกษาความสามารถในการลดทอนรังสีเอกซ์ของตัวอย่างที่เตรียมขึ้น โดยพิจารณาจากค่าปริมาณรังสีที่ส่องผ่าน ค่าประสิทธิภาพในการกำบังรังสี ค่าสัมประสิทธิ์การลดทอนเชิงเส้น ค่าความหนาครั้งค่า และค่าความหนาของวัสดุที่ลดลง 10 เท่าของวัสดุ ซึ่งใช้แหล่งกำเนิดรังสีเอกซ์จากเครื่องเอกซเรย์เต้านมที่ $^{(M)}28$ kV_p, เครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมในช่องปากที่ $^{(I)}61$ kV_p และเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไปที่ $^{(G)}70$ และ $^{(G)}80$ kV_p นอกจากนี้เมื่อคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การลดทอนเชิงมวลทางทฤษฎีด้วยโปรแกรม WinXCom ที่มีพลังงานในช่วง 1 ถึง 200 keV พบว่าความสามารถในการลดทอนรังสีเอกซ์ของพอลิเมอร์ผสมมีค่าเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มปริมาณ Bi_2O_3 โดยพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi_2O_3 ในอัตราส่วน 50:50 โดยน้ำหนักที่มีความหนาประมาณ 0.49 มิลลิเมตร แสดงค่าประสิทธิภาพในการกำบังรังสีสูงสุด ร้อยละ 97.14, 74.49, 57.01 และ 52.01 ที่ $^{(M)}28$, $^{(I)}61$, $^{(G)}70$ และ $^{(G)}80$ kV_p ตามลำดับ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าพอลิเมอร์ผสม PVA/PVP: Bi_2O_3 ที่สังเคราะห์ขึ้นนี้ โดยเฉพาะพอลิเมอร์ผสมที่มี Bi_2O_3 ปริมาณมากมีศักยภาพในการป้องกันรังสีเอกซ์สำหรับการใช้งานทางการแพทย์ได้

คำสำคัญ: วัสดุกำบังรังสีเอกซ์, พอลิเมอร์โพลีไวนิลแอลกอฮอล์และโพลีไวนิลไพโรลิโดน, บิสมัทออกไซด์

Corresponding author E-mail: Paitoon.sci@gmail.com

Received: 9 February 2025

Revised: 21 August 2025

Accepted: 26 August 2025

บทนำ

รังสีเอกซ์เป็นพลังงานรูปแบบหนึ่งของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีคุณสมบัติในการทะลุทะลวงผ่านวัตถุต่างๆ รวมถึงเนื้อเยื่อและอวัยวะภายในร่างกายได้ จึงนิยมนำรังสีเอกซ์มาใช้ทางการแพทย์เพื่อช่วยวินิจฉัยโรค ในขณะที่เดียวกันรังสีเอกซ์เป็นรังสีที่มีพลังงานสูง เมื่อเข้าสู่ร่างกายเกินกว่ากำหนดอาจทำให้เกิดความเสี่ยงต่อเซลล์ เกิดความบกพร่องหรือเสื่อมสภาพ นำไปสู่โอกาสเกิดโรคมะเร็ง หรืออาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในยีนทำให้มีผลต่อลักษณะทางพันธุกรรมได้⁽¹⁾ ดังนั้นการปฏิบัติงานทางด้านรังสีต้องดำเนินการตามหลักการ As Low As Reasonably Achievable (ALARA) เพื่อได้รับปริมาณรังสีน้อยที่สุด ประกอบด้วย เวลา ระยะทาง และวัสดุกำบังรังสี⁽²⁾ การใช้วัสดุกำบังรังสีเอกซ์ที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมกับลักษณะงานเป็นสิ่งจำเป็น โดยทั่วไปธาตุที่ดูดกลืนรังสีเอกซ์ได้ดีเป็นธาตุที่มีเลขอะตอม (atomic number) สูง เช่น ตะกั่ว (lead; Pb) มีเลขอะตอม (Z) เท่ากับ 82 ซึ่งเป็นธาตุที่นิยมนำมาผลิตวัสดุกำบังรังสีอย่างไรก็ตามตะกั่วเป็นธาตุที่มีความเป็นพิษสูงและส่งผลกระทบต่อระบบต่างๆ ของร่างกายอีกทั้งไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม⁽³⁾ ปัจจุบันจึงมีการใช้ธาตุโลหะหรือสารประกอบของธาตุโลหะชนิดอื่น เช่น แบเรียมซัลเฟต (barium sulfate; BaSO₄) ทังสเตน (tungsten; W) หรือบิสมัท (bismuth; Bi) เป็นต้น เพื่อทดแทนการใช้ตะกั่ว สารประกอบและธาตุดังกล่าวมีคุณสมบัติในการกำบังรังสีที่ดี แต่ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากการใช้สารกลุ่มกำบังรังสีเพียงอย่างเดียวจะมีน้ำหนักมาก ราคาแพง กระบวนการผลิตซับซ้อนและความยืดหยุ่นน้อยเพื่อแก้ไขปัญหา จึงมีการศึกษาสารประกอบกลุ่มกำบังรังสีโดยใช้พอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ เช่น พอลิแลคติกแอซิด (PLA)⁽⁴⁾ โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA)⁽⁵⁻¹⁰⁾ อีพอกซี (epoxy)^(9,10) โพลีไวนิลคลอไรด์ (PVC)⁽¹¹⁻¹³⁾ พอลิเอทิลีนความหนาแน่นต่ำ (LDPE)⁽¹⁴⁾ พอลิเอทิลีนความหนาแน่นสูง (HDPE)⁽¹⁵⁾ โพลีไดเมทิลซิลอกเซน (PDMS)⁽¹⁶⁾ โพลีไวนิลแอลกอฮอล์/โพลีไวนิลไพร์โรลิโดน (PVA/PVP)^(17,18) พอลิสไตรีน (PS)⁽¹⁹⁾ พอลิยูรีเทนสูตรน้ำ (WPU)⁽²⁰⁾ ยางธรรมชาติ (Natural rubber)^(21,22) อะครีโลไนไตรล์-บิวทาไดอีน-สไตรีน (ABS)⁽²³⁾ เป็นต้น

โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol; PVA) เป็นวัสดุพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เป็นสารกึ่งผลึก (semi-crystalline) สามารถละลายในน้ำขึ้นรูปเป็นฟิล์มได้ ราคาถูก หาได้ง่าย มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ ทนทานต่อสารเคมี มีความยืดหยุ่น มีความแข็งแรง และไม่เปราะหักต่อสิ่งแวดล้อม สามารถพัฒนาเป็นวัสดุกำบังรังสีเมื่อผสมกับทังสเตนออกไซด์ (WO₃) และบิสมัทออกไซด์ (Bi₂O₃)⁽⁵⁻¹⁰⁾ ได้ เป็นต้น ขณะที่โพลีไวนิลไพร์โรลิโดน (polyvinyl pyrrolidone; PVP) เป็นพอลิเมอร์ที่มีความเป็นอสัณฐาน (amorphous) น้ำหนักโมเลกุลสูง สามารถละลายน้ำและขึ้นรูปเป็นฟิล์มได้ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมเช่นเดียวกับ PVA นอกจากนี้ PVP ยังมีความเสถียรทางความร้อนอีกด้วย จากคุณสมบัติเด่นของ PVA และ PVP เมื่อนำพอลิเมอร์ทั้ง 2 ชนิด มาผสมกันจะทำให้วัสดุที่ได้มีความแข็งแรงสูงกว่าพอลิเมอร์เพียงชนิดเดียว เนื่องจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group; -OH) ของ PVA และหมู่คาร์บอนิล (carbonyl; C=O) ของ PVP^(17,18) โดยมีค่าโมดูลัสความยืดหยุ่น (Young's Modulus) ที่ 225-260 MPa และค่าความทนต่อแรงดึง (Tensile Strength) 18.9-20.1 MPa นอกจากนี้ การศึกษาการลดทอนเชิงเส้นสูงสุดของพอลิเมอร์ผสม PVA/PVP เมื่อเติม Bi₂O₃ ปริมาณ 26.24 ร้อยละ โดยน้ำหนัก (wt%)⁽¹⁷⁾ ที่ 60 และ 70 kV_p มีค่าเท่ากับ 11.84 และ 10.05 cm⁻¹ ตามลำดับ และเมื่อเติม WO₃ ปริมาณ 24 wt%⁽¹⁸⁾ ที่ 60, 70 และ 80 kV_p มีค่าเป็น 4.68, 4.27 และ 4.12 cm⁻¹ ตามลำดับ จากผลการศึกษาดังกล่าวทำให้ Bi₂O₃ เป็นสารประกอบทางเลือกที่น่าสนใจในการใช้กำบังรังสีเอกซ์ อีกทั้งเป็นสารประกอบที่มีเลขอะตอมสูง (high Z compound) บิสมัทมีเลขอะตอม Z_{Bi} = 83 ใกล้เคียงกับตะกั่วแต่ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย มีราคาถูก และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม การเติมอนุภาค Bi₂O₃ ในพอลิเมอร์ พบว่าให้ประสิทธิภาพในการกำบังรังสีได้เทียบเท่ากับอนุภาคเลดออกไซด์ (PbO)⁽¹³⁾ ทำให้สามารถนำ Bi₂O₃ มาใช้เป็นสารกำบังรังสีทดแทนตะกั่วได้ ปัจจุบันข้อมูลการศึกษาผลของการเติม Bi₂O₃ ใน

พอลิเมอร์ผสม PVA/PVP ต่อคุณสมบัติการกำบังรังสีเอกซ์ทางการแพทย์ยังมีไม่มากนัก

งานวิจัยนี้ศึกษาผลการเติม Bi_2O_3 ปริมาณสูงต่อคุณสมบัติการกำบังรังสีของพอลิเมอร์ผสม PVA/PVP ในอัตราส่วน $(100-x)$ PVA/PVP : (x) Bi_2O_3 เมื่อ x เท่ากับ 0-50 wt% โดยใช้แหล่งกำเนิดรังสีเอกซ์จากเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทางการแพทย์ซึ่งประกอบด้วย เครื่องเอกซเรย์เต้านม เครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมในช่องปาก และเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป เพื่อคำนวณค่าประสิทธิภาพการลดทอนรังสีเอกซ์ (Attenuation Efficiency; AE) ค่าสัมประสิทธิ์การลดทอนเชิงเส้น (Linear Attenuation Coefficient; LAC) ค่าความหนาครึ่งค่า (Half-Value Layer; HVL) ค่าความหนาของวัสดุที่ลดลง 10 เท่า (Tenth-Value Layer; TVL) และค่าสัมประสิทธิ์การลดทอนเชิงมวล (Mass Attenuation Coefficient; MAC) ทางทฤษฎีที่คำนวณได้จากโปรแกรม WinXCom^(24,25) ในช่วงพลังงาน 1 ถึง 200 กิโลอิเล็กตรอนโวลต์ (keV) ผ่านกฎ Mixture Rule

วัสดุและวิธีการ

สารเคมี

โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA), $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ มวลโมเลกุล 89,000-98,000 (Sigma-Aldrich, USA), โพลีไวนิลไพโรลิโดน (PVP), $(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n$ มวลโมเลกุล 360,000 (FLUKA, USA), บิสมัทออกไซด์ (Bi_2O_3) ขนาด 10 ไมโครเมตร (Sigma-Aldrich, USA) และน้ำกลั่นบริสุทธ์ (RCI Labscan, Thailand)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องซังสาร 4 ตำแหน่ง (GR-200, AND, Japan), เครื่องกวนสารให้ความร้อน (MAG HS7, Yellow Line, Germany), ตู้อบควบคุมความชื้น (FCDE160, TORUN, China), เครื่องวัดปริมาณ

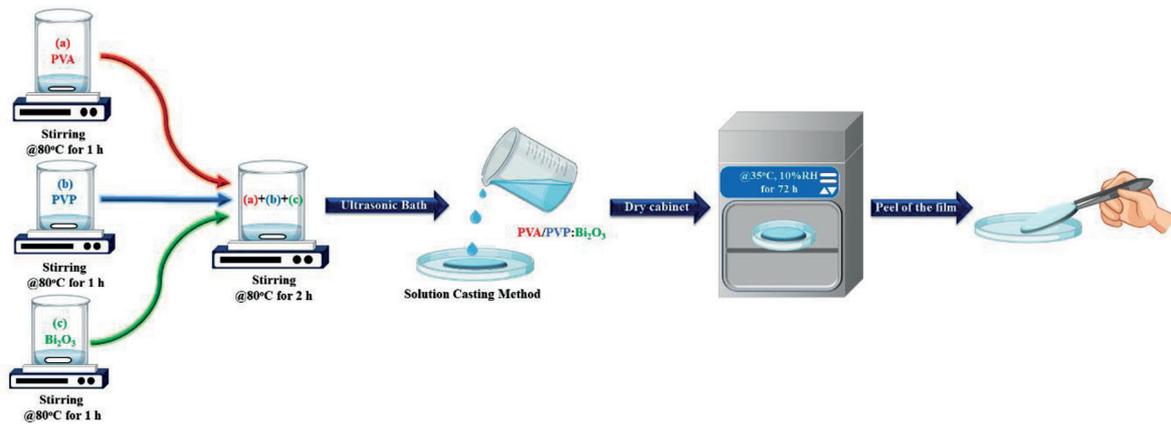
รังสี (RaySafe X2 MAM & R/F Sensor, RaySafe, Sweden), เครื่องอัลตราโซนิก (JP-040S, Skymen, China), เครื่องเคลือบตัวอย่างด้วยโลหะนำไฟฟ้า (JEC 3000 FC, JEOL, Japan), กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JSM-7610F Plus, JEOL, Japan), เครื่องเอกซเรย์เต้านม (Mammography^(M)) (Selenia Dimensions, Hologic, USA), เครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมในช่องปาก (Intra-oral Radiography^(I)) (C610NS, Asahi, Japan) และเครื่องเอกซเรย์ทั่วไป (General X-ray Machine^(G)) (RAD Speed Pro, Shimadzu, Japan)

การเตรียมพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi_2O_3

การเตรียมวัสดุผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi_2O_3 ในอัตราส่วนของ PVA: PVP: Bi_2O_3 ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยทำการซังสาร PVA 2.0 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นบริสุทธ์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และซังสาร PVP 2.0 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นบริสุทธ์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และละลาย Bi_2O_3 ในน้ำกลั่นบริสุทธ์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการกวนสารแต่ละชนิดในบีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องกวนพร้อมให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายทั้ง 3 ชนิด มาผสมกัน กวนสารให้เข้ากัน โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และนำสารผสมที่ได้มาผ่านเครื่องอัลตราโซนิก ความถี่ 40 กิโลเฮิร์ตซ์ (kilohertz) เป็นเวลา 0.5 ชั่วโมง เพื่อลดฟองอากาศที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการสังเคราะห์ จากนั้นนำส่วนผสมใส่ถาดแก้วและเข้าตู้ควบคุมความชื้นที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 10%Rh เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นลอกแผ่นพอลิเมอร์ผสมออกจากถาดแก้วจะได้พอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi_2O_3 โดยมีขั้นตอนการสังเคราะห์ ดังแสดงในภาพที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงอัตราส่วนของพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi₂O₃

สารประกอบ	ร้อยละโดยน้ำหนัก (wt%) ของ Bi ₂ O ₃				
	x = 0	x = 10	x = 30	x = 40	x = 50
โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA)	50	45	35	30	25
โพลีไวนิลไพโรลิโดน (PVP)	50	45	35	30	25
บิสมัทออกไซด์ (Bi ₂ O ₃)	0	10	30	40	50



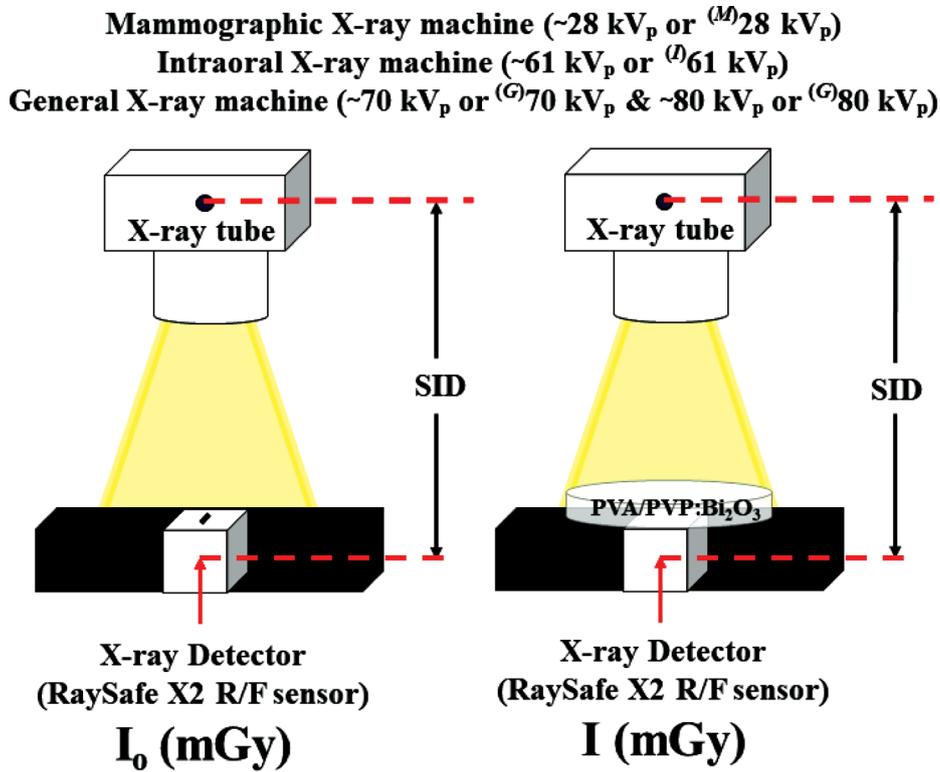
ภาพที่ 1 กระบวนการสังเคราะห์พอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi₂O₃

การศึกษาลักษณะทางกายภาพของพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi₂O₃

นำพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi₂O₃ ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพเบื้องต้นด้วยตาเปล่า (Visual Inspection) จากนั้นนำพอลิเมอร์ผสมมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปติดบนแท่นทองเหลืองที่มีกระดาษคาร์บอนติดอยู่ เคลือบผิวชิ้นงานด้วยโลหะทอง (Au) ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า 99.99% ลงบนพื้นผิวของพอลิเมอร์ผสมอย่างสม่ำเสมอ โดยเครื่องเคลือบตัวอย่างด้วยโลหะนำไฟฟ้า (Coater) ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ตั้งค่ากระแสไฟฟ้าที่ 30 มิลลิแอมแปร์ (mA) เป็นเวลา 60 วินาที เพื่อให้ชิ้นงานสามารถนำไฟฟ้าได้^(26,27) และนำชิ้นงานไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

การทดสอบการกำบังรังสีเอกซ์ของพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi₂O₃

นำพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi₂O₃ วางบนเครื่องวัดปริมาณรังสี โดยมีระยะทางระหว่างแหล่งกำเนิดรังสีกับพื้นผิว (SID) เท่ากับ 66, 100 และ 100 เซนติเมตร สำหรับเครื่องเอกซเรย์เต้านม เครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมในช่องปาก และเครื่องเอกซเรย์ทั่วไป ตามลำดับ โดยเครื่องเอกซเรย์เต้านม ตั้งค่าเทคนิค 28 kV และ 50 mAs เครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมในช่องปาก ตั้งค่าเทคนิค 60 kV, 10 mA, 400 ms และเครื่องเอกซเรย์ทั่วไป ตั้งค่าเทคนิค 70 และ 80 kV, 100 ms, 100 mA จากนั้นวัดปริมาณรังสีเอกซ์ที่ผ่านอากาศ (I₀) และปริมาณรังสีเอกซ์ที่ผ่านออกมาจากวัสดุ (I) ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยคำนวณค่าปริมาณรังสีเอกซ์ที่ส่องผ่าน (T) ค่าประสิทธิภาพในการกำบังรังสีเอกซ์ (AE) และค่าสัมประสิทธิ์การลดทอนรังสีเอกซ์เชิงเส้น (LAC, μ) ได้ดังสมการที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ



ภาพที่ 2 การวัดปริมาณรังสีทะลุผ่านพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi₂O₃

$$T (\%) = 100 \times \left(\frac{I}{I_0} \right) \quad (1)$$

$$AE (\%) = 100 \times \left(\frac{I_0 - I}{I_0} \right) = 100 \times \left(1 - e^{-\mu t} \right) \quad (2)$$

$$\mu = \frac{\ln(I_0 / I)}{t} \quad (3)$$

เมื่อ t คือ ความหนาของพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi₂O₃ จากค่าเฉลี่ย (Mean) จำนวน 10 ครั้ง

สำหรับค่าความหนาครึ่งค่า (HVL) ซึ่งเป็นความหนาของวัสดุทำให้ความเข้มของรังสีเอกซ์ลดลง 1/2 เท่า คำนวณได้จากสมการที่ 4 และการคำนวณค่าความหนาของวัสดุที่ทำให้ความเข้มของรังสีเอกซ์ลดลง 1/10 เท่า (TVL) ได้ ดังสมการที่ 5

$$HVL = \frac{\ln(2)}{\mu} = \frac{0.693}{\mu} \quad (4)$$

$$TVL = \frac{\ln(10)}{\mu} = \frac{2.303}{\mu} \quad (5)$$

ส่วนค่าสัมประสิทธิ์การลดทอนเชิงมวล (Mass Attenuation Coefficient; MAC หรือ μ_m) ของตัวกลางที่เป็นสารประกอบ สามารถคำนวณได้ด้วยโปรแกรม WinXCom^(24,25) โดยใช้สมการที่ 6

$$\mu_m = \sum_i w_i (\mu_m)_i \quad (6)$$

เมื่อ w_i และ $(\mu_m)_i$ คือ เศษส่วนโดยน้ำหนัก (Weight Fraction) และค่าสัมประสิทธิ์การลดทอนเชิงมวลเฉพาะตัวของสารประกอบ ตามลำดับ

ผล

เครื่องเอกซเรย์ทางการแพทย์ที่ใช้ในการศึกษานี้ ประกอบด้วย เครื่องเอกซเรย์เต้านม เครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมในช่องปาก และเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป ที่ผ่านมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยแสดงค่าความต่างศักย์หลอด ค่าเวลาฉายรังสี และปริมาณรังสี ดังแสดงในตารางที่ 2 กรณีใช้แหล่งกำเนิดรังสีเอกซ์เป็นเครื่องเอกซเรย์เต้านม (ตั้งค่าเทคนิค: 28 kV, 50 mAs) พบค่าความต่างศักย์หลอดเฉลี่ยเท่ากับ 27.50±0.04 kV_p (~28 kV_p หรือ ^(M)28 kV_p) ที่มีค่าปริมาณรังสีที่ผ่านอากาศเฉลี่ยเท่ากับ 2.00±0.00 mGy ขณะที่เครื่อง

เอกซเรย์ทันตกรรมในช่องปาก (ตั้งค่าเทคนิค: 60 kV, 10 mA, 400 ms) พบค่าความต่างศักย์หลอดเฉลี่ยเท่ากับ 60.78±0.13 kV_p (~61 kV_p หรือ ^(D)61 kV_p) ซึ่งมีค่าปริมาณรังสีที่ผ่านอากาศเฉลี่ยเป็น 0.14±0.00 mGy กรณีเครื่องเอกซเรย์ทั่วไป (ตั้งค่าเทคนิค: 70 และ 80 kV, 100 mA, 100 ms) มีค่าความต่างศักย์หลอดเฉลี่ยเท่ากับ 69.80±0.11 kV_p (~70 kV_p หรือ ^(G)70 kV_p) และ 79.96±0.09 kV_p (~80 kV_p หรือ ^(G)80 kV_p) และค่าปริมาณรังสีที่ผ่านอากาศเท่ากับ 0.29±0.00 และ 0.40±0.00 mGy ตามลำดับ

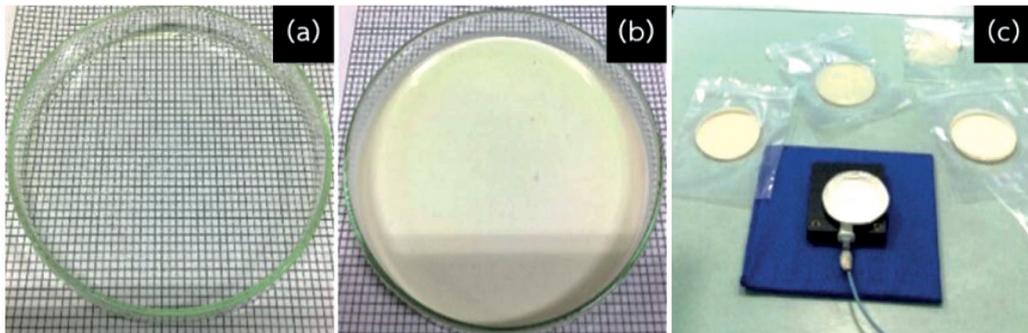
ตารางที่ 2 แสดงค่าความต่างศักย์หลอด ค่าเวลาฉายรังสี และปริมาณรังสีของเครื่องเอกซเรย์ทางการแพทย์

รายการทดสอบ	การฉายรังสี (Exposure)					ค่าเฉลี่ย (Mean)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)	สัมประสิทธิ์ของความผันแปร (C.V.%)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5			
1. เครื่องเอกซเรย์เต้านม (Mammographic X-ray machine)								
ยี่ห้อ HOLOGIC รุ่น SELENIA Dimensions ตั้งค่าเทคนิค: 28 kV, 50 mAs, SID = 66 cm								
ความต่างศักย์หลอด (kV _p)	27.50	27.50	27.60	27.50	27.50	27.50	0.04	0.16
ค่าเวลาฉายรังสี (ms)	497.90	497.90	497.90	497.90	497.90	497.90	0.00	0.00
ปริมาณรังสี (mGy)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	0.00	0.02
2. เครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมในช่องปาก (Intraoral X-ray machine)								
ยี่ห้อ ASAHI รุ่น C610NS ตั้งค่าเทคนิค: 60 kV, 10 mA, 400 ms, SID = 100 cm								
ความต่างศักย์หลอด (kV _p)	60.90	60.90	60.60	60.80	60.70	60.78	0.13	0.21
ค่าเวลาฉายรังสี (ms)	422.90	423.80	423.10	423.10	423.20	423.22	0.34	0.08
ปริมาณรังสี (mGy)	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.00	0.13
3. เครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป (General diagnostic X-ray)								
ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น RAD Speed Pro ตั้งค่าเทคนิค: 70 kV, 100 mA, 100 ms, SID = 100 cm								
ความต่างศักย์หลอด (kV _p)	69.90	69.70	69.90	69.90	69.70	69.80	0.11	0.16
ค่าเวลาฉายรังสี (ms)	99.90	99.90	99.90	99.90	99.80	99.90	0.04	0.04
ปริมาณรังสี (mGy)	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.00	0.06
ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น RAD Speed Pro ตั้งค่าเทคนิค: 80 kV, 100 mA, 100 ms, SID = 100 cm								
ความต่างศักย์หลอด (kV _p)	79.90	79.90	80.10	79.90	80.00	79.96	0.09	0.11
ค่าเวลาฉายรังสี (ms)	99.90	99.90	99.80	99.80	99.90	99.90	0.05	0.05
ปริมาณรังสี (mGy)	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.00	0.03

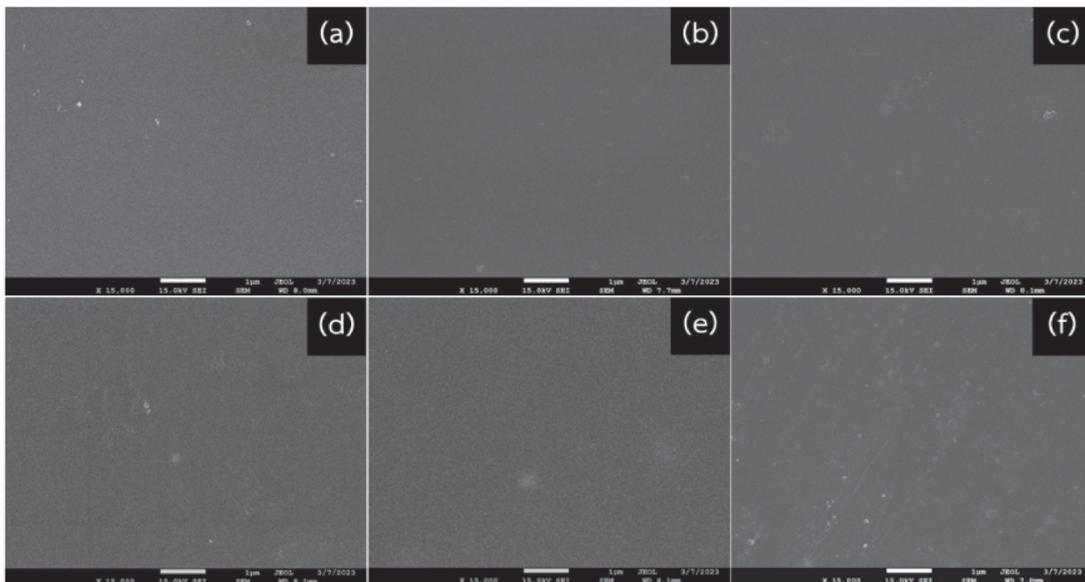
การศึกษาลักษณะทางกายภาพของพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi_2O_3

ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi_2O_3 ในอัตราส่วน (100-x) PVA/PVP: (x) Bi_2O_3 เมื่อ x เท่ากับ 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 wt% ที่ขึ้นรูป ดังแสดงในภาพที่ 3 จากการสังเกตลักษณะทางกายภาพเบื้องต้นด้วยตาเปล่า พบว่าตัวอย่าง

พอลิเมอร์ PVA/PVP ที่ไม่มีการเติม Bi_2O_3 จะมีลักษณะโปร่งแสง ขณะที่การเพิ่มปริมาณ Bi_2O_3 ในพอลิเมอร์ผสม PVA/PVP ทำให้พอลิเมอร์มีสีขาวขุ่นและความโปร่งแสงลดลง ผลการศึกษาลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าทุกตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน ผิวเรียบ และไม่มีรูพรุนปรากฏ ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 3 ลักษณะทางกายภาพของพอลิเมอร์ผสม (100-x) PVA/PVP: (x) Bi_2O_3 เมื่อ (a) $x = 0$ wt% และ (b) $x = 50$ wt% และ (c) ลักษณะตัวอย่างพอลิเมอร์ผสมสำหรับการทดสอบสมบัติการกำบังรังสี



ภาพที่ 4 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงลักษณะพื้นผิวของพอลิเมอร์ผสม (100-x) PVA/PVP: (x) Bi_2O_3 เมื่อ x เท่ากับ 0 (a), 10 (b), 20 (c), 30 (d), 40 (e) และ 50 (f) wt% ที่กำลังขยาย 15,000 เท่า

การทดสอบการกำบังรังสีของพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi₂O₃

การทดสอบคุณสมบัติการกำบังรังสีตามวิธีการทดสอบและค่าปริมาณรังสีที่ผ่านออกมา (I) จากพอลิเมอร์ผสม PVA/PVP กับ Bi₂O₃ ดังแสดงในตารางที่ 3 สามารถคำนวณร้อยละปริมาณรังสีเอกซ์ส่องผ่าน (T) ได้จากสมการที่ 1 ดังแสดงในภาพที่ 5(a) พบว่าค่า T เพิ่มขึ้น เมื่อค่าความต่างศักย์หลอด kV_p เพิ่มขึ้น ตัวอย่างเช่น ค่า T ของตัวอย่างพอลิเมอร์ผสม x = 50 wt% ความหนา 0.49±0.07 mm มีค่าเท่ากับ 2.86, 25.51,

42.99 และ 47.99% ที่ ^(M)28, ^(I)61, ^(G)70 และ ^(G)80 kV_p ตามลำดับ ขณะที่การเพิ่มปริมาณของ Bi₂O₃ มากขึ้น จะทำให้ค่า T ลดลงด้วยเช่นกัน ตัวอย่างเช่น ที่ ^(G)80 kV_p ค่า T เท่ากับ 99.50, 93.87, 82.00, 71.87, 59.89 และ 47.99% เมื่อตัวอย่างพอลิเมอร์ผสมที่ x = 0 wt% (หนา 0.39±0.08 mm), x = 10 wt% (หนา 0.32±0.07 mm), x = 20 wt% (หนา 0.39±0.06 mm), x = 30 wt% (หนา 0.54±0.06 mm), x = 40 wt% (หนา 0.50±0.06 mm) และ x = 50 wt% (หนา 0.49±0.07 mm) ตามลำดับ

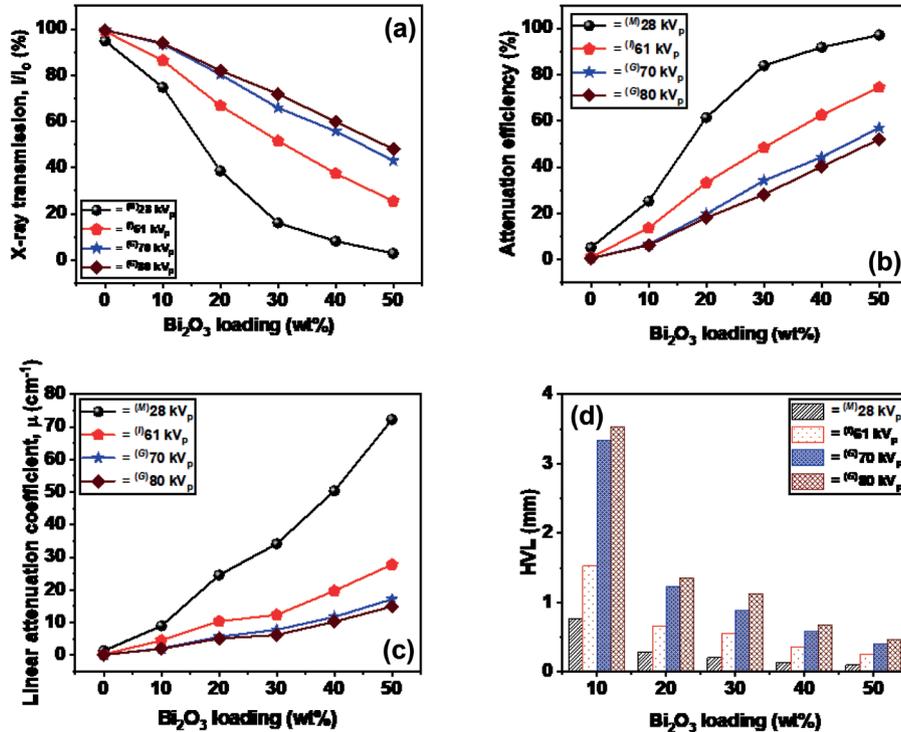
ตารางที่ 3 ค่าปริมาณรังสีที่ผ่านออกมาจากพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi₂O₃

ปริมาณบิสมีทออกไซด์	ความหนา (mm)	ปริมาณรังสีที่ผ่านออกมาจากวัสดุพอลิเมอร์ผสม (mGy) ที่ค่าความต่างศักย์หลอดของเครื่องเอกซเรย์แต่ละชนิด			
		^(M) 28 kV _p	^(I) 61 kV _p	^(G) 70 kV _p	^(G) 80 kV _p
x = 0 wt%	0.39±0.08	1.90	0.14	0.29	0.40
x = 10 wt%	0.32±0.07	1.50	0.12	0.27	0.38
x = 20 wt%	0.39±0.06	0.77	0.09	0.23	0.33
x = 30 wt%	0.54±0.06	0.32	0.07	0.19	0.29
x = 40 wt%	0.50±0.06	0.16	0.05	0.16	0.24
x = 50 wt%	0.49±0.07	0.06	0.04	0.13	0.19

หมายเหตุ: ^M เครื่องเอกซเรย์เต้านม, ^I เครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมในช่องปาก และ ^G เครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป

ค่าสัมประสิทธิ์การลดทอนรังสีเชิงเส้น (LAC) ของพอลิเมอร์ผสม (100-x) PVA/PVP: (x) Bi₂O₃ ดังแสดงในภาพที่ 5(c) ซึ่งให้เห็นว่าการเติม Bi₂O₃ ในพอลิเมอร์ผสม PVA/PVP ทำให้ค่า LAC สูงกว่าพอลิเมอร์ผสมที่ไม่มีการเติม Bi₂O₃ ตัวอย่างเช่น ที่ ^(G)80 kV_p ค่า LAC เท่ากับ 0.13, 1.96, 5.12, 6.17, 10.30 และ 14.94 cm⁻¹ เมื่อ x = 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 wt% ตามลำดับ เมื่ออัตราส่วนของ Bi₂O₃ เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ค่า LAC มีค่าเพิ่มขึ้น โดยค่า LAC สูงสุดของงานวิจัยนี้พบเมื่อ x = 50 wt% ดังแสดงในตารางที่ 4 นอกจากนี้ค่า LAC จะมีค่าลดลงเมื่อพลังงานของรังสีเอกซ์หรือโฟตอนสูงขึ้น ตัวอย่างเช่น เมื่อ x = 50 wt% ค่า LAC

เท่ากับ 72.28, 27.80, 17.17 และ 14.94 cm⁻¹ ที่ ^(M)28, ^(I)61, ^(G)70 และ ^(G)80 kV_p ตามลำดับ ส่วนค่า HVL และ TVL ของพอลิเมอร์ผสม PVA/PVP กับ Bi₂O₃ พบว่าที่ kV_p เท่ากัน การเพิ่มปริมาณ Bi₂O₃ จะทำให้ค่า HVL และ TVL ลดลง เนื่องจากการเพิ่มปริมาณของบิสมีททำให้ค่า LAC เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบค่า HVL ของพอลิเมอร์ผสม PVA/PVP ที่เติม Bi₂O₃ ในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 5(d) พบว่าค่า HVL จะมีค่าต่ำสุดเมื่อใช้ปริมาณ Bi₂O₃ ที่ x = 50 wt% โดยมีค่าเท่ากับ 0.10, 0.25, 0.40 และ 0.46 mm ที่ ^(M)28, ^(I)61, ^(G)70 และ ^(G)80 kV_p ตามลำดับ



ภาพที่ 5 สมบัติการกำบังรังสีของพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi₂O₃ เมื่อ (a) คือ ค่าปริมาณรังสีเอกซ์ส่องผ่าน, (b) คือ ค่าประสิทธิภาพการกำบังรังสี, (c) คือ ค่าสัมประสิทธิ์การลดทอนรังสีเชิงเส้น และ (d) คือ ค่าความหนาครึ่งค่า

ตารางที่ 4 แสดงค่าประสิทธิภาพการกำบังรังสี (AE) ค่าสัมประสิทธิ์การลดทอนเชิงเส้น (LAC) ค่าความหนาครึ่งค่า (HVL) และค่าความหนาของวัสดุที่ลดลง 10 เท่า (TVL) ของพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi₂O₃

รายการ	ความต่าง ศักร์ย์หลอด	ปริมาณ Bi ₂ O ₃ (wt%)					
		x = 0	x = 10	x = 20	x = 30	x = 40	x = 50
ค่าประสิทธิภาพ การกำบังรังสี (%)	^(M) 28 kV _p	5.15	25.20	61.41	83.91	91.85	97.14
	^(J) 61 kV _p	1.00	13.59	33.22	48.41	62.57	74.49
	^(G) 70 kV _p	0.41	6.47	19.70	34.12	44.26	57.01
	^(G) 80 kV _p	0.50	6.13	18.00	28.13	40.11	52.01
ค่าสัมประสิทธิ์ การลดทอนรังสีเชิงเส้น (cm ⁻¹)	^(M) 28 kV _p	1.34	9.00	24.57	34.15	50.38	72.28
	^(J) 61 kV _p	0.25	4.53	10.42	12.37	19.75	27.80
	^(G) 70 kV _p	0.10	2.08	5.66	7.80	11.75	17.17
	^(G) 80 kV _p	0.13	1.96	5.12	6.17	10.30	14.94
ค่าความหนาครึ่งค่า (mm)	^(M) 28 kV _p	5.17	0.77	0.28	0.20	0.14	0.10
	^(J) 61 kV _p	27.30	1.53	0.66	0.56	0.35	0.25
	^(G) 70 kV _p	66.36	3.34	1.22	0.89	0.59	0.40
	^(G) 80 kV _p	54.53	3.53	1.35	1.12	0.67	0.46

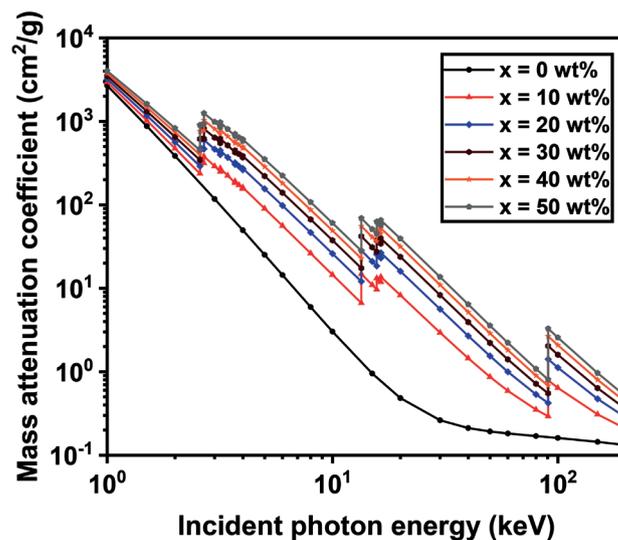
ตารางที่ 4 แสดงค่าประสิทธิภาพการกำบังรังสี (AE) ค่าสัมประสิทธิ์การลดทอนเชิงเส้น (LAC) ค่าความหนาครึ่งค่า (HVL) และค่าความหนาของวัสดุที่ลดลง 10 เท่า (TVL) ของพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi₂O₃ (ต่อ)

รายการ	ความต่างศักย์หลอด	ปริมาณ Bi ₂ O ₃ (wt%)					
		x = 0	x = 10	x = 20	x = 30	x = 40	x = 50
ค่าความหนาของวัสดุที่ทำให้ความเข้มรังสีเอกซ์ลดลง 1/10 เท่า (mm)	^(M) 28 kV _p	17.18	2.56	0.94	0.67	0.46	0.32
	^(L) 61 kV _p	90.68	5.08	2.21	1.86	1.17	0.83
	^(G) 70 kV _p	220.45	11.09	4.07	2.95	1.96	1.34
	^(G) 80 kV _p	181.13	11.74	4.49	3.73	2.23	1.54

หมายเหตุ: ^M เครื่องเอกซเรย์เต้านม, ^L เครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมในช่องปาก และ ^G เครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป

ค่าสัมประสิทธิ์การลดทอนเชิงมวล (Mass Attenuation Coefficient; MAC) ของพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi₂O₃ คำนวณทางทฤษฎีด้วยโปรแกรม WinXCom ในช่วงพลังงานระหว่าง 1 ถึง 200 กิโลอิเล็กตรอนโวลต์ (keV) ดังแสดงในภาพที่ 6 จากผลการคำนวณ พบว่าค่า MAC มีค่าสูงในช่วงแรกและลดลงอย่างรวดเร็ว ค่า MAC จะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณร้อยละโดยน้ำหนัก (wt%) ของ Bi₂O₃ เพิ่มขึ้น ซึ่งค่า MAC

จะสูงกว่าเมื่อพอลิเมอร์ผสม PVA/PVP ไม่มี Bi₂O₃ นอกจากนี้ลักษณะของกราฟ MAC ของพอลิเมอร์ผสม PVA/PVP ที่มีการเติม Bi₂O₃ จะมีความคล้ายคลึงกันเนื่องจากพอลิเมอร์ผสมมีธาตุองค์ประกอบที่เหมือนกัน นอกจากนี้ลักษณะของกราฟจะมีความไม่ต่อเนื่องกันเนื่องจากอยู่ในช่วงของขอบเขตของการดูดกลืนพลังงาน (Absorption Edge) ในวงโคจรอิเล็กตรอนของบิสมัท (Bi) ทำให้ค่า MAC ทางทฤษฎีเพิ่มขึ้น



ภาพที่ 6 ค่าสัมประสิทธิ์การลดทอนเชิงมวล (Mass attenuation coefficient; MAC) ของพอลิเมอร์ผสม (100-x) PVA/PVP: (x) Bi₂O₃ เมื่อ x = 0-50 wt% ที่คำนวณด้วยโปรแกรม WinXCom

วิจารณ์

เมื่อเปรียบเทียบค่าประสิทธิภาพการกำบังรังสี (AE) ของพอลิเมอร์ผสม PVA/PVP/Bi₂O₃ กับพอลิเมอร์พื้นชนิดอื่น ๆ ที่เติม Bi₂O₃ ดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าที่ค่าความต่างศักย์หลอด (M)28 kV_p มีค่าพลังงานรังสีเอกซ์เฉลี่ยอยู่ ~20 keV⁽²⁸⁾ ซึ่งตัวอย่าง x = 50 wt% หนา 0.49±0.07 mm มีค่า AE เท่ากับ 97.14% ใกล้เคียงกับพอลิแลคติกแอซิด (PLA) ที่เติมอนุภาคนาโน Bi₂O₃ ในปริมาณ 38 wt% หนา 1.00 mm⁽⁴⁾ PVA ที่เติมอนุภาคนาโน Bi₂O₃ ในปริมาณ 18 wt% หนา 0.25 mm⁽⁵⁾ PVC ที่เติม Bi₂O₃ ในปริมาณ 50 wt% หนา 1.00 mm⁽¹¹⁾ ส่วนที่ (D)61 kV_p มีค่าพลังงานรังสีเอกซ์เฉลี่ยอยู่ในช่วง ~33-40 keV⁽²⁹⁻³³⁾ สำหรับตัวอย่าง x = 50 wt% มีค่า AE เท่ากับ 74.49% ซึ่งใกล้เคียงกับพอลิไวนิลคลอไรด์ (PVC) ที่เติม Bi₂O₃ ในปริมาณ 50 wt% หนา 1.00 mm⁽¹¹⁾ และพอลิเอทิลีนความหนาแน่นสูง (HDPE) ที่เติม n-Bi₂O₃/n-WO₃/GO ในปริมาณ 25 wt% หนา 6.00 mm⁽¹⁵⁾ ซึ่งมีค่า AE น้อยกว่าตัวอย่างพอลิเมอร์ผสม x = 20 wt% หนา 0.39±0.06 mm สังเกตได้ว่าค่า AE มีค่าใกล้เคียงกัน แต่งานวิจัยนี้ใช้พอลิเมอร์ผสมที่มีความหนาน้อยกว่าในการกำบังรังสี

ผลการศึกษาของ Shik NA และคณะ⁽¹³⁾ พบว่าพอลิเมอร์ผสม Bi₂O₃ ขนาดอนุภาคระดับนาโนมีความสามารถในการกำบังรังสีได้ดีกว่าอนุภาคระดับไมโคร แต่เมื่อเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตราคาของ Bi₂O₃ ขนาดอนุภาคระดับนาโนในสัดส่วนเท่ากันจะสูงกว่า ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ Bi₂O₃ ขนาดอนุภาคระดับไมโคร เพื่อลดต้นทุนการผลิต แต่ยังคงประสิทธิภาพการกำบังรังสีเอกซ์ได้ดี ในการศึกษาตัวอย่างที่ x ≥ 40 wt% หนา ~0.50 mm จะมีค่า AE ที่ (M)28 kV_p มากกว่า 90% ซึ่งอุปกรณ์กำบังรังสีที่จำหน่ายทั่วไปควรมีค่า AE มากกว่า 90%^(34,35) กรณีเมื่อใช้ค่าความต่างศักย์หลอดสูงกว่า 28 kV_p จะทำให้ค่า AE ลดลง ดังนั้นเพื่อให้สามารถนำไปใช้งานได้ในระดับพลังงานรังสีที่สูงขึ้น ควรออกแบบตัวอย่างให้มีความหนาตามสมการ Beer-Lambert Law โดยมีความหนาอย่างน้อยเท่ากับค่า TVL ณ พลังงานรังสีสูงสุดที่ใช้งาน

ค่า LAC และ MAC เพิ่มขึ้นเนื่องจากรังสีหรือโฟตอนจากเครื่องเอกซเรย์ด้านที่ (M)28 kV_p, เครื่องเอกซเรย์ทันตรกรมในช่องปากที่ (D)61 kV_p และเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไปที่ (G)70 และ (G)80 kV_p ซึ่งจะมีค่าพลังงานรังสีเอกซ์เฉลี่ยประมาณ ~20 keV⁽²⁸⁾, ~33-40 keV⁽²⁹⁻³³⁾, ~36-44 keV^(30,32) และ ~40-48 keV⁽³⁰⁻³³⁾ ตามลำดับ เมื่อรังสีผ่านพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi₂O₃ โฟตอนจะชนกับอิเล็กตรอนวงในของ Bi₂O₃ แล้วถ่ายเทพลังงานทั้งหมดให้กับอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ถูกชนจะมีพลังงานสูงขึ้นแล้วหลุดออกจากวงโคจร เรียกว่า โฟโตอิเล็กตรอน (Photoelectron) เรียกปรากฏการณ์ในวัสดุนี้ว่า โฟโตอิเล็กทริก (Photoelectric Effect) ซึ่งโอกาสของการเกิดปรากฏการณ์โฟโตอิเล็กทริกจะสัมพันธ์กับ (Z/E)³ เมื่อ Z และ E คือเลขอะตอมของวัสดุและระดับพลังงานโฟตอน^(8,11) ตามลำดับ โดยปฏิกิริยานี้จะเกิดในระดับพลังงานของโฟตอนน้อยกว่า 500 keV⁽³⁾ ทำให้รังสีหรือโฟตอนที่ผ่านออกมามีปริมาณลดลงจากเดิม สำหรับพอลิเมอร์ผสมที่มีปริมาณ Bi₂O₃ เพิ่มขึ้น จะทำให้ค่าความหนาแน่นอิเล็กตรอนยังผล (Effective Electron Density) และเลขอะตอมยังผล (Effective Atomic Number) เพิ่มขึ้น⁽¹⁷⁾ ส่งผลให้โอกาสในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโฟตอนกับพอลิเมอร์ผสมเพิ่มขึ้น ทำให้สามารถลดทอนหรือกำบังรังสีเอกซ์ได้ดีกว่า เมื่อพลังงานของรังสีเอกซ์หรือโฟตอนสูงขึ้นจะทำให้ค่า LAC และ MAC มีค่าลดลง เนื่องจากอำนาจในการทะลุทะลวงของโฟตอนผ่านพอลิเมอร์ผสมเพิ่มขึ้น เกิดปฏิกิริยาระหว่างโฟตอนกับวัสดุลดลงทำให้ปริมาณรังสีที่ผ่านออกมาจากวัสดุ (I) ถึงเครื่องตรวจจับรังสี (radiation detector) มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบค่า LAC ของพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi₂O₃ กับงานวิจัยอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่าที่ความต่างศักย์หลอด (D)61 kV_p ค่า LAC ของพอลิเมอร์ผสมเมื่อ x = 30 wt% มีค่าเท่ากับ 12.37 cm⁻¹ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า LAC สูงสุด (11.84 cm⁻¹) ของ PVA/PVP ที่เติม Bi₂O₃ ในปริมาณ 26.24 wt%⁽¹⁷⁾ และมากกว่าค่า LAC สูงสุด (4.68 cm⁻¹) ของ PVA/PVP ที่เติม WO₃ ในปริมาณ 24 wt%⁽¹⁸⁾ เนื่องจากปริมาณและ

เลขอะตอม (Z) ของสารกำบังรังสีที่ใช้แตกต่างกัน นอกจากนั้นพบว่า พอลิเมอร์ผสมชนิดนี้ใช้ปริมาณสารกำบังรังสีน้อยกว่าแต่ให้ค่า LAC สูงกว่า เช่น ค่า LAC ของตัวอย่างเมื่อ $x = 30 \text{ wt\%}$ สูงกว่าค่า LAC สูงสุด (5.04 cm^{-1}) ของ Wood/PVC ที่เติม Bi₂O₃ ในปริมาณ 35 wt%⁽¹²⁾ ค่า LAC สูงสุด (9.92 cm^{-1}) ของ พอลิสไตรีน (PS) ที่เติม lead oxide (PbO) ในปริมาณ 35 wt%⁽¹⁹⁾ และค่า LAC สูงสุด (9.36 cm^{-1}) ของ sulfur-vulcanized natural rubber latex (SVNRL) ที่เติมอนุภาคนาโน Bi₂O₃ ปริมาณ 200 ส่วนในร้อยส่วนของยางโดยน้ำหนัก (Parts per Hundred Rubber)⁽²²⁾ ด้วยเช่นกัน โดยค่าสัมประสิทธิ์ลดทอนเชิงเส้น (LAC, μ) ที่แตกต่างกัน สามารถอธิบายได้ดังสมการ $\mu = \rho Z^4 / AE^3$ เมื่อ ρ , Z, A และ E คือ ค่าความหนาแน่นวัสดุกำบัง

เลขอะตอมของสารประกอบ น้ำหนักอะตอมของสารประกอบ และพลังงานของโฟตอน ตามลำดับ⁽³⁶⁾

ดังนั้นเมื่อพิจารณาค่า LAC, HVL, TVL จากการทดลองและค่า MAC ทางทฤษฎีด้วยโปรแกรม WinXCom พบว่าพอลิเมอร์ผสม PVA/PVP ที่เติม Bi₂O₃ มีคุณสมบัติในการกำบังรังสีใกล้เคียงตะกั่วและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่า ขณะที่พอลิเมอร์ผสม PVA/PVP เป็นวัสดุพอลิเมอร์ที่สามารถขึ้นรูปเป็นฟิล์มได้ มีราคาถูกหาได้ง่าย มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ ทนทานต่อสารเคมี มีความยืดหยุ่น มีความแข็งแรง และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถพัฒนาเป็นต้นแบบชุดป้องกันรังสีเอกซ์ทดแทนการใช้ตะกั่วในอนาคต

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบค่าประสิทธิภาพการกำบังรังสี (AE) ของพอลิเมอร์พื้นชนิดอื่นที่เติม Bi₂O₃

พอลิเมอร์พื้น (Polymer matrix)	โลหะ ออกไซด์	ความต่างศักย์ตลอด (kV _p)	ประสิทธิภาพการกำบังรังสี (%)	ความหนาชิ้นงาน (mm)	เอกสารอ้างอิง
โพลีไวนิลแอลกอฮอล์/ โพลีไวนิลไพโรลิโดน (PVA/PVP)	50 wt%	^(M) 28	97.14	0.49	งานวิจัยนี้
	Bi ₂ O ₃	^(I) 61	74.49		
		^(G) 70	57.01		
		^(G) 80	52.01		
พอลีแลคติกแอซิด (PLA)	38 wt% n-Bi ₂ O ₃	30	100.00	1.00	Noor Azman NZ และคณะ ⁽⁴⁾
โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA)	18 wt% n-Bi ₂ O ₃	25-35	100.00	0.25	Noor Azman NZ และคณะ ⁽⁶⁾
พอลิไวนิลคลอไรด์ (PVC)	50 wt% Bi ₂ O ₃	20-30	97.00	1.00	Nunez-Briones AG และคณะ ⁽¹¹⁾
พอลิเอทิลีนความหนาแน่นสูง (HDPE)	25 wt% n-Bi ₂ O ₃ / n-WO ₃ /GO	60	18.99	6.00	Abdolahzadeh T และคณะ ⁽¹⁵⁾
โพลีไดเมทิล-ไซลอกเซน (PDMS)	44.44 wt% Bi ₂ O ₃	80	75.00	1.23	Nambiar S และคณะ ⁽¹⁶⁾

หมายเหตุ: ^M เครื่องเอกซเรย์เต้านม, ^I เครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมในช่องปาก และ ^G เครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์การลดทอนเชิงเส้นและความหนาครึ่งค่าของพอลิเมอร์พื้นชนิดอื่น

พอลิเมอร์พื้น (Polymer matrix)	โลหะ ออกไซด์	ความต่างศักย์หลอด (kV _p)	ประสิทธิภาพ การกำบังรังสี เชิงเส้น (cm ⁻¹)	ค่าความหนา ครึ่งค่า (mm)	เอกสาร อ้างอิง
โพลีไวนิลแอลกอฮอล์/ โพลีไวนิลไพโรลิโดน (PVA/PVP)	50 wt% Bi ₂ O ₃	^(M) 28 ^(D) 61 ^(G) 70 ^(G) 80	72.28 27.80 17.17 14.94	0.10 0.25 0.40 0.46	งานวิจัยนี้
Wood-PVC	35 wt% Bi ₂ O ₃	60	5.04	1.38	Poltabtim W และคณะ ⁽¹²⁾
โพลีไวนิลแอลกอฮอล์/ โพลีไวนิลไพโรลิโดน (PVA/PVP)	26.24 wt% Bi ₂ O ₃	60 70	11.84 10.05	0.59 0.69	Bijanu A และคณะ ⁽¹⁷⁾
โพลีไวนิลแอลกอฮอล์/ โพลีไวนิลไพโรลิโดน (PVA/PVP)	24 wt% WO ₃	60 70 80	4.68 4.27 4.12	1.48 1.62 1.68	Bijanu A และคณะ ⁽¹⁸⁾
พอลิสไตรีน (PS)	35 wt% PbO	60 70	9.92 3.94	0.70 1.76	Osman AF และคณะ ⁽¹⁹⁾
พอลิยูรีเทน สูตรน้ำ (WPU)	60 wt% Bi ₂ O ₃	60 80	14.52 11.53	0.48 0.60	Koyuncu B และคณะ ⁽²⁰⁾
ยางธรรมชาติ (Natural rubber)	57.80 wt%	80	5.60	1.24	Kalkornsurapranee E และคณะ ⁽²¹⁾
Sulfur-vulcanized natural rubber latex (SVNRL)	200 phr n-Bi ₂ O ₃	60	9.36	0.74	Thumwong A และคณะ ⁽²²⁾

หมายเหตุ: ^M เครื่องเอกซเรย์เต้านม, ^D เครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมในช่องปาก และ ^G เครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป

สรุป

พอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi₂O₃ ในอัตราส่วน (100-x) PVA/PVP : (x) Bi₂O₃ เมื่อ x เท่ากับ 0-50 wt% สามารถเตรียมขึ้นรูปด้วยวิธีการที่ง่ายและใช้ต้นทุนต่ำ ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพด้วยตาเปล่าและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า พอลิเมอร์ผสมที่เตรียมขึ้นมีความเป็นเนื้อเดียวกันผิวเรียบ ไม่มีรูพรุน การเติม Bi₂O₃ ลงในพอลิเมอร์ผสม PVA/PVP ทำให้ความโปร่งแสงของตัวอย่างพอลิเมอร์ผสมลดลง ผลการศึกษสมบัติการกำบังรังสีพบว่า การเติม Bi₂O₃ ทำให้วัสดุมีค่า LAC เพิ่มขึ้น โดยที่มีค่า HVL และ

TVL ลดลง การเติม Bi₂O₃ ปริมาณ 50 wt% ในพอลิเมอร์ผสม PVA/PVP ที่มีความหนาประมาณ 0.49 มิลลิเมตร ให้ค่าประสิทธิภาพในการกำบังรังสีสูงสุด เท่ากับ 97.14, 74.49, 57.01 และ 52.01% ที่ ^(M)28, ^(D)61, ^(G)70 และ ^(G)80 kV_p ตามลำดับ พอลิเมอร์ผสมนี้สามารถลดทอนรังสีเอกซ์พลังงานต่ำได้ดีจึงเหมาะนำไปประยุกต์เป็นวัสดุกำบังรังสีเอกซ์พลังงานต่ำ เช่น ชุดป้องกันรังสีเอกซ์จากเครื่องเอกซเรย์เต้านม เป็นต้น อย่างไรก็ตามปัจจุบันผู้วิจัยได้ศึกษาสมบัติการกำบังรังสีของตัวอย่างที่ใช้สารเคมีเกรดห้องปฏิบัติการ (A.C.S. grade) เช่น Bi₂O₃, PVA และ PVP ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า 99% ทำให้ต้นทุนยังสูงเมื่อเปรียบเทียบกับราคาต้นทุน/กิโลกรัมในท้องตลาด

แนวทางแก้ไข คือ อาจเปลี่ยนพอลิเมอร์เป็นเกรดอุตสาหกรรม (commercial grade) ที่มีความบริสุทธิ์ต่ำกว่าจะทำให้ต้นทุนต่ำกว่าชุดป้องกันรังสีเอกซ์ในท้องตลาด พอลิเมอร์ผสมระหว่าง PVA/PVP กับ Bi₂O₃ ยังจำเป็นต้องผ่านการทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันรังสีเอกซ์ให้ครอบคลุมทุกช่วงพลังงานที่ใช้งานจริงในงานรังสีวินิจฉัยโดยไม่เจาะจงเครื่องใดเครื่องหนึ่ง อีกทั้งควรมีการทดสอบสมบัติเชิงกลของวัสดุ เช่น การทดสอบแรงดึง การทดสอบความสามารถในการต้านทานการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของวัสดุ เป็นต้น เพื่อพิจารณาปริมาณการเติม Bi₂O₃ ที่เหมาะสมในแต่ละลักษณะการใช้งาน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กลุ่มงานรังสีและเครื่องมือแพทย์ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือทดสอบ ขอขอบคุณโรงพยาบาลนครพิงค์ จังหวัดเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องเอกซเรย์สำหรับใช้ในการทดสอบการกำบังรังสีเอกซ์ และขอขอบคุณ รศ.ดร. อนุชา วัชรภาสกร ภาควิชาฟิสิกส์และวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการเตรียมตัวอย่างทดสอบ ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. การป้องกันอันตรายจากรังสี. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว; 2546.
- International Commission on Radiological Protection. The 2007 Recommendations of the international commission on radiological protection (ICRP Publication 103). Ann ICRP 2007; 37(2-4): 1-332.
- Prabhu S, Bubbly SG, Gudennavar SB. X-ray and γ -ray shielding efficiency of polymer composites: choice of fillers, effect of loading and filler size, photon energy and multifunctionality. Polym Rev 2023; 63(1): 246-88.
- Noor Azman NZ, Siddiqui SA, Haroosh HJ, Albetran HM, Johannessen B, Dong Y, et al. Characteristics of X-ray attenuation in electrospun bismuth oxide/polylactic acid nanofiber mats. J Synchrotron Radiat 2013; 20: 741-8.
- Noor Azman NZ, Musa NF, Ab Razak NNN, Ramli RM, Mustafa IS, Rahman AA, et al. Effect of Bi₂O₃ particle sizes and addition of starch into Bi₂O₃-PVA composites for X-ray shielding. Appl Phys A 2016; 122: 818. (9 pages).
- Oliver N, Ramli RM, Noor Azman NZ. An empirical study on the X-ray attenuation capability of n-WO₃/n-Bi₂O₃/PVA with added starch. Nucl Eng Technol 2022; 54: 3459-69.
- Ahmad M, Zaki UM, Ramli RM, Rahman AA, Noor Azman NZ. Effect of combination of two different filler loadings of electrospun Bi₂O₃/WO₃/PVA nanofibre mats on X-ray attenuation study. Chem Phys Impact 2021; 2: 100020. (13 pages).
- Hazlan MH, Jamil M, Ramli RM, Noor Azman NZ. X-ray attenuation characterisation of electrospun Bi₂O₃/PVA and WO₃/PVA nanofibre mats as potential X-ray shielding materials. Appl Phys A 2018; 124: 497. (9 pages).
- Abunahel BM, Ramli RM, Quffa KM, Noor Azman NZ. Effect of nanofibrous porosity on the X-ray attenuation properties of electrospun n-Bi₂O₃/epoxy-polyvinyl alcohol (PVA) nanofiber mats. Appl Phys A 2018; 124: 540. (9 pages).
- Abunahel BM, Mustafa IS, Noor Azman NZ. Characteristics of X-ray attenuation in nano-sized bismuth oxide/epoxy-polyvinyl alcohol (PVA) matrix composites. Appl Phys A 2018; 124: 828. (7 pages).

11. Nunez-Briones AG, Benavides R, Mendoza-Mendoza E, Martinez-Pardo ME, Carrasco-Abrego H, Kotzian C, et al. Preparation of PVC/Bi₂O₃ composites and their evaluation as low energy X-ray radiation shielding. *Radiat Phys Chem* 2021; 179: 109198. (6 pages).
12. Poltabtim W, Wimolmala E, Markpin T, Sombatsompop N, Rosarpitak V, Saenboonruang K. X-ray shielding, mechanical, physical and water absorption properties of wood/PVC composites containing bismuth oxide. *Polymers* 2021; 13: 2212. (16 pages).
13. Shik NA, Gholamzadeh L. X-ray shielding performance of the EPVC composites with micro- or nanoparticles of WO₃, PbO or Bi₂O₃. *Appl Radiat Isot* 2018; 139: 61–5.
14. Alshahri S, Alsuhybani M, Alosime E, Almurayshid M, Alrwais A, Alotaibi S. LDPE/bismuth oxide nanocomposite: preparation, characterization and application in X-ray shielding. *Polymers* 2021; 13: 3081. (15 pages).
15. Abdolazadeh T, Morshedian J, Ahmadi S. Preparation and characterization of nano WO₃/Bi₂O₃/GO and BaSO₄/GO dispersed HDPE composites for X-ray shielding application. *Polyolefins J* 2022; 9: 73–83.
16. Nambiar S, Osei EK, Yeow JTW. Polymer nanocomposite-based shielding against diagnostic X-rays. *J Appl Polym Sci* 2013; 127(6): 4939–46.
17. Bijanu A, Rajak G, Paulose R, Arya R, Agrawal V, Gowri VS, et al. Flexible, chemically bonded Bi-PVA-PVP composite for enhanced diagnostic X-ray shielding applications. *J Inorg Organomet Polym* 2023; 33: 2279–91.
18. Bijanu A, Paulose R, Tomar AS, Agrawal V, Gowri VS, Sanghi SK, et al. Chemically bonded tungsten-based polymer composite for X-rays shielding applications. *Mater Today Commun* 2022; 32: 104100. (10 pages).
19. Osman AF, Balaa HE, Samad OE, Awad R, Badawi MS. Assessment of X-ray shielding properties of polystyrene incorporated with different nano-sizes of PbO. *Radiat Environ Biophys* 2023; 62: 235–51.
20. Koyuncu B, Aral N, Candan C, Nergis B. Bismuth oxide nanoparticles/waterborne polyurethane-coated fabrics for ionizing radiation protection. *J Coat Technol Res* 2024; 21(3): 969–78.
21. Kalkornsuraanee E, Kothan S, Intom S, Johns J, Kaewjaeng S, Kedkaew C, et al. Wearable and flexible radiation shielding natural rubber composites: effect of different radiation shielding fillers. *Radiat Phys Chem* 2021; 179: 109261.
22. Thumwong A, Chinnawet M, Intarasena P, Rattanapongs C, Tokonami S, Ishikawa T, et al. Comparative study on X-ray shielding and mechanical properties of natural rubber latex nanocomposites containing Bi₂O₃ or BaSO₄: experimental and numerical determination. *Polymers* 2022; 14: 3654. (16 pages).
23. Olivieri F, Avolio R, Gentile G, Mazzone A, Rizzi R, Nacucchi M, et al. High filler content acrylonitrile-butadiene-styrene composites containing tungsten and bismuth oxides for effective lead-free X-ray radiation shielding. *Polym Compos* 2024; 45: 2101–13.
24. Gerward L, Guilbert N, Jensen KB, Levring H. X-ray absorption in matter: reengineering XCOM. *Radiat Phys Chem* 2001; 60: 23–4.
25. Gerward L, Guilbert N, Jensen KB, Levring H. WinXCom—a program for calculating X-ray attenuation coefficients. *Radiat Phys Chem* 2004; 71: 653–4.
26. Sharaby MR, Soliman EA, Abdel-Rahman AB, Osman A, Khalil R. Novel pectin-based nanocomposite film for active food packaging applications. *Sci Rep* 2022; 12: 20673. (14 pages).

27. Solikhin A, Murayama K. Enhanced properties of poly (vinyl alcohol) composite films filled with microfibrillated cellulose isolated from continuous steam explosion. *Int J Plast Technol* 2018; 22: 122–36.
28. Williams MB, Simoni PU, Smilowitz L, Stanton M, Phillips W, Stewart A. Analysis of the detective quantum efficiency of a developmental detector for digital mammography. *Med Phys* 1999; 26: 2273–85.
29. Santos MAP, Fragoso MCF, Lima RA, Hazin CA. X-ray beam qualities for dental radiology purposes. In: *Proceedings of International Nuclear Atlantic Conference - INAC; 2009 Sep 27 - Oct 2. Rio de Janeiro, Brazil: Brazilian Association for Nuclear Energy; 2009.*
30. Poirie Y, Kuznetsova S, Villarreal-Barajas JE. Characterization of nano-Dot optically stimulated luminescence detectors and high-sensitivity MCP-N thermoluminescent detectors in the 40–300 kV_p energy range. *Med Phys* 2018; 45(1): 402–13.
31. McCaffrey JP, Shen H, Downton B, Mainegra-Hing E. Radiation attenuation by lead and nonlead materials used in radiation shielding garments. *Med Phys* 2007; 34(2): 530–7.
32. Cho T, Uehara S, Yoshimura A, Yoshinaga H. Dental x-ray spectrometry with an Si(Li) semiconductor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 1978; 45(6): 965–77.
33. Aoki K, Koyama M. Measurement of backscattered x-ray spectra at the water surface in the energy range 60 kV to 120 kV. *Phys Med Biol* 2002; 47(7): 1205–17.
34. Shousha, HA, Rabie N, Hassan GM. Experimental investigation of commercially available lead composite aprons used for diagnostic X-rays. *Radiat Eff Defects Solids* 2011; 166(12): 935–41.
35. Christodoulou EG, Goodsitt MM, Larson SC, Darner KL, Satti J, Chan HP. Evaluation of the transmitted exposure through lead equivalent aprons used in a radiology department, including the contribution from backscatter. *Med Phys* 2003; 30: 1033–8.
36. Jayakumar S, Saravanan T, Philip J. A review on polymer nanocomposites as lead-free materials for diagnostic X-ray shielding: recent advances, challenges and future perspectives. *Hybrid Adv* 2023; 4: 100100. (26 pages).

Fabrication and Characterization for X-Ray Radiation Shielding of PVA/PVP: Bi_2O_3 Composites

Paitoon Boonsong

Regional Medical Sciences Center 1 Chiang Mai, Department of Medical Sciences, Mae Rim District, Chiang Mai 50180, Thailand

ABSTRACT This study aims to develop composites of polyvinyl alcohol/polyvinylpyrrolidone (PVA/PVP) with varying bismuth oxide (Bi_2O_3) content (0-50 wt%) as lead-free X-ray shielding materials. The X-ray attenuation performance of composites was investigated in terms of attenuation efficiency, linear attenuation coefficient, half-value layer, and tenth-value layer values. X-ray sources were operated at tube potentials of $^{(M)}28$ kV_p for the mammographic X-ray machine, $^{(I)}60$ kV_p for the intraoral X-ray machine, and $^{(G)}70$ and $^{(G)}80$ kV_p for the general diagnostic X-ray machines. Additionally, the theoretical values of mass attenuation coefficients were also investigated using the WinXCom program at energies ranging from 1 keV to 200 keV. The results demonstrated that the ability of the prepared composites to attenuate the initial X-ray beam was increased with the increase of the Bi_2O_3 amount. The 50 wt% PVA/PVP and 50 wt% of Bi_2O_3 composite with a thickness of approximately 0.49 mm exhibited the best X-ray attenuation efficiencies, reaching 97.14, 74.49, 57.01, and 52.01% at $^{(M)}28$, $^{(I)}61$, $^{(G)}70$, and $^{(G)}80$ kV_p, respectively. These findings suggest that the fabricated PVA/PVP: Bi_2O_3 composites, particularly those with high Bi_2O_3 content, are promising candidates for X-ray shielding in medical applications.

Keywords: X-ray shielding material, Polyvinyl alcohol/polyvinylpyrrolidone polymer, Bismuth oxide

การทดสอบความคงตัวของตัวอย่างทดสอบ ความช้ำนาญในอาหารทางจุลชีววิทยา ภายใต้สภาวะจำลองการขนส่งและอุณหภูมิห้อง

อัจฉรา อยู่คง กมลวรรณ กันแต่ง และ สุตารัตน์ ศรีน้อยเมือง

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความคงตัว (stability) ของตัวอย่างทดสอบความช้ำนาญในอาหารทางจุลชีววิทยา ภายใต้สภาวะจำลองการขนส่งและอุณหภูมิ โดยใช้ตัวอย่างทดสอบความช้ำนาญที่เตรียมขึ้นเพื่อส่งให้ห้องปฏิบัติการสมาชิกปีงบประมาณ พ.ศ. 2567 ได้ทำการทดสอบโดยเก็บรักษาและขนส่งตัวอย่างภายใต้สภาวะต่างๆ กัน ได้แก่ ตัวอย่างชุดที่ 1 วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 4 วัน เพื่อเร่งการเสื่อมสภาพของตัวอย่างที่อุณหภูมิสูงกว่าการขนส่งแบบแช่เย็น ตัวอย่างชุดที่ 2 จำลองการขนส่งโดยเก็บตัวอย่างทดสอบที่อุณหภูมิแช่เย็น 2-8°C เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 1 วัน ตัวอย่างชุดที่ 3 คือ ตัวอย่างที่เก็บแช่เย็น 2-8°C จนถึงวันสุดท้ายที่กำหนดให้สมาชิกทดสอบ ผลการทดสอบตัวอย่างเชิงคุณภาพ *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* และ *Salmonella* spp. จากตัวอย่างทั้ง 3 ชุดพบว่ามีความคงตัวตลอดอายุการเก็บรักษา ส่วนผลทดสอบตัวอย่างเชิงปริมาณ Coliforms และ *Escherichia coli* ซึ่ง $0.3\sigma_{pt}$ เท่ากับ 0.129 โดยตัวอย่างชุดที่ 1 มีค่า 1.569 มากกว่า $0.3\sigma_{pt}$ แสดงว่าตัวอย่างไม่มีความคงตัว ชุดที่ 2 และ 3 มีค่า 0.121 และ 0.087 ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่า $0.3\sigma_{pt}$ แสดงว่ายังมีความคงตัว และ *Staphylococcus aureus* $0.3\sigma_{pt}$ เท่ากับ 0.105 พบว่าชุดที่ 1 และ 2 มีค่า 1.087 และ 1.090 ตามลำดับ ซึ่งมากกว่า $0.3\sigma_{pt}$ แสดงถึงความคงตัวของตัวอย่างลดลง อย่างไรก็ตามตัวอย่างชุดที่ 3 ที่เก็บในสภาวะแช่เย็น 2-8°C จนถึงการตรวจวิเคราะห์ มีค่า 0.073 น้อยกว่า $0.3\sigma_{pt}$ แสดงว่าสภาวะแช่เย็นช่วยรักษาความคงตัวของตัวอย่างดีกว่าอุณหภูมิห้อง ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นความสำคัญของการควบคุมอุณหภูมิในการขนส่งและเก็บรักษาตัวอย่างทดสอบความช้ำนาญ

คำสำคัญ: ความคงตัวของตัวอย่างทดสอบความช้ำนาญในอาหาร, การทดสอบความช้ำนาญทางจุลชีววิทยา, อุณหภูมิ และตัวอย่างทดสอบความช้ำนาญ

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

Received: 4 July 2025

Revised: 18 September 2025

Accepted: 19 September 2025

บทนำ

การทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing; PT) หมายถึง กระบวนการประเมินสมรรถนะของห้องปฏิบัติการโดยการเปรียบเทียบผลการทดสอบหรือผลการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการนั้นกับห้องปฏิบัติการอื่น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความถูกต้อง ความแม่นยำ และความสามารถในการดำเนินการทดสอบของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานที่กำหนด โดยผู้ดำเนินการแผนทดสอบความชำนาญ (PT Provider; PTP) จะทำการเตรียมตัวอย่างทดสอบ จัดส่งตัวอย่างที่แบ่งมาจากตัวอย่างเดียวกันไปยังห้องปฏิบัติการสมาชิกในช่วงเวลาเดียวกัน เพื่อให้สมาชิกตรวจวิเคราะห์และส่งผลภายในระยะเวลาที่กำหนด โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการให้มีประสิทธิภาพตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2017⁽¹⁾

ในการดำเนินโครงการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการ การจัดเตรียมตัวอย่างทดสอบที่มีคุณภาพเป็นขั้นตอนสำคัญที่ส่งผลต่อความน่าเชื่อถือของผลการประเมินประสิทธิภาพของห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมโครงการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งค่าทางสถิติที่มีความสำคัญแสดงถึงการควบคุมคุณภาพ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการประเมินความสามารถ (Standard Deviation of Proficiency Assessment; SDPA) และค่าความไม่แน่นอน (Uncertainty) ในตัวอย่างทดสอบความชำนาญจะต้องมีลักษณะที่เป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) และมีความคงตัว (stability) ตลอดระยะเวลาที่เกี่ยวข้อง ตั้งแต่การเตรียมตัวอย่าง การเก็บรักษา การขนส่ง จนถึงขั้นตอนการทดสอบโดยสมาชิก ความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างช่วยให้มั่นใจได้ว่าทุกห้องปฏิบัติการได้รับตัวอย่างที่มีลักษณะและคุณสมบัติทางการวิเคราะห์เหมือนกัน สามารถนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกันอย่างยุติธรรม ขณะที่ความคงตัวของตัวอย่างจะช่วยรับประกันว่าคุณสมบัติที่ต้องการทดสอบยังคงอยู่ครบถ้วนตลอดกระบวนการ ทั้งนี้เพื่อป้องกันผลกระทบจากการเสื่อมสภาพของตัวอย่างซึ่งอาจนำไปสู่ผลการทดสอบที่คลาดเคลื่อน นอกจากนี้การจัดส่งตัวอย่างไปยังผู้เข้าร่วมยังเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ต้องควบคุมอย่างเหมาะสม โดยเฉพาะกรณีตัวอย่างที่มีความไว

ต่ออุณหภูมิหรือระยะเวลา การควบคุมสภาวะแวดล้อมระหว่างขนส่งและการติดตามสถานะตัวอย่างจึงมีความสำคัญต่อการรักษาคุณภาพของตัวอย่างทดสอบจนถึงปลายทาง

ห้องปฏิบัติการสมาชิกที่เข้าร่วมในโครงการทดสอบความชำนาญมักมีคำถามว่า สภาพการขนส่ง โดยเฉพาะระยะเวลาและอุณหภูมิ ส่งผลกระทบต่อตัวอย่างทดสอบหรือไม่ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ของตัวอย่างทดสอบความชำนาญในอาหารทางจุลชีววิทยาในสภาวะขนส่งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น ระยะเวลา และสภาพแวดล้อมในการขนส่ง ซึ่งอาจส่งผลให้จุลินทรีย์เพิ่มหรือลดจำนวนหรือแม้แต่ตายหมดได้ ด้วยเหตุนี้จึงเป็นความท้าทายที่ผู้ดำเนินการแผนทดสอบความชำนาญจะต้องควบคุมสภาวะการขนส่งให้เหมาะสม เพื่อสร้างความมั่นใจในตัวอย่างทดสอบที่จัดส่งให้สมาชิกว่ามีความคงตัว เพื่อให้สอดคล้องกับระบบคุณภาพ ISO/IEC 17043:2023⁽²⁾ ตามข้อ 7.4.4 ระบุว่าผู้จัดโปรแกรมการทดสอบความชำนาญต้องมั่นใจว่า ตัวอย่างทดสอบ (PT items) มีความคงตัวตลอดระยะเวลาการจัดเก็บ การขนส่ง และระยะเวลาทั้งหมดของรอบการทดสอบความชำนาญ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาสภาวะการขนส่งที่มีผลต่อความคงตัวของตัวอย่างทดสอบความชำนาญด้านการตรวจวิเคราะห์ห้อาหารทางจุลชีววิทยา โดยจำลองอุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน และนำผลที่ได้มาประเมินผลการทดสอบความคงตัวเพื่อนำไปใช้คัดเลือกรูปแบบการขนส่งที่เหมาะสมต่อไป

วัสดุและวิธีการ

เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน

เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน *Escherichia coli* (DMST 24373), *Listeria monocytogenes* (DMST 17303), *Staphylococcus aureus* (DMST 8013), *Clostridium perfringens* (DMST 16637), *Salmonella Rissen* (DMST 17365), *Staphylococcus epidermidis* (DMST 15505), *Bacillus subtilis* (DMST 15896) และ *Enterobacter aerogenes* (DMST 8841) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์

การแพทย์ เก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -80°C (DW-86L 728D, Haier, China) อุณหภูมิต่ำกว่า -70°C

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Brain heart infusion broth (BHI) (Oxoid, England), Tryptic Soy Agar (TSA) (Scharlau, Spain), Buffered Peptone Water (BPW) (Scharlau, Spain), Lauryl sulphate tryptose broth (LST) (Oxoid, England) 2% brilliant green lactose bile broth (2% BGLB) (Difco, France), EC broth (Difco, France), Levine eosin methylene blue (L-EMB agar)(Scharlau, Spain), Tryptone broth (Gibco, USA), methyl red-Voges Proskauer broth (MR-VP) (Merck, Germany), Baird-Parker (BP agar) (Scharlau, Spain), Coagulase rabbit plasma with EDTA (BBL, USA) Rappaport-Vassiliadis medium with soya (RVS broth)(Merck, Germany), Muller-Kauffmann tetrathionate novobiocin broth (MKTTn broth)(Merck, Germany), Xylose lysine deoxycholate agar (XLD agar) (Scharlau, Spain), Hektoen enteric agar (HE agar) (Oxoid, England), Bismuth sulphite agar (BS agar) (Oxoid, England), Nutrient agar (NA) (Oxoid, England), Triple sugar iron agar (TSI agar) (Oxoid, England), Motility indole lysine (MIL) (Difco, France), Urea agar (Difco, France) Fraser broth agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA) (Scharlau, Spain), Oxford agar (OXA) (Oxoid, England), Blood agar (Oxoid, England), Carbohydrate utilization broth L-rhamnose and D-xylose agar (CDH, india), Yeast extract agar (TSYEA) (Scharlau, Spain) และ Voges-Proskauer (VP medium) (Scharlau, Spain)

น้ำยาและสารเคมี

Gram stain reagents (BIOTECH, Biotech reagent Co., Ltd., Thailand), Kovacs' reagent

(Scharlau, Spain) และสารละลายสำหรับเจือจาง (diluent) 0.1% peptone water (Oxoid, England)

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilizer) (EPSILON 2-10D LSCplus, Martin Christ, Germany) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (GE L600, Getinge getting group, Sweden) เครื่องนับโคโลนี (3328, Leica, USA), ตู้บเพาะเชื้อ $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ (MIR 522, SANYO, Japan), ตู้บเพาะเชื้อ $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ (MIR 252, SANYO, Japan) ตู้บเพาะเชื้อ $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ (MIR 553, SANYO, Japan), กล้องจุลทรรศน์แบบสองตา (Leica, Germany), อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ $41.5\pm 1^{\circ}\text{C}$ (MEMMERT, Germany), อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ $47\pm 2^{\circ}\text{C}$ (MEMMERT, Germany), เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 0.01-0.1 กรัม (BP2100, Sartorius, Germany), เครื่องผสม vortex mixer (VX100, LABNET, USA) และเครื่องให้ความร้อนพร้อมกวนด้วยแม่เหล็ก (Stuart, USA)

การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

การเตรียมเชื้อสำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา โดยนำเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานมาเตรียมเป็นเชื้อสำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างแต่ละรอบการทดสอบ โดยทวนสอบคุณสมบัติของเชื้อมาตรฐานควบคุมไปด้วยทุกครั้งว่า เป็นจุลินทรีย์ที่ถูกต้องตรงตามชนิดที่ต้องการ ยังมีชีวิตและมีความบริสุทธิ์⁽³⁾ ดังนี้ เชื้อชนิด Coliforms, *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* และ เชื้อจุลินทรีย์แข่งขัน⁽⁴⁾ นำเม็ด bead มากิ่งและ streak บน TSA plate บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เชื้อชนิด clostridium⁽⁵⁾ ทำการ streak บน TSA plate หรือ TSC-EY บ่มที่อุณหภูมิ 35°C บ่มที่สภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้น เชื้อโคโลนีเดี่ยวนำไปตรวจสอบลักษณะเฉพาะหรือรูปร่าง และคุณสมบัติทางชีวเคมี กรณีที่เชื้อมีคุณสมบัติผ่านนำไปใช้งานได้ เลือกโคโลนีเดี่ยวเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว TSB หรือ BHI บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และเชื้อ

กลุ่ม clostridium เชียลง BHI (ที่เตรียมใหม่ ๆ หรือต้มโล่อากาศ) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C บ่มที่สภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำเชื้อ working culture ที่ได้เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8°C เพื่อใช้ในการเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนานู

การเตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนานู

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ตัวอย่างเชิงคุณภาพ (qualitative test) เตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนานูเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชุด โดยเติมเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย (target microorganisms) ให้เหลือรอดปริมาณน้อย ๆ 10 ถึง 10^2 cfu⁽³⁾ ต่อหน่วยทดสอบ และเติมจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายหรือจุลินทรีย์แข่งขัน (non target หรือ competitive microorganisms) ให้เหลือรอดในปริมาณมากกว่าจุลินทรีย์เป้าหมายอย่างน้อย 100 เท่า⁽³⁾

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ตัวอย่างเชิงปริมาณ (quantitative test) เตรียมตัวอย่างทดสอบความชำนานู 1 ชุด โดยเติมจุลินทรีย์เป้าหมายให้เหลือรอดในปริมาณที่อยู่ในช่วงของการนับของแต่ละวิธี 10^2 ถึง 10^6 cfu ต่อกรัม⁽³⁾ และเติมจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เป้าหมายหรือจุลินทรีย์แข่งขัน ให้เหลือรอดใกล้เคียงตัวอย่างอาหารในธรรมชาติมากที่สุด และปริมาณมากกว่าจุลินทรีย์เป้าหมายอย่างน้อย 100 เท่า⁽³⁾ นำเชื้อจุลินทรีย์ผสมลงใน 10% skim milk (Oxoid, England) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 5 นาที และทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องกวนสารละลายแบบแม่เหล็กตลอดการแบ่งบรรจุใส่ในขวดแก้ว (vial) นำเข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งปิดฝาขวดด้วยจุกยางและฝอะลูมิเนียม ตัวอย่างที่เตรียมแล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8°C

การสุ่มตัวอย่าง

สุ่มตัวอย่างเพื่อทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว โดยใช้โปรแกรมในเว็บไซต์ <https://www.randomizer.org>⁽⁶⁾ เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่เหมาะสมและเป็นตัวแทนชุดตัวอย่างทั้งหมด

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity test)

ตัวอย่างทดสอบวิเคราะห์เชิงคุณภาพ สุ่มตัวอย่างมาตรฐานวิเคราะห์จำนวน 2 ชุด ชุดละ 10 ตัวอย่าง โดยทั้ง 2 ชุด ต้องมีผลการวิเคราะห์ตรงตามค่ากำหนดทั้ง 2 ตัวอย่าง

ตัวอย่างทดสอบวิเคราะห์เชิงปริมาณ นำตัวอย่างทดสอบมาตรฐานวิเคราะห์จำนวน 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาคำนวณทางสถิติโดยใช้ Cochran's test เพื่อเปรียบเทียบนัยสำคัญของความแตกต่างเพื่อทดสอบ Within sample variation แล้วทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันตาม ISO 13528:2022⁽⁷⁾ ค่ารวมค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างตัวอย่าง (s_b ; Between sample standard deviation) การทดสอบนี้เลือกใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation for proficiency assessment; σ_{pt}) ของการประเมินผลการทดสอบความชำนานู ตาม ISO 22117:2019⁽⁸⁾ ซึ่งรอบการทดสอบ Coliforms และ *E. coli* ปริมาณเป็น Most Probable Number/gram (MPN/g) มีค่า $0.43 \log_{10}$ MPN/g และรอบการทดสอบ *S. aureus* ปริมาณเป็น Colony Forming Unit/gram (cfu/g) มีค่า $0.35 \log_{10}$ cfu/g โดยค่า Within sample variation: Cochran_{cal} (ค่าสถิติที่คำนวณได้จากข้อมูลตัวอย่าง) ต้องมีค่าน้อยกว่า Cochran_{crit} (ค่าวิกฤติจากตาราง Cochran's test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ s_b ต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.3 ของค่า Standard deviation ของ Proficiency testing (PT) ($\leq 0.3\sigma_{pt}$) จึงจะสรุปได้ว่าตัวอย่างทดสอบมีความเป็นเนื้อเดียวกันเหมาะสมที่จะนำไปใช้

การทดสอบความคงตัว (Stability test)

ทดสอบความคงตัวในการขนส่ง (เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนานูที่จัดส่งให้กับห้องปฏิบัติการสมาชิกในปีงบประมาณ พ.ศ. 2567) โดยการนำตัวอย่างมาเก็บตามอุณหภูมิที่กำหนดไว้ในวันเดียวกันกับวันที่

ขนส่งมารับตัวอย่างเพื่อส่งให้กับสมาชิกในรอบนั้น โดยใช้วิธีวิเคราะห์ที่ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หมายเลขทะเบียน 4043/50 ดังนี้

รายการทดสอบ Coliforms (MPN/g) วันที่เริ่มทดสอบ 30 ตุลาคม พ.ศ. 2566 โดยวิธีวิเคราะห์ FDA BAM Online, 2020 (Chapter 4)⁽⁹⁾

รายการทดสอบ *E. coli* (MPN/g) วันที่เริ่มทดสอบ 30 ตุลาคม พ.ศ. 2566 โดยวิธีวิเคราะห์ FDA BAM Online, 2020 (Chapter 4)⁽⁹⁾

รายการทดสอบ *L. monocytogenes* (พบ/ไม่พบ/25 g) วันที่เริ่มทดสอบ 13 พฤศจิกายน พ.ศ. 2566 โดยวิธีวิเคราะห์ ISO/IEC 17025:2017⁽¹⁰⁾

รายการทดสอบ *S. aureus* (cfu/g) วันที่เริ่มทดสอบ 8 มกราคม พ.ศ. 2567 โดยวิธีวิเคราะห์ FDA BAM Online, 2016 (Chapter 12)⁽¹¹⁾

รายการทดสอบ *C. perfringens* (พบ/ไม่พบ/0.1 g) วันที่เริ่มทดสอบ 15 มกราคม พ.ศ. 2567 โดยวิธีวิเคราะห์ FDA BAM Online, 2001 (Chapter 16)⁽¹²⁾

รายการทดสอบ *Salmonella* spp. (พบ/ไม่พบ/25 g) วันที่เริ่มทดสอบ 18 มีนาคม พ.ศ. 2567 โดยวิธีวิเคราะห์ ISO 6579-1:2017/Amd.1, 2020⁽¹³⁾

สุ่มตัวอย่างที่เตรียมไว้ในแต่ละแผนทดสอบ เฉพาะตัวอย่างที่เต็มจุลินทรีย์เป้าหมาย แบ่งตัวอย่างเป็น 3 ชุด ชุดละ 5 ตัวอย่าง วางตัวอย่างทดสอบในสภาวะอุณหภูมิต่างๆ หลังจากครบตามเวลาที่กำหนด นำตัวอย่างทดสอบทั้ง 3 ชุด มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทดสอบเดียวกันกับการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (ตัวอย่างทดสอบเชิงปริมาณ ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ สำหรับตัวอย่างทดสอบเชิงคุณภาพ ตรวจตัวอย่างละ 1 ซ้ำ)

ตัวอย่างทดสอบชุดที่ 1 เก็บตัวอย่างทดสอบไว้ที่อุณหภูมิห้อง (34–37°C) เป็นเวลา 4 วัน เพื่อเร่งการเสื่อมสภาพที่อุณหภูมิสูงขึ้นจากการขนส่ง

ตัวอย่างทดสอบชุดที่ 2 จำลองการขนส่งโดยเก็บตัวอย่างทดสอบไว้ที่อุณหภูมิแช่เย็น 2–8°C เป็นเวลา 3 วัน

จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 1 วัน เพื่อจำลองระยะเวลาที่บริษัทขนส่งตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างอาจติดค้างอยู่ที่อุณหภูมิก่อนห้องก่อนถึงห้องปฏิบัติการสมาชิก

ตัวอย่างทดสอบชุดที่ 3 เก็บตัวอย่างทดสอบไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 2–8°C จนถึงวันหลังวันสุดท้ายที่กำหนดให้สมาชิกทดสอบในรอบนั้น ๆ

การประเมินผลการทดสอบความคงตัว

ตัวอย่างทดสอบเชิงคุณภาพที่เต็มจุลินทรีย์เป้าหมาย ต้องตรวจพบจุลินทรีย์เป้าหมายทั้ง 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างทดสอบเชิงปริมาณ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยจากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ($mean_{\text{homo}}$) ที่ดำเนินการวิเคราะห์ก่อนส่งตัวอย่างให้สมาชิก กับค่าเฉลี่ยผลวิเคราะห์ที่สภาวะทดสอบความคงตัว ($mean_{\text{sta}}$) ต่างกันทั้ง 3 ชุด ผลการทดสอบ $|mean_{\text{homo}} - mean_{\text{sta}}|$ น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.3 ของค่า Standard deviation⁽⁷⁾ ของ PT ($\leq 0.3 \sigma_{\text{pt}}$) จึงจะสรุปได้ว่าตัวอย่างมีความคงตัวที่เหมาะสม⁽⁷⁾

ผล

ผลการทดสอบความคงตัวและความเป็นเนื้อเดียวกันเชิงคุณภาพ

ผลการทดสอบเชิงคุณภาพ ตัวอย่าง *L. monocytogenes* (พบ/ไม่พบ/25 g) *C. perfringens* (พบ/ไม่พบ/0.1 g) และ *Salmonella* spp. (พบ/ไม่พบ/25 g) ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของแต่ละเชื้อเมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์จำนวน 2 ชุด ชุดละ 10 ตัวอย่าง พบว่าทั้ง 2 ชุด มีผลการวิเคราะห์ตรงตามค่ากำหนดทั้ง 2 ตัวอย่าง แสดงว่าตัวอย่างทดสอบมีความเป็นเนื้อเดียวกันที่เหมาะสม และผลการทดสอบความคงตัว ตัวอย่างทดสอบชุดที่ 1–3 (รหัสตัวอย่าง A, B และ C) ที่ออกแบบสภาวะการขนส่ง โดยจำลองอุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกันของทั้ง 3 เชื้อดังกล่าว ตรวจพบจุลินทรีย์เป้าหมายทั้ง 5 ตัวอย่าง แสดงว่าตัวอย่างมีความคงตัวในทุกสภาวะการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความคงตัวเชิงคุณภาพ *L. monocytogenes*, *C. perfringens* และ *Salmonella* spp.

<i>L. monocytogenes</i> , <i>C. perfringens</i> และ <i>Salmonella</i> spp.					
ตัวอย่างทดสอบชุดที่ 1		ตัวอย่างทดสอบชุดที่ 2		ตัวอย่างทดสอบชุดที่ 3	
รหัสตัวอย่าง	ผล	รหัสตัวอย่าง	ผล	รหัสตัวอย่าง	ผล
A1	พบ	B1	พบ	C1	พบ
A2	พบ	B2	พบ	C2	พบ
A3	พบ	B3	พบ	C3	พบ
A4	พบ	B4	พบ	C4	พบ
A5	พบ	B5	พบ	C5	พบ

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของ Coliforms และ *E. coli* เชิงปริมาณ

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันโดยทดสอบ Coliforms (MPN/g) และ *E. coli* (MPN/g) พบว่า Cochran's test (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) Within sample variation $Cochran_{cal} = 0.219$ น้อยกว่า $Cochran_{crit} = 0.602$ แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างตัวอย่าง (s_s ; Between sample standard deviation) คำนวณค่า s_s ตาม ISO 13528 Annex B $s_s = 0.000$ เมื่อค่า $\sigma_{pt} = 0.430^{(6)}$ $0.3 \sigma_{pt} = 0.129$ โดยมีค่า Between sample variation; s_s น้อยกว่า $0.3 \sigma_{pt}$ จึงมีความเป็นเนื้อเดียวกันที่เหมาะสม ดังแสดงในตารางที่ 2

ผลการทดสอบความคงตัวของแต่ละเชื้อตัวอย่างทดสอบชุดที่ 1-3 ที่ออกแบบสภาวะการขนส่งโดยจำลองอุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยจากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน กับค่าเฉลี่ยผลวิเคราะห์การทดสอบความคงตัวของ Coliforms และ *E. coli* พบว่าตัวอย่างทดสอบชุดที่ 1 เก็บตัวอย่างอย่างทดสอบไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน มีค่า $|mean_{homo} - mean_{sta}|$ มากกว่า $0.3 \sigma_{pt}$ ส่วนตัวอย่างทดสอบชุดที่ 2 เก็บตัวอย่างทดสอบไว้ที่อุณหภูมิแช่เย็น 2-8°C 3 วัน และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 1 วัน และตัวอย่างทดสอบชุดที่ 3 เก็บตัวอย่างทดสอบไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 2-8°C จนถึงวันหลังวันสุดท้ายที่กำหนดให้สมาชิกทดสอบ มีค่า $|mean_{homo} - mean_{sta}|$ น้อยกว่า $0.3 \sigma_{pt}$ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ของ Coliforms และ *E. coli* (MPN/g)

PT sample number	Coliforms และ <i>E. coli</i> (MPN/g)		Coliforms และ <i>E. coli</i> (log ₁₀ MPN/g)	
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 1	Replicate 2
102	24,000	46,000	4.380	4.663
244	24,000	9,300	4.380	3.968
105	24,000	24,000	4.380	4.380
160	9,300	24,000	3.968	4.380
150	24,000	46,000	4.380	4.663
199	46,000	24,000	4.663	4.380
193	24,000	24,000	4.380	4.380
145	9,300	24,000	3.968	4.380
184	16,000	46,000	4.204	4.663
114	24,000	24,000	4.380	4.380

$mean_{homo} = 4.366$

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความคงตัวเชิงปริมาณของ Coliforms และ *E.coli* (MPN/g)

Coliforms และ <i>E. coli</i>							
ทดสอบ ความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity test)		ตัวอย่างทดสอบ ชุดที่ 1		ตัวอย่างทดสอบ ชุดที่ 2		ตัวอย่างทดสอบ ชุดที่ 3	
Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2
4.380	4.663	2.968	2.968	4.380	4.322	4.380	4.663
4.380	3.968	2.875	2.875	4.380	4.380	3.968	4.176
4.380	4.380	2.633	2.633	4.380	4.380	3.968	4.380
3.968	4.380	2.633	2.633	3.968	3.968	4.322	4.380
4.380	4.663	2.875	2.875	4.322	3.968	4.176	4.380
4.663	4.380						
4.380	4.380						
3.968	4.380						
4.204	4.663						
4.380	4.380						
mean _{homo} = 4.366		mean _{homo} = 2.797		mean _{homo} = 4.245		mean _{sta} = 4.279	
mean _{homo} - mean _{sta}		4.366 - 2.797		4.366 - 4.245		4.366 - 4.279	
0.3 σ_{pt} เท่ากับ 0.129		= 1.569		= 0.121		= 0.087	

ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของ *S. aureus*

การทดสอบ *S. aureus* (cfu/g) การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน พบว่า Cochran's test (ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%) Within sample variation Cochran_{cal} = 0.616 น้อยกว่า Cochran_{crit} = 0.718 แสดงว่าข้อมูลไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างตัวอย่าง (s_s ; Between sample standard deviation) เมื่อกำหนดค่า s_s ตาม ISO 13528 Annex B ได้ $s_s = 0.002$ เมื่อค่า $0.3 = 0.350^{(8)}$ เพราะฉะนั้น $0.3 \sigma_{pt} = 0.105$ Between sample variation; s_s น้อยกว่า $0.3 \sigma_{pt}$ แสดงว่าตัวอย่างทดสอบมีความเป็นเนื้อเดียวกันที่เหมาะสม ดังแสดงในตารางที่ 4

ผลการทดสอบความคงตัวของตัวอย่างทดสอบชุดที่ 1-3 ที่ออกแบบสภาวะการขนส่งโดยจำลองอุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยจากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันกับค่าเฉลี่ยผลวิเคราะห์การทดสอบความคงตัว พบว่าตัวอย่างทดสอบชุดที่ 1 เก็บตัวอย่างทดสอบไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน และตัวอย่างทดสอบชุดที่ 2 เก็บตัวอย่างทดสอบไว้ที่อุณหภูมิแช่เย็น 2-8°C เป็นเวลา 3 วัน และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 1 วัน มีค่า |mean_{homo} - mean_{sta}| มากกว่า $0.3 \sigma_{pt}$ ส่วนตัวอย่างทดสอบชุดที่ 3 เก็บตัวอย่างทดสอบไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 2-8°C จนถึงวันหลังวันสุดท้ายที่กำหนดให้สมาชิกทดสอบ มีค่า |mean_{homo} - mean_{sta}| น้อยกว่า $0.3 \sigma_{pt}$ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของ *S. aureus* (cfu/g)

PT sample number	<i>S. aureus</i> (cfu/g)		<i>S. aureus</i> (log ₁₀ cfu/g)	
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 1	Replicate 2
143	180,000	170,000	5.255	5.230
152	160,000	180,000	5.204	5.255
141	170,000	190,000	5.230	5.279
136	160,000	180,000	5.204	5.255
148	320,000	180,000	5.505	5.255
140	180,000	180,000	5.255	5.255
130	180,000	200,000	5.255	5.301
101	190,000	200,000	5.279	5.301
155	260,000	180,000	5.415	5.255
108	180,000	160,000	5.255	5.204
mean _{homo} = 5.273				

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความคงตัวเชิงปริมาณ ของ *S. aureus* (cfu/g)

<i>S. aureus</i>							
ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity test)		ตัวอย่างทดสอบ ชุดที่ 1		ตัวอย่างทดสอบ ชุดที่ 2		ตัวอย่างทดสอบ ชุดที่ 3	
Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2
5.255	5.230	3.919	4.826	4.204	4.204	5.146	5.255
5.204	5.255	4.114	4.146	4.176	4.176	5.204	5.230
5.230	5.279	4.176	4.146	4.146	4.114	5.146	5.230
5.204	5.255	4.079	4.230	4.230	4.230	5.204	5.176
5.505	5.255	4.114	4.114	4.176	4.176	5.204	5.204
5.255	5.255						
5.255	5.301						
5.279	5.301						
5.415	5.255						
5.255	5.204						
mean _{homo} = 5.273		mean _{homo} = 4.186		mean _{homo} = 4.183		mean _{sta} = 5.200	
mean _{homo} - mean _{sta}		5.273-4.186		5.273-4.183		5.273-5.200	
0.3σ _{pt} เท่ากับ 0.105		= 1.087		=1.090		= 0.073	

วิจารณ์

จากตัวอย่างทดสอบความชำนาญเชิงคุณภาพที่เติมเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย *L. monocytogenes*, *C. perfringens* และ *Salmonella* spp. ในสภาวะต่างๆ พบว่าตัวอย่างที่เก็บในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน

ตัวอย่างที่เก็บในอุณหภูมิแช่เย็น เป็นเวลา 3 วัน และที่อุณหภูมิห้องอีก 1 วัน และตัวอย่างที่เก็บในอุณหภูมิแช่เย็นที่ทดสอบหลังสมาชิกทำการทดสอบแล้ว ผลการทดสอบพบว่า ตัวอย่างทั้งสามชุดยังตรวจพบจุลินทรีย์เป้าหมาย แสดงให้เห็นถึงความสามารถของเชื้อในการคงอยู่ภายใต้สภาวะเหล่านี้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา

ของ Ertürk A และคณะ⁽¹⁴⁾ และ Jasson V และคณะ⁽¹⁵⁾ ที่ระบุว่า *Salmonella* spp. และ *L. monocytogenes* สามารถคงอยู่ในอาหารที่แห้งหรือกึ่งแห้งได้นานหลายวัน ในอุณหภูมิห้อง โดยไม่สูญเสียความสามารถในการเจริญเติบโตเมื่อเข้าสู่สภาวะที่เหมาะสมอีกครั้ง ดังนั้นห้องปฏิบัติการสมาชิกที่ได้รับตัวอย่างทดสอบจึงสามารถมั่นใจได้ว่า ตัวอย่างทดสอบยังมีความคงตัวอยู่ตลอดจนถึงห้องปฏิบัติการสมาชิก แม้ว่าตัวอย่างจะติดค้างอยู่ภายนอกห้องก่อนถึงมือสมาชิก ส่วนตัวอย่างทดสอบความชำนาญเชิงปริมาณ พบว่าการจัดเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานานส่งผลให้ค่าที่วัดได้มีความเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับเกณฑ์ที่กำหนดไว้ ซึ่งแสดงถึงการสูญเสียความคงตัวของตัวอย่างในระดับที่มีนัยสำคัญ โดยเฉพาะในกรณีของจุลินทรีย์ Coliforms และ *E. coli* ที่มีความไวต่อสภาวะแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจนำไปสู่ความคลาดเคลื่อนของผลการวิเคราะห์เมื่อส่งตัวอย่างให้กับสมาชิก ในทางตรงกันข้ามตัวอย่างที่เก็บในอุณหภูมิที่ควบคุมได้ เช่น การแช่เย็นพบว่าสามารถคงสภาพของตัวอย่างได้ดี การวางไว้ที่อุณหภูมิห้องในระยะเวลาสั้นๆ ภายหลังจากการแช่เย็นไม่ส่งผลกระทบต่อความคงตัวอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการขนส่งที่อาจมีระยะเวลาการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสั้นๆ ยังสามารถรักษาคุณภาพของตัวอย่างได้ อยู่ในระดับที่เหมาะสม สำหรับการทดสอบเชื้อ *S. aureus* ผลการวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างทั้งที่เก็บในอุณหภูมิห้องและที่เก็บแช่เย็นแล้ว มีการสัมผัสกับอุณหภูมิห้องในช่วงระยะเวลาหนึ่ง มีแนวโน้มเกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจแสดงถึงความไวของเชื้อชนิดนี้ต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

แม้ว่าการแช่เย็นจะช่วยยืดอายุของความคงตัวได้บ้าง แต่ยังไม่เพียงพอที่จะป้องกันการลดลงของปริมาณเชื้อเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิระหว่างการจัดส่ง อย่างไรก็ตามเมื่อตัวอย่างถูกเก็บรักษาในสภาวะแช่เย็นอย่างต่อเนื่องและทำการทดสอบหลังสมาชิกวิเคราะห์ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสามารถรักษาความคงตัวได้ ซึ่งตอกย้ำความสำคัญของการควบคุมอุณหภูมิใน

ทุกขั้นตอน ตั้งแต่การเตรียมตัวอย่างไปจนถึงการจัดส่ง เพื่อให้แน่ใจว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ ผลการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการกำหนดแนวทางที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาและขนส่งตัวอย่างทดสอบความชำนาญ ทำให้มั่นใจในคุณภาพและความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ และเพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาตัวอย่างทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยา ให้มีความคงตัวในสภาวะต่างๆ ได้ดีขึ้น เพื่อนำไปใช้เป็นวัสดุอ้างอิง (reference material) หรือวัสดุอ้างอิงรับรอง (certified reference material) ต่อไป อีกทั้งผลการศึกษานี้เป็นฐานข้อมูลสำคัญที่ใช้ให้เห็นถึงศักยภาพของการออกแบบตัวอย่าง PT ที่ไม่ต้องการแช่เย็นในอนาคต โดยเฉพาะหากมีการนำแนวทางการเติมเชื้อจุลินทรีย์ร่วมกับการเติมสารช่วยคงตัว (stabilizer) หรือการปรับเทคนิคการเตรียมตัวอย่างมาใช้ร่วมกัน หากสามารถควบคุมความคงตัวของจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตัวอย่างที่พัฒนาอาจถูกใช้เป็น reference material สำหรับการทดสอบความชำนาญ และอาจขยายสู่การใช้งานในห้องปฏิบัติการทั่วไป เช่น ใช้เป็น positive control หรือ internal quality control ได้ด้วย ซึ่งจะช่วยในการลดต้นทุนในการที่ต้องเตรียมเชื้อใหม่ทุกครั้งหรือต้องซื้อเชื้อจุลินทรีย์ที่รู้ค่าจากต่างประเทศ

ทั้งนี้การวิจัยในอนาคตเกี่ยวกับการพัฒนาตัวอย่างทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยาให้มีความคงตัวในสภาวะต่างๆ เพื่อใช้เป็นวัสดุอ้างอิงหรือวัสดุอ้างอิงรับรองนั้น อาจเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัยทั้งด้านวิชาการ เทคนิค กฎหมาย และทรัพยากร การเติมสารช่วยคงตัว แม้อาจเพิ่มความคงตัวของเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่าง แต่ก็อาจมีผลต่อคุณสมบัติของจุลินทรีย์ เช่น การเจริญเติบโตหรือการตรวจพบที่เปลี่ยนแปลงไป⁽¹⁶⁾ ทำให้การนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการอาจเกิดความคลาดเคลื่อน อีกทั้งกระบวนการประเมินความคงตัวในระยะยาวตามเกณฑ์มาตรฐาน เช่น ISO 17034 จำเป็นต้องใช้เวลา ทรัพยากร และการควบคุมที่รัดกุม ซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดของการดำเนินงาน ณ ปัจจุบัน นอกจากนี้ข้อกำหนดด้านกฎหมายและความปลอดภัยทางชีวภาพในการจัดส่ง

หรือนำเข้าสู่ออกตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อเป็นอุปสรรคที่ต้องพิจารณาอย่างรอบคอบ โดยเฉพาะหากต้องการใช้ในระดับนานาชาติหรือในห้องปฏิบัติการที่มีข้อจำกัดทางเทคนิค เช่น การคืนสภาพเชื้อที่ต้องใช้ขั้นตอนเฉพาะ สุดท้ายแม้จะสามารถพัฒนาตัวอย่างที่มีความคงตัวในสถานะที่ไม่ต้องแช่เย็นได้ แต่การนำไปใช้เป็นวัสดุอ้างอิงหรือควบคุมคุณภาพภายในยังต้องพิจารณาความพร้อมของห้องปฏิบัติการ การฝึกอบรมผู้ใช้งาน และการสนับสนุนจากหน่วยงานกำกับดูแล เพื่อให้เกิดการยอมรับและใช้งานได้อย่างแพร่หลายและเชื่อถือได้

สรุป

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความคงตัวของตัวอย่างทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยาในอาหารภายใต้สภาวะจำลองการขนส่งและการเก็บที่อุณหภูมิห้อง การทดสอบความคงตัวเชิงคุณภาพสำหรับเชื้อ *L. monocytogenes*, *C. perfringens* และ *Salmonella* spp. แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างมีความคงตัวภายใต้สภาวะการทดสอบทั้งหมด แม้ปริมาณเชื้อในตัวอย่างอาจลดลงตามอุณหภูมิที่จัดเก็บแต่ยังคงสามารถตรวจพบได้ในการทดสอบความคงตัวเชิงปริมาณของเชื้อ Coliforms, *E. coli* และ *S. aureus* ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิแบบแช่เย็นตลอดอายุการเก็บรักษา พบว่าตัวอย่างมีความคงตัวลดลงหรือไม่มี ความคงตัว ทั้งนี้อาจพิจารณาจากค่าความเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อ (log CFU) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงหรือมากกว่า $0.3 \sigma_{pt}$ ซึ่งบ่งชี้ว่าปริมาณเชื้อมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการเลือกอุณหภูมิการเก็บรักษาที่เหมาะสม จึงเป็นปัจจัยสำคัญในการรักษาคุณภาพของตัวอย่าง เพื่อให้ผลการทดสอบมีความน่าเชื่อถือ การพัฒนาเพิ่มเติมอาจทำได้โดยการเติมเชื้อจุลินทรีย์ร่วมกับสารช่วยความคงตัวหรือปรับเทคนิคการเตรียมตัวอย่าง เพื่อให้สามารถควบคุมความคงตัวได้อย่างมีประสิทธิภาพ และนำไปสู่การผลิตวัสดุอ้างอิงที่ใช้เป็นตัวอย่างทดสอบความชำนาญ หรือควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ โดยไม่จำเป็นต้องพึ่งการแช่เย็นลดต้นทุน และเพิ่มความสะดวกในการใช้งาน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้การสนับสนุนในการจัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญทางอาหารด้านจุลชีววิทยา และขอขอบคุณ นายปรีชา จึงสมานกุล และนางสาวปิยมาศ แจ่มศรี ที่ให้คำปรึกษาในการวางแผนทดสอบความชำนาญ และงานวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: International Organization for Standardization; 2017.
2. ISO/IEC 17043:2023. Conformity assessment – General requirements for the competence of proficiency testing providers. 2nd ed. Geneva: International Organization for Standardization; 2023.
3. ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media. Geneva: International Organization for Standardization; 2014.
4. Boone DR, Garrity GM, Castenholz RW. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1, section 5. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 2001.
5. Garrity G, editor. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2, section 12-14. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 2001.
6. Research Randomizer. [online]. [cited 2023 Oct 30]. Available from: URL: <http://www.randomizer.org/form.htm>.

7. ISO 13528:2022. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva: International Organization for Standardization; 2022.
8. ISO 22117:2019. Microbiology of the food chain - Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva: International Organization for Standardization; 2019.
9. Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual. [online]. 2002; [cited 2022 Nov 1]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>.
10. ISO 11290-1:2017. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. - Part 1: Detection method. Geneva: International Organization for Standardization; 2017.
11. Chapter 12: Staphylococcus aureus. In: U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual. [Online]. Silver Spring (MD): FDA; 2016 [cited 2021 Jan 14]. Available from: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-staphylococcus-aureus>.
12. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, Chapter 16: *Clostridium perfringens*. [online]. 2001; [cited 2023 Oct 30]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-16-clostridium-perfringens>.
13. ISO 6579-1:2017/Amd.1:2020. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Part 1: Detection of *Salmonella* spp. Geneva: International Organization for Standardization; 2020.
14. Ertürk A, Ekdal A, Gürel M, Karakaya N, Guzel C, Gönenç E. Evaluating the impact of climate change on groundwater resources in a small Mediterranean watershed. *Sci Total Environ* 2014; 499: 437-47.
15. Jasson V, Jacxsens L, Luning P, Rajkovic A, Uyttendaele M. Alternative microbial methods: an overview and selection criteria. *Food Microbiol* 2009; 27(6): 710-30.
16. Martinez OV, Malinin TI. Effect of osmotic stabilizers on the radiometric detection of cell wall-damaged bacteria. *J Clin Microbiol* 1979; 10(5): 657-61.

Stability Testing of Food Microbiological Proficiency Testing Samples under Simulated Transportation and Room Temperature Conditions

Atchara Ukong, Kamonwan Kantaeng, and Sudarat Srinoimueang

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

ABSTRACT This study aimed to evaluate the stability of microbiological proficiency testing samples in food under simulated transport conditions and temperatures. The research was conducted using proficiency testing samples prepared for distribution to laboratory members for the fiscal year 2024. The samples were stored and transported under different conditions: Set 1, where samples were kept at room temperature for 4 days to accelerate degradation due to higher temperatures than normal cold-chain transport, Set 2, simulating transport where the samples were stored at refrigerated temperatures 2–8°C for 3 days and then left at room temperature for 1 day, and Set 3, where samples were kept at refrigerated temperatures 2–8°C until the final testing day set for members. Results from the qualitative testing of *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, and *Salmonella* spp. showed stability throughout the storage period. Quantitative test results for Coliforms and *Escherichia coli* with a threshold of $\leq 0.3\sigma_{pt}$ which equals ≤ 0.129 , it was found that the sample set 1 had a value of 1.569, which was greater than $0.3\sigma_{pt}$, indicating that the sample was not stable. Sample sets 2 and 3 had values of 0.121 and 0.087, respectively, which were less than $0.3\sigma_{pt}$, indicating these samples remained stable. For *Staphylococcus aureus*, with a threshold of $0.3\sigma_{pt}$ value of 0.105, the sample sets 1 and 2 had values of 1.087 and 1.090, respectively, which were greater than $0.3\sigma_{pt}$ indicating decreases in sample stability. However, sample set 3, which was stored under refrigerated conditions of 2–8 °C until analysis, had a value of 0.073, which was less than $0.3\sigma_{pt}$ demonstrating that refrigeration helped maintain sample stability better than room temperature conditions. This study highlights the importance of temperature control during the transportation and storage of proficiency testing samples to ensure the quality and accuracy of analytical results.

Keywords: Stability of food proficiency testing samples, Microbiological proficiency testing, Temperature

ภาวะท้องเสียเฉียบพลันและเชื้อก่อโรคระบบทางเดินอาหารในผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง โรงพยาบาลรามธิบดี

ตรีวัฒน์ วัฒนะโชคชัย กิ่งกาญจน์ รัชชมนิ พิเชฐ ยุทธนาการวิกรม และ เอกวัฒน์ ผสมทรัพย์
ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

บทคัดย่อ เชื้อก่อโรคระบบทางเดินอาหารเป็นสาเหตุสำคัญของการเจ็บป่วยและเสียชีวิตทั่วโลก โดยเฉพาะโรคอุจจาระร่วงแบบเฉียบพลันซึ่งเป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุขในประเทศไทย จากการวิเคราะห์ข้อมูลผลการตรวจหาเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงของห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามธิบดี ระหว่างวันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2558 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ. 2564 จำแนกตามเพศ อายุ ชนิดสิ่งส่งตรวจ และช่วงการระบาดของโรคโควิด 19 จากผู้ป่วยที่ส่งตรวจ จำนวน 1,496 ราย ตรวจพบเชื้อก่อโรคระบบทางเดินอาหาร ร้อยละ 29.41 โดยมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และปรสิต ร้อยละ 48.41, 41.36 และ 2.27 ตามลำดับ เชื้อที่พบมากที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ *Salmonella* spp., *Norovirus*, *Rotavirus A*, *Clostridium difficile* และ *Escherichia coli* ร้อยละ 20.50, 18.96, 16.63, 12.38 และ 10.06 ช่วงก่อนการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 พบสัดส่วนผู้ป่วยสูงกว่าช่วงที่มีการแพร่ระบาดดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$, OR = 1.79, 95% CI: 1.38, 2.31) โดยตรวจพบเชื้อก่อโรคระบบทางเดินอาหารสูงสุดในกลุ่มเด็กวัยเรียน ร้อยละ 41.35 และมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อในกลุ่มเด็กวัยเรียน ($p = 0.001$, OR = 2.2, 95% CI = 1.39, 3.49) และเด็กวัยเตาะแตะ ($p = 0.022$, OR = 1.56, 95% CI = 1.07, 2.29) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินอาหารพบมากในเด็กวัยเรียนและเด็กวัยเตาะแตะ และการตรวจพบเชื้อโรคลดลงในช่วงการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 ซึ่งอาจสัมพันธ์กับมาตรการป้องกันโรคที่นำมาใช้ในช่วงเวลาดังกล่าว ผลการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ประกอบการวางแผนเพื่อเฝ้าระวังและควบคุมโรคระบบทางเดินอาหารในกลุ่มเสี่ยงได้ต่อไป

คำสำคัญ: เชื้อก่อโรคระบบทางเดินอาหาร, โรคอุจจาระร่วง, การติดเชื้อร่วมโรคระบบทางเดินอาหาร

Corresponding author E-mail: ekawat.pas@mahidol.ac.th

Received: 23 April 2025

Revised: 14 October 2025

Accepted: 14 October 2025

บทนำ

โรคอุจจาระร่วงเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตและการเจ็บป่วยในเด็กทั่วโลก โดยเฉพาะในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี ซึ่งมีอัตราการเสียชีวิตสูงเป็นอันดับสามประมาณ 443,832 รายต่อปี โดยเฉพาะในเด็กที่มีอายุระหว่าง 5-9 ปี เสียชีวิตประมาณ 50,851 ราย⁽¹⁾ ปัญหานี้พบได้บ่อยในประเทศกำลังพัฒนา⁽²⁾ เนื่องจากข้อจำกัดด้านระบบสุขาภิบาล แหล่งน้ำสะอาด และการเข้าถึงบริการทางการแพทย์ที่เพียงพอ⁽³⁾ โรคอุจจาระร่วงหรือที่เรียกว่าโรคท้องร่วงหรือท้องเสีย หมายถึง การถ่ายอุจจาระเหลวหรือเป็นน้ำตั้งแต่ 3 ครั้งขึ้นไป ภายใน 1 วัน⁽¹⁾ อาการท้องเสียแบบเฉียบพลันเป็นกลุ่มอาการที่ไม่สามารถแยกในทางคลินิกได้ด้วยสาเหตุที่เฉพาะเจาะจง⁽⁴⁾ เป็นภาวะที่พบได้บ่อยซึ่งมีความรุนแรงและมีสาเหตุที่แตกต่างกัน⁽⁵⁾ สาเหตุของโรคอุจจาระร่วงส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย (bacteria) ไวรัส (virus) และปรสิต (parasite) ผ่านอาหารหรือน้ำดื่มที่ปนเปื้อนและสามารถแพร่เชื้อจากคนสู่คนได้⁽¹⁾

เชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของอาการท้องเสียบ่อยที่สุดทั่วโลก ได้แก่ โนโรไวรัส (Norovirus) ซึ่งมีรายงานการระบาดในหลายประเทศทั้งทวีปเอเชียและยุโรป^(6,7) ส่วนโรตาไวรัส (Rotavirus) เป็นอีกสาเหตุสำคัญ โดยเฉพาะประเทศที่มีรายได้ต่ำถึงปานกลางรวมถึงประเทศไทย⁽⁸⁾ ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จากการศึกษาในเวียดนามและกัมพูชา พบว่าเชื้อ Norovirus Rotavirus A และ *Salmonella* spp. เป็นเชื้อที่ตรวจพบได้บ่อยในผู้ป่วยเด็กที่มีอาการท้องเสียเฉียบพลัน^(9,10) ในประเทศไทยจากการศึกษาที่โรงพยาบาลในภาคกลางพบว่า Norovirus และ Rotavirus A เป็นสาเหตุหลักของโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันในเด็กเช่นเดียวกัน⁽¹¹⁾ สำหรับประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น สหรัฐอเมริกา พบว่าเชื้อ non-typhoidal *Salmonella* spp. เป็นสาเหตุที่ทำให้มีการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลและเสียชีวิตมากที่สุด⁽¹²⁾

จากรายงานขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) และองค์การยูนิเซฟ (United Nations Children's Fund: UNICEF) พบว่ามีผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงทั่วโลกประมาณ 2,000

ล้านคนต่อปี⁽⁷⁾ โดยในประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของโรคอุจจาระร่วงแบบเฉียบพลันในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น จากข้อมูลการรักษาพยาบาลในแผนกผู้ป่วยใน (Inpatient Department: IPD) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2558-2562 มีอัตราเฉลี่ยอยู่ที่ 33.79 รายต่อประชากร 1,000 คนต่อปี⁽¹³⁾ แม้ว่าจะมีอัตราการเสียชีวิตลดลงอย่างมากในช่วงสามทศวรรษที่ผ่านมา แต่ภาระด้านการรักษาพยาบาลยังคงสูงถึง 400 ล้านบาทต่อปี⁽¹³⁾ ด้วยเหตุนี้การทำความเข้าใจลักษณะการตรวจพบเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารที่ตรวจพบในผู้ป่วย จึงมีความสำคัญต่อการวางแผนการเฝ้าระวังและป้องกันโรค อย่างไรก็ตามการศึกษาที่มีในประเทศไทยเกี่ยวกับเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยตรงยังไม่มากนัก การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบการกระจายของเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารในผู้ป่วยที่มีอาการอุจจาระร่วงเฉียบพลันซึ่งมารับการตรวจที่โรงพยาบาลรามาริบัติ โดยจำแนกตามปัจจัยเพศ อายุ ชนิดตัวอย่าง และในช่วงก่อนและระหว่างการแพร่ระบาดของโรค COVID-19 เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการวางแผนเพื่อเฝ้าระวังโรคในกลุ่มเสี่ยงต่อไป

วัสดุและวิธีการ

รูปแบบการศึกษา

เป็นการศึกษาข้อมูลย้อนหลังเชิงพรรณนา จากข้อมูลผลการตรวจ Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs) ของกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอาการอุจจาระร่วงเฉียบพลัน ที่นิยามว่ามีการถ่ายอุจจาระเหลวหรือเป็นน้ำตั้งแต่ 3 ครั้งขึ้นไป ภายใน 24 ชั่วโมง หรือมีการถ่ายเพียง 1-2 ครั้ง ร่วมกับมีเลือดปนในอุจจาระ ภายในระยะเวลาไม่เกิน 14 วันก่อนวันที่ส่งตรวจ และส่งตัวอย่างอุจจาระเพื่อตรวจหาเชื้อก่อโรคมายังห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาริบัติ มหาวิทยาลัยมหิดล ระหว่างวันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2558 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ. 2564 จำนวน 4,713 ราย แบ่งออกเป็น ผู้ป่วยนอก 1,927 ราย และผู้ป่วยใน 2,786 ราย ซึ่งข้อมูลของผู้ป่วยทุกแผนกที่ส่งตรวจวิเคราะห์ได้ทำการคัดข้อมูลที่ซ้ำซ้อนออก จึงเหลือข้อมูลที่นำมาใช้ในการศึกษา จำนวน 1,496 ราย

เชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารที่ศึกษา

เชื้อก่อโรคที่ตรวจด้วย NAATs ในการศึกษาครอบคลุมเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารที่สำคัญเรียงตามอักษร ได้แก่ Adenovirus 40/41, Astrovirus, *Campylobacter* spp., *Clostridium difficile*, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora* spp., *Escherichia coli*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, Norovirus, *Plesiomona* spp., Rotavirus A, *Salmonella* spp., Sapovirus, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae* และ *Yersinia enterocolitica*

การเตรียมข้อมูล

ได้รับความอนุเคราะห์ข้อมูลจากหน่วยชีวสารสนเทศทางห้องปฏิบัติการ โรงพยาบาลรามธิบดี ซึ่งข้อมูลที่น่ามาวิเคราะห์จะนับเพียงหนึ่งครั้งต่อผู้ป่วยหนึ่งรายต่อเหตุการณ์ป่วย โดยหากผู้ป่วยรายเดียวกันมีการส่งตรวจมากกว่าหนึ่งครั้งในช่วงเวลาห่างกันน้อยกว่า 14 วัน จะถือเป็นเหตุการณ์เดียวกันและนับเพียงครั้งแรกเท่านั้น เพื่อลดความซ้ำซ้อนของข้อมูล โดยทำการจำแนกข้อมูลเพศ ได้แก่ เพศชาย (male) เพศหญิง (female) กลุ่มอายุ ได้แก่ ทารกแรกเกิด อายุ น้อยกว่า 1 เดือน (newborn) เด็กทารก อายุมากกว่า 1 เดือน ถึง 1 ปี (infant) เด็กวัยเตาะแตะ อายุมากกว่า 1 ปี ถึง 3 ปี (toddler) เด็กก่อนวัยเรียน อายุมากกว่า 3 ปี ถึง 6 ปี (pre-schooler) เด็กวัยเรียน อายุมากกว่า 6 ปี ถึง 12 ปี (school-aged child) วัยรุ่น อายุมากกว่า 12 ปี ถึง 18 ปี (adolescent) ผู้ใหญ่ อายุมากกว่า 18 ปี ถึง 60 ปี (adult) และผู้สูงอายุที่มีอายุมากกว่า 60 ปีขึ้นไป (elderly) ข้อมูลส่งตรวจทางการแพทย์ (specimens) ได้แก่ ตัวอย่างที่ป้ายจากบริเวณทวารหนัก (rectal swab) และตัวอย่างที่ป้ายจากอุจจาระ (stool swab) จำแนกข้อมูลรายเดือนตั้งแต่เดือนมกราคม ถึง ธันวาคม ในปี พ.ศ. 2558-2564 ตามลำดับ และทำการจำแนกข้อมูลช่วงก่อนการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 (ระหว่างวันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2558 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ. 2562) และช่วงที่มีการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 (ระหว่างวันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2563 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ. 2564) โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel 2021

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้

ทำการศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลสถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistics) ได้แก่ จำนวน ร้อยละ และสัดส่วน ระหว่างข้อมูลของตัวแปรอิสระ (Independent) ได้แก่ เพศ กลุ่มอายุ สิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ เดือน และปี กับข้อมูลของตัวแปรตาม (Dependent) ได้แก่ สถานะเป็นโรคอุจจาระร่วงและไม่เป็นโรคอุจจาระร่วง วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตามด้วย chi-square test โดยใช้ Stata Version 18.0 SE (Stata Corp LLC, College Station, USA) และวิเคราะห์ระดับความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตามที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิเคราะห์ด้วย Binary Logistic Regression แบบ Multivariable Analysis โดยใช้ STATA Version 18.0, R version 4.3.2 (R Foundation for Statistical Computing, Austria) และ R Studio Version 2024.09.0-375 (Posit PBC, USA)

จริยธรรมการวิจัย

โครงการวิจัยตามบทความนี้ได้รับการอนุมัติและรับรองด้านจริยธรรมการวิจัยในคน จากคณะกรรมการจริยธรรมและการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ COA.MURA2022/609 เมื่อวันที่ 21 ตุลาคม พ.ศ. 2565

ผล

จากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันทั้งหมด 1,496 ราย มีผู้ติดเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหาร 440 ราย คิดเป็นร้อยละ 29.41 สามารถแบ่งการติดเชื้อออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ติดเชื้อแบคทีเรีย ร้อยละ 48.41 (213/440) กลุ่มที่ติดเชื้อปรสิต ร้อยละ 2.27 (10/440) กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัส ร้อยละ 41.36 (182/440) กลุ่มที่ติดเชื้อแบคทีเรียร่วมกับปรสิต ร้อยละ 1.82 (8/440) และกลุ่มที่ติดเชื้อแบคทีเรียร่วมกับไวรัส ร้อยละ 6.14 (27/440) โดยไม่พบเชื้อ *Plesiomonas shigelloides* ในผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงทั้งหมด

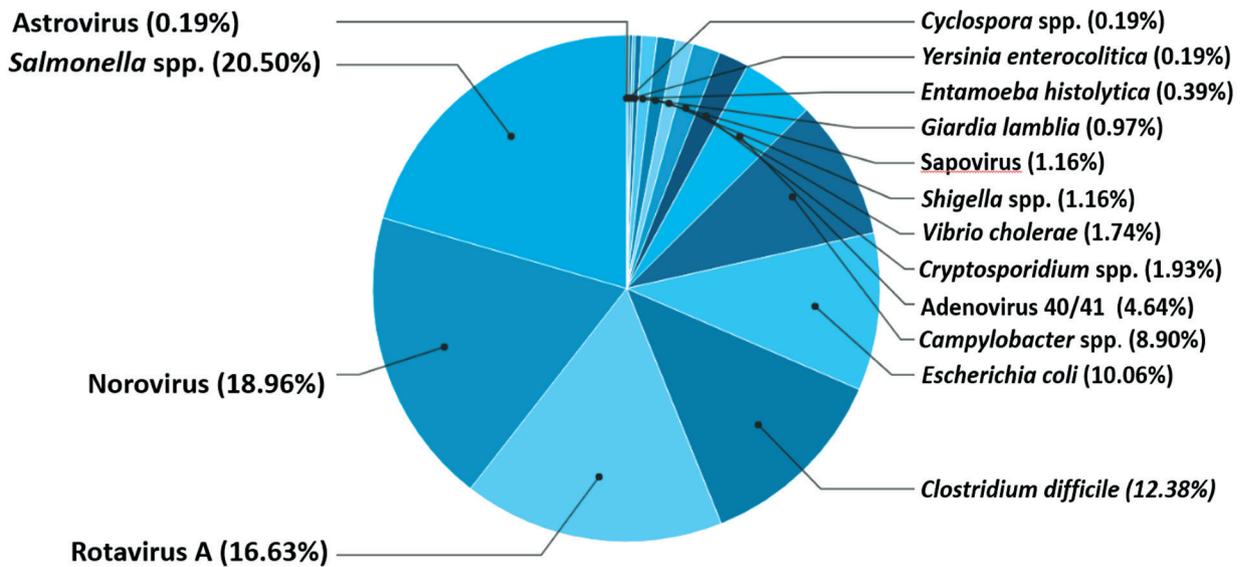
ในจำนวนผู้ติดเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหาร 440 ราย ตรวจพบเชื้อก่อโรคทั้งหมด 517 ครั้ง



(detections) ซึ่งมากกว่าจำนวนผู้ป่วย 440 ราย เนื่องจากผู้ป่วยบางรายติดเชื้อร่วมมากกว่า 1 ชนิด โดยเชื้อก่อโรคที่ตรวจพบในสัดส่วนที่สูงที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ *Salmonella* spp. ร้อยละ 20.50 (106/517),

Norovirus ร้อยละ 18.96 (98/517), Rotavirus A ร้อยละ 16.63 (86/517), *Clostridium difficile* ร้อยละ 12.38 (64/517) และ *Escherichia coli* ร้อยละ 10.06 (52/517) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1

Diarrhea-causing pathogens



Source: Virology Laboratory, Department of Pathology, Ramathibodi Hospital • Created with Datawrapper

ภาพที่ 1 สัดส่วนเป็นร้อยละของเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารที่พบในผู้ติดเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารเปรียบเทียบกับจำนวนที่ตรวจพบทั้งหมด 517 ครั้ง ณ โรงพยาบาลรามธิบดี ระหว่างวันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2558 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ. 2564

สัดส่วนเป็นร้อยละของการตรวจพบเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารรายปี

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลย้อนหลังตั้งแต่ปี พ.ศ. 2558-2564 พบว่าจำนวนและร้อยละการตรวจพบเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารมีความแตกต่างกันในแต่ละปี โดยในช่วงปี พ.ศ. 2558-2562 อัตราการตรวจพบในเพศชายและเพศหญิงค่อนข้างใกล้เคียงกันและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงปี พ.ศ. 2562 ภายหลังจากการระบาดของโรคโควิด 19 ระหว่างปี พ.ศ. 2563-2564 มีการเปลี่ยนแปลงชัดเจน โดยตรวจพบเชื้อในเพศชายและเพศหญิงลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงก่อนหน้า สำหรับการตรวจหาเชื้อก่อโรคในแต่ละกลุ่มอายุ พบว่ามีการตรวจพบเชื้อก่อโรคสูงบางกลุ่มในบางปี ได้แก่ กลุ่มเด็กทารกในปี พ.ศ. 2562 เด็กวัยเตาะแตะในปี

พ.ศ. 2561 และ 2562 เด็กวัยเรียนในปี พ.ศ. 2561 และ 2563 และวัยรุ่นในปี พ.ศ. 2561 นอกจากนี้ยังพบสัดส่วนในกลุ่มผู้สูงอายุที่เพิ่มขึ้นในบางปี ได้แก่ ปี พ.ศ. 2562

ในช่วงปี พ.ศ. 2558-2560 การเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อวินิจฉัยโรกระบบทางเดินอาหารส่วนใหญ่ใช้วิธีเก็บ rectal swab อย่างไรก็ตามตั้งแต่ปี พ.ศ. 2561 เป็นต้นมา มีการเปลี่ยนแปลงการเก็บสิ่งส่งตรวจโดย stool swab มากขึ้น ส่งผลให้ทั้งจำนวนและสัดส่วนของสิ่งส่งตรวจประเภทนี้เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ขณะที่การใช้ rectal swab ลดลง เหตุผลสำคัญ คือ การเก็บ stool swab ทำได้สะดวกและลดความไม่สบายตัวของผู้ป่วย การวิเคราะห์หาเชื้อก่อโรคจำแนกตามเดือน พบว่ามีการตรวจพบเชื้อก่อโรคมกในบางเดือน เช่น มกราคม ถึง เมษายน และ พฤศจิกายน ถึง ธันวาคม โดยการตรวจหาเชื้อก่อโรค

ในบางปีพบว่ามีการกระจายตัวตลอดทั้งปี สำหรับการศึกษในช่วงที่มีการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 พบว่ามีการตรวจพบเชื้อลดลงในหลายกลุ่มอายุและหลายเดือน เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงก่อนการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 ดังแสดงในตารางที่ 1

อัตราการตรวจพบเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารสูงสุดในปี พ.ศ. 2559 รองลงมาในปี พ.ศ. 2561 และ

ปี พ.ศ. 2562 ร้อยละ 37.50, 33.82 และ 33.65 ตามลำดับ อัตราการตรวจพบเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารน้อยที่สุดในปี พ.ศ. 2563 ร้อยละ 21.36 ซึ่งเป็นสัดส่วนของจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจทั้งหมดในช่วงเวลานั้น ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนและสัดส่วนเป็นร้อยละของการตรวจพบเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารรายปีเปรียบเทียบกับจำนวนสิ่งส่งตรวจของแต่ละกลุ่ม ระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 จำแนกตามปัจจัยที่ใช้ในการศึกษา

		Total samples (Positive counts, % Positive)						
Year		2558	2559	2560	2561	2562	2563	2564
	2558–2564	11	104	163	340	318	309	251
	1496	(3, 27.27%)	(39, 37.50%)	(54, 33.13%)	(115, 33.82%)	(107, 33.65%)	(66, 21.36%)	(56, 22.31%)
	(440, 29.41%)							
Sex	Male	4	57	96	167	167	170	136
	(797 cases)	(1, 0.13%)	(23, 2.89%)	(29, 3.64%)	(57, 7.15%)	(49, 6.15%)	(40, 5.02%)	(32, 4.02%)
	Female	7	47	67	173	151	139	115
	(699 cases)	(2, 0.29%)	(16, 2.29%)	(25, 3.58%)	(58, 8.3%)	(58, 8.3%)	(26, 3.72%)	(24, 3.43%)
Age	Newborn (< 1M)	-	-	-	2	3	-	-
	(5 cases)				(2, 40%)	(0, 0%)		
	Infant (> 1M–1Y)	-	14	16	93	106	67	60
	(356 cases)		(7, 1.97%)	(7, 1.97%)	(22, 6.18%)	(33, 9.27%)	(11, 3.09%)	(9, 2.53%)
	Toddler (> 1Y–3Y)	-	12	19	52	49	35	24
	(191 cases)		(8, 4.19%)	(10, 5.24%)	(21, 10.99%)	(18, 9.42%)	(6, 3.14%)	(4, 2.09%)
	Pre-schooler (> 3Y–6Y)	-	17	19	29	30	24	18
	(137 cases)		(5, 3.65%)	(7, 5.11%)	(8, 5.84%)	(6, 4.38%)	(6, 4.38%)	(6, 4.38%)
	School-aged child (> 6Y–12Y)	-	8	11	23	19	20	23
	(104 cases)		(3, 2.88%)	(6, 5.77%)	(13, 12.5%)	(6, 5.77%)	(9, 8.65%)	(6, 5.77%)
	Adolescent (> 12Y–18Y)	-	4	5	17	8	13	16
	(63 cases)		(4, 3.17%)	(4, 6.35%)	(8, 12.7%)	(3, 4.76%)	(3, 4.76%)	(2, 3.17%)
	Adult (> 18Y–60Y)	8	31	68	77	48	82	63
	(377 cases)	(3, 0.80%)	(11, 2.92%)	(12, 3.18%)	(24, 6.37%)	(15, 3.98%)	(18, 4.77%)	(13, 3.45%)
	Elderly (> 60Y)	3	18	25	47	55	68	47
	(263 cases)	(0, 0.00%)	(3, 1.14%)	(8, 3.04%)	(17, 6.46%)	(26, 9.89%)	(23, 4.94%)	(16, 6.08%)
Specimen	Rectal swab	11	44	93	35	-	-	-
	(183 cases)	(3, 1.64%)	(20, 10.93%)	(31, 16.94%)	(17, 9.29%)			
	Stool swab	-	60	70	305	318	309	251
	(1,313 cases)		(19, 1.45%)	(23, 1.75%)	(98, 7.46%)	(107, 8.15%)	(66, 5.03%)	(56, 4.27%)

ตารางที่ 1 จำนวนและสัดส่วนเป็นร้อยละของการตรวจพบเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารรายปีเปรียบเทียบกับจำนวนสิ่งส่งตรวจของแต่ละกลุ่ม ระหว่างปี พ.ศ. 2558–2564 จำแนกตามปัจจัยที่ใช้ในการศึกษา (ต่อ)

		Total samples (Positive counts, % Positive)						
		2558	2559	2560	2561	2562	2563	2564
Month	January	–	11	14	50	30	28	18
	(151 cases)		(7, 2.65%)	(2, 1.32%)	(28, 18.54%)	(8, 5.3%)	(9, 5.96%)	(4, 2.65%)
	February	–	11	12	37	28	31	21
	(140 cases)		(3, 2.14%)	(3, 2.14%)	(14, 10%)	(5, 3.57%)	(8, 5.71%)	(5, 3.57%)
	March	–	9	17	31	24	27	39
	(147 cases)		(4, 2.72%)	(4, 2.72%)	(9, 6.12%)	(8, 5.44%)	(3, 2.04%)	(9, 6.12%)
	April	–	8	9	34	20	25	15
	(111 cases)		(3, 2.7%)	(2, 1.8%)	(7, 6.31%)	(5, 4.5%)	(5, 4.5%)	(3, 2.7%)
	May	–	6	9	32	31	22	20
	(120 cases)		(3, 2.5%)	(3, 2.5%)	(6, 5%)	(8, 6.67%)	(4, 3.33%)	(4, 3.33%)
	June	1	2	31	23	20	21	20
	(118 cases)	(0, 0.00%)	(1, 0.85%)	(9, 7.63%)	(10, 8.47%)	(7, 5.93%)	(4, 3.39%)	(6, 5.08%)
July	–	12	10	19	21	29	13	
(104 cases)		(3, 2.88%)	(6, 5.77%)	(5, 4.81%)	(9, 8.65%)	(4, 3.85%)	(4, 3.85%)	
August	–	8	22	24	36	21	17	
(128 cases)		(1, 0.78%)	(7, 5.47%)	(10, 7.81%)	(15, 11.72%)	(5, 3.91%)	(3, 2.34%)	
September	1	10	9	27	35	39	20	
(141 cases)	(0, 0.00%)	(4, 2.84%)	(6, 4.26%)	(7, 4.96%)	(13, 9.22%)	(10, 7.09%)	(3, 2.13%)	
October	–	11	7	15	20	30	19	
(102 cases)		(3, 2.94%)	(2, 1.96%)	(6, 5.88%)	(10, 9.8%)	(6, 5.88%)	(2, 1.96%)	
November	2	6	10	16	30	21	22	
(107 cases)	(1, 0.93%)	(4, 3.74%)	(5, 4.67%)	(6, 5.61%)	(11, 10.28%)	(6, 5.61%)	(7, 6.54%)	
December	7	10	13	32	23	15	27	
(127 cases)	(2, 1.57%)	(6, 4.72%)	(5, 3.94%)	(7, 5.51%)	(18, 6.3%)	(2, 1.57%)	(6, 4.72%)	
COVID-19	Before	11	104	163	340	318	–	–
Pandemic	(936 cases)	(3, 0.32%)	(39, 4.17%)	(54, 5.77%)	(115, 12.29%)	(107, 11.43%)		
	During	–	–	–	–	–	309	251
	(560 cases)						(66, 11.79%)	(56, 10%)

หมายเหตุ: % = Percentage

เชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารในผู้ป่วยจำแนกตามเพศ อายุ ชนิดสิ่งส่งตรวจ แต่ละเดือน และระยะก่อนและระหว่างการระบาดของโรคโควิด 19 จากจำนวนผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันทั้งหมด 1,496 ราย

จากจำนวนผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันทั้งหมด 1,496 ราย อัตราการตรวจพบเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารในผู้ป่วยเพศหญิง พบว่าสูงกว่าเพศชายเล็กน้อย ในเพศชายและเพศหญิงพบผู้ติดเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหาร ร้อยละ 28.98 และ 29.90 ตามลำดับ อัตราการตรวจพบเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารพบสูงในกลุ่ม School-aged child, Newborn และ Toddler ร้อยละ 41.35, 40.00 และ 35.08 ตามลำดับ พบอัตราการตรวจพบเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหาร

น้อยที่สุดในกลุ่ม Infant ร้อยละ 25.00 ในสิ่งส่งตรวจพบเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารในตัวอย่าง rectal swab และ stool swab ร้อยละ 38.80 และ 28.10 ตามลำดับ พบอัตราการตรวจพบเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารสูงมากในแต่ละเดือนของปี พ.ศ. 2558–2564 รวมกัน ดังนี้ เดือนพฤศจิกายน มกราคม และสิงหาคม ร้อยละ 37.38, 36.42 และ 32.03 ตามลำดับ และพบเชื้อก่อโรคน้อยที่สุดในเดือนพฤษภาคม ร้อยละ 23.33 ในช่วงที่มีการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 พบว่ามีการตรวจพบเชื้อลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงก่อนการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารในผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันทั้งหมด 1,496 ราย จำแนกตามเพศ อายุ ชนิดสิ่งส่งตรวจ แต่ละเดือน และระยะก่อนและระหว่างการระบาดของโรคโควิด 19

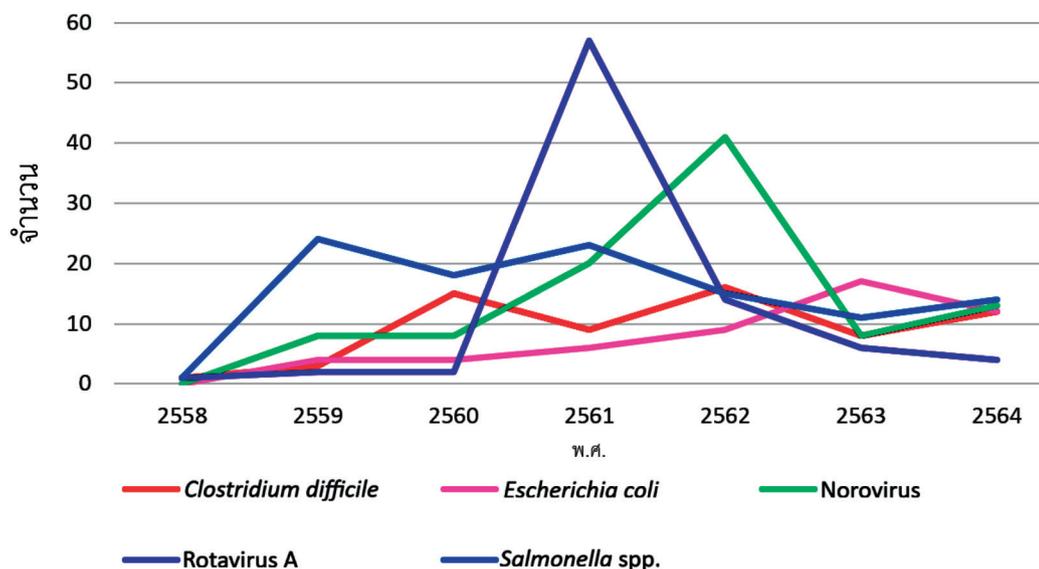
Factors	Number	Gastrointestinal Pathogen				p-value	
		P	(%)	N	(%)		
Sex	Male	797 (53.28%)	231	28.98	566	71.02	0.698
	Female	699 (46.72%)	209	29.90	490	70.10	
Age	Newborn	5 (0.33%)	2	40.00	3	60.00	0.011
	Infant	356 (23.80%)	89	25.00	267	75.00	
	Toddler	191 (12.77%)	67	35.08	124	64.92	
	Preschooler	137 (9.16%)	38	27.74	99	72.26	
	School-aged child	104 (6.95%)	43	41.35	61	58.65	
	Adolescent	63 (4.21%)	22	34.92	41	65.08	
	Adult	377 (25.20%)	96	25.46	281	74.54	
	Elderly	263 (17.58%)	83	31.56	180	68.44	
Specimen	Rectal swab	183 (12.23%)	71	38.80	112	61.20	0.003
	Stool swab	1,313 (87.77%)	369	28.10	944	71.90	
Month	January	151 (10.09%)	55	36.42	96	63.58	0.234
	February	140 (9.36%)	38	27.14	102	72.86	
	March	147 (9.83%)	37	25.17	110	74.83	
	April	111 (7.42%)	25	22.52	86	77.48	
	May	120 (8.02%)	28	23.33	92	76.67	
	June	118 (7.89%)	37	31.36	81	68.64	
	July	104 (6.95%)	31	29.81	73	70.19	
	August	128 (8.56%)	41	32.03	87	67.97	
	September	141 (9.43%)	43	30.50	98	69.50	
	October	102 (6.82%)	29	28.43	73	71.57	
	November	107 (7.15%)	40	37.38	67	62.62	
	December	127 (8.49%)	36	28.35	91	71.65	
COVID-19							< 0.001
Pandemic	Before	936 (62.57%)	318	33.97	618	66.03	
	During	560 (37.43%)	122	21.79	438	78.21	

หมายเหตุ: p-value = Probability value, % = Percentage, P = Positive และ N = Negative

การกระจายของเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงระหว่างปี พ.ศ. 2558-2564

การกระจายของเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงและจำนวนครั้งที่พบในแต่ละปีมีความผันแปร การตรวจพบเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วง 5 อันดับแรก ในระหว่างปี พ.ศ. 2558-2564 ได้แก่ *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, Norovirus, Rotavirus A และ *Salmonella* spp. ในปี พ.ศ. 2559 มีการตรวจพบเชื้อ

Salmonella spp. สูงที่สุด 24 ตัวอย่าง ขณะที่ปี พ.ศ. 2561 พบเชื้อ Rotavirus A สูง 57 ตัวอย่าง และปี พ.ศ. 2562 พบเชื้อ Norovirus สูงสุด 41 ตัวอย่าง เชื้อ *Clostridium difficile* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงปี พ.ศ. 2558-2562 ก่อนลดลงและเพิ่มอีกในปี พ.ศ. 2564 ส่วน *Escherichia coli* พบเพิ่มขึ้นชัดเจนในปี พ.ศ. 2563 จำนวน 17 ตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 จำนวนเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วง 5 อันดับแรกรายปี

การติดเชื้อก่อโรคร่วมระบบทางเดินอาหาร

ในจำนวนผู้ติดเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหาร 440 ราย พบผู้ติดเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหาร ชนิดเดียว ร้อยละ 84.32 (371/440) และผู้ติดเชื้อก่อโรคร่วมมากกว่า 1 ชนิด ร้อยละ 15.68 (69/440) สำหรับผู้ติดเชื้อก่อโรคร่วมมากกว่า 1 ชนิด แบ่งออกเป็น กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหาร 2 ชนิด ร้อยละ 13.86 (61/440) มีลักษณะการจับคู่ของเชื้อก่อโรค 26 รูปแบบ ในผู้ติดเชื้อ 61 ราย และกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารร่วม 3 ชนิด ร้อยละ 1.82 (8/440) มีลักษณะการจับคู่ของเชื้อก่อโรค 6 รูปแบบ ในผู้ติดเชื้อ 8 ราย ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

การติดเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป พบในผู้ป่วย 69 ราย โดยเป็นผู้ป่วยที่ติดเชื้อร่วมกัน 2 ชนิด มีจำนวน 61 ราย ร้อยละ 88.41 (61/69) และผู้ติดเชื้อร่วมกัน 3 ชนิด มีจำนวน 8 ราย ร้อยละ 11.59 (8/69) โดยเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารแบบ 2 ชนิด ที่พบมาก 5 อันดับแรก ได้แก่ Norovirus - Salmonella spp., Escherichia coli - Salmonella spp., Clostridium difficile - Salmonella spp., Adenovirus 40/41 - Salmonella spp. และ Campylobacter spp. - Salmonella spp. ร้อยละ 13.11 (8/61), 11.48 (7/61), 8.20 (5/61), 6.56 (4/61) และ 6.56 (4/61) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 สัดส่วนเป็นร้อยละชนิดของเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารในผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงร่วม 2 ชนิด จำนวน 61 ราย

Co-Infection (2 strains)	Number	(%)
Adenovirus 40/41, Escherichia coli	1	1.64
Adenovirus 40/41, Norovirus	1	1.64
Adenovirus 40/41, Rotavirus A	2	3.28
Adenovirus 40/41, Salmonella spp.	4	6.56
Clostridium difficile, Escherichia coli	2	3.28
Clostridium difficile, Giardia lamblia	2	3.28
Clostridium difficile, Norovirus	1	1.64
Clostridium difficile, Salmonella spp.	5	8.20
Campylobacter spp., Clostridium difficile	3	4.92

ตารางที่ 3 สัดส่วนเป็นร้อยละชนิดของเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารในผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงร่วม 2 ชนิด จำนวน 61 ราย (ต่อ)

Co-Infection (2 strains)	Number	(%)
<i>Campylobacter</i> spp., <i>Cryptosporidium</i> spp.	1	1.64
<i>Campylobacter</i> spp., <i>Escherichia coli</i>	1	1.64
<i>Campylobacter</i> spp., Norovirus	2	3.28
<i>Campylobacter</i> spp., <i>Salmonella</i> spp.	4	6.56
<i>Cryptosporidium</i> spp., <i>Escherichia coli</i>	1	1.64
<i>Cryptosporidium</i> spp., <i>Salmonella</i> spp.	2	3.28
<i>Cyclospora</i> spp., <i>Salmonella</i> spp.	1	1.64
<i>Escherichia coli</i> , Norovirus	2	3.28
<i>Escherichia coli</i> , Rotavirus A	2	3.28
<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> spp.	7	11.48
<i>Escherichia coli</i> , Sapovirus	1	1.64
<i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella</i> spp.	1	1.64
<i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Salmonella</i> spp.	1	1.64
Norovirus, Rotavirus A	3	4.92
Norovirus, <i>Salmonella</i> spp.	8	13.11
Rotavirus A, <i>Salmonella</i> spp.	1	1.64
<i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp.	2	3.28

หมายเหตุ: % = Percentage

ตารางที่ 4 สัดส่วนเป็นร้อยละชนิดของเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารในผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงร่วม 3 ชนิด จำนวน 8 ราย

Co-Infection (3 strains)	Number	(%)
<i>Campylobacter</i> spp., <i>Clostridium difficile</i> , <i>Salmonella</i> spp.	1	12.50
<i>Campylobacter</i> spp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio cholerae</i>	1	12.50
<i>Campylobacter</i> spp., Norovirus, <i>Salmonella</i> spp.	2	25.00
<i>Campylobacter</i> spp., Rotavirus A, <i>Salmonella</i> spp.	1	12.50
<i>Escherichia coli</i> , Norovirus, <i>Vibrio cholerae</i>	2	25.00
<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i>	1	12.50

หมายเหตุ: % = Percentage

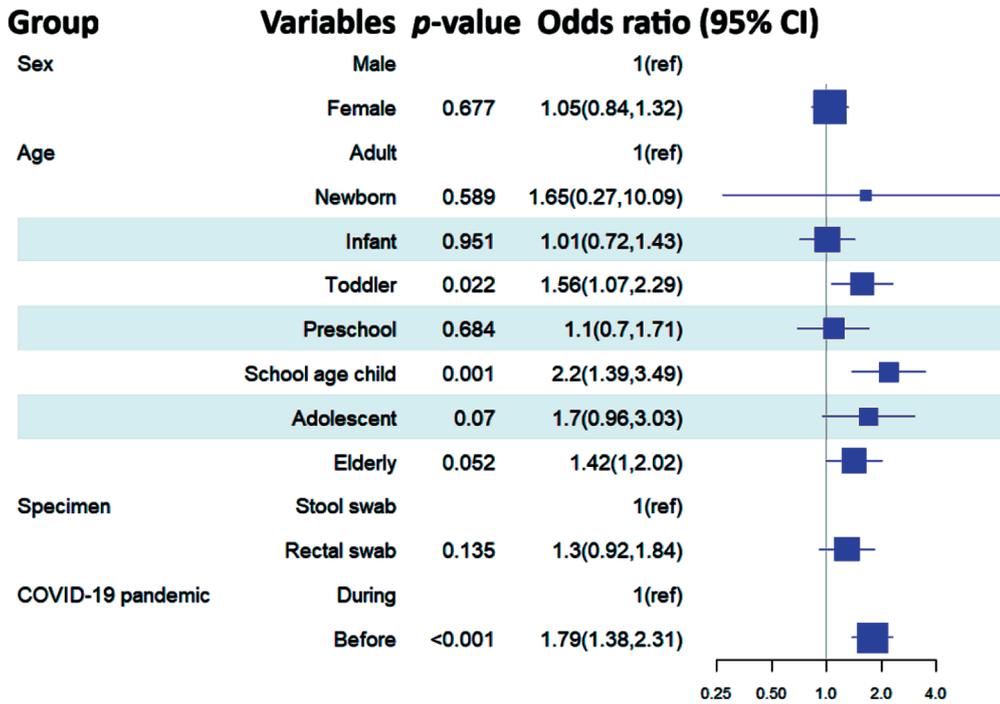
การวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วง จำแนกตาม เพศ อายุ ชนิดของสิ่งส่งตรวจ และช่วงเวลาการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19

การวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคอุจจาระร่วงแบบเฉียบพลันโดยจำแนกตาม เพศ อายุ ชนิดของสิ่งส่งตรวจ และช่วงเวลาการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 เมื่อพิจารณาตามกลุ่มอายุ พบว่ากลุ่มเด็กวัยเตาะแตะ

(Toddler) และเด็กวัยเรียน (School-aged child) มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.022$, OR = 1.56, 95% CI: 1.07, 2.29 และ $p = 0.001$, OR = 2.2, 95% CI: 1.39, 3.49) ในช่วงก่อนการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 (Before) เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงที่มีการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 (During) พบว่าก่อนการแพร่ระบาด

โรคดังกล่าวมีผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงแบบเฉียบพลันสูง
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$, OR = 1.79,
95% CI: 1.38, 2.31) ขณะที่ปัจจัยด้านเพศและชนิดของ

สิ่งส่งตรวจ ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
(ค่า $p > 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ปัจจัยจำแนกตาม เพศ อายุ ชนิดของสิ่งส่งตรวจ และช่วงเวลาการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 ต่อความเสี่ยงของการติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินอาหาร

วิจารณ์

จากการศึกษาข้อมูลโรคอุจจาระร่วงแบบ
เฉียบพลัน 1,496 ราย ของห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา
ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาล
รามาริบัติ ระหว่างปีพ.ศ. 2558-2564 พบว่ามีผู้ป่วยติดเชื้อ
ก่อโรคระบบทางเดินอาหารอายุต่ำกว่า 5 ปี ร้อยละ 28.57
ขณะที่ Ganguly E และคณะ⁽¹⁴⁾ ได้ศึกษาอัตรา
การตรวจพบเชื้อก่อโรคระบบทางเดินอาหารและปัจจัย
เสี่ยงของการเจ็บป่วยด้วยโรคท้องร่วงในเด็กที่มีอายุ
ต่ำกว่า 5 ปี ในอินเดีย พบอัตราการเกิดโรคท้องร่วง
ระหว่างปี พ.ศ. 2545-2556 อยู่ที่ร้อยละ 21.70 (95% CI:
11.24-34.46) ในการศึกษาที่พบการติดเชื้อแบคทีเรีย
สูงที่สุด รองลงมาเป็นเชื้อไวรัสและปรสิต เชื้อก่อโรคที่
พบมากที่สุดในผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง คือ *Salmonella*
spp. และ Norovirus สอดคล้องกับการศึกษาของ

Sell J และ Dolan B⁽¹⁵⁾ ที่พบว่าเชื้อ *Salmonella* spp.
เป็นสาเหตุของการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลและ
การเสียชีวิตมากที่สุดในสหรัฐอเมริกา ขณะที่ใน
ประเทศไทย พบว่าในกลุ่มผู้ป่วย Traveler's diarrhea
มีสาเหตุการติดเชื้อก่อโรคส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรีย
เช่น *Escherichia coli* (ETEC) ที่เป็น enterotoxigenic
ร้อยละ 80 รองลงมา คือ *Campylobacter jejuni*
ร้อยละ 33.3 และ *Salmonella* spp. ร้อยละ 40⁽¹⁶⁾
มีรายงานการระบาดของเชื้อ Norovirus ระหว่างเดือน
ธันวาคม พ.ศ. 2564 ถึง มกราคม พ.ศ. 2565 ในจังหวัด
จันทบุรี ซึ่งตรวจพบเชื้อก่อโรคในผู้ป่วยและผักสด
แสดงให้เห็นว่า Norovirus มีบทบาทสำคัญในโรค
อุจจาระร่วงเช่นเดียวกัน^(17,18) ในอดีตเชื้อ Rotavirus
เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงที่พบได้บ่อยที่สุดใน
เด็กเล็กทั่วโลก อย่างไรก็ตามการป้องกันโรคด้วย

การรับวัคซีน Rotavirus ช่วยลดอุบัติการณ์ของโรคอุจจาระร่วงลงได้⁽⁵⁾ ในการศึกษาครั้งนี้พบผู้ป่วยติดเชื้อ Rotavirus อยู่ในอันดับสามของเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วง ซึ่งต่างจากรายงานการศึกษาล่าสุดในสาธารณรัฐประชาชนจีนที่พบความชุกของ Rotavirus ในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี ร้อยละ 24.7 และลดลงหลังการให้วัคซีน⁽¹⁹⁾ รวมทั้งต่างจากการศึกษาในสหราชอาณาจักร พบว่าวัคซีน Rotavirus ช่วยลดการแพร่เชื้อได้⁽²⁰⁾ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าอัตราการตรวจพบเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารในผู้ป่วยเพศชายสูงกว่าเพศหญิงเล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาจากสาธารณรัฐประชาชนจีนของ Huang Z และคณะ⁽²¹⁾ Zhao YF และคณะ⁽²²⁾ และ Gao Q และคณะ⁽²³⁾ ที่รายงานแนวโน้มอุบัติการณ์ของผู้ป่วยเพศชายสูงกว่าผู้ป่วยเพศหญิง อย่างไรก็ตาม การศึกษาในประเทศไทย เช่น การวิเคราะห์ข้อมูลจากฐานข้อมูลหลักประกันสุขภาพถ้วนหน้า (Universal Health Coverage) ในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางเพศ⁽¹³⁾ จากการศึกษาโรคอุจจาระร่วงแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตรวจพบเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงที่สูงขึ้นในหลายทศวรรษ โดยเฉพาะในกลุ่ม toddler พบว่ามีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อก่อโรกระบบทางเดินอาหารอย่างมีนัยสำคัญสูงที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Pickering LK⁽²⁴⁾ ที่ทำการศึกษารอคูจจาระร่วงที่ติดเชื้อแบบเฉียบพลันตั้งแต่ปี พ.ศ. 2529 ในสถานรับเลี้ยงเด็ก

การศึกษานี้พบว่าในประเทศไทยมีการตรวจพบเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงสูงมากในช่วงฤดูหนาว โดยเฉพาะในเดือนพฤศจิกายน และ มกราคม รวมถึงช่วงฤดูฝนในเดือนสิงหาคม ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Ahmed SF และคณะ⁽²⁵⁾ ที่รายงานว่าการตรวจพบเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงในภูมิภาคของแคชเมียร์ ประเทศอินเดียสูงสุดในช่วงฤดูร้อน (16.5%) ความแตกต่างนี้อาจอธิบายได้จากลักษณะทางภูมิอากาศที่ไม่เหมือนกัน โดยประเทศไทยมีภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ขณะที่แคชเมียร์ตั้งอยู่ในละติจูดสูงกว่าและมีภูมิอากาศแบบภูเขาที่อบอุ่น จึงมีความแตกต่างของอุณหภูมิและฤดูกาลอย่างชัดเจน

นอกจากนี้ปัจจัยอื่น ๆ เช่น ลักษณะทางภูมิศาสตร์ สังคม วัฒนธรรม และเศรษฐกิจ อาจทำให้การตรวจพบเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงแตกต่างกันตามฤดูกาลระหว่างสองพื้นที่ได้

ในช่วงระหว่างที่มีการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 มีผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงแบบเฉียบพลันลดลง สอดคล้องกับการศึกษาของ Negesso A และคณะ⁽²⁶⁾ ที่ได้ทำการศึกษาผลกระทบของการระบาดใหญ่จากโรคโควิด 19 ต่ออุบัติการณ์ของโรคอุจจาระร่วงแบบเฉียบพลันในเอธิโอเปีย ลดลงจาก 3,287,850 คน เหลือ 2,961,771 คน คิดเป็นร้อยละ 9.91 ($p < 0.001$, 95% CI: 6.3-17.6) การลดลงของโรคอุจจาระร่วงในประเทศไทยในช่วงการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 เป็นผลมาจากมาตรการป้องกันและควบคุมโรคที่เข้มงวด นอกจากนี้การได้รับวัคซีนป้องกันโรคโรตาไวรัส (Rotavirus vaccine) ภายใต้โครงการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันแห่งชาติ (Expanded Program of Immunization; EPI) ในปี พ.ศ. 2563 เป็นผลลัพธ์ที่คาดหวังว่าจะช่วยลดการเข้ารับการรักษาพยาบาล ลดอัตราการตาย ลดภาวะของโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันในเด็ก โดยเฉพาะผู้ที่มีอายุต่ำกว่า 1 ปี ซึ่งเป็นกลุ่มเป้าหมายของการใช้วัคซีน⁽¹³⁾ รวมทั้งการส่งเสริมสุขอนามัยที่ดี เช่น การปรุงอาหารให้สุกใหม่ การใช้ช้อนกลาง และการล้างมือก่อนรับประทานอาหารเป็นมาตรการส่งเสริมสุขอนามัยโดยกระทรวงสาธารณสุข ซึ่งการล้างมืออย่างสม่ำเสมอสามารถลดอุบัติการณ์ของโรคอุจจาระร่วงลงได้ร้อยละ 30⁽²⁷⁾ การติดเชื้อร่วม (Co-infection) ของเชื้อก่อโรค 2 ชนิด มีความหลากหลายสูงโดยเฉพาะ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. พบร่วมกับเชื้ออื่น ๆ ที่พบได้บ่อย เช่น Norovirus และ *Clostridium difficile* การวิเคราะห์เชิงลึกเกี่ยวกับเชื้อชนิดเดียวหรือหลายชนิดจะช่วยให้สามารถเข้าใจรูปแบบการเกิดโรคการแพร่กระจายเชื้อ และความสัมพันธ์กับปัจจัยทางสังคมและสิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งช่วยสนับสนุนการออกแบบมาตรการป้องกันที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเดิม⁽²⁸⁾ การตรวจพบเชื้อก่อโรคแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชนิดของสิ่งส่งตรวจ ($p = 0.003$) โดยพบว่าสัดส่วนการตรวจพบเชื้อใน rectal swab สูงกว่า stool swab อย่างชัดเจน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำคัญ

ของชนิดสิ่งส่งตรวจต่อความไวของการตรวจวิเคราะห์
เชื้อก่อโรค การเลือกสิ่งส่งตรวจ และวิธีการตรวจวินิจฉัย
ที่เหมาะสม จึงช่วยลดความเสี่ยงของการการตรวจหาเชื้อ
ก่อโรคอุจจาระร่วงที่คลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง^(29,30)

สรุป

โรคติดเชื้อระบบทางเดินอาหารสามารถเกิดขึ้นได้
ตลอดทั้งปี โดยเฉพาะในกลุ่มเด็กวัยเตาะแตะและเด็ก
วัยเรียนซึ่งมีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อ ข้อมูลในช่วงก่อน
สถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 แสดงให้
เห็นถึงอัตราการตรวจพบเชื้อก่อโรคสูงกว่าช่วงที่มีการแพร่
ระบาดของโรคโควิด 19 การเฝ้าระวังอย่างต่อเนื่องและการใช้
มาตรการป้องกันโรคติดเชื้อสามารถช่วยลดอัตราการ
เกิดอุจจาระร่วงได้ การศึกษานี้มีประโยชน์ในการทำ
เข้าใจรูปแบบการเกิดโรคและเชื้อก่อโรกระบบทางเดิน
อาหาร ข้อมูลนี้สามารถนำไปใช้เตรียมความพร้อมใน
การรับมือกับโรคอุจจาระร่วงในอนาคตได้อย่างเหมาะสม
ในทุกช่วงวัยและทุกเพศ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์
โรงพยาบาลรามาริบัติ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับการสนับสนุนการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณ
รศ.นพ.มงคล คุณากร รศ.ดร.บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค
และเจ้าหน้าที่ธุรการ ภาควิชาพยาธิวิทยา ที่ได้ให้
การสนับสนุนการวิจัยด้วยดีเสมอมา ขอขอบคุณ
ผศ.ดร.ธนรรธ ชูขจร สำหรับคำปรึกษาข้อเสนอแนะ
และความรู้ทางสถิติ และขอขอบคุณ พญ.ธีรรัตน์
กชกานต์ ที่ได้คำแนะนำในการใช้โปรแกรมวิเคราะห์
ทางสถิติ

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Diarrhoeal disease. [online]. 2024; [cited 2025 Aug 14]. Available from: URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>.
2. Fletcher SM, McLaws ML, Ellis JT. Prevalence of gastrointestinal pathogens in developed and developing countries: systematic

review and meta-analysis. *J Public Health Res* 2013; 2(1): 42-53.

3. Rudolph JA, Rufo PA. Diarrhea. In: *Encyclopedia of infant and early childhood development*. Amsterdam: Elsevier/Academic Press; 2008. p. 394-401.
4. Drancourt M. Acute diarrhea. In: Cohen J, Powderly WG, Opal SM, editors. *Infectious diseases*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier; 2017. p. 335-40.e2.
5. Nemeth V, Pflieger N. Diarrhea. [Updated 2022 Nov 21]. In: StatPearls. [online]. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; 2024. [cited 2025 Aug 14]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448082>.
6. Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2014; 14(8): 725-30.
7. Hoa Tran TN, Trainor E, Nakagomi T, Cunliffe NA, Nakagomi O, Desselberger U. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *J Clin Virol* 2013; 56(3): 185-93.
8. Troeger C, Khalil IA, Rao PC, Cao S, Blacker BF, Ahmed T, et al. Rotavirus vaccination and the global burden of rotavirus diarrhea among children younger than 5 years. *JAMA Pediatr* 2018; 172(10): 958-65.
9. Nguyen TA, Yagyu F, Okame M, Phan TG, Trinh QD, Yan H, et al. Diversity of viruses associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Ho Chi Minh City, Vietnam. *J Med Virol* 2007; 79(5): 582-90.
10. Vong S, Perroud V, Turner P, Vuthy N, Ngan C, Guillard B, et al. Acute watery diarrhea in Cambodian children: epidemiology

- of viral and bacterial pathogens. *Int J Infect Dis* 2013; 17(9): e761-7.
11. Kittigul L, Pombubpa K, Sujirarat D, Diraphat P, Utrarachkij F, Khampitak K, et al. Norovirus and rotavirus infections in children less than five years of age hospitalized with acute gastroenteritis in Thailand. *J Med Virol* 2012; 84(5): 682-90.
 12. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(1): 7-15.
 13. Charoenwat B, Suwannaying K, Paibool W, Laoaroon N, Sutra S, Thepsuthammarat K. Burden and pattern of acute diarrhea in Thai children under 5 years of age: a 5-year descriptive analysis based on Thailand National Health Coverage (NHC) data. *BMC Public Health* 2022; 22(1): 1161. (10 pages).
 14. Ganguly E, Sharma PK, Bunker CH. Prevalence and risk factors of diarrhea morbidity among under-five children in India: a systematic review and meta-analysis. *Indian J Child Health* 2015; 2(4): 152-60.
 15. Sell J, Dolan B. Common Gastrointestinal Infections. *Prim Care* 2018; 45(3): 519-32.
 16. Mala W, Kotepui KU, Masangkay FR, Wangdi K, Wilairatana P, Kotepui M. Evidence of pathogens associated with travelers' diarrhea in Thailand: a systematic review. *Trop Dis Travel Med Vaccines* 2025; 11: 8. (12 pages).
 17. Chuchaona W, Khongwichit S, Luang-on W, Vongpunsawad S, Poovorawan Y. Norovirus GII.3[P25] in patients and produce, Chanthaburi Province, Thailand, 2022. *Emerg Infect Dis* 2023; 29(5): 1067-70.
 18. Khiewbanyang S, Kaewpradab Y, Kanchanaudom W, Pholprasert S, Koyta T, Hoontong P, et al. An investigation of a norovirus outbreak linked to contaminated vegetables in Mueang District, Chanthaburi Province, Thailand, December 2021–January 2022. *Outbreak Surveill Investig Response (OSIR) J* 2023; 16(4): 217-23.
 19. Cai L, Tang B, Kong F, Chang Z, Zhang Y, Zheng Y, et al. Disease burden of rotavirus related diarrhea in children under 5 years in China: a meta-analysis. *Sci Rep*. [serial online]. 2025; [cited 2025 Aug 14]; 15(1): 15973. Available from: URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-00778-w>.
 20. Rosato C, Murphy J, Maskell S, Harris J. Assessing the impact of vaccination on rotavirus transmission dynamics using Bayesian inference. *arXiv*. [serial online]. 2025; [cited 2025 Aug 14]; 2506: 14536. Available from: URL: <https://arxiv.org/abs/2506.14536>.
 21. Huang Z, He Z, Wei Z, Wang W, Li Z, Xia X, et al. Correlation between prevalence of selected enteropathogens and diarrhea in children: a case-control study in China. *Open Forum Infect Dis* 2021; 8(10): ofab445. (7 pages).
 22. Zhao YF, Guo XJ, Zhang ZS, Ma XQ, Wang R, Yan XY, et al. Epidemiology of functional diarrhea and comparison with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: a population-based survey in China. *PLoS One* 2012; 7(8): e43749. (7 pages).
 23. Gao Q, Liu H, Yu W, Wang Z, Yang Y, Guo K, et al. Pathogenetic characteristics of infectious diarrhea in Yantai City, Shandong Province, 2018–2019. *Front Public Health* 2023; 11: 1195118. (8 pages).
 24. Pickering LK. The day care center diarrhea dilemma. *Am J Public Health* 1986; 76(6): 623-4.
 25. Ahmed SF, Farheen A, Muzaffar A, Mattoo GM. Prevalence of diarrhoeal disease, its seasonal and age variation in under-fives in Kashmir, India. *Int J Health Sci* 2008; 2(2): 126-33.

26. Negsso A, Arega B, Abdissa F, Zewdu B, Teshome A, Minda A, Agunie A. Effect of COVID-19 pandemic on the incidence of acute diarrheal disease and pneumonia among under 5 children in Ethiopia- a database study. *PLOS Glob Public Health* 2023; 3(6): e0000304. (12 pages).
27. Wikipedia Contributors. Global handwashing day. [online]. 2024; [cited 2025 Aug 14]. Available from: URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Global_Handwashing_Day.
28. Walker CLF, Rudan I, Liu L, Nair H, Theodoratou E, Bhutta ZA, et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet* 2013; 381(9875): 1405-16.
29. Jean S, Yarbrough ML, Anderson NW, Burnham CA. Culture of rectal swab specimens for enteric bacterial pathogens decreases time to test result while preserving assay sensitivity compared to bulk fecal specimens. *J Clin Microbiol*. [serial online]. 2019; [cited 2023 Mar 22]; 57(6): e02077-18. Available from: URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6535583>.
30. Munyemana JB, Kabayiza JC, Seruyange E, Nilsson S, Andersson ME, Lindh M. Acquisition and clearance of enteric pathogens in children under 5 years of age in Kigali and Musanze, Rwanda, 2022: a longitudinal cohort study. *Clin Microbiol Infect*. 2025; 31(10): 1684-90.

Acute Diarrhea and Gastrointestinal Pathogens in Diarrheal Patients at Ramathibodi Hospital, Thailand

**Treewat Watthanachokchai, Kingkan Rakmanee, Pichet Yutthanakarnwikom,
and Ekawat Pasomsub**

*Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok
10400, Thailand*

ABSTRACT Gastrointestinal pathogens are major causes of morbidity and mortality worldwide. Acute diarrhea is a significant public health issue frequently encountered in Thailand. The Data were analyzed from results of laboratory tests for diarrhea-causing pathogens at the Virology Laboratory, Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Thailand, from January 1, 2015, to December 31, 2021. Cases were categorized by gender, age, type of specimens, and the period of the COVID-19 pandemic during which they were collected. Among 1,496 patients with acute diarrhea, 29.41% were found to be positive for gastrointestinal pathogens. The primary causative agents included bacteria (48.41%), viruses (41.36%), and parasites (2.27%). The five most frequently identified pathogens were *Salmonella* spp. (20.50%), Norovirus (18.96%), Rotavirus A (16.63%), *Clostridium difficile* (12.38%), and *Escherichia coli* (10.06%). The proportion of positive cases was significantly higher before the COVID-19 pandemic than during the pandemic ($p < 0.001$, OR = 1.79, 95% CI: 1.38, 2.31). The highest detection rate was observed among school-aged children (41.35%), who also had a significantly increased risk of infection ($p = 0.001$, OR = 2.2, 95% CI = 1.39, 3.49), as did toddlers ($p = 0.022$, OR = 1.56, 95% CI = 1.07, 2.29). These findings indicated that gastrointestinal pathogen infections were most prevalent among children, particularly school-aged children and toddlers. A decline in detection rates was observed during the COVID-19 pandemic, which may be attributed to the public health preventive measures implemented during that period. This information may support future planning for surveillance and control of diarrheal diseases in high-risk groups.

Keywords: Gastrointestinal pathogens, Diarrhea, Co-infection of gastrointestinal pathogens

รูปแบบของเชื้อก่อโรคติดเชื้อทางเดินหายใจเฉียบพลัน โรงพยาบาลรามธิบดี สิบปีย้อนหลัง

กิงกาญจน์ รัชมณี ตรีวัฒน์ วัฒนะโชคชัย พิเชฐ ยุทธนาการวิกรม และ เอกวัฒน์ ผสมทรัพย์
ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

บทคัดย่อ เชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจเป็นสาเหตุสำคัญของการเจ็บป่วยและเสียชีวิตทั่วโลกโดยเฉพาะในกลุ่มเด็กเล็ก จากการวิเคราะห์ข้อมูลผลการตรวจ Nucleic Acid Amplification Tests ของห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามธิบดี ระหว่างวันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2555 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ. 2564 จากผู้ป่วยทั้งหมด 16,976 ราย พบผู้ป่วยติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจ 6,619 ราย (ร้อยละ 38.99) มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส คิดเป็นร้อยละ 3.35, 0.84 และ 95.81 ตามลำดับ ผู้ติดเชื้อไวรัสส่วนใหญ่มีสาเหตุจาก Rhinovirus/Enterovirus, Respiratory Syncytial Virus และ Influenza A virus คิดเป็นร้อยละ 37.50, 12.18 และ 9.08 ตามลำดับ พบความชุกของการติดเชื้อสูงสุดในกลุ่มเด็กวัยเตาะแตะ เด็กก่อนวัยเรียน และทารก ร้อยละ 70.58, 61.55 และ 56.42 ตามลำดับ ในเพศหญิงพบมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อสูงกว่าเพศชายอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.009$, OR = 1.1, 95% CI: 1.02–1.18) สำหรับเด็กวัยเตาะแตะมีความเสี่ยงสูงสุด ($p < 0.001$, OR = 5.96, 95% CI: 5.27–6.76) การติดเชื้อพบสูงในเดือนกรกฎาคม ถึง กันยายน โดยเฉพาะก่อนการระบาดของโรคโควิด 19 มีผู้ติดเชื้อสูงกว่าช่วงที่มีการระบาดของโรคโควิด 19 ($p < 0.001$, OR = 1.37, 95% CI: 1.21–1.55) สามารถพบการติดเชื้อได้ในทุกเพศทุกวัยโดยไม่เปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาล ผลการศึกษานี้มีความสำคัญต่อการพัฒนาแนวทางการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ การจัดการผู้ป่วยตามมาตรฐานและตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลก เพื่อลดอัตราการเจ็บป่วยและเสียชีวิตจากโรคระบบทางเดินหายใจ

คำสำคัญ: โรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน, เชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจ, การติดเชื้อระบบทางเดินหายใจร่วม

Corresponding author E-mail: ekawat.pas@mahidol.ac.th

Received: 23 April 2025

Revised: 14 October 2025

Accepted: 14 October 2025

บทนำ

การติดเชื้อทางเดินหายใจ (Respiratory Tract Infections; RTIs) เป็นโรคติดเชื้อที่พบได้บ่อยที่สุดในประชากรทุกกลุ่มอายุ โดยมีสาเหตุแตกต่างกันไปตามปัจจัย เช่น อายุ สิ่งแวดล้อม พฤติกรรม และปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง⁽¹⁾ ข้อมูลจากองค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) พบว่าโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจเป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยภาวะทุพพลภาพ และเสียชีวิตเป็นอันดับ 1 ของโลก ซึ่งมักพบมากในประเทศที่มีสถานะทางเศรษฐกิจไม่ตีส่วนการติดเชื้อไวรัสระบบทางเดินหายใจส่วนล่างเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตเป็นอันดับ 3 ของโลก รองจากโรคหัวใจและโรคหลอดเลือดสมอง⁽²⁾ เชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจมีหลายชนิดส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัส โดยศูนย์ควบคุมโรคติดต่อแห่งสหรัฐอเมริกา (Centers for Disease Control and Prevention, USA; US-CDC) ได้ระบุว่าผู้ป่วยมักมีอาการคล้ายโรคไข้หวัดใหญ่ ได้แก่ มีไข้ (อุณหภูมิสูงกว่า 38 องศาเซลเซียส) ร่วมกับอาการไอและ/หรือเจ็บคอ⁽³⁾ การติดเชื้อระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง (Lower Respiratory Tract Infections; LRTIs) หมายถึง การติดเชื้อที่เกิดในหลอดลมส่วนล่างหรือปอด เช่น หลอดลมอักเสบ หลอดลมฝอยอักเสบ และปอดบวม มักมีอาการหายใจลำบาก หอบเหนื่อย และตรวจพบความผิดปกติในปอด การติดเชื้อระบบทางเดินหายใจส่วนล่างแบบเฉียบพลัน หมายถึง LRTIs ที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายในไม่กี่วันร่วมกับอาการรุนแรง เช่น ไข้สูง หอบเหนื่อย และการเปลี่ยนแปลงในภาพรังสีทรวงอก⁽³⁾

ผู้ป่วยเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปี ที่ติดเชื้อไวรัส เช่น Influenza Virus (Flu), และ Respiratory Syncytial Virus (RSV) มีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตสูงขึ้น⁽⁴⁾ ขณะที่การติดเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง เช่น *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ปัจจุบันยังมีการรายงานน้อยมาก⁽⁴⁾ อาการทางคลินิกของผู้ป่วยที่ติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจหลายชนิดมักคล้ายกัน^(3,4) ทำให้การตรวจวินิจฉัยที่จำเพาะทำได้ยาก อาจนำไปสู่การเลือก

ใช้ยาที่ไม่เหมาะสมและการรักษาที่ผิดพลาด ส่งผลให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียและการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสได้ การติดเชื้อระบบทางเดินหายใจแบบเฉียบพลันในประเทศไทยยังเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญ โดยเฉพาะในช่วงฤดูฝนและฤดูหนาวที่มีการระบาดของเชื้อไวรัสระบบทางเดินหายใจหลายชนิด ข้อมูลจากกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ช่วงปี พ.ศ. 2566-2567 มีรายงานผู้ป่วยที่ติดเชื้อระบบทางเดินหายใจเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในกลุ่มเด็กเล็กและผู้สูงอายุ ซึ่งเป็นกลุ่มเสี่ยงต่อการมีภาวะแทรกซ้อนและเสียชีวิต⁽⁵⁾ การเฝ้าระวังเชื้อไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ เช่น Flu, RSV และ Human Metapneumovirus (hMPV) มีความสำคัญในการป้องกัน วางแผนควบคุมโรค และจัดสรรทรัพยากรทางการแพทย์⁽⁶⁾

แม้เชื้อก่อโรกระบบทางเดินหายใจจะมีความหลากหลาย แต่เชื้อก่อโรคเหล่านี้มักมีสภาวะในการหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกัน ทำลายปอด และก่อให้เกิดโรคแทรกซ้อนตามมาคล้ายคลึงกัน⁽⁷⁾ ดังนั้นการศึกษาข้อมูลทางระบาดวิทยาของเชื้อก่อโรกระบบทางเดินหายใจแบบเฉียบพลัน (Acute Respiratory Tract Infection; ARTIs) หมายถึง การติดเชื้อทางเดินหายใจที่เกิดขึ้นภายใน 14 วัน ร่วมกับอาการอย่างน้อยหนึ่งอาการ เช่น ไข้ ไอ เจ็บคอ คัดจมูก หรือหายใจลำบาก อย่างไรก็ตาม รายงานการระบาดของเชื้อก่อโรกระบบทางเดินหายใจที่ไม่ใช่ SARS-CoV-2 ยังมีจำนวนน้อย การส่งเสริมให้มีการรายงานผลอุบัติการณ์และการศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อก่อโรกระบบทางเดินหายใจอีกหลายชนิด จะช่วยให้สามารถนำข้อมูลมาใช้ในการบริหารจัดการทางการแพทย์ เพิ่มความรู้ความเข้าใจให้บุคลากรด้านสาธารณสุขเกี่ยวกับเชื้อก่อโรค และปัจจัยเสี่ยงเพื่อเตรียมความพร้อมรับมือกับการระบาดในอนาคตได้ดียิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์และวิธีการ

รูปแบบการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาข้อมูลเชิงพรรณนาแบบย้อนหลัง (Retrospective descriptive study) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกและความสัมพันธ์ของ

ปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจแบบเฉียบพลัน หมายถึง การติดเชื้อที่เกิดขึ้นในระยะเวลาไม่เกิน 14 วัน และมีอาการอย่างน้อยหนึ่งอาการ ได้แก่ ไข้ ไอ เจ็บคอ คัดจมูก น้ำมูกไหล หรือหายใจลำบาก โดยกลุ่มเป้าหมายที่ทำการศึกษานี้จำกัดเฉพาะผู้ป่วยที่มีผลการตรวจ Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs) ต่อเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจ ซึ่งข้อมูลที่น่ามาวิเคราะห์เป็นผลการตรวจจากห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาริบัติ มหาวิทยาลัยมหิดล ระหว่างวันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2555 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ. 2564

การเตรียมข้อมูล

ผู้ป่วยโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน จำนวน 16,976 ราย จำแนกข้อมูล ได้แก่ เพศ กลุ่มอายุ เป็นทารกแรกเกิด (newborn): อายุต่ำกว่า 1 เดือน เด็กทารก (infant): มากกว่า 1 เดือน ถึง 1 ปี เด็กวัยเตาะแตะ (toddler): มากกว่า 1 ปี ถึง 3 ปี เด็กก่อนวัยเรียน (pre-schooler): มากกว่า 3 ปี ถึง 6 ปี เด็กวัยเรียน (school-aged child): มากกว่า 6 ปี ถึง 12 ปี วัยรุ่น (adolescent): มากกว่า 12 ปี ถึง 18 ปี ผู้ใหญ่ (adult): มากกว่า 18 ปี ถึง 60 ปี และผู้สูงอายุ (elderly): มากกว่า 60 ปีขึ้นไป ชนิดสิ่งส่งตรวจ (clinical specimens) ได้แก่ ชนิดป้ายบริเวณจมูก (nasal swab) น้ำล้างจมูก (nasal wash) สารคัดหลั่งดูดจากโพรงจมูก (nasopharyngeal aspirate) ป้ายหลังโพรงจมูก (nasopharyngeal swab) น้ำล้างหลังโพรงจมูก (nasopharyngeal wash) และป้ายบริเวณลำคอ (throat swab) และเดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างผู้ป่วย

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้

วิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นด้วยสถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistics) ได้แก่ จำนวน ร้อยละ และสัดส่วน ของข้อมูลตัวแปรเชิงหมวดหมู่ (เพศ กลุ่มอายุ สิ่งส่งตรวจ เดือนและปีที่เก็บตัวอย่าง) รวมถึงสถานะการติดเชื้อ เป็นโรค และไม่เป็นโรคของเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจ (เรียงตามตัวอักษร) ได้แก่ Adenovirus (ADV),

Bordetella parapertussis (*B. parapertussis*), *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*), Bocavirus (BoV), *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*), Coronavirus 229E (CoV 229E), Coronavirus HKU1 (CoV HKU1), Coronavirus NL63 (CoV NL63), Coronavirus OC43 (CoV OC43), Enterovirus (ENT), Influenza A Virus (Flu A), Influenza B Virus (Flu B), Influenza C Virus (Flu C), *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*), Human Metapneumovirus (hMPV), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*), *Moraxella catarrhalis* (*M. catarrhalis*), *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*), *Parachovirus* (PEV), *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*), Parainfluenza Virus 1 (PIV1), Parainfluenza Virus 2 (PIV2), Parainfluenza Virus 3 (PIV3), Parainfluenza Virus 4 (PIV4), Respiratory Syncytial Virus (RSV), *Salmonella* species (*Salmonella* spp.), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) และ Rhinovirus/Enterovirus (RE) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (significance level = 0.05) โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel 2021 และ Stata Version 18

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรเชิงหมวดหมู่กับสถานะการติดเชื้อด้วย Chi-square test of independence โดยใช้ Stata Version 18 SE (Stata Corp LLC, College Station, USA) และวิเคราะห์ความเสี่ยงในการติดเชื้อด้วย Binary logistic regression เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงสาเหตุและความเสี่ยงของการติดเชื้อแบบ Multivariable analysis โดยใช้โปรแกรม Stata Version 18, R Studio Version 4.3.2 (R Foundation for Statistical Computing, Austria) และ R Studio Version 2024.09.0-375 (Posit PBC, USA)

จริยธรรมการวิจัย

การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติและรับรองด้านจริยธรรมการวิจัยในคน จากคณะกรรมการจริยธรรมและการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ COA.MURA2022/610 เมื่อวันที่ 21 ตุลาคม พ.ศ. 2565

ผล

จากข้อมูลผู้ป่วยโรคระบบทางเดินหายใจแบบเฉียบพลันทั้งสิ้น 16,976 ราย ตรวจพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจทั้งหมด จำนวน 6,619 ราย คิดเป็นร้อยละ 38.99 (6,619/16,976) หากแยกตามสัดส่วนของเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส พบจำนวน 6,680 ครั้ง คิดเป็นร้อยละ 3.35 (224/6,680), 0.84 (56/6,680) และ 95.81 (6,400/6,680) ตามลำดับ (บางรายตรวจพบเชื้อได้มากกว่า 1 ชนิด)

พบการติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจได้หลายชนิดในผู้ป่วยบางราย สัดส่วนของการติดเชื้อที่พบในผู้ป่วย แบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ติดเชื้อแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว ร้อยละ 2.52 (167/6,619) กลุ่มที่ติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ร้อยละ 0.23 (15/6,619) กลุ่มที่ติดเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส ร้อยละ 0.02 (1/6,619) กลุ่มที่ติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ร้อยละ 0.62 (41/6,619) กลุ่มที่ติดเชื้อราเพียงชนิดเดียว ร้อยละ 0.56 (37/6,619) กลุ่มที่ติดเชื้อราและไวรัส ร้อยละ 0.05 (3/6,619) และกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสเพียงชนิดเดียว ร้อยละ 96.01 (6,355/6,619)

ชนิดของเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจที่ตรวจพบ

เชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจที่ตรวจพบทั้งหมดแยกตามชนิด (species) จำนวน 7,534 ครั้ง เชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจที่พบมากที่สุด คือ RE รองลงมาคือ RSV และ Flu A ร้อยละ 37.50 (2,825/7,534), 12.18 (918/7,534) และ 9.08 (684/7,534) ตามลำดับ โดยไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp. ในผู้ป่วยทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สัดส่วนของจำนวนเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจที่ตรวจพบทั้งหมด 7,534 ครั้ง แยกตามชนิด (species)

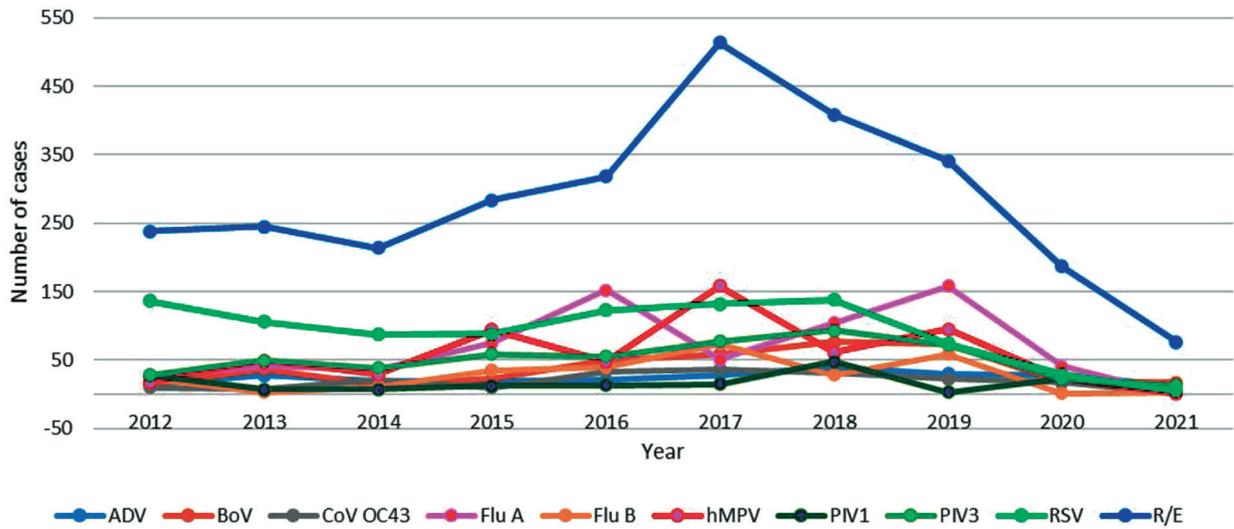
Pathogen	Number	(% Proportion)	Pathogen	Number	(% Proportion)
ADV	238	3.16	<i>K. pneumoniae</i>	74	0.98
<i>B. parapertussis</i>	3	0.04	<i>L. pneumophila</i>	1	0.01
<i>B. pertussis</i>	1	0.01	<i>M. catarrhalis</i>	16	0.21
BoV	380	5.04	<i>M. pneumoniae</i>	21	0.28
<i>C. pneumoniae</i>	4	0.05	PEV	1	0.01
CoV 229E	68	0.90	<i>P. jirovecii</i>	56	0.74
CoV HKU1	76	1.01	PIV1	159	2.11
CoV NL63	91	1.21	PIV2	113	1.50
CoV OC43	190	2.52	PIV3	506	6.72
ENT	1	0.01	PIV4	117	1.55
Flu A	684	9.08	RSV	918	12.18
Flu B	274	3.64	<i>Salmonella</i> spp.	0	0.00
Flu C	4	0.05	<i>S. aureus</i>	96	1.27
<i>H. influenzae</i>	23	0.31	<i>S. pneumoniae</i>	20	0.27
hMPV	574	7.62	RE	2,825	37.50

ความชุกของเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจรายปี

ความชุกของเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจ พบสูงสุดในปี พ.ศ. 2555 รองลงมา คือ ปี พ.ศ. 2556 และ 2562 ร้อยละ 48.33, 45.80 และ 42.63 ตามลำดับ ความชุกของเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจ พบ น้อยที่สุดในปี พ.ศ. 2564 ร้อยละ 28.48 จากการ

ศึกษาข้อมูลสถิติรายปีเกี่ยวกับการติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจ แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มที่มีความผันผวนในแต่ละปีที่มีสาเหตุจากเชื้อก่อโรคหลากหลายสายพันธุ์ โดยเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจทั้งหมด พบว่าเป็นเชื้อไวรัสใน 10 อันดับแรก ดังแสดงในภาพที่ 1

The top 10 pathogens causing respiratory tract infections



ภาพที่ 1 ข้อมูลรายปีของชนิดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจที่พบ 10 อันดับแรก

สัดส่วนผู้ติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน แสดงเป็นกลุ่มต่าง ๆ

จากการวิเคราะห์ข้อมูลพบผู้ป่วยติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันในเพศหญิงและเพศชายใกล้เคียงกัน ร้อยละ 39.09 และ 38.89 ตามลำดับ เมื่อจำแนกตามช่วงอายุมีจำนวนผู้ป่วยรวมทั้งหมด 16,970 (มีผู้ป่วย 6 ราย ไม่มีข้อมูลอายุผู้ป่วย) และพบว่ากลุ่มเด็กเล็กมีความชุกต่อการติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจสูงที่สุด โดยเฉพาะในกลุ่ม toddler, pre-schooler และ infant ร้อยละ 70.58 61.55 และ 56.42 ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม newborn มีความชุกต่ำที่สุด ร้อยละ 18.81 สำหรับชนิดสิ่งส่งตรวจทางคลินิก 14,456 ตัวอย่าง (มีสิ่งส่งตรวจคลินิก 2,520 ตัวอย่าง ที่ไม่ได้ระบุชนิดสิ่งส่งตรวจ) พบการติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจสูงที่สุดในตัวอย่าง nasopharyngeal aspirate ร้อยละ 43.54 รองลงมา คือ nasopharyngeal swab ร้อยละ 42.13 และ nasal swab ร้อยละ

41.19 ตามลำดับ เมื่อจำแนกตามเดือนพบว่าความชุกของการติดเชื้อก่อโรคสูงในช่วงเดือนกรกฎาคม - กันยายน ดังนี้ เดือนกันยายน ร้อยละ 44.18 เดือนสิงหาคม ร้อยละ 42.95 และเดือนกรกฎาคม ร้อยละ 42.44 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าความชุกของการติดเชื้อลดลงในช่วงการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 โดยพบร้อยละ 34.23 เปรียบเทียบกับช่วงก่อนการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 ที่พบร้อยละ 39.62 ดังแสดงในตารางที่ 2

การติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจรวมมากกว่าหนึ่งชนิด

พบผู้ป่วยที่ติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจเพียงชนิด (species) เดียว ร้อยละ 87.52 (5,793/6,619) ดังแสดงในตารางที่ 3 และผู้ติดเชื้อก่อโรคมกกว่า 1 ชนิด (826/6,619) ร้อยละ 12.48 (มีความแตกต่าง 164 รูปแบบ) แบ่งออกเป็น ผู้ติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจ 2 ชนิด (108 รูปแบบ) ร้อยละ 90.19 (745/826)

ตั้งแสดงในตารางที่ 4, ติดเชื้อ 3 ชนิด (49 รูปแบบ) ร้อยละ 8.96 (74/826) และติดเชื้อ 5 ชนิด (1 รูปแบบ) ร้อยละ 0.12 (1/826) ติดเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ BoV, hMPV, PIV1, RSV และ RE (6 รูปแบบ) ร้อยละ 0.73 (8/826) ตั้งแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 2 การแจกแจงผู้ป่วยโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน แยกตามเพศ กลุ่มอายุ ชนิดสิ่งส่งตรวจ เดือนต่างๆ ระยะเวลาก่อนและระหว่างการระบาดของโรคโควิด 19 และสัดส่วนของเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจในกลุ่มผู้ติดเชื้อทั้งหมด

	จำนวน	Respiratory Pathogens				p-value*
		P	(%)	N	(%)	
เพศผู้ป่วย (16,976)		6,619		10,357		0.783
Male	8,504 (50.09%)	3,307	38.89	5,197	61.11	
Female	8,472 (49.91%)	3,312	39.09	5,160	60.91	
กลุ่มอายุผู้ป่วย (16,970)		6,617		10,353		< 0.001
Newborn	101 (0.60%)	19	18.81	82	81.19	
Infant	1,659 (19.78%)	936	56.42	723	43.58	
Toddler	1,737 (10.24%)	1,226	70.58	511	29.42	
Pre-schooler	1,061 (6.25%)	653	61.55	408	38.45	
School-aged child	825 (4.86%)	358	43.39	467	56.61	
Adolescent	619 (3.65%)	203	32.79	416	67.21	
Adult	5,020 (29.58%)	1,475	29.38	3,545	70.62	
Elderly	5,948 (35.05%)	1,747	29.37	4,201	70.63	
ชนิดสิ่งส่งตรวจ (14,456)		5,939		8,517		0.002
Nasopharyngeal aspirate	147 (1.02%)	64	43.54	83	56.46	
Nasopharyngeal swab	1,581 (10.94%)	666	42.13	915	57.87	
Nasopharyngeal wash	35 (0.24%)	10	28.57	25	71.43	
Nasal swab	12,465 (86.23%)	5,134	41.19	7,331	58.81	
Nasal wash	125 (0.86%)	37	29.60	88	70.40	
Throat swab	103 (0.71%)	28	27.18	75	72.82	
เดือน (พ.ศ. 2555-2565) (16,976)		6,619		10,357		< 0.001
January	1,462 (8.61%)	579	39.60	883	60.40	
February	1,385 (8.16%)	536	38.70	849	61.30	
March	1,455 (8.57%)	526	36.15	929	63.85	
April	1,288 (7.59%)	449	34.86	839	65.14	
May	1,199 (7.06%)	394	32.86	805	67.14	
June	1,177 (6.93%)	453	38.49	724	61.51	
July	1,383 (8.15%)	587	42.44	796	57.56	
August	1,595 (9.40%)	685	42.95	910	57.05	
September	1,641 (9.67%)	725	44.18	916	55.82	
October	1,575 (9.28%)	611	38.79	964	61.21	
November	1,419 (8.36%)	533	37.56	886	62.44	
December	1,397 (8.23%)	541	38.73	856	61.27	
ระยะเวลาการระบาดของโรค โควิด 19 (16,976)		6,619		10,357		< 0.001
During	1,978 (11.65%)	677	34.23	1,301	65.77	
Before	14,998 (88.35%)	5,942	39.62	9,056	60.38	

หมายเหตุ: % = Percentage, p-value = Probability value, P = positive, N = negative และ * = Pearson Chi-Square

ตารางที่ 3 สัดส่วนของเชื้อก่อโรกระบบทางเดินหายใจที่ตรวจพบชนิดเดียวในผู้ติดเชื้อ 5,793 ราย

Virus	Number	(%)	Bacteria	Number	(%)
ADV	129	2.23	<i>B. parapertussis</i>	1	0.02
BoV	193	3.33	<i>B. pertussis</i>	1	0.02
CoV 229E	40	0.69	<i>C. pneumoniae</i>	2	0.03
CoV HKU1	55	0.95	<i>H. influenzae</i>	13	0.22
CoV NL63	65	1.12	<i>K. pneumoniae</i>	41	0.71
CoV OC43	148	2.55	<i>L. pneumophila</i>	0	0
ENT	0	0	<i>M. catarrhalis</i>	8	0.14
Flu A	609	10.51	<i>M. pneumoniae</i>	17	0.29
Flu B	222	3.83	<i>Salmonella. spp</i>	0	0
Flu C	2	0.03	<i>S. aureus</i>	53	0.91
hMPV	435	7.51	<i>S. pneumoniae</i>	3	0.05
PEV	0	0			
PIV1	132	2.28			
PIV2	80	1.38			
PIV3	395	6.82			
PIV4	79	1.36			
RSV	745	12.86			
RE	2288	39.50			
			Fungi	Number	(%)
			<i>P. jirovecii</i>	37	0.64

ตารางที่ 4 รูปแบบการติดเชื้อก่อโรกระบบทางเดินหายใจร่วม 2 ชนิด ต่อจำนวนผู้ติดเชื้อร่วม 2 ชนิด ทั้งสิ้น 745 ราย

Co-infection (2 species)	Number	(%)	Co-infection (2 species)	Number	(%)
ADV, RE	51	6.85	ADV, PIV2	2	0.27
CoV OC43, RE	22	2.95	ADV, RSV	6	0.81
CoV NL63, RE	7	0.94	CoV NL63, RSV	4	0.54
ADV, hMPV	6	0.81	PIV2, RSV	2	0.27
BoV, RE	83	11.14	ADV, Flu B	2	0.27
Flu B, RE	23	3.09	CoV NL63, hMPV	3	0.40
PIV3, RE	50	6.71	Flu B, PIV2	3	0.40
BoV, PIV1	3	0.40	PIV4, RSV	3	0.40
BoV, PIV4	1	0.13	CoV HKU1, hMPV	1	0.13
PIV1, RE	12	1.61	Flu A, RSV	8	1.07
ADV, PIV3	4	0.54	CoV HKU1, CoV OC43	1	0.13
RSV, RE	70	9.40	ADV, BoV	8	1.07
BoV, RSV	18	2.42	BoV, PIV2	1	0.13
CoV 229E, Flu A	2	0.27	ADV, CoV OC43	2	0.27
hMPV, RSV	15	2.01	Flu A, hMPV	5	0.67
PIV3, RSV	3	0.40	BoV, Flu B	7	0.94
hMPV, RE	64	8.59	CoV HKU1, PIV3	2	0.27
Flu A, RE	32	4.30	Flu A, PIV3	6	0.81
CoV HKU1, RE	10	1.34	hMPV, PIV3	2	0.27
ADV, Flu A	3	0.40	CoV NL63, PIV3	2	0.27

ตารางที่ 4 รูปแบบการติดเชื้อก่อโรกระบบทางเดินหายใจร่วม 2 ชนิด ต่อจำนวนผู้ติดเชื้อร่วม 2 ชนิด ทั้งหมด 745 ราย (ต่อ)

Co-infection (2 species)	Number	(%)	Co-infection (2 species)	Number	(%)
CoV 229E, RE	12	1.61	CoV OC43, RSV	3	0.40
BoV, PIV3	14	1.88	CoV OC43, Flu A	2	0.27
PIV2, RE	7	0.94	Flu B, RSV	4	0.54
BoV, hMPV	12	1.61	CoV OC43, PIV3	1	0.13
PIV4, RE	17	2.28	BoV, Flu A	3	0.40
CoV NL63, PIV2	2	0.27	Flu B, PIV4	1	0.13
Flu A, PIV4	1	0.13	<i>K. pneumoniae</i> , <i>P. jirovecii</i>	5	0.67
CoV 229E, PIV3	1	0.13	Flu A, <i>S. aureus</i>	1	0.13
CoV 229E, RSV	5	0.67	CoV OC43, <i>K. pneumoniae</i>	1	0.13
hMPV, PIV2	3	0.40	<i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i>	1	0.13
Flu B, hMPV	4	0.54	<i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i>	16	2.15
hMPV, PIV4	3	0.40	<i>M. catarrhalis</i> , RE	1	0.13
hMPV, PIV1	2	0.27	<i>H. influenzae</i> , <i>S. aureus</i>	3	0.40
CoV NL63, CoV OC43	1	0.13	<i>H. influenzae</i> , PIV1	1	0.13
CoV OC43, PIV1	3	0.40	<i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i>	1	0.13
Flu B, PIV3	3	0.40	<i>H. influenzae</i> , <i>P. jirovecii</i>	2	0.27
CoV NL63, Flu A	1	0.13	<i>P. jirovecii</i> , RE	3	0.40
CoV 229E, hMPV	1	0.13	<i>P. jirovecii</i> , <i>S. aureus</i>	7	0.94
CoV 229E, PIV1	1	0.13	<i>H. influenzae</i> ,	1	0.13
ADV, <i>C. pneumoniae</i>	1	0.13	<i>S. pneumoniae</i>		
BoV, CoV HKU1	1	0.13	<i>S. pneumoniae</i> , RE	6	0.81
PIV3, PIV4	2	0.27	<i>M. catarrhalis</i> ,	2	0.27
BoV, CoV NL63	1	0.13	<i>S. pneumoniae</i>		
ADV, CoV NL63	2	0.27	RSV, <i>S. aureus</i>	2	0.27
ADV, CoV HKU1	1	0.13	<i>K. pneumoniae</i> ,	1	0.13
CoV HKU1, Flu A	1	0.13	<i>M. catarrhalis</i>	2	0.27
PIV2, PIV3	1	0.13	<i>K. pneumoniae</i> , RSV		
<i>M. pneumoniae</i> , PIV3	1	0.13	<i>B. parapertusis</i> , PIV3	1	0.13
PIV1, PIV3	1	0.13	<i>H. influenzae</i> ,	1	0.13
<i>M. pneumoniae</i> , RE	1	0.13	<i>K. pneumoniae</i>		0.13
ADV, PIV4	1	0.13	ADV, <i>M. catarrhalis</i>	1	
CoV OC43, hMPV	1	0.13	ADV, <i>S. aureus</i>	2	0.27
<i>S. aureus</i> , RE	5	0.67	<i>K. pneumoniae</i> , PIV3	1	0.13
CoV 229E, <i>M. catarrhalis</i>	1	0.13	PIV3, <i>S. aureus</i>	1	0.13
			<i>K. pneumoniae</i> ,	2	0.27
			<i>S. pneumoniae</i>		
			CoV OC43, PIV2	1	0.13
			ENT, RE	1	0.13
			Flu A, Flu B	1	0.13

ตารางที่ 5 รูปแบบการติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจแบบร่วม 3 ชนิดต่อจำนวนผู้ติดเชื้อร่วม 3 ชนิด ทั้งสิ้น 74 ราย

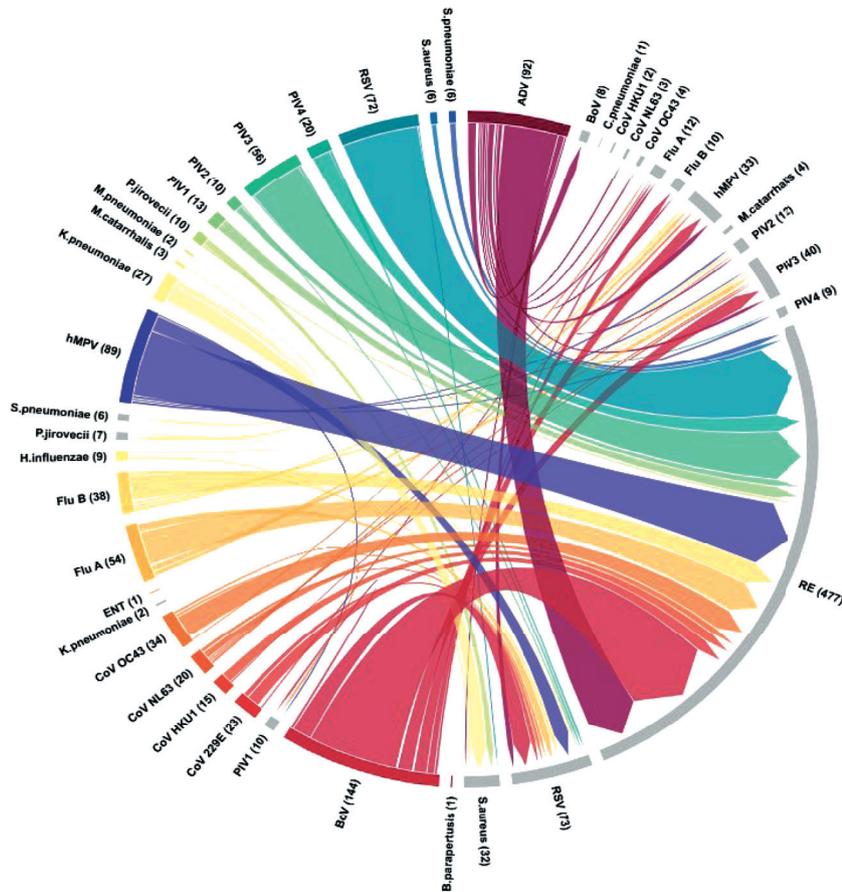
Co-infection (3 species)	Number	(%)	Co-infection (3 species)	Number	(%)
Flu A, PIV3, RE	1	1.35	BoV, Flu A, PIV2	2	2.70
ADV, RSV, RE	1	1.35	BoV, hMPV, PIV3	1	1.35
BoV, PIV1, PIV3	1	1.35	ADV, CoV NL63, RSV	1	1.35
Flu B, RSV, RE	1	1.35	CoV 229E, PIV4, RE	1	1.35
CoV 229E, RSV, RE	2	2.70	ADV, BoV, PIV4	2	2.70
Flu B, PIV2, RE	1	1.35	ADV, CoV OC43, RE	2	2.70
hMPV, RSV, RE	4	5.41	PIV2, RSV, RE	1	1.35
CoV HKU1, RSV, RE	1	1.35	BoV, hMPV, RE	2	2.70
ADV, BoV, RE	4	5.41	hMPV, PIV2, RE	2	2.70
hMPV, PIV2, RSV	1	1.35	CoV 229E, Flu A, RSV	2	2.70
ADV, PIV2, RSV	1	1.35	PIV4, RSV, RE	1	1.35
CoV OC43, PIV3, RE	1	1.35	BoV, Flu A, RSV	1	1.35
BoV, RSV, RE	4	5.41	hMPV, PIV4, RE	1	1.35
PIV3, PIV4, RE	1	1.35	Flu C, hMPV, <i>L. pneumophila</i>	1	1.35
CoV HKU1, PIV3, RE	1	1.35	BoV, <i>M. catarrhalis</i> ,	1	1.35
BoV, Flu B, RE	2	2.70	<i>S. pneumoniae</i>		
BoV, PIV4, RSV	1	1.35	CoV OC43, <i>H. influenzae</i> ,	1	1.35
BoV, PIV2, RE	1	1.35	<i>M. pneumoniae</i>		
hMPV, PIV1, RE	1	1.35	<i>K. pneumoniae</i> ,	1	1.35
ADV, PIV3, RE	2	2.70	PIV3, <i>S. aureus</i>		
BoV, PIV3, RE	6	8.11	BoV, PIV4, RE	1	1.35
BoV, PIV1, RE	1	1.35	<i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , RE	2	2.70
hMPV, <i>M. pneumoniae</i> , RE	1	1.35	PEV, <i>S. pneumoniae</i> , RE	1	1.35
BoV, Flu A, RE	1	1.35	BoV, <i>S. aureus</i> , RE	1	1.35
BoV, CoV NL63, RE	2	2.70	ADV, <i>K. pneumoniae</i> , RSV	1	1.35
			CoV HKU1, <i>K. pneumoniae</i> ,	1	1.35
			<i>S. pneumoniae</i>		
			<i>K. pneumoniae</i> , <i>P. jirovecii</i> ,	1	1.35
			<i>S. aureus</i>		

ตารางที่ 6 รูปแบบการติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจแบบร่วม 4 ชนิดต่อจำนวนผู้ติดเชื้อร่วม 4 ชนิด ทั้งสิ้น 6 ราย

Co-infection (4-strains)	Number	(%)
CoV HKU1, Flu A, PIV4, RSV	1	16.67
ADV, PIV2, RSV, RE	1	16.67
ADV, hMPV, RSV, RE	1	16.67
Flu A, hMPV, RSV, RE	1	16.67
<i>C. pneumoniae</i> , Flu C, PIV2, RE	1	16.67
ADV, <i>B. parapertusis</i> , <i>P. jirovecii</i> , RE	1	16.67

รูปแบบการติดเชื้อก่อโรคร่วมกันแบบ 2 ชนิด 5 อันดับแรก ได้แก่ BoV และ RE, RSV และ RE, hMPV และ RE, ADV และ RE, และ PIV3 และ RE ร้อยละ 10.05, 8.47, 7.75, 6.17 และ 6.05 ตามลำดับ

โดยมีสาเหตุมาจากเชื้อก่อโรคสูงสุดใน 5 อันดับแรก ได้แก่ RE, BoV, RSV, hMPV และ ADV ร้อยละ 33.15, 11.11, 9.51, 8.15 และ 6.43 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2

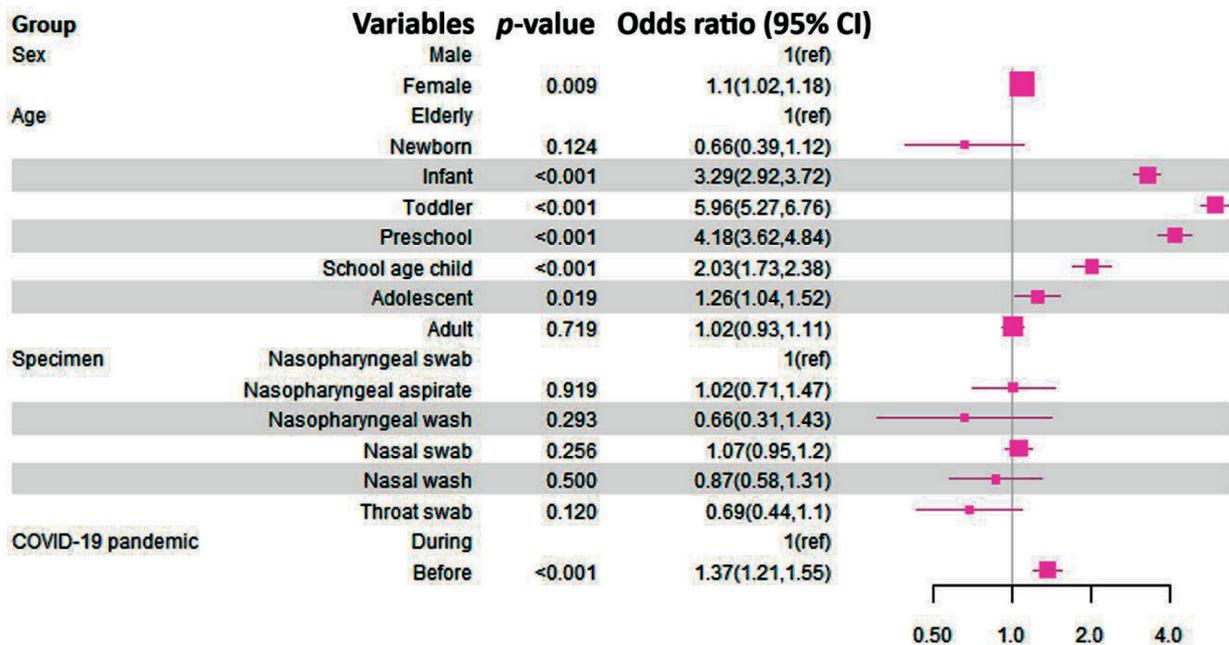


ภาพที่ 2 รูปแบบการติดเชื้อก่อโรคทางเดินหายใจร่วมกัน (Co-infection) แบบ 2 ชนิด

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจในผู้ป่วยทางเพศ พบว่าเพศหญิงมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเพศชาย ($p = 0.009$, OR = 1.1, 95% CI: 1.02-1.18) ปัจจัยด้านกลุ่มอายุ พบว่าในกลุ่มเด็กทารก เด็กวัยเตาะแตะ เด็กก่อนวัยเรียน และเด็กวัยเรียน มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้สูงอายุ โดยเฉพาะกลุ่มเด็กวัยเตาะแตะและกลุ่มเด็กก่อนวัยเรียน มีความเสี่ยงสูงอย่างชัดเจน (OR = 5.96, 95% CI: 5.27-6.76 และ OR = 4.18, 95% CI: 3.62-4.84) ตามลำดับ นอกจากนี้ในกลุ่มวัยรุ่น พบว่ามีความสัมพันธ์

กับการติดเชื้อก่อโรคอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ($p = 0.019$, OR = 1.26, 95% CI: 1.04-1.52) ในกลุ่มผู้สูงอายุ เด็กทารกแรกเกิด และผู้ใหญ่ไม่มีความสัมพันธ์การติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจ ดังแสดงในภาพที่ 3

ไม่พบสิ่งส่งตรวจทางคลินิกชนิดใดที่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) สำหรับการตรวจหาเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจในช่วงเวลาการแพร่ระบาดของ COVID-19 พบว่าก่อนการแพร่ระบาดของ COVID-19 มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบเชื้อก่อโรคในอัตราความเสี่ยงที่สูงกว่าช่วงที่มีการแพร่ระบาดของ COVID-19 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$, OR = 1.37, 95% CI: 1.21-1.55) ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงในผู้ป่วยที่ติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจ

วิจารณ์

จากการศึกษาข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาริบัติ ระหว่างวันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2555 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ. 2564 พบอัตราการติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจอยู่ที่ร้อยละ 39.00 ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Zhang J และคณะ⁽⁸⁾ ที่รายงานอัตราการติดเชื้อก่อโรคทางเดินหายใจร้อยละ 40.18 อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้แตกต่างจากการศึกษาของ Hong S และคณะ⁽⁹⁾ ที่ทำการศึกษาทางระบาดวิทยาในเมืองเซียงเหมิน สาธารณรัฐประชาชนจีน โดยพบอัตราการติดเชื้อสูงถึงร้อยละ 56.36

ผู้ป่วยส่วนใหญ่ในการศึกษานี้ติดเชื้อไวรัส ขณะที่การติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราพบในอัตราที่ต่ำกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chen J และคณะ⁽¹⁰⁾ ในโรงพยาบาลในเมืองเฉิงตู สาธารณรัฐประชาชนจีน ที่พบว่าเชื้อไวรัสเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ คิดเป็นร้อยละ 14.9 และสอดคล้องกับการศึกษาของ Sitthikarnkha P และคณะ⁽⁴⁾ ที่พบว่าเชื้อ Rhinovirus/Enterovirus เป็นสาเหตุสำคัญ โดยการศึกษาของ Klein EY และคณะ⁽¹¹⁾ รายงานว่า

เชื้อแบคทีเรียที่พบบ่อย เช่น *Streptococcus pneumoniae* และ *Staphylococcus aureus* มักเป็นการติดเชื้อซ้อนในผู้ป่วยไข้หวัดใหญ่ แต่มีอัตราเกิดขึ้นต่ำกว่าการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่เพียงชนิดเดียว ผลการศึกษานี้ไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Avendaño Carvajal L และคณะ⁽²⁾ และ Tregoning JS และ Schwarze J⁽⁷⁾ ซึ่งพบว่า RSV เป็นไวรัสหลักในผู้ป่วยเมื่อพิจารณาตามช่วงอายุ พบว่าเด็กเล็กโดยเฉพาะกลุ่มวัยเตาะแตะ เด็กก่อนวัยเรียน และทารก มีความชุกของการติดเชื้อสูงกว่ากลุ่มวัยอื่น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sitthikarnkha P และคณะ⁽⁴⁾ แต่แตกต่างจากการศึกษาของ File TM⁽¹⁾ ที่พบว่าผู้สูงอายุมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อสูงขึ้น การติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจมากกว่า 1 ชนิด พบได้ในอัตราร้อยละ 8.7 โดยพบเชื้อ Rhinovirus มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hong S และคณะ⁽⁹⁾ ในการศึกษาของ Babawale PI และ Guerrero-Plata A⁽¹²⁾ รายงานว่าการติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อไวรัสระบบทางเดินหายใจพบได้เฉลี่ยร้อยละ 10 ถึง ร้อยละ 20 ของผู้ป่วย และบางกรณีสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ในการศึกษาข้อมูลย้อนหลัง 10 ปี โดย

Krammer M และคณะ⁽¹³⁾ พบอัตราการติดเชื้อร่วมร้อยละ 7.3 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้ การศึกษาด้านกลุ่มเพศ พบผู้ป่วยเพศหญิงมีอัตราการติดเชื้อสูงกว่าเพศชาย ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Zhang J และคณะ⁽⁶⁾ ณ มณฑลซานตง สาธารณรัฐประชาชนจีน

การติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจสามารถพบได้ตลอดทั้งปี โดยมีความชุกสูงในเดือนกรกฎาคม ถึง กันยายน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sitthikarnkha P และคณะ⁽⁴⁾ ที่พบความชุกสูงในช่วงเดือนสิงหาคม ถึง ตุลาคมของทุกปี คิดเป็นร้อยละ 75.14 สอดคล้องกับการศึกษาของ Avolio M และคณะ⁽¹⁴⁾ ที่พบการระบาดของเชื้อไวรัสระบบทางเดินหายใจที่มีความสัมพันธ์กับฤดูฝน และความชื้นสัมพัทธ์ที่สูง ความชุกของการติดเชื้อลดลงในช่วงการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Avolio M และคณะ⁽¹⁴⁾ ที่รายงานว่ามีความชุกลดลงเนื่องจากประชาชนปฏิบัติตามมาตรการป้องกันโรค เช่น การเว้นระยะห่างทางสังคมและการสวมหน้ากากอนามัย การศึกษาของ Langford BJ และคณะ⁽¹⁵⁾ สนับสนุนผลการศึกษานี้ โดยชี้ว่ามาตรการควบคุมและป้องกันโรคโควิด 19 ช่วยลดอัตราการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจ ไม่พบว่ามีสิ่งส่งตรวจชนิดใดที่มีความจำเพาะสูงในการตรวจหาเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจ ดังนั้นจึงสามารถใช้ตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจได้หลากหลายชนิดตามความเหมาะสม โดยพิจารณาพร้อมกับปัจจัยด้านคุณภาพ การเก็บสิ่งส่งตรวจ วิธีการตรวจวิเคราะห์ และคำแนะนำจากบริษัทผู้ผลิตชุดทดสอบ

สรุป

การศึกษานี้พบว่าการติดเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจเฉียบพลัน ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อไวรัสโดยเฉพาะ Rhinovirus/Enterovirus ซึ่งพบมากในกลุ่มเด็กอายุ 1-6 ปี โดยเฉพาะเด็กวัยเตาะแตะ และเด็กก่อนวัยเรียน เพศหญิงมีอัตราการติดเชื้อสูงกว่าเพศชาย และช่วงเวลาที่มีการระบาดสูงสุด คือ เดือนกรกฎาคม ถึง กันยายนของทุกปี นอกจากนี้ยังพบเชื้อก่อโรคที่มีความสำคัญทางคลินิก เช่น RSV, Flu และ hMPV รวมถึงการติดเชื้อ

ก่อโรคระบบทางเดินหายใจแบบร่วมกันหลายชนิดได้ การตรวจวินิจฉัยสามารถใช้สิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจได้ทุกชนิด ในช่วงสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 พบว่าความชุกของเชื้อก่อโรคลดลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากมาตรการทางด้านสาธารณสุขในการป้องกันโรคที่เข้มงวด การศึกษานี้ช่วยเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับลักษณะการแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรคระบบทางเดินหายใจ และสนับสนุนการพัฒนาเครื่องมือวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพ เพื่อเตรียมความพร้อมรับมือการแพร่ระบาดที่อาจเกิดขึ้นได้ในอนาคตอย่างเป็นระบบ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล นพ.มงคลคุณากร รศ.ดร.บุษบา ฤกษ์อำนาจโชค ที่ส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณ ผศ.ดร.ธนรรด ชูจร ในการให้คำปรึกษาและความรู้ทางสถิติ และขอขอบคุณ พญ.ธีรรัตน์ กษกานต์ ที่ให้คำแนะนำการใช้งานโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ

เอกสารอ้างอิง

1. File TM. The epidemiology of respiratory tract infections. *Semin Respir Infect* 2000; 15(3): 184-94.
2. Avendaño Carvajal L, Perret Pérez C. Epidemiology of respiratory infections. In: Bertrand P, Sánchez I, editors. *Pediatric respiratory diseases: a comprehensive textbook*. Cham, Switzerland: Springer Nature; 2020. p. 263-72.
3. Spencer JA, Shutt DP, Moser SK, Clegg H, Wearing HJ, Mukundan H, et al. Distinguishing viruses responsible for influenza-like illness. *J Theor Biol* 2022; 545: 111145. (21 pages).
4. Sitthikarnkha P, Uppala R, Niamsanit S, Sutra S, Thepsuthammarat K, Techasatian L, et al. Epidemiology of acute lower respiratory tract infection hospitalizations in Thai children:

- a 5-year national data analysis. *Influenza Other Respir Viruses* 2022; 16(1): 142-50.
5. กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. รายงานผลการทบทวนสถานการณ์โรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจในประเทศไทย. [ออนไลน์]. นนทบุรี: กรมควบคุมโรค; 2564. [สืบค้นเมื่อ 15 ส.ค. 2568]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://ddc.moph.go.th/uploads/publish/1203820211217034553.pdf>.
 6. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานสถานการณ์สายพันธุ์เชื้อไวรัสระบบทางเดินหายใจในประเทศไทย [ออนไลน์]. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2568. [สืบค้นเมื่อ 15 ส.ค. 2568]. เข้าถึงได้จาก: URL: https://www.plandmsc.com/images/2025/3_ประชุมกรม_ครั้งที่_3_2568/7.4_-_สวส_เอกสารแนบ_เรื่อง_1_เอกสารประกอบ_รายงานสถานการณ์.pdf.
 7. Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(1): 74-98.
 8. Zhang J, Yang T, Zou M, Wang L, Sai L. The epidemiological features of respiratory tract infection using the multiplex panels detection during COVID-19 pandemic in Shandong province, China. *Sci Rep* 2023; 13: 6319. (8 pages).
 9. Hong S, Li D, Wei Y, Zheng Y, Cai J, Zheng H, et al. Epidemiology of respiratory pathogens in patients with acute respiratory tract infection in Xiamen, China: a retrospective survey from 2020 to 2022. *Heliyon* 2023; 9(11): e22302. (10 pages).
 10. Chen J, Hu P, Zhou T, Zheng T, Zhou L, Jiang C, Pei X. Epidemiology and clinical characteristics of acute respiratory tract infections among hospitalized infants and young children in Chengdu, West China, 2009-2014. *BMC Pediatr* 2018; 18: 216. (8 pages).
 11. Klein EY, Monteforte B, Gupta A, Jiang W, May L, Hsieh YH, et al. The frequency of influenza and bacterial coinfection: a systematic review and meta-analysis. *Influenza Other Respir Viruses*. 2016; 10(5): 394-403.
 12. Babawale PI, Guerrero-Plata A. Respiratory viral coinfections: insights into epidemiology, immune response, pathology, and clinical outcomes. *Pathogens* 2024; 13(4): 316. (13 pages).
 13. Krammer M, Hoffmann R, Ruf HG, Neumann AU, Traidl-Hoffmann C, Goekkaya M, et al. Ten-year retrospective data analysis reveals frequent respiratory co-infections in hospitalized patients in Augsburg. *iScience* 2024; 27(6): 110136. (12 pages).
 14. Avolio M, Venturini S, De Rosa R, Crapis M, Basaglia G. Epidemiology of respiratory virus before and during COVID-19 pandemic. *Infez Med* 2022; 30(1): 104-8.
 15. Langford BJ, So M, Raybardhan S, Leung V, Westwood D, MacFadden DR, et al. Bacterial co-infection and secondary infection in patients with COVID-19: a living rapid review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 2020; 26(12): 1622-9.

A Ten-Year Retrospective Study on Patterns of Pathogens in Acute Respiratory Tract Infection at Ramathibodi Hospital, Thailand

**Kingkan Rakmanee, Treewat Watthanachokchai, Pichet Yutthanakarnwikom,
and Ekawat Pasomsub**

*Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok
10400, Thailand*

ABSTRACT Respiratory pathogens are a major cause of morbidity and mortality worldwide, especially among young children. This study analyzed data from Nucleic Acid Amplification Tests (NATs) conducted by the Virology Laboratory, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Thailand, between January 1, 2012, and December 31, 2021. Out of 16,976 patients, respiratory pathogens were detected in 6,619 cases (38.99%). The pathogens included bacteria, fungi, and viruses, accounting for 3.35%, 0.84%, and 95.81%, respectively. The majority of viral infections were caused by the most prevalent pathogens, including Rhinovirus/Enterovirus (37.50%), Respiratory Syncytial Virus (12.18%), and Influenza A virus (9.08%). The highest prevalence was observed among toddlers, pre-school children, and infants (70.58%, 61.55%, and 56.42%, respectively). Females showed a significantly higher risk of infection compared to males ($p = 0.009$, OR = 1.1, 95% CI: 1.02–1.18). Toddlers had the highest risk ($p < 0.001$, OR = 5.96, 95% CI: 5.27–6.76). Infections were most common from July to September. Specifically, before the COVID-19 outbreak, the infection rate was higher than during the COVID-19 pandemic ($p < 0.001$, OR = 1.37, 95% CI: 1.21–1.55). Respiratory infections affected individuals across all ages and genders and were not limited to specific seasons. This study's findings highlight the importance of developing laboratory diagnostic and patient management guidelines in line with WHO recommendations to reduce illness and mortality from respiratory infections.

Keywords: Acute respiratory tract infection, Respiratory pathogens, Respiratory pathogens co-infection

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอบาร์โคดในการตรวจยืนยัน อาหารเป็นพิษจากเห็ดสกุล *Amanita* ที่ไม่สร้างสารพิษอะมานิติน

พรพรรณ ชลนาจิกกุล สิทธิพร ปานเม่น ณิชกานต์ หนูรุ่ง ชิตกมล ทูลคำรักษ์ ศรีประภา ภัสรพงษ์กุล
อัญชลี นิตมา สุจิตรา ลิกพันธ์ ชุติมณูชู้ อุตวิชัย รุ่งแสง จันทรคุณาสุชะ นิสากร ปาละกุล และ
ดุษฎี พลภัทรพิเศษกุล

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพญา 11000

บทคัดย่อ อาหารเป็นพิษจากการรับประทานเห็ดพิษในสกุล *Amanita* ที่สร้างสารพิษอะมานิติน ส่งผลให้เกิดสภาวะตับและไตวายซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิต นอกเหนือจากเห็ดพิษชนิดที่สร้างสารพิษดังกล่าวแล้วยังพบสาเหตุการเสียชีวิตจากเห็ดพิษในสกุล *Amanita* ที่ไม่สร้างสารพิษอะมานิตินได้เช่นกัน ดังนั้นเพื่อระบุชนิดเห็ดที่ก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษในสกุล *Amanita* ที่ไม่สร้างสารพิษอะมานิตินแต่ทำให้เกิดการเสียชีวิต จึงมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) ของยีน Ribosomal DNA ร่วมกับการวิเคราะห์ Phylogenetic Tree ผลการวิเคราะห์สามารถระบุชนิดตัวอย่างเห็ดที่เหลือจากการรับประทานของผู้ป่วย โดยการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI GenBank และแผนภาพ Phylogenetic Tree พบว่าตัวอย่างเห็ดมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ร้อยละ 88.69-89.77 กับ *Amanita echinocephala* ใน section *Lepidella* เมื่อยืนยันความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยแผนภาพ Phylogenetic Tree พบว่าตัวอย่างเห็ดจากกรณีอาหารเป็นพิษนี้อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *A. echinocephala* ที่คำรองระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 80 และพบความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งบ่งชี้ว่าอาจเป็นเห็ดชนิดใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานการพบในประเทศไทยมาก่อน ผู้ป่วยที่รับประทานเห็ดชนิดนี้แสดงอาการพิษคล้ายกับผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษอะมานิติน แต่มีระยะแสดงอาการพิษนานกว่าและเสียชีวิตเนื่องจากสภาวะเลือดเป็นกรดและภาวะหัวใจล้มเหลว

คำสำคัญ: เห็ดสกุล *Amanita*, เห็ดพิษ, อะมานิติน, ดีเอ็นเอบาร์โคด

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

Received: 20 June 2025

Revised: 4 November 2025

Accepted: 11 November 2025

บทนำ

มีรายงานการเสียชีวิตจากการรับประทานเห็ดพิษในประเทศไทยทุกปี⁽¹⁾ โดยพบว่ามากกว่าร้อยละ 90 ของการเสียชีวิตจากการรับประทานเห็ดในประเทศไทยเกิดจากการรับประทานเห็ดสกุล *Amanita*⁽²⁾ ทั้งนี้เห็ดในสกุล *Amanita* มีได้เป็นเห็ดพิษทั้งหมด ยังมีบางชนิดที่รับประทานได้และเป็นที่ยอมรับในท้องถิ่น โดยเห็ดในกลุ่มที่รู้จักกันดีและนิยมขายในตลาดชุมชนท้องถิ่น ได้แก่ เห็ดระโงกหรือเห็ดไข่ห่าน เช่น เห็ดระโงกขาว (*A. princeps*) ที่มีลักษณะหมวกเห็ดสีขาว เรียบ ไม่มีสะเก็ดหยาบ มีริ้วซี่หวีที่ขอบหมวกในทุกๆ ระยะของเห็ด และก้านดอกกลวงตลอดแนว ซึ่งลักษณะการพบริ้วคล้ายซี่หวีที่ขอบหมวกจะไม่พบในกลุ่มเห็ดระโงกพิษ เช่น เห็ดระโงกขาวพิษ (*A. exitialis*)⁽³⁾

เห็ดในสกุล *Amanita* แบ่งออกเป็น 3 สกุลย่อย (subgenera) และ 11 หมวด (section) คือ สกุลย่อย *Amanita*, *Amanitina* และ *Lepidella* โดยสกุลย่อย *Amanita* ประกอบด้วย 4 หมวด คือ *Amanita*, *Amarrendiae*, *Caesareae* และ *Vaginatae* สกุลย่อย *Amanitina* ประกอบด้วย 6 หมวด คือ *Amidella*, *Arenariae*, *Phalloideae*, *Roanokenses*, *Strobiliformes* และ *Validae* สกุลย่อย *Lepidella* ประกอบด้วย 1 หมวด คือ *Lepidella*^(4,5) โดยเห็ดที่มีการสร้างสารพิษในกลุ่ม amatoxins และ phallotoxins อยู่ใน section *Amanita* เช่น *A. gleocystidioides* และ section *Phalloideae* เช่น *A. brunneitoxicaria*, *A. exitialis*, *A. fuliginea* และ *A. phalloides*⁽⁶⁾ สารพิษหลักที่พบในกลุ่มเห็ดพิษสกุล *Amanita* ที่เป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิต ได้แก่ สารพิษอะมานิติน (*Amanitin*) ซึ่งเป็นสารพิษที่มีความเป็นพิษสูงและทนความร้อน⁽⁷⁾ สารพิษชนิดนี้สามารถพบได้ในเห็ดพิษหลายสกุล เช่น *Amanita* (*Amanitaceae*), *Galerina* (*Hymenogastraceae*) และ *Lepiota* (*Agaricaceae*)⁽⁸⁾ สารพิษนี้มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *RNA Polymerase II* (*Pol II*) จึงรบกวนการสังเคราะห์โปรตีนที่มีความจำเป็นต่อการทำงานของอวัยวะต่างๆ ภายในร่างกายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในตับและไต ซึ่งเป็นสารหลักที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตจากเห็ดพิษกลุ่มนี้⁽⁹⁾ อาการพิษจากการรับประทานเห็ดพิษในกลุ่มนี้จะแสดง

อาการ 2 ระยะ คือ ระยะแรกของการได้รับพิษจะแสดงอาการภายใน 4-6 ชั่วโมง โดยผู้ป่วยมีอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย และระยะที่สองเกิดหลังจากการได้รับพิษ 12 ชั่วโมง ผู้ป่วยมักมีอาการตับและไตวาย เนื่องจากเซลล์จำนวนมากถูกทำลายและเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้⁽¹⁰⁻¹²⁾ นอกจากนี้ยังมีสารพิษกลุ่ม Neurotoxins ที่ส่งผลโดยตรงต่อระบบประสาทส่วนกลาง เช่น สาร Ibotenic acid และสาร Muscimol ที่มีการตรวจพบได้ในเห็ด เช่น *Amanita digitosa*, *Amanita ibotengutake* และ *Amanita muscaria* โดยผู้ป่วยที่รับประทานเห็ดพิษกลุ่มนี้จะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน เวียนศีรษะ เพื่อ สับสน และอ่อนเพลีย^(12,13) นอกจากนี้เห็ดพิษสกุล *Amanita* ที่สร้างสารพิษทั้ง 2 กลุ่มดังกล่าวข้างต้นแล้ว ในการศึกษาขั้นนี้ยังพบว่ามีเห็ดสกุล *Amanita* ที่ไม่ทราบชนิดและตรวจไม่พบสารพิษทั้ง 2 กลุ่ม แต่ส่งผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตจากภาวะตับและไตวาย

การตรวจยืนยันชนิดของสิ่งมีชีวิตในปัจจุบันมีการนำเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โคด (DNA barcode) มาใช้ โดยการศึกษาข้อมูลนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ ขนาดประมาณ 500-800 bp ของบริเวณที่มีความแปรผันระหว่างสปีชีส์สูง ซึ่งมีประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต จึงถูกนำมาใช้ศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตและใช้ในการค้นพบสิ่งมีชีวิตสปีชีส์ใหม่ ๆ⁽¹⁴⁾ บริเวณของนิวคลีโอไทด์ที่นิยมใช้ในการระบุชนิดของเห็ดราและใช้ในการศึกษานี้คือ บริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) ที่อยู่ระหว่างยีนที่มีการถอดรหัสของไรโบโซมขนาด 40S (18S) และขนาด 60S (5.8S และ 28S) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลักษณะจำเพาะและมีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง จึงสามารถนำมาใช้ในการระบุชนิดของเห็ดราได้^(10,15) ยีนในกลุ่ม *MSDIN* จะถูกแปลรหัสเป็นสารพิษอะมานิติน ประกอบด้วย เปปไทด์ที่มีความแปรปรวนสูง (highly variable peptide)^(9,10,13) ที่รวมตัวกันเป็นวงเปปไทด์ เรียกว่า core peptide กับบริเวณอนุรักษ์ (conserved regions) 2 ส่วน ได้แก่ เปปไทด์ส่วนต้น 10 กรดอะมิโน และเปปไทด์ส่วนปลาย 17 กรดอะมิโน รวมกันเป็นเปปไทด์ขนาด 33-37 กรดอะมิโน⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ จากนั้นเปปไทด์ที่ได้จะถูกปรับเปลี่ยนเพิ่มเติมด้วยกระบวนการสร้างวงแหวน (cyclization) อย่างไรก็ตามจะไม่พบยีนในกลุ่ม *MSDIN* ในเชื้อรา

ที่ไม่สร้างสารพิษอะมานิติน⁽⁶⁾ การตรวจยีน *MSDIN* ที่บ่งชี้การสร้างสารอะมานิตินในการศึกษานี้มีการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อ core peptide ชนิด แอลฟา-อะมานิติน (alpha-amanitin) และ เบตา-อะมานิติน (beta-amanitin) ซึ่งเป็น core peptide ที่พบมากที่สุด^(6,19) การศึกษาในครั้งนี้ มุ่งเน้นระบุชนิดเห็ดที่ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษในสกุล *Amanita* ที่ไม่สร้างสารพิษอะมานิติน ซึ่งทำให้เกิดการเสียชีวิตในปี พ.ศ. 2566 โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โคดของเชื้อราบริเวณ ITS ของยีน ribosomal DNA ในการตรวจยืนยันชนิดของเห็ดและการตรวจยีน *MSDIN* ที่สร้างสารอะมานิติน^(10,19)

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างเห็ด

ตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหารนำส่งพร้อมผู้ป่วยจากสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 จังหวัดอุบลราชธานี โดยผู้ป่วยต้องสงสัยอาการอาหารเป็นพิษจากการรับประทานเห็ดในสกุล *Amanita* ในปี พ.ศ. 2566 จำนวน 2 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ตัวอย่างหมายเลข D705 (GenBank accession number: PX593710) และ D706 (GenBank accession number: PX593711)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างเห็ด

จำแนกชนิดของตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหาร โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพิจารณาจากลักษณะภายนอก (macroscopic) เช่น รูปร่าง ขนาด สีของหมวกเห็ด ครีบ ก้าน โคนก้าน และลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ (microscopic) เช่น รูปร่าง ขนาด สีของเบสิดิโอสปอร์ cystidia และทำการทดสอบคุณสมบัติอะไมลอยด์ (amyloidity) ของเบสิดิโอสปอร์ด้วยวิธี Lugol's iodine โดยการย้อมเบสิดิโอสปอร์ด้วย iodine solution เพื่อดูการติดสีที่ผนังเบสิดิโอสปอร์⁽²⁰⁾ จากนั้นเปรียบเทียบลักษณะที่พบกับฐานข้อมูลหรือเอกสารจำแนกชนิดเห็ด (Keys) เพื่อระบุชนิดเห็ด⁽²¹⁾

การสกัดดีเอ็นเอตัวอย่าง

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA; gDNA) จากตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหารและใช้ชุดสกัด

DNeasy[®] Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) โดยบดเห็ดสดปริมาณ 100 มิลลิกรัม ผสมกับ Lysis buffer จากนั้นบ่มในอ่างน้ำร้อน (Memmert, Germany) ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 30 นาที ทำการกำจัด RNA ด้วยเอนไซม์ *RNase A* และทำให้ดีเอ็นเอที่จับกับ Silica membrane บริสุทธิ์ด้วย Wash buffer ที่มีส่วนประกอบของ Absolute ethanol จากนั้นละลายดีเอ็นเอที่ได้ด้วย Nuclease-free water และเก็บ gDNA ในตู้แช่แข็ง (Severin/MDC9859, Germany) อุณหภูมิ -20°C สำหรับการศึกษต่อไป

การเพิ่มปริมาณบริเวณ ITS ของยีน Ribosomal DNA และการตรวจยีน *MSDIN* ที่บ่งชี้การสร้างสารอะมานิติน

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของยีน ribosomal DNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ ประกอบด้วย ITS1F 5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3'⁽²²⁾ และ ITS4 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'⁽²³⁾ และปฏิกิริยา PCR มีปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย OnePCR[™] fluorescence dye (GeneDirect[®], South Korea) 9.5 ไมโครลิตร Nuclease-free H₂O 9.5 ไมโครลิตร 10 μM ของไพรเมอร์แต่ละคู่ 2.5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอตัวอย่าง 1.0 ไมโครลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดเข้าเครื่อง SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystem, USA) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้ Denaturation ที่ 94°C 45 วินาที Annealing ที่ 55°C 45 วินาที Extension ที่ 72°C 1.30 นาที และ Final extension ที่ 72°C 10 นาที โดยทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 34 รอบ^(6,24) จากนั้นทำการตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (2% (w/v) agarose gel) โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และทำ PCR product ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปก่อนนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *MSDIN* ที่สร้างสารอะมานิตินใช้ไพรเมอร์จำเพาะ ประกอบด้วย ABAEmsdin-F: 5' -ATG TCT GAY RTC AAY RCY RCY CGT TYC -3'⁽⁶⁾ และ Reverse primer 5'

-CCA AGC CTR AYA WRG TCM ACA AC-3'⁽¹⁹⁾ ทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย OnePCR™ fluorescence dye 9.5 ไมโครลิตร Nuclease-free H₂O 9.5 ไมโครลิตร 10 μM ของไพรเมอร์แต่ละคู่ 2.5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอตัวอย่าง 1.0 ไมโครลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดเข้าเครื่อง SimpliAmp Thermal Cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้ Denaturation ที่ 94°C 30 วินาที Annealing ที่ 51°C 30 วินาที Extension ที่ 72°C 30 วินาที และ Final extension ที่ 72°C 10 นาที โดยทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 33 รอบ^(6,24) จากนั้นทำการตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (2% (w/v) agarose gel) โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน, Positive control ซึ่งได้จากการสกัดดีเอ็นเอจากเห็ด *Amanita exitialis* ที่ตรวจพบยีนกลุ่ม *MSDIN* ที่สร้างสารอะมานิตินและ Negative control ซึ่งได้จากการสกัดดีเอ็นเอจากเห็ด *Chlorophyllum molybdites* ที่ไม่สร้างสารอะมานิติน

การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ Fungal DNA barcode

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของยีน Ribosomal DNA ซึ่งเป็น DNA barcode สำหรับระบุชนิดของเห็ดรา ประกอบด้วย บริเวณ internal transcribe spacer 1 ที่อยู่ระหว่างยีน 18S และยีน 5.8S ของไรโบโซม และ internal transcribe spacer 2 ที่อยู่ระหว่างยีน 5.8S และยีน 28S ของไรโบโซม⁽¹⁰⁾ จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ที่ได้จากตัวอย่างหมายเลข D705 และ D706 มาเปรียบเทียบกับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล rRNA/ITS databases ของ GenBank NCBI ภายใต้อัลกอริทึม BLASTN ซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ได้จะถูกแสดงออกมาในรูปแบบร้อยละ (%) ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล

สืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเห็ดพิษสกุล *Amanita* ทั้ง 3 สกุลย่อย (subgenera) ประกอบด้วย เห็ดทั้งหมด 11 หมวด (section) จำนวน

23 ข้อมูล จากฐานข้อมูล NCBI GenBank ตามที่มีรายงานอ้างอิงของการเกิดสถานการณ์อาหารเป็นพิษจากการรับประทานเห็ด^(5,10,11) มาทำ DNA sequence alignment เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล โดยใช้วิธี Maximum likelihood (ML) โดยโปรแกรม IQ-Tree จาก <http://www.iqtree.org/> โมเดล General Time-Reversible (GTR) และ Rate Heterogeneity แบบ Gamma Model จากนั้นทำการทดสอบความเชื่อมั่นของเคลด (clade) ด้วยวิธี ML โดยอาศัยกระบวนการทางสถิติ Bootstrap analysis จำนวน 1,000 ซ้ำเพื่อวิเคราะห์ค่าความน่าจะเป็นสูงสุดและประมวลผลเป็นแผนภาพ Phylogenetic Tree โดยเคลดที่มีค่า Bootstrap (BS) มากกว่าร้อยละ 70 ถือว่ามีความเชื่อมั่นที่ดี และใช้โปรแกรม FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) แสดงแผนภาพ Phylogenetic Tree

การคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเห็ดพิษสกุล *Amanita* ทั้ง 3 สกุลย่อย (subgenera) ประกอบด้วย เห็ดทั้งหมด 11 หมวด (section) จำนวน 23 ข้อมูล จากฐานข้อมูล NCBI GenBank^(5,10,11) มาสร้าง DNA sequence alignment โดยใช้โปรแกรม Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE) Alignment และศึกษาระยะห่างทางพันธุกรรม ภายใต้อัลกอริทึม ClustVis (<http://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) โดยแสดงผลแบบ Heatmap ที่มีการไล่เฉดสีแบบ Sequential Palette จากค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ค่าต่ำไปหาค่าสูง⁽²⁵⁾

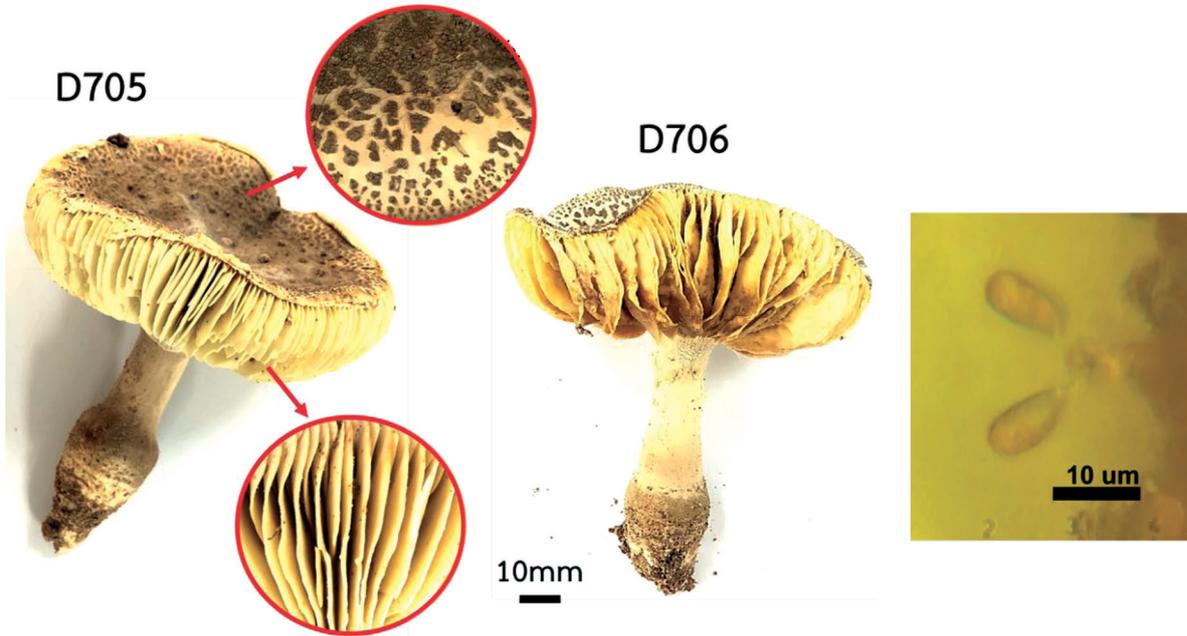
ผล

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดตัวอย่าง

ตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหาร หมายเลข D705 และ D706 ที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตจากการรับประทาน มีลักษณะหมวกเห็ดทรงแบน เว้ากลาง สีเทาอมน้ำตาล บนหมวกเห็ดมีเกล็ดแหลมสีเทาอมน้ำตาล ครีบเรียงตัวห่างกันสีเหลืองอ่อน ก้านเห็ดเรียบ

สีเทาอมน้ำตาล และโคนก้านมีทรงรี สปอร์ทรงรี ผิวเรียบ ขนาด $(9.0-10.0) \times (5.0-6.5) \mu\text{m}$ ดังแสดงในภาพที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบกับเอกสารจำแนกชนิดเห็ด พบว่า ตัวอย่างเห็ดทั้ง 2 หมายเลข มีความใกล้เคียงกับเห็ด *Amanita fritillaria* ซึ่งจัดอยู่ใน section *Validae*⁽⁵⁾ แต่ยังคงพบว่าตัวอย่างเห็ดมีความแตกต่างจาก *A. fritillaria*

ที่เคยมีรายงานการพบทางภาคเหนือของประเทศไทย ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2551 มีลักษณะ ดังแสดงในตารางที่ 1 นอกจากนี้พบว่าตัวอย่างเห็ดทั้งสองมีลักษณะทาง สันฐานวิทยาแตกต่างจากเห็ด *Amanita echinocephala* ซึ่งจัดอยู่ใน section *Lepidella*⁽⁴⁾ มีลักษณะ ดังแสดง ในตารางที่ 1



ภาพที่ 1 ตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหารหมายเลข D705 (ซ้าย) และ D706 (กลาง) และลักษณะ สปอร์ของตัวอย่างเห็ดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ขวา)

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสันฐานวิทยาของเห็ดเปรียบเทียบกับตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหาร

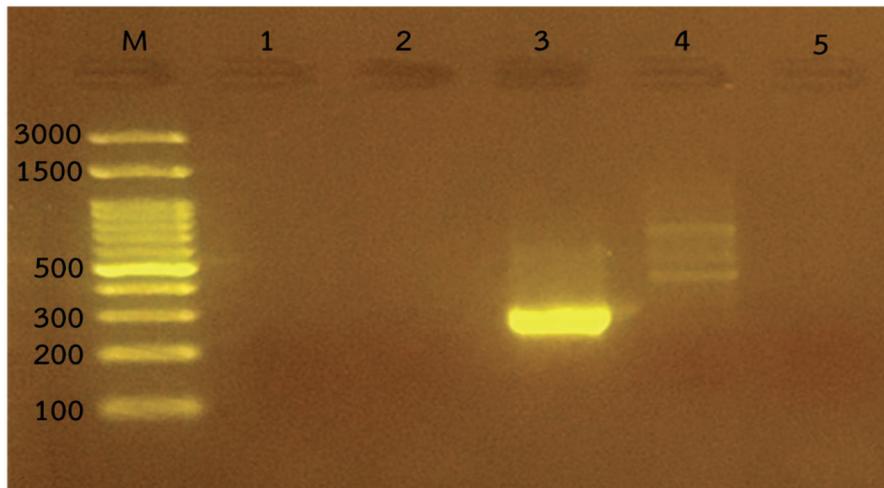
ชนิดเห็ด	หมวก (Pileus)	ครีบ (Lamellae)	ก้าน (Stipe)	สปอร์ (Basidiospores)
<i>Amanita fritillaria</i> ⁽²¹⁾	หมวกเห็ดทรงแบน สีน้ำตาลอมเทา ผิวหมวก มีเกล็ดสีน้ำตาลดำ	ครีบเรียงตัวถี่ สีขาวครีม	ก้านเรียบ สีขาวอมเทา โคนก้านทรงกลม	สปอร์ทรงรีกว้างถึง ทรงรี ขนาด $(6.5-10) \times (5-8.5) \mu\text{m}$
<i>Amanita echinocephala</i> ⁽²⁶⁾	หมวกเห็ดทรงขามคว่ำ เรียบ สีขาวหรือครีม ผิวหมวกมีเกล็ดแหลม สีขาวครีม	ครีบเรียงตัวห่างกัน สีครีมขาว	ก้านไม่เรียบ สีขาวครีม โคนก้านบวมทรงแหลม	สปอร์ทรงรีผิวเรียบ ขนาด $(9.5-11.5) \times (6.5-8) \mu\text{m}$
<i>Amanita</i> spp. (D705 และ D706)	หมวกเห็ดทรงแบนเว้ากลาง สีเทาอมน้ำตาล ผิวหมวก มีเกล็ดแหลม สีเทาอมน้ำตาล	ครีบเรียงตัวห่างกัน สีเหลืองอ่อน	ก้านเรียบ สีเทาอมน้ำตาล โคนก้านทรงรี	สปอร์ทรงรีผิวเรียบ ขนาด $(9.0-10.0) \times (5.0-6.5) \mu\text{m}$

การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ Fungal DNA Barcode

เพื่อระบุชนิดของตัวอย่างเห็ด จึงทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างเห็ดบริเวณ ITS ซึ่งเป็นดีเอ็นเอบาร์โคดที่นิยมใช้ในการระบุชนิดของเห็ดรา โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งจะได้ PCR product บริสุทธิ์ที่มีขนาดประมาณ 700 bp และทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank^(5,10,11) โดยใช้ BLASTN พบว่าตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหารหมายเลข D705 และ D706 มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับเห็ด

Amanita echinocephala (MH603602.1) มากที่สุด ด้วยความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 89.77 และ 88.69 ตามลำดับ

การตรวจยีน *MSDIN* ที่บ่งชี้การสร้างสารอะมานิติน เมื่อทำการตรวจหายีน *MSDIN* โดยวิธี PCR ในเห็ดตัวอย่างหมายเลข D705 และ D706 พบว่าตรวจไม่พบยีน *MSDIN* ซึ่งผลบวกของยีน *MSDIN* ที่สร้างสารอะมานิตินมีขนาดประมาณ 300 base pair ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ผลปฏิบัติการ PCR ของยีน *MSDIN* (ที่บ่งชี้การสร้างสารอะมานิติน) วิเคราะห์ผลด้วย 2% agarose gel electrophoresis (Lane M: DNA Marker, Lane 1-2: ตัวอย่างเห็ดจากสถานการณ์อาหารเป็นพิษ หมายเลข D705 และ D706 ตามลำดับ, Lane 3: Positive control จากเห็ดที่ตรวจพบยีนกลุ่ม *MSDIN* ที่สร้างสารอะมานิติน, Lane 4: Negative control) จากเห็ด *Chlorophyllum molybdites* ที่ไม่สร้างสารอะมานิติน และ Lane 5: Blank (Nuclease free water)

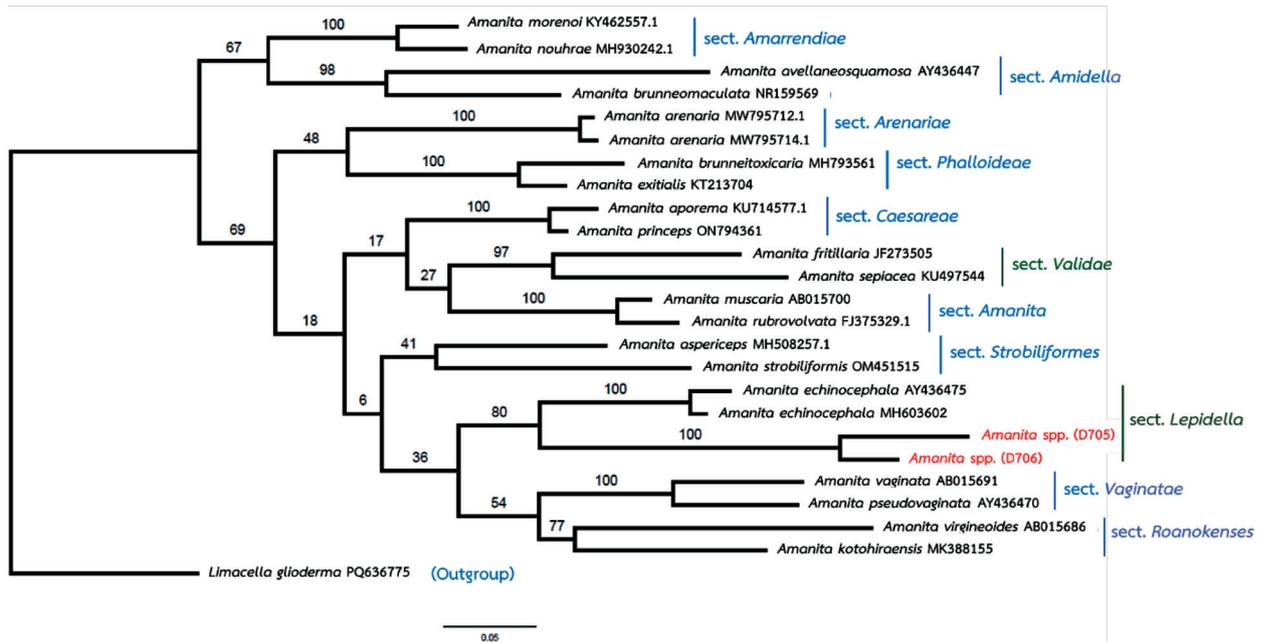
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ Phylogenetic Tree

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหารหมายเลข D705 และ D706 พบว่าตัวอย่างเห็ดทั้ง 2 หมายเลขมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับเห็ด *Amanita fritillaria* ซึ่งจัดอยู่ใน section *Validae*⁽⁵⁾ แต่จากการศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของยีน Ribosomal DNA พบว่าตัวอย่างเห็ดทั้ง 2 หมายเลขมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับเห็ด *Amanita*

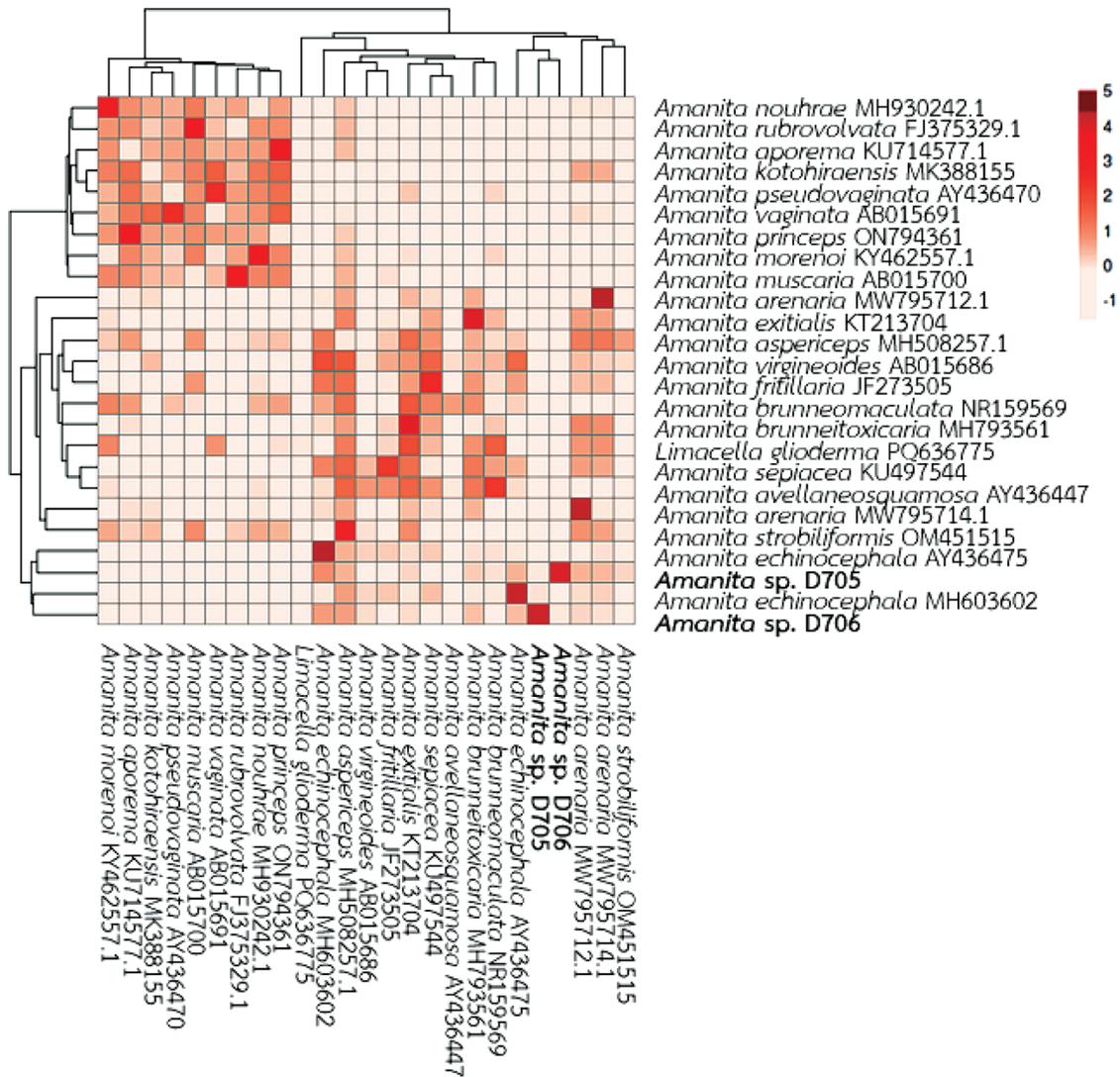
echinocephala ที่จัดอยู่ใน section *Lepidella*⁽⁴⁾ จึงทำการสืบค้นข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเห็ดพิษ *Amanita* ทั้ง 3 สกุลย่อย (subgenera) ประกอบด้วย เห็ดทั้งหมด 11 หมวด (section) จำนวน 23 สายพันธุ์ จากฐานข้อมูล GenBank NCBI^(5,10,11) ตามที่มีรายงานการเกิดสถานการณ์อาหารเป็นพิษจากการรับประทานเห็ดดังกล่าว นำมาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลด้วยวิธี Maximum Likelihood (ML) และคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของตัวอย่าง

เห็ดพิษสกุล *Amanita* ที่ไม่สร้างสารพิษอะมานิติน ทั้ง 2 ตัวอย่าง โดยมี DNA sequence alignment ของนิวคลีโอไทด์ความยาว 734 ตำแหน่ง พบว่าการวิเคราะห์การจัดกลุ่มความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล ตัวอย่างเห็ดจากสถานการณ์อาหารเป็นพิษจากทั้งสองตัวอย่างหมายเลข D705 และ D706 จับกลุ่มกับเห็ด *Amanita echinocephala* ที่ระดับความเชื่อมั่น

ร้อยละ 80 ดังแสดงในภาพที่ 3 ให้ผลสอดคล้องกับผลของระยะห่างทางพันธุกรรมที่แสดงให้เห็นว่ามีความใกล้เคียงกับ *Amanita fritillaria* น้อยกว่า *Amanita echinocephala* ซึ่งแสดงโดย Heatmap สีชมพูอ่อน (แถบสีช่วง -1 ถึง 0) และ Heatmap สีแดงอ่อน (แถบสีช่วง 1 ถึง 2) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 3 แผนภาพ Phylogenetic Tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเห็ดตัวอย่าง *Amanita* spp. (D705) และ *Amanita* spp. (D706) เปรียบเทียบกับเห็ดพิษ *Amanita* ทั้ง 3 สกุลย่อย (subgenera) จำนวน 23 สายพันธุ์ จากฐานข้อมูล GenBank NCBI^(5,10,11) ตัวเลขเหนือกิ่ง Phylogenetic Tree แสดงถึงค่ารองรับความเชื่อมั่นเคลตคำนวณด้วยวิธีทางสถิติแบบ Bootstrap analysis (BS) ความยาวกิ่ง (branch length) เท่ากับ 0.05 หมายถึง มีความแตกต่างของลำดับพันธุกรรมประมาณ 5% หรือ 0.05 การเปลี่ยนแปลงต่อตำแหน่ง (substitution per site)



ภาพที่ 4 ผลการวิเคราะห์ Heatmap ของระยะห่างทางพันธุกรรมของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหารและจากฐานข้อมูล NCBI GenBank^(5,10,11) และใช้โปรแกรม ClustVis⁽²⁵⁾ โดยมีการไล่เฉดสีแบบ Sequential Palette จากค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำที่ถูกแสดงเป็น Heatmap สีอ่อน ไปหาค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงที่ถูกแสดงเป็น Heatmap สีเข้ม

วิจารณ์

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหารหมายเลข D705 และ D706 มีความคาบเกี่ยวระหว่างเห็ด *Amanita fritillaria* (เป็นชนิดที่ไม่มีรายงานการเกิดพิษ) ซึ่งจัดอยู่ใน section *Validae*⁽⁵⁾ ที่เคยมีรายงานการพบทางภาคเหนือของประเทศไทยครั้งแรกในปี พ.ศ. 2551 และเห็ด *Amanita echinocephala* ซึ่งจัดอยู่ใน section *Lepidella*⁽⁴⁾ โดยเป็นเห็ดที่ไม่เคยมีรายงานการพบในประเทศไทย

และไม่มีรายงานการเกิดพิษ แต่เป็นเห็ดที่มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS รวมทั้งความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล Phylogenetic Tree และระยะห่างทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับตัวอย่างเห็ดทั้ง 2 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเห็ดทั้ง 2 มีโอกาสจะเป็นเห็ดชนิดใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานการพบมาก่อนในประเทศไทย ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเห็ดทั้ง 2 หมายเลข D705 และ D706 ที่มีความเหมือนของ

ลำดับนิวคลีโอไทด์กับเห็ด *Amanita echinocephala* (MH603602.1) ร้อยละ 89.77 และ 88.69 ตามลำดับ เห็ดชนิดนี้ไม่มีรายงานการเป็นชนิดซับซ้อน (Species complex) ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน แต่มีความใกล้เคียงกันของลักษณะทางพันธุกรรม และ ชนิดซ่อนเร้น (Cryptic species) ซึ่งมีลักษณะทาง สัณฐานวิทยาเหมือนหรือคล้ายคลึงกันมากไม่สามารถ แยกได้ด้วยตาเปล่า แต่พบว่ามีความแตกต่างของลักษณะ ทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน⁽²⁷⁾

ปัจจุบันคำที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์เชื้อราที่ คาดว่าเป็นชนิดใหม่ใช้ค่าความเหมือนของลำดับ นิวคลีโอไทด์น้อยกว่าร้อยละ 97 ในกรณีที่พบค่าความ เหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของยีน Ribosomal DNA มากกว่าร้อยละ 97-100 จะบ่งชี้ ความเหมือนของสายพันธุ์เชื้อรา⁽²⁸⁾ อย่างไรก็ตามการ ระบุชนิดเห็ดในปัจจุบันใช้หลักการทางอนุกรมวิธานแบบ โพลีฟาสิก (polyphasic taxonomy) โดยพิจารณาจาก ลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับการวิเคราะห์ข้อมูล ทางพันธุกรรม ซึ่งจากข้อมูลนี้ภายใต้หลักเกณฑ์การศึกษา พบว่าตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหาร จำนวน 2 ตัวอย่าง หมายเลข D705 และ D706 มีลักษณะทาง สัณฐานวิทยาคาบเกี่ยวระหว่างเห็ดใน section *Validae* และ section *Lepidella* จากข้อมูลการวิเคราะห์ความ สัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและระยะห่างทางพันธุกรรม ยืนยันความใกล้เคียงของตัวอย่างเห็ดดังกล่าวกับเห็ด *A. echinocephala* ใน section *Lepidella* แต่เมื่อ ทำการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาระหว่าง ตัวอย่างเห็ดหมายเลข D705 และ D706 กับข้อมูลทาง อนุกรมวิธานของเห็ด *A. echinocephala* พบว่าลักษณะ หมวกเห็ด สีของครีบ และโคนก้านเห็ดมีความแตกต่างกัน ซึ่งคาดว่าเห็ดที่ผู้ป่วยรับประทานที่ใช้ในการศึกษานี้ อาจเป็นเห็ดชนิดใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย

จากกรณีการเสียชีวิตของผู้ป่วยจากการรับประทาน เห็ดสกุล *Amanita* (ตัวอย่างเห็ดหมายเลข D705 และ D706) ตรวจไม่พบสารชีวพิษร้ายแรง (lethal peptide) ชนิดอะมานิติน โดยยืนยันจากการตรวจไม่พบยีน *MSDIN* ซึ่งเป็นยีนที่บ่งชี้การสร้างสารพิษอะมานิตินที่

เป็นสารพิษหลักของเห็ดใน section *Phalloideae* โดย นอกเหนือจากเห็ดใน section *Phalloideae* แล้วยังมี รายงานสารพิษที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในกลุ่มอื่น ๆ เช่น allenic norleucine ซึ่งเป็น Nephrotoxin ที่สามารถ พบได้ในเห็ด *Amanita smithiana* และ *Amanita proxima* ผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษดังกล่าวมีลักษณะอาการ สำคัญ ได้แก่ อาการระคายเคืองทางระบบทางเดินอาหาร ภายในเวลา 6-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นผู้ป่วยเริ่มตรวจพบ ภาวะตับและไตวาย รวมถึงสภาวะเลือดเป็นกรด และภาวะ หัวใจล้มเหลว^(29,30) ซึ่งแสดงอาการพิษคล้ายกับผู้ป่วยที่ รับประทานตัวอย่างเห็ดทั้งสอง นอกจากนี้อาจเกิดจาก สารพิษร้ายแรงชนิดอื่น ๆ เพราะในปัจจุบันยังมี core peptide อีกมากกว่า 90 ชนิด ที่ยังไม่สามารถระบุ หน้าที่ได้⁽¹⁸⁾ เนื่องจากมีข้อจำกัดในการวิเคราะห์ระบุ สารพิษทางเคมี คือ ใช้ตัวอย่างในการสกัดปริมาณมาก จึงมีความจำเป็นต้องลงพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่างเพิ่มเติม เพื่อนำมาทำการสกัดสารพิษและวิเคราะห์ ด้วย Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) เพื่อระบุชนิดของสารพิษที่ออกฤทธิ์ ต่อไป

สรุป

ตัวอย่างเห็ดที่เหลือจากการรับประทานของผู้ป่วย จำนวน 2 ตัวอย่าง หมายเลข D705 และ D706 มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยผลการวิเคราะห์ Phylogenetic Tree มีการจับกลุ่มกับ *Amanita echinocephala* ซึ่งเป็นเห็ดที่ไม่เคยมีรายงานการพบ ในประเทศไทยมาก่อน ทั้งนี้มีความเหมือนของลำดับ นิวคลีโอไทด์ร้อยละ 88.69-89.77 แสดงให้เห็นว่า มีโอกาสที่ตัวอย่างเห็ดจะเป็นเห็ดชนิดใหม่ที่ไม่เคย มีรายงานในประเทศไทยมาก่อน โดยผู้ป่วยที่รับประทาน เห็ดชนิดนี้แสดงอาการพิษคล้ายกับผู้ป่วยที่ได้รับ สารพิษอะมานิติน แต่มีระยะแสดงอาการพิษนานกว่า และเสียชีวิตเนื่องจากสภาวะเลือดเป็นกรดและภาวะ หัวใจล้มเหลว ซึ่งสารพิษที่เป็นสาเหตุการเสียชีวิต อาจเกิดจากสาร allenic norleucine หรือสารพิษอื่น ๆ ทั้งนี้จำเป็นต้องทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมเพื่อระบุชนิด

ของสารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อไป นอกจากนี้ตัวอย่างเห็ด
ยังมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกับเห็ด
Amanita echinocephala และเห็ด *Amanita
fritillaria* ที่เคยมีรายงานการพบทางภาคเหนือของ
ประเทศไทย ดังนั้นข้อมูลยีนบริเวณ ITS ของตัวอย่างเห็ด
ที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแหล่งข้อมูลอ้างอิงทาง
ห้องปฏิบัติการพิษวิทยา สามารถนำข้อมูลไปถ่ายทอดให้
กับชุมชนเพื่อป้องกันการเกิดสถานการณ์อาหารเป็นพิษ
จากการรับประทานเห็ดซ้ำในพื้นที่ และช่วยให้ประชาชน
ตระหนักถึงอันตรายจากการรับประทานเห็ดพิษ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ทำให้การศึกษานี้สำเร็จ
ด้วยดี และขอขอบคุณ ทู่นสนับสนุนจากสำนักงาน
คณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม
(สกสว.)

เอกสารอ้างอิง

1. Somrithipol S, Pinruan U, Sommai S, Khamsuntorn P, Luangsa-ard JJ. Mushroom poisoning in Thailand between 2003 and 2017. *Mycoscience* 2022; 63(6): 267-73.
2. Trakulsrichai S, Sriapha C, Tongpoo A, Udomsubpayakul U, Wongvisavakorn S, Srisuma S, et al. Clinical characteristics and outcome of toxicity from *Amanita* mushroom poisoning. *Int J Gen Med* 2017; 10: 395-400.
3. Chonnakijkul P, Parnmen S, Nooron N, Sikaphan S, Chankunasuka R, Phatsarapongkul S, et al. Confirmation of lethal *Amanitas* by nuclear ITS barcode region and amanitin-encoding MSDIN gene from food sample of fatal mushroom poisoning cases. In: The 13th National Conference in Toxicology (NCT13); 2023 Sep 6-7. Bangkok, Thailand: BITEC; 2023. p. 75-86.
4. Borovicka J, Randa Z, Jelinek E, Kotrba P, Dunn CE. Hyperaccumulation of silver by *Amanita strobiliformis* and related species of the section *Lepidella*. *Mycol Res* 2007; 111(11): 1339-44.
5. Cui YY, Cai Q, Tang LP, Liu JW, Yang ZL. The family Amanitaceae: molecular phylogeny, higher-rank taxonomy and the species in China. *Fungal Divers* 2018; 91(3): 5-230.
6. Parnmen S, Nooron N, Okada PA, Sikaphan S, Pringsulaka O, Binchai S, et al. Characterization of lethal toxin-producing genes in *Amanita brunneitoxicaria* and PCR-based detection of deadly poisonous amanitas in the section Phalloideae. *Trends Sci* 2023; 20(3): 4301. (9 pages).
7. Rasooly R, Do P, He X, Hernlem B. A sensitive, cell-based assay for measuring low-level biological activity of α -Amanitin. *Int J Mol Sci* 2023; 24(22): 16402. (12 pages).
8. Lüli Y, Cai Q, Chen ZH, Sun H, Zhu XT, Li X, et al. Genome of lethal *Lepiota venenata* and insights into the evolution of toxin-biosynthetic genes. *BMC Genomics* 2019; 20: 198. (14 pages).
9. Kang E, Cheong KY, Lee MJ, Kim S, Shin GT, Kim H, et al. Severe but reversible acute kidney injury resulting from *Amanita punctata* poisoning. *Kidney Res Clin Pract* 2015; 34(4): 233-6.
10. Parnmen S, Sikaphan S, Leudang S, Boonpratuang T, Rangsiruji A, Naksuwankul K. Molecular identification of poisonous mushrooms using nuclear ITS region and peptide toxins: a retrospective study on fatal cases in Thailand. *J Toxicol Sci* 2016; 41(1): 65-76.

11. Ramchiun S, Sikaphan S, Leudang S, Polputpisatkul D, Nantachaiphong N, Khaentaw T, et al. Molecular characterization and liquid chromatography-mass spectrometric multiple reaction monitoring-based detection in case of suspected phalloides syndrome poisoning. *J Assoc Med Sci* 2019; 52(1): 47-54.
12. Nooron N, Parnmen S, Sikaphana S, Leudang S, Uttawichai C, Polputpisatkul D. The situation of mushrooms food poisoning in Thailand: symptoms and common species list. *Thai J Toxicol* 2020; 35: 58-69.
13. Phatsarapongkul S, Parnmen S, Nooron N, Chankunasuka R, Thunkhamrak C, Nitma U, et al. Analyzing DNA barcoding and identifying toxins caused by neurotoxic mushroom poisoning using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Assoc Med Sci* 2024; 57(2): 107-14.
14. Ratnasingham S, Hebert PD. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol Ecol Notes* 2007; 7: 355-64.
15. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(16): 6241-6.
16. Luo H, Hong SY, Sgambelluri RM, Angelos E, Li X, Walton JD. Peptide macrocyclization catalyzed by a prolyl oligopeptidase involved in α -amanitin biosynthesis. *Chem Biol* 2014; 21(12): 1610-7.
17. Pulman JA, Childs KL, Sgambelluri RM, Walton JD. Expansion and diversification of the MSDIN family of cyclic peptide genes in the poisonous agarics *Amanita phalloides* and *A. bisporigera*. *BMC Genomics* 2016; 17: 1038. (14 pages).
18. He Z, Long P, Fang F, Li S, Zhang P, Chen Z. Diversity of MSDIN family members in amanitin-producing mushrooms and the phylogeny of the MSDIN and prolyl oligopeptidase genes. *BMC Genomics* 2020; 21: 440. (18 pages).
19. Li P, Deng W, Li T. The molecular diversity of toxin gene families in lethal *Amanita* mushrooms. *Toxicon* 2014; 83: 59-68.
20. Vizzini A, Consiglio G, Setti L. Testing spore amyloidity in *Agaricales* under light microscope: the case study of *Tricholoma*. *IMA Fungus* 2020; 11: 24. (20 pages).
21. Sanmee R, Tulloss RE, Lumyong P, Dell B, Lumyong S. Studies on *amanita* (*Basidiomycetes: amanitaceae*) in northern Thailand. *Fungal Divers* 2008; 32: 97-123.
22. Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 1993; 2(2): 113-8.
23. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic Press; 1990. p. 315-322.
24. Nooron N, Parnmen S, Chonnakijkul P, Sikaphan S, Chankunasuka R, Phatsarapongkul S, et al. Use of nuclear ITS region as DNA barcode marker for the species identification of mushroom in the genus *Macrocybe* causing foodborne illness. *Thai J Toxicol* 2023; 38(1): 55-67.

25. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: W566-70.
26. Reilly PO. Fascinated by fungi. 2nd ed. Machynlleth, Powys: Coch-y-bonddu Books; 2022.
27. Zhang Y, Mo M, Yang L, Mi F, Cao Y, Liu C, et al. Exploring the species diversity of edible mushrooms in Yunnan, Southwestern China, by DNA barcoding. *J Fungi* 2021; 7: 310. (23 pages).
28. Brock PM, Döring H, Bidartondo MI. How to know unknown fungi: the role of a herbarium. *New Phytol* 2009; 181(3): 719-24.
29. Barman B, Warjri S, Lynrah KG, Phukan P, Mitchell ST. Amanita nephrotoxic syndrome: presumptive first case report on the Indian subcontinent. *Indian J Nephrol* 2018; 28(2): 170-2.
30. Aydın MF, Sezen M, Oruç A, Yıldız A, Özerik K, Aslan H, et al. Three cases of mushroom poisoning with an unexpected initial presentation: acute kidney injury with *Amanita proxima* poisoning. *Renal Replace Ther* 2023; 9: 63. (6 pages).

DNA Barcoding in Confirmation of Foodborne Poisoning Caused by Amanitin Non-Producing *Amanita* Species

Pornpanna Chonnakijkul, Sittiporn Parnmen, Nattakarn Nooron, Chidkamon Thunkhamrak, Sriprapa Phatsarapongkul, Unchalee Nitma, Sujitra Sikaphan, Chutimon Uttawichai, Rungsaeng Chankunasuka, Nisakorn Palakul, and Dutsadee Polputpisatkul

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

ABSTRACT Food poisoning resulting from the consumption of toxic mushrooms in the genus *Amanita* that produce amanitin leads to liver and kidney failure, which is the primary cause of mortality. In addition to the toxic *Amanita* species that produce amanitin, fatalities have also been reported from *Amanita* species lacking amanitin production. Therefore, to identify the *Amanita* mushrooms that cause food poisoning lacking amanitin, yet result in death, fungal DNA barcoding targeting the Internal Transcribed Spacer (ITS) region of ribosomal DNA and Phylogenetic Tree analysis were employed. The species identification of mushroom samples remaining from patients consumption was performed through nucleotide sequence similarity analysis against the NCBI GenBank databases, and a Phylogenetic Tree was constructed. The results revealed that the mushroom samples exhibited nucleotide sequence similarities ranging from 88.69% to 89.77%, indicating a close relationship to *Amanita echinocephala* in the section *Lepidella*. Phylogenetic analysis confirmed that the mushroom samples clustered with *A. echinocephala* with a bootstrap support value of 80%. Certain morphological differences were observed, indicating the potential existence of a novel species not previously reported in Thailand. Patients who ingested this toxic mushroom exhibited symptoms similar to those seen in amanitin poisoning but with a longer latency period before symptom onset. The cause of death was attributed to acidosis and cardiac arrest.

Keywords: *Amanita* mushrooms, Toxic mushrooms, Amanitin, DNA barcodes

การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 144 ชนิด ในผักและผลไม้ ด้วยเทคนิค LC-QTOF/MS

อคราพิชญ์ ศิริประภารัตน์ และ วีรุฒิ วิทยานันท์

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพสุธา 11000

บทคัดย่อ สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชถูกใช้ในการผลิตผักและผลไม้ของภาคเกษตรกรรมอย่างกว้างขวาง เพื่อป้องกันรักษา และเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร รวมทั้งมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นทำให้อาจมีการตกค้าง เพื่อให้มั่นใจว่าผักผลไม้ปลอดภัยจากสารเคมีที่เป็นอันตราย จึงจำเป็นต้องมีวิธีวิเคราะห์สำหรับใช้ในการตรวจสอบสารพิษตกค้างในอาหารและผลิตภัณฑ์ งานวิจัยนี้นำเสนอประสิทธิภาพของเครื่องมือ LC-QTOF/MS สำหรับการตรวจวัดเชิงปริมาณของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 144 ชนิด พร้อมกันในตัวอย่างผักและผลไม้ด้วยเทคนิค full-scan acquisition ทดสอบความใช้ได้ของวิธีร่วมกับวิธี QuEChERS ในการเตรียมตัวอย่าง พบว่าขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณมีค่าเท่ากับ 5 และ 10 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ในผักและผลไม้ทุกชนิด ตรวจสอบความแม่นยำและความเที่ยงโดยเติมสารมาตรฐานในตัวอย่างทีระดับ 10, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม ระดับละ 10 ซ้ำ พบค่าเฉลี่ยการคืนกลับอยู่ในเกณฑ์ยอมรับระหว่าง 70-120% และมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่น้อยกว่า 20% วิธีมีความเป็นเส้นตรงของช่วงการใช้งานที่ความเข้มข้นระหว่าง 10-100 นาโนกรัมต่อกรัม ($R^2 > 0.99$) ทำการควบคุมคุณภาพภายนอกโดยการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ ผล z-scores เป็นที่น่าพอใจ ($|z| \leq 2$) การวิเคราะห์ตัวอย่างในงานประจำด้วยเครื่อง LC-QTOF/MS ให้ผลที่สอดคล้องกับเครื่อง LC-MS/MS ที่ได้รับการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการ บ่งชี้ว่าวิธีที่พัฒนาและทดสอบความใช้ได้ด้วยเครื่องมือดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อใช้สำหรับตอบสนองข้อกำหนดทางกฎหมายและการแจ้งเตือนภัยต่อผู้บริโภค

คำสำคัญ: สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช, ผักและผลไม้, QuEChERS, LC-QTOF/MS

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

Received: 4 June 2025

Revised: 10 November 2025

Accepted: 11 November 2025

บทนำ

ผักและผลไม้จัดเป็นอาหารที่มีความสำคัญต่อร่างกายและได้รับความนิยมจากผู้บริโภคที่ใส่ใจต่อสุขภาพ เนื่องจากผักและผลไม้เป็นแหล่งของวิตามินเกลือแร่ใยอาหาร และสารพฤกษเคมีต่างๆ ที่มีประโยชน์และจำเป็นต่อร่างกาย เมื่อมีความต้องการบริโภคผักและผลไม้มากขึ้น ทำให้มีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชระหว่างการผลิตผักและผลไม้มีปริมาณสูงขึ้น เพื่อเป็นการลดการสูญเสียจากกระบวนการเพาะปลูกและเก็บเกี่ยวผลผลิต ทำให้เพิ่มรายได้ของเกษตรกรและผู้ประกอบการ โดยข้อมูลจากสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตรในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา ระบุว่าปริมาณการนำเข้าสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทยสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง⁽¹⁾ สารเคมีเหล่านี้อาจมีการตกค้างจากการใช้ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อทั้งแบบเฉียบพลันและในระยะยาวต่อสุขภาพของผู้บริโภค เช่น เป็นอันตรายต่อระบบต่อมไร้ท่อ ระบบประสาท และระบบภูมิคุ้มกัน รวมทั้งสามารถก่อให้เกิดมะเร็งด้วยการสะสมในเนื้อเยื่อไขมันของร่างกายมนุษย์ในระยะยาว⁽²⁾ รวมทั้งยังส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการให้ความสำคัญกับการควบคุมการใช้สารเคมีทางการเกษตรเพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภค โดยการออกระเบียบข้อบังคับในการกำหนดปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit, MRL) สำหรับประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขได้ออกประกาศของกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 387 พ.ศ. 2560 เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง⁽³⁾ ระบุค่า MRL ของสารแต่ละชนิดในอาหารแต่ละประเภท และในกรณีของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ไม่ได้กำหนดค่า MRL กฎหมายกำหนดให้ใช้ค่าดีฟอลต์ลิมิต (default limit) ตามที่ระบุในบัญชีหมายเลข 3 นอกเหนือจากนั้นให้ใช้ค่า default limit สำหรับพืชที่ระดับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นค่ามาตรฐานสำหรับอาหารทุกชนิด โดยต้องพิจารณาในบัญชีหมายเลข 1 วัตถุอันตรายชนิดที่ 4 (วอ. 4) ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 และที่แก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2551 ที่กำหนดว่า หากตรวจพบเกิน Limit of Detection ของวิธี จะถือว่าอาหารนั้นเป็นอาหารผิดมาตรฐาน นอกจากนี้ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 419 พ.ศ. 2563⁽⁴⁾ กำหนด

คุณลักษณะของวิธีสำหรับตรวจวิเคราะห์สารบางชนิดที่จัดเป็น วอ. 4 และฉบับที่ 449 พ.ศ. 2567⁽⁵⁾ กำหนดค่า MRL เพิ่มเติมจากฉบับที่ 387 ทำให้จำนวนชนิดสารที่มี MRL เพิ่มขึ้นจาก 305 ชนิด เป็น 314 ชนิด กรณีของประเทศในสหภาพยุโรปใช้ค่า default limit ที่ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เช่นเดียวกับกฎหมายของไทยเป็นค่ามาตรฐานของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชราว 1,100 ชนิด ในอาหารทุกชนิดเช่นเดียวกัน⁽⁶⁾ ซึ่งเป็นการกำหนดค่ามาตรฐานที่เข้มงวดโดยใช้ cautionary principle หรือการป้องกันไว้ก่อนกรณีไม่ทราบความเสี่ยง⁽⁷⁾ ข้อมูลจากการแจ้งเตือนภัยในปี พ.ศ. 2565 ของ Rapid Alert System for Food and Feed network (RASFF) ของสหภาพยุโรป พบว่าในบรรดาการแจ้งเตือนภัยทั้งหมดเป็นการแจ้งเตือนภัยการพบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชมากที่สุด โดยพบการตกค้างในผักและผลไม้ซึ่งจัดเป็นอาหารที่มีความเสี่ยงเป็นอันดับหนึ่ง จำนวน 594 ครั้ง และรองลงมา คือ พืชสมุนไพรและเครื่องเทศ จำนวน 116 ครั้ง⁽⁸⁾ แสดงให้เห็นว่าอาหารประเภทผักและผลไม้จำเป็นต้องได้รับการตรวจติดตามด้านความปลอดภัยอย่างเป็นระบบและต่อเนื่อง

การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในอาหารสามารถใช้เทคนิคและเครื่องมือที่หลากหลาย แต่ส่วนใหญ่จะทำการวิเคราะห์โดยใช้ chromatography technique ได้แก่ gas chromatography (GC)⁽⁹⁾ และ liquid chromatography (LC)⁽¹⁰⁾ สำหรับสารเคมีที่ละลายน้ำได้ดีและระเหยเป็นไอยากมักใช้เครื่องมือชนิด LC ซึ่งเป็นเทคนิคการแยกสารและตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยใช้หลักการแยกตามความสามารถในการดูดซับหรือแยกสารในเฟสต่างๆ⁽¹¹⁾ ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในการวิเคราะห์สารอินทรีย์ เช่น การวิเคราะห์ยา การตรวจหาสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม และใช้สำหรับการวิเคราะห์ในอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น ในงานวิจัยนี้เป็นการนำเครื่อง LC ที่ใช้งานควบคู่กับเครื่องตรวจวัดชนิดที่มีความละเอียดสูง (high resolution) คือ Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (QTOF/MS)⁽¹²⁾ ซึ่งเป็นเทคโนโลยีใหม่ที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาสารตกค้างจากสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช

ในผักและผลไม้ได้ในเวลาไม่นานมานี้ โดย detector ชนิด QTOF/MS นั้นนอกจากจะเป็นเทคนิคที่มี high sensitivity แล้ว ยังให้ high mass accuracy ที่ทำให้การระบุชนิดสารทำได้แม่นยำอีกด้วย เนื่องจากอาศัยหลักการตรวจวัดมวลสารที่ความละเอียดสูง เครื่องมือชนิดนี้ถูกนำมาใช้วิเคราะห์หาสารตกค้างในน้ำ อาหาร และสิ่งแวดล้อม รวมทั้งผลิตภัณฑ์สุขภาพอื่นหลายชนิด โดยในปี พ.ศ. 2561 มีการนำเสนอฐานข้อมูล The sequential window acquisition of all theoretical fragment ions (SWATH)⁽¹³⁾ ที่สร้างโดย LC-QTOF/MS ใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในไข่ไก่และอาหารทารก ซึ่งสามารถระบุชนิดและปริมาณได้อย่างถูกต้องน่าเชื่อถือ โดยมี linearity ของวิธีในช่วง 0.001–0.250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับไข่ไก่ และ 0.003–0.200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับอาหารทารก และเป็นไปตามค่ามาตรฐาน (MRL) ของสหภาพยุโรป (EU) ในปี พ.ศ. 2562 มีการรายงานการตรวจคัดกรองสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชแบบ non-target analysis ด้วยเครื่อง LC-QTOF/MS ในตัวอย่างอาหารที่มีเมทริกซ์ซับซ้อน ได้แก่ พริกและพริกไทยเสฉวน สามารถวิเคราะห์ที่ปริมาณต่ำมากได้ถึง 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม⁽¹⁴⁾ สำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างหรือการสกัดที่ใช้ในการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในอาหารมีหลายวิธี เช่น วิธี QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe)⁽¹⁵⁾ วิธี Solid-Phase Extraction (SPE)⁽¹⁶⁾ และวิธี Liquid-Liquid Extraction (LLE)⁽¹⁷⁾ เนื่องจากวิธีเหล่านี้เป็นวิธีที่มีต้นทุนต่ำ มีประสิทธิภาพดี และสามารถลด matrix interference จากอาหารได้ดี นอกจากนี้มีเทคนิคเตรียมตัวอย่างขั้นสูงอื่นๆ เช่น Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE)⁽¹⁸⁾ Microwave-Assisted Extraction (MAE)⁽¹⁹⁾ และ Pressurized Liquid Extraction (PLE)⁽²⁰⁾ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้เช่นเดียวกัน ในปี พ.ศ. 2560 มีรายงานวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยไมโครเวฟ (Microwave-assisted extraction) ถูกนำมาใช้ควบคู่กับ LC-MS/MS⁽¹⁹⁾ เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช

ในแอปเปิล อย่างไรก็ตามเทคนิคขั้นสูงเหล่านี้ยังไม่ได้ถูกนำไปใช้งานอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากมีข้อจำกัดด้วยเป็นเทคนิคการสกัดที่ยุ่งยาก ซับซ้อน มีราคาสูง และการควบคุมเครื่องมือที่ใช้ในการสกัดให้มีประสิทธิภาพคงที่ยังเป็นเรื่องท้าทาย สำหรับการพัฒนายุทธวิธีวิเคราะห์ในงานวิจัยขั้นนี้ใช้ตัวอย่างประเภทผักและผลไม้ (vegetables and fruits commodities) ที่มีความหลากหลายด้านองค์ประกอบของเนื้อตัวอย่าง เช่น สัตว์ส่วนของน้ำที่เป็นองค์ประกอบ ความเป็นกรดต่างชนิดและปริมาณรงควัตถุ ปริมาณไขมัน เป็นต้น นอกจากนี้วิธีนี้ต้องครอบคลุมสารจำนวนมากถึง 144 ชนิด สารเหล่านี้ถูกคัดเลือกเพื่อให้ครอบคลุมชนิดสารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขที่เกี่ยวข้อง และมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex) มากที่สุด ซึ่งสารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติและโครงสร้างทางเคมีที่หลากหลายทั้งด้านขนาด องค์ประกอบ และความซับซ้อนของสารการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างจำนวนมาก จำเป็นต้องมีวิธีการเตรียมตัวอย่างหรือการสกัดที่ครอบคลุมสารได้กว้างขวาง แต่มีค่าการคืนกลับที่เหมาะสมในทุกชนิดสารเมื่อวิเคราะห์ในคราวเดียวกัน วิธี QuEChERS รวดเร็ว ง่าย ราคาถูก มีประสิทธิภาพ และปลอดภัย เป็นวิธีที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าดีมีข้อดีหลายประการ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการสกัดสารที่มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันและสามารถประยุกต์ใช้กับชนิดตัวอย่างที่หลากหลายได้ ปัจจุบันวิธี QuEChERS เป็นหนึ่งในเทคนิคที่เป็นที่นิยมสำหรับการสกัดตัวอย่างผักและผลไม้ที่ถูกนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ เพื่อพัฒนายุทธวิธีวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในตัวอย่างผักและผลไม้ โดยใช้เครื่อง LC-QTOF/MS ควบคู่กับวิธีการเตรียมตัวอย่างแบบ QuEChERS ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์สารเคมีเป้าหมาย จำนวน 144 ชนิด การศึกษานี้ได้เลือกตัวแทนตัวอย่างผักและผลไม้ จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ แอปเปิล กะหล่ำปลี แครอท แตงกวา อุ่น ผักกาดหอม มะนาว มะม่วง สตรอว์เบอร์รี่ และมะเขือเทศ⁽²¹⁾ และทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิค LC-QTOF/MS กับเครื่องมือ LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานเป้าหมาย (goal standard method)

ที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 โดยการทดสอบทางสถิติและเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ตัวอย่างในงานประจำ ทำการเข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing, PT) กับหน่วย PT provider ทั้งในและต่างประเทศ เพื่อประเมินความแม่นยำและความน่าเชื่อถือของวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยวิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้กับข้อกำหนดทางกฎหมายและมาตรฐานที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยด้านอาหารได้ และสามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการภายใต้ภารกิจหลักของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน: เป็นสารละลายผสมของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 144 ชนิด รายชื่อสาร ดังแสดงในตารางที่ 1 เกรดวัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material, CRM) RD0686521.5: KIT of 144 components-part 1-13 of 13:144 components, มีความเข้มข้นอ้างอิงรับรองประมาณ 100 ± 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ยี่ห้อ CPACHEM, C.P.A. Chem Ltd., France)

สารเคมี: acetonitrile (HPLC, Merck, USA) QuEChERS Extraction Packet, EN Method Part No: 5982-7650 เป็นส่วนผสมของ $MgSO_4$ 4 กรัม NaCl 1 กรัม sodium citrate dehydrate 1 กรัม และ disodium hydrogen citrate sesquihydrate 0.5 กรัม และ Dispersive SPE EN เป็นส่วนผสมของ $MgSO_4$ 900 มิลลิกรัม Primary and Secondary Amine (PSA) 50 มิลลิกรัม และ graphite carbon black (GCB) 50 มิลลิกรัม (Agilent Technologies, USA) DI water (Type I มีค่า resistivity > 18 mΩ.cm) water (LC-MS grade, Supelco, Germany) และ methanol (Hyper grade for LC-MS, LiChrosolv, USA)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายผสมความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารมาตรฐาน 144 ชนิด ใน acetonitrile โดยเปิดสารละลายมาตรฐานผสมแต่ละขวด จำนวน 6 ขวด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำกว่า $-18^{\circ}C$ (EVERmed รุ่น LF 625 S xPRO, ITALY) เตรียม intermediate standard solution ก่อนการใช้งาน ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน intermediate standard solution ลง centrifuge tube ที่บรรจุตัวอย่างที่เป็น blank น้ำหนัก 10.0 ± 0.1 กรัม จำนวน 6 หลอด คำนวณปริมาณสารมาตรฐานที่เติมให้ได้ช่วงความเข้มข้น 5, 10, 20, 50, 75 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม แล้วสกัดตามวิธี ใช้สารสกัดที่ได้สำหรับการวิเคราะห์ทันทีหรือสามารถเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำกว่า $-18^{\circ}C$ ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.001 กรัม (LC 620S) และ 0.01 มิลลิกรัม (MC 210S) (Sartorius, Germany), เครื่องบดป่นอาหาร (RONIC, Poland), เครื่องหมุนปั่นผสมสารละลาย Vortex-2Genie (Scientific Industries, USA), เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (ยี่ห้อ REACTI-THERM III #TS-18824, Thermo Scientific, USA), micropipette ขนาด 2-20 ไมโครลิตร ขนาด 20-200 ไมโครลิตร และขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร (Eppendorf, Germany), centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร และ 15 มิลลิลิตร, ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำกว่า $-18^{\circ}C$, certified volumetric flask, เครื่องแก้วทุกชนิดล้างด้วย acetone 2 ครั้ง (Optima LC/MS grade, Fisher Brand, UK) และ n-hexane (n-Hexane AR, MERCK, Germany) 2 ครั้ง แล้วผึ่งให้แห้งก่อนนำมาใช้งาน

เครื่อง LC-QTOF/MS: Agilent 1290 Infinity II-G6546A (Agilent Technology, USA) ใช้ ZORBAX Eclipse Plus C18 $1.8 \mu m$ 3.0×150 mm (Agilent Technology, USA) มีสถานะเครื่อง ดังนี้

mobile phase A: water + 4.5 mM ammonium formate + 0.5 mM ammonium fluoride + 0.1% formic acid

mobile phase B: methanol + 4.5 mM ammonium formate + 0.5 mM ammonium fluoride + 0.1% formic acid

flow rate: 0.45 ml/min

injection volume: 5 µl

column temperature: 45°C

gradient profile – Agilent G7120A

Total time (min)	flow rate (ml/min)	% mobile phase A	% mobile phase B
0.0	0.45	98	2
0.5	0.45	98	2
1.0	0.45	50	50
4.0	0.45	35	65
16.0	0.45	0	100
18.0	0.45	0	100
18.1	0.45	98	2
20.0	0.45	98	2

QTOF/MS conditions:

Polarity: Positive ionization

Ionization mode: Dual AJS ESI

Drying gas temperature: 325°C

Drying gas flow rate: 10 L/min

Nebulizer gas pressure: 40 psig

Sheath gas temperature: 400°C

Sheath gas flow rate: 12 L/min

Capillary voltage: 4,000 V

MS scan range (m/z): 50 to 1,000

Scan mode: Agilent All Ions MS/MS screening workflow

CE value (V): 0, 15, 35

Reference ions (m/z): 121.0509/922.0098

หมายเหตุ: Reference ions คือ ไอออนที่มีค่ามวลประจุ (m/z) คงที่และถูกใช้เป็นตัวอ้างอิงเพื่อปรับเทียบความแม่นยำของมวล (mass accuracy) ของเครื่อง LC-QTOF/MS แบบ real-time ระหว่างการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ตารางที่ 1 ข้อมูล mass transition ของสารต่างๆ ในเครื่อง LC-QTOF/MS

Pesticides	RT (min)	Quantifier ion (m/z)	Quantifier ion I (m/z)	Quantifier ion II (m/z)	Quantifier ion III (m/z)
3-hydroxy carbofuran	3.633	238.1074	107.0491	163.0754	
Abamectin B1a	15.247	895.4791	145.0851	577.5173	876.7986
Acetamiprid	3.633	223.0745	98.9996	126.0105	
Acibenzolar-S-methyl (BTH)	7.579	210.9994	136.0090		
Aldicarb	4.546	116.0530	61.0106	89.0419	
Aldicarb Sulphoxide	2.851	89.0420	65.0056		
Aldicarb Sulfone	2.918	223.0747	62.9899		
Ametoctradin	11.181	276.2183	149.0819	176.0931	
Aminocarb	2.918	209.1285	137.0835		
Anilazine	8.162	276.9624	126.0105	274.9653	
Atrazine	6.387	216.1010	182.9954	111.9944	
Azamethiphos	4.917	324.9809	182.9954	111.9944	
Azoxystrobin	7.169	404.1241	329.0795	372.0979	
Bendiocarb	5.129	224.0917	109.0284		
Bioresmethrin	15.022	339.1955	128.0616	171.0799	
Bixafen	9.420	414.0382	265.9927	394.0309	
Boscalid (Nicobifen)	7.712	343.0399	307.0633		
Bromacil	5.315	261.0233	187.9342	131.9443	
Bupirimate	9.129	317.1642	166.0975	108.0114	
Carbaryl	5.341	202.0863	127.0542	145.0648	115.542
Carbendazim (Azole)	3.421	192.0768	160.0505		
Carbetamide	4.758	237.1234	118.0863	120.0444	
Carbofuran	5.288	222.1125	55.0542	123.0441	
Carbofuran-3-keto	9.314	253.1183	115.0542	161.0597	
Carbosulfan	15.658	381.2206	118.0685	76.0216	
Carboxin	5.540	236.0740	93.0573	143.0161	
Chlorbromuron	7.659	292.9687	203.9205	182.0241	
Chloridazon (PAC)	3.845	222.0429	104.0495		
Chloroxuron	8.321	291.0895	72.0449		
Chlortoluron (Chlorotoluron)	6.030	213.0789	72.0449		
Clethodim	11.844	360.1395	136.0757	164.0706	
Clothianidin	3.48	250.0160	131.9669		
Cyanazine (Fortrol)	4.785	241.0963	104.0010		
Cycluron	6.811	199.1805	72.0444	89.0709	
Cyflumetofen	11.897	448.1730	173.0208		
Cyproconazole (I)	8.162	292.1211	125.0153	70.0400	
Cyproconazole (II)	8.546	292.1211	125.0153	169.0083	
Demeton-S-Methylsulfone	3.063	263.0171	169.0083		
Demeton-S-Methyl sulfoxide	3.010	247.0222	169.0083		
Diethofencarb	7.394	268.1543	180.1019	152.0706	
Dimefox	3.500	155.0744	110.0166		

ตารางที่ 1 ข้อมูล mass transition ของสารต่างๆ ในเครื่อง LC-QTOF/MS (ต่อ)

Pesticides	RT (min)	Quantifier ion (m/z)	Quantifier ion I (m/z)	Quantifier ion II (m/z)	Quantifier ion III (m/z)
Dimethachlor	6.864	256.1099	148.1121	224.0837	
Dimethomorph (E)	7.500	388.1310	301.0626	165.0546	
Dimethomorph (Z)	7.963	388.1310	301.0626	165.0546	
Diphenamid	6.811	240.1383	134.0964		
Diuron	6.493	233.0243	132.9606	72.0449	
Epoxiconazole (BAS 480F)	8.983	330.0804	123.0241	121.0448	
Ethiofencarb	5.871	226.0896	77.0386	107.0491	
Ethiofencarb sulfone	3.341	258.0795	58.0287	107.0491	
Ethiofencarb sulfoxide	3.408	242.0845	185.0631	107.0491	
Ethiofumesate	6.626	287.0948	241.0529	259.0635	
Ethirimol	4.931	210.1601	140.1070		
Etofenprox	15.764	359.2006	183.0804	107.0491	
Etoxazole	13.592	360.1770	304.1132	141.0146	
Famoxadone	10.400	392.1605	239.0941	93.0573	
Fenamidone	7.579	312.1165	236.1182	92.0495	
Fenamiphos	9.354	304.1131	201.9848		
Fenarimol	8.745	331.0399	268.0524	81.0447	
Fenbuconazole	9.036	337.1215	125.0153	70.0400	
Fenhexamid	8.718	302.0709	143.0128	97.1012	
Fenobucarb (Baycarb)	7.288	208.1332	95.0491		
Fenothiocarb	9.504	254.1209	72.0443		
Fenoxycarb	9.354	302.1387	88.0393		
Fenpropidin	6.533	274.2529	86.0964		
Fensulfothion	6.281	309.0379	140.0290	252.9753	
Fenthion-sulfoxide (Mesulfenfos)	5.288	295.0222	109.0049	279.9987	
Flufenacet (Fluthiamide)	8.851	364.0737	124.0539	152.0506	
Flufenoxuron	13.314	489.0435	141.0113		
Fluometuron	5.858	233.0896	145.0260	72.0444	
Fluopyram	8.533	397.0537	208.0130	173.0205	
Fluquinconazole	8.559	376.0163	272.0147		
Fluridone	6.957	330.1100	309.0960		
Flurtamone	7.328	334.1049	227.0667		
Flusilazole	9.288	316.1076	169.0473		
Hexazinone	5.315	253.1659	71.0604	171.0876	
Hexythiazox	13.115	353.1085	168.0570	228.0240	
Imazalil (Enilconazole)	5.791	297.0556	158.9763	69.0447	
Imidacloprid	3.381	256.0596	209.0589		
Indoxacarb	11.248	528.0780	150.0100	203.0184	
Iprovalicarb	8.758	321.2173	116.0706	119.0855	

ตารางที่ 1 ข้อมูล mass transition ของสารต่างๆ ในเครื่อง LC-QTOF/MS (ต่อ)

Pesticides	RT (min)	Quantifier ion (m/z)	Quantifier ion I (m/z)	Quantifier ion II (m/z)	Quantifier ion III (m/z)
Isoprocarb	6.387	216.1019	77.0386	95.0491	
Isoproturon	6.440	207.1492	165.1022		
Linuron	7.354	249.0192	182.0241	159.9715	
Lufenuron	12.585	510.9857	158.0412	141.0135	
Malaoxon	5.156	315.0662	71.0128		
Mepanipyrim	8.665	224.1182	77.0386		
Metaflumizone	12.572	507.1250	178.0463		
Metalaxyl	6.507	280.1543	220.1332	192.1383	
Methiocarb (Mercaptodimethur)	7.526	226.0896	107.0491	121.0648	
Methomyl	3.116	88.0216	58.0287	72.9981	
Methoxyfenozide (Intrepid)	8.122	369.2173	149.0597		
Metobromuron	6.122	259.0077	169.9600	91.0416	
Metolachlor	9.341	284.1412	176.1434	252.1150	
Metrafenone	10.850	409.0645	166.0624	209.0808	
Monocrotophos (Azodrin)	3.129	224.0682	58.0287		
Monolinuron	5.606	215.0582	126.0100	98.9996	
Novaluron	11.539	493.0196	141.0146	158.0412	
Omethoate	2.785	214.0297	78.9943		
Oxamyl	2.931	72.0444	72.0444	124.9821	
Penconazole	9.857	284.0716	158.9763		
Phenthoate (Fenthoate)	9.619	321.0379	124.9821		
Pirimicarb	5.513	239.1503	72.0444		
Promecarb	7.871	208.1332	94.0413	109.0648	
Prometon	6.533	226.1662	86.0349		
Prometryn	8.321	242.1434	68.0243	200.0964	
Propiconazole	10.307	342.0771	158.9763		
Propoxur	5.116	111.0440	58.0287	93.0335	
Propyzamide (Pronamide)	8.162	256.0290	189.9821	172.9556	
Prosulfocarb	11.870	252.1417	91.0542		
Prothoate	6.652	286.0695	124.9821	96.9508	
Pyraclostrobin	10.466	388.1059	133.0522	163.0628	
Pyridaben	14.651	365.1449	132.0934	147.1168	
Propoxur	8.824	295.0399	93.0573		
Propyzamide (Pronamide)	7.420	200.1182	82.0651	80.0495	
Prosulfocarb	9.354	395.1489	213.0910	192.0781	
Prothoate	8.281	332.1569	159.0750		
Pyraclostrobin	5.328	202.0854	68.0243	124.0869	
Pyridaben	11.460	748.4994	142.1222		
Pyrifenoxy	10.480	732.4681	98.0964	142.1226	
Pyrimethanil	11.274	746.4838	142.1226	144.1383	
Rotenone	7.367	298.2741	100.1121		

ตารางที่ 1 ข้อมูล mass transition ของสารต่างๆ ในเครื่อง LC-QTOF/MS (ต่อ)

Pesticides	RT (min)	Quantifier ion (m/z)	Quantifier ion I (m/z)	Quantifier ion II (m/z)	Quantifier ion III (m/z)
Rotenone	7.367	298.2741	100.1121	144.1383	
Sedaxane	3.765	202.0433	175.0324	131.0604	
Simazine	9.937	308.1524	125.0153	70.0400	
Spinetoram	9.486	297.1598	133.0648		
Spinosyn A	12.466	334.1681	145.0522	117.0209	
Spinosyn D	6.533	226.1662	170.1036		
Spiroxamine	7.818	230.1167	104.0010	174.0541	
Thiabendazole (Tiabendazole)	8.705	372.0288	160.9731	158.9761	
Tebuconazole (Terbuconazole)	3.898	253.0309	90.0338	126.0105	
Tebufenozide	3.116	292.0266	131.9664		
Tebufenpyrad	10.864	258.0714	90.0464	125.0153	
Terbumeton	5.593	355.0563	107.9936	88.0215	
Terbutylazine (TERBA)	4.838	241.0981	119.0481		
Tetraconazole	3.288	251.1060	76.0393		
Thiacloprid	3.447	104.0165	63.9977		
Thiamethoxam	4.944	343.0529	85.9695	151.0324	
Thiobencarb (Benthiocarb)	10.652	300.9616	174.9710	124.9821	
Thiodicarb	8.480	296.1160	99.0791		
Thiofanox	13.314	304.0091	142.9217		
Thiofanox-sulfone	4.282	190.0433	109.0107	136.0215	
Thiofanox-sulfoxide	11.407	409.1370	116.0495	186.0525	
Thiophanate-methyl	11.46	346.0929	69.0447	73.0648	
Tolclofos-methyl	8.851	318.1368	125.0153	70.0400	
Triadimenol	3.580	288.0488	146.0634	58.0287	
Triallate	3.633	238.1074	107.0491	163.0754	
Tricyclazole	15.247	895.4791	145.0851	577.5173	876.7986
Trifloxystrobin	3.633	223.0745	98.9996	126.0105	
Triflumizole	7.579	210.9994	136.0090		
Triticonazole	4.546	116.0530	61.0106	89.0419	
Vamidothion	2.851	89.0420	65.0056		

หมายเหตุ: Collision Energy (CE) = 0, 15, 35 V

การเตรียมตัวอย่างและการสกัดตัวอย่าง
ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีเป็น
ผักและผลไม้ 10 ชนิด คัดเลือกตาม SANTE/
11312/2021 (V2)⁽²¹⁾ ได้แก่แอปเปิล กะหล่ำปลี แครอท
แตงกวา องุ่น ผักกาดหอม มะนาว มะม่วง สตรอว์เบอร์รี
และมะเขือเทศ โดยบดปั่นแต่ละชนิดให้เป็น
เนื้อเดียวกันด้วยเครื่องบดปั่น ชั่งแบ่งตัวอย่างเพื่อเป็น
analytical portions โดยชั่งตัวอย่างสำหรับวิธี

QuEChERS น้ำหนัก 10.0 ± 0.1 กรัม ลงใน
centrifuge tube ขนาด 50 ml เติม acetonitrile
10 ml เขย่า เป็นเวลา 1 นาที แล้วเติม QuEChERS
Extraction Packets, EN method เขย่า เป็นเวลา
1 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 4,000 รอบ
ต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารสกัดส่วนใส ปริมาตร
2 ml clean up ด้วย dispersive SPE เขย่า เป็นเวลา
1 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม

จากนั้นนำส่วนสารละลายใส่กรองด้วย Filter Tubes Nylon 0.2 μm นำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-QTOF/MS

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ (Method development)

พัฒนาวิธีโดยอ้างอิงจากวิธีมาตรฐานของสหภาพยุโรป EN 15662:2018⁽²²⁾ ซึ่งเป็นการตรวจวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชหลายชนิดพร้อมกันในอาหารที่มาจากพืช เช่น ผักและผลไม้ มีกระบวนการสกัดแบบ QuEChERS ด้วย citrate-buffered ทำให้บริสุทธิ์ด้วย dispersive SPE และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC และ LC ดัดแปลงวิธีอ้างอิง โดยใช้เครื่อง LC-QTOF/MS ค้นหาสถานะของเครื่องมือทั้งขั้นตอนการแยกสารด้วยเครื่อง LC ปรับสัดส่วนของสารเคมีตัวทำละลาย mobile phase และ column ที่ใช้ พัฒนาขั้นตอนการตรวจวัดด้วย detector ชนิด QTOF/MS ตั้งเกณฑ์พิจารณาความถูกต้องของมวลสาร (≤ 5 ppm) คัดเลือกรูปแบบไอโซโทป ตั้งเกณฑ์ความแตกต่างของ RT โดยใช้ $RT \pm 0.2$ min และคัดเลือกไอออนที่เหมาะสมอย่างน้อย 2 ไอออน ที่จำเพาะของสารสนใจแต่ละชนิดด้วยการหา mass transition condition สำหรับใช้เป็น quantification ion และ qualification ion

ความจำเพาะของวิธี (Specificity/Selectivity)

ฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้นที่ 50 นาโนกรัมต่อกรัม เข้าเครื่อง LC-QTOF/MS ตามสภาวะที่กำหนด จำนวน 3 ซ้ำ บันทึกค่า retention time (RT) แล้วทดสอบความจำเพาะของวิธีโดยวิเคราะห์ method blank (reagent blank) และ sample blank ทั้ง 10 ชนิด เมื่อไม่พบพีคหรือพบพีคที่มีสัญญาณ signal-to-noise ratio (S/N) น้อยกว่า 3 ที่มี RT และ/หรือค่า m/z ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานถือว่าวิธีปราศจากสารรบกวนและวิธีมีความจำเพาะ

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Linearity of calibration curve)

สร้างกราฟมาตรฐานแบบ procedural standard calibration โดยเติม intermediate standard solution ใน sample blank ทั้ง 10 ชนิด ที่ 6 ระดับ

ความเข้มข้น ได้แก่ 5, 10, 20, 50, 75 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม จากนั้นสกัดตามวิธีแล้วฉีดเข้าเครื่อง LC-QTOF/MS แบบสุ่ม (random, $n = 3$) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (determination coefficient, R^2) ค่าที่ได้ควรเข้าใกล้ 1 (เกณฑ์ยอมรับ $R^2 > 0.99$) นอกจากนี้ทำการตรวจสอบความถูกต้องของความเข้มข้นที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานในแต่ละระดับความเข้มข้น โดยค่าที่คำนวณได้ต้องไม่ต่างจากความเข้มข้นที่เตรียมเกิน 20%

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

หาขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) โดยเติมสารมาตรฐานที่ระดับ LOD (5 นาโนกรัมต่อกรัม) ใน sample blank แล้วสกัดตามขั้นตอนฉีดเข้าเครื่อง LC-QTOF/MS จำนวน 10 ซ้ำ ($n = 10$) คำนวณค่า (S/N) ค่า estimated LOD คือ ระดับความเข้มข้นที่มีสัญญาณ S/N มากกว่า 3

ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

หาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) กรณี pesticide residue สามารถประมาณค่า LOQ เท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อกรัม (target LOQ) ซึ่งถือว่าเป็นค่า default limit ตามกฎหมายได้ ทำโดยเติมสารมาตรฐานที่ระดับ LOQ (10 นาโนกรัมต่อกรัม) ใน sample blank แล้วสกัดตามขั้นตอน วิเคราะห์ จำนวน 10 ซ้ำ ($n = 10$) วิเคราะห์ตามวิธี แล้วคำนวณ %recovery กำหนดเกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วง 70-120% และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ $\leq 20\%$

ความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ (Linear of working range)

ศึกษาความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ โดยเติมสารมาตรฐานลงใน sample blank ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 5, 10, 20, 50, 75 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ ($n = 3$) สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง spiked concentration กับ concentration found คำนวณหาสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) โดยค่า R^2 ที่ได้ต้องมีค่าเข้าใกล้ 1 (เกณฑ์ยอมรับ $R^2 > 0.95$)

ความแม่นยำและความเที่ยง (Accuracy and Precision)

เติมสารมาตรฐานในตัวอย่าง (sample blank) ที่ระดับ LOQ, $5 \times \text{LOQ}$ และ $10 \times \text{LOQ}$ ที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ วิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ ($n = 10$) แล้วคำนวณ %recovery และ %RSD โดยเกณฑ์ยอมรับความแม่นยำ (accuracy): mean recovery 70–120% และเกณฑ์ยอมรับความเที่ยง (precision): %RSD มีค่า $\leq 20\%$

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Estimation of Measurement Uncertainty, MU) ของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในอาหาร ที่ทำการทดสอบใช้วิธีการของ EURACHEM⁽²³⁾ ซึ่งเป็นการคำนวณโดยใช้ทุกแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน จากนั้นคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้ค่า $k = 2$ เป็นวิธีที่มีความถูกต้อง เป็นที่ยอมรับและเหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน

การเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ระหว่างเครื่อง LC-QTOF/MS และ LC-MS/MS

วิเคราะห์ตัวอย่างที่ส่งตรวจ ณ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร จำนวน 40 ตัวอย่าง ด้วยเครื่อง LC-QTOF/MS เปรียบเทียบผลที่ได้กับผลวิเคราะห์ที่ได้จากเครื่อง LC-MS/MS ที่ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 เพื่อประเมินความสามารถของเครื่องมือ โดยใช้การทดสอบของสถิติที่เหมาะสม

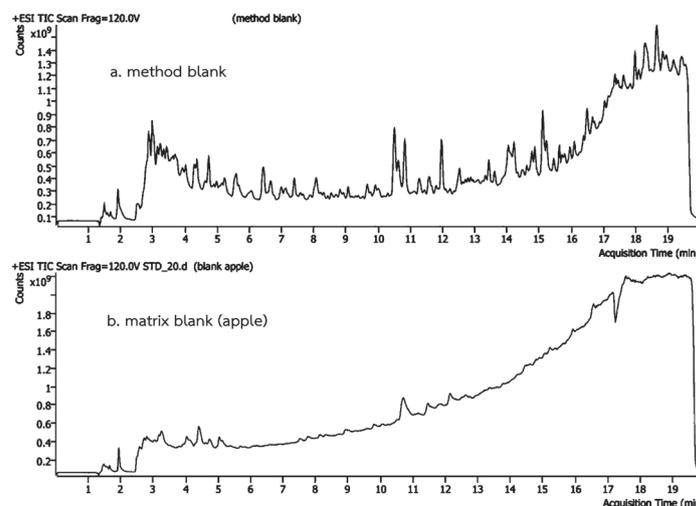
การเข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญในตัวอย่างวิเคราะห์

เข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing program) กับหน่วยงานหรือองค์กรที่ได้ รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2023 ทั้งในประเทศและต่างประเทศ เช่น FAPAS สหราชอาณาจักร, Progetto Trieste สาธารณรัฐอิตาลี, บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด และหน่วยงานราชการ เช่น สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ (NIMT) กรมวิชาการเกษตร เป็นต้น ซึ่งถือเป็นการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory comparison)

ผล

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

จากการศึกษาการวิเคราะห์ method blank และ sample blank ในตัวอย่างผักและผลไม้ทั้ง 10 ชนิด ตรวจไม่พบสารรบกวนที่ทำให้พีคตรงหรือใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-QTOF/MS ทำให้สามารถตรวจวัดพีคของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชทั้ง 144 ชนิด ได้อย่างชัดเจน ซึ่งมีความจำเพาะ และมีความไวในการตรวจวัดสารสนใจได้ถูกต้อง ตัวอย่าง Total ion chromatogram (TIC) ของการวิเคราะห์ method blank และ apple ที่เป็น matrix blank ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 Total ion chromatogram ของการวิเคราะห์ method blank (a) และ matrix blank (apple) (b)

สามารถสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง concentration กับ peak area (response) ของสารสนใจมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 5-100 นาโนกรัมต่อกรัม ตัวอย่างสาร idoxacarb และ metalaxyl ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยกราฟมาตรฐานของสารทุกชนิดมีค่า R^2 ในช่วง 0.990-1.00 ซึ่งค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์ยอมรับที่ 0.99 ผลการทวนสอบความเข้มข้นแต่ละจุดโดยการทำให้ "back-calculated concentration" พบว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างไม่เกิน 20% ของความเข้มข้นที่เตรียม ตัวอย่างสาร acetamiprid, diuron, indoxacarb, metalaxyl และ oxamyl ดังแสดงในตารางที่ 2

การยืนยันความถูกต้องของชนิดสารสนใจจาก chromatogram แสดงด้วยการซ้อนทับกันระหว่าง quantifier ion peak และ qualifier ion peak (I, II และ III) ของสารมาตรฐานที่ RT 6.586 และ 11.306 min ของสาร idoxacarb และ metalaxyl ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2 สอดคล้องตามเกณฑ์ข้อกำหนดการยืนยันสารที่ต้องการวิเคราะห์ตาม SANTE⁽²¹⁾

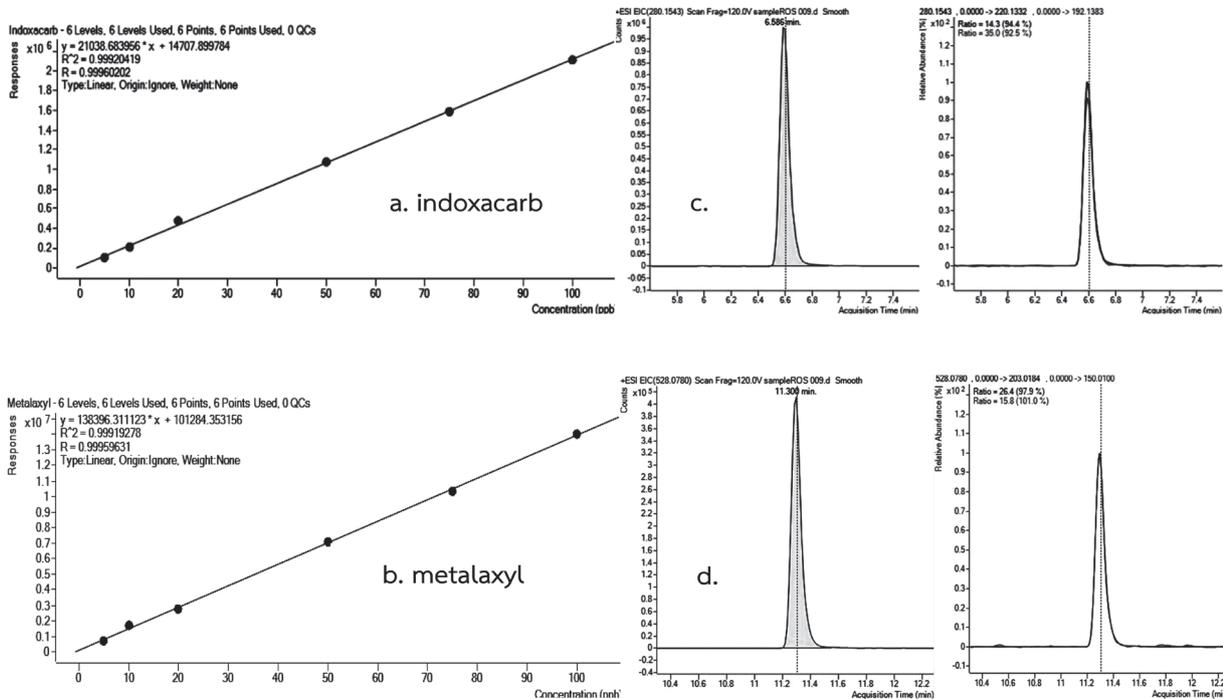
ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชทุกชนิดเมื่อฉีดเข้าเครื่อง LC-QTOF/MS เท่ากับ 5 นาโนกรัมต่อกรัม คำนวณค่า signal to noise (S/N) มีค่ามากกว่า 3 และยืนยันค่า LOD โดยการสกัดตัวอย่างแล้ววิเคราะห์ 10 ซ้ำ ($n = 10$) ผลพบสารทุกชนิดทั้ง 10 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยมีขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) มีค่าเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อกรัม

ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีดังแสดงในตารางที่ 3 หาความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับ LOQ, $5 \times LOQ$ และ $10 \times LOQ$ ที่ 10, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม ของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 144 ชนิด ในผักและผลไม้ทั้ง 10 ชนิด ผลการทดสอบความแม่นยำ (%recovery) ที่ระดับ LOQ มีค่าระหว่าง 77.2-119.3% และความเที่ยงจาก RSD มีค่าระหว่าง 1.5-19.6% ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับกลาง ($5 \times LOQ$) มีค่า 74.0-119.8% และ 1.3-19.0% ตามลำดับ และที่ระดับสูง ($10 \times LOQ$) มีค่า 74.0-119.8% และ 0.7-17.0% ตามลำดับ ซึ่งอยู่

ในเกณฑ์ยอมรับ 70-120% และ $\leq 20\%$ ยกเว้น abamectin B1a, anilazine และ carbosulfan ในบางชนิด ตัวอย่างผักและผลไม้

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ (linearity of working range) พบว่าสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชส่วนใหญ่มีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ระหว่าง 10-100 ng/g โดยช่วงของการวิเคราะห์นี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเนื่องจากการเตรียมสารมาตรฐานโดยการสกัด (procedural calibration curve) ด้วยคุณลักษณะทั้งหมดที่ทำการทดสอบความใช้ได้นี้ แสดงว่าสามารถใช้วิธีวิเคราะห์สารสนใจดังกล่าวได้ดังแสดงในตารางที่ 3

ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดตามแนวของ ISO GUM Approach⁽²³⁾ หรือ Bottom-up Approach (ที่ระดับความเชื่อมั่นประมาณ 95%, $k = 2$) พบว่าแหล่งความไม่แน่นอนที่สำคัญที่สุดคือ standard concentration (36.3%) และ method precision (36.3%) ตามด้วย recovery (9.8%), sample weigh (7.0%), calibration curve (C_0) (5.5%) และ Volume of sample taken (5.0%) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3 ตัวอย่างการคำนวณหาความไม่แน่นอนขยาย (Expanded Uncertainty) พบค่า Combined Relative Standard Uncertainty ($u_c(X)/X$) มีค่าเป็น 0.044 ในกรณีตัวอย่างตรวจพบสาร carbaryl ปริมาณ 0.05 mg/kg ได้ค่า $u_c(x) = 0.044 \times 0.05 = 0.0022$ mg/kg จากนั้นขยายความไม่แน่นอนมาตรฐานด้วยการคูณด้วยค่า Coverage factor, k ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% Expanded Uncertainty at Confidence Interval (C.I.) 95% ($k = 2$) ได้ $U(x) = 2 \times 0.0022 = 0.0044$ mg/kg การรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ เช่น พบ carbaryl 0.05±0.0044 mg/kg (ที่ระดับความเชื่อมั่นประมาณ 95%, $k = 2$) โดยค่าความไม่แน่นอนที่รายงานมีค่าคิดเป็น ร้อยละ 8.8 ของค่าที่รายงาน ซึ่งสัดส่วนที่น้อยนี้อาจมาจากการทำการทดสอบความใช้ได้ทุกวันและเวลาเดียวกันที่สภาวะเดียวกัน ทำให้ได้ค่าความไม่แน่นอนจากความเที่ยงต่ำ หากเก็บข้อมูลการวิเคราะห์ต่างวันเวลากันจะได้ข้อมูลที่สะท้อนความเป็นจริงมากขึ้น



ภาพที่ 2 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานและ Chromatogram แสดง quantification ion peak, qualification ion peak, ion intensity ratio และ mass-to-charge (m/z) ของ indoxacarb (a และ c) และ metalaxyl (b และ d)

ตารางที่ 2 Linear equation และ R² จากการทำการกราฟสารมาตรฐานของตัวอย่างผักและผลไม้ทั้ง 10 ชนิด ในช่วงตั้งแต่ 5, 10, 20, 50, 75 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม

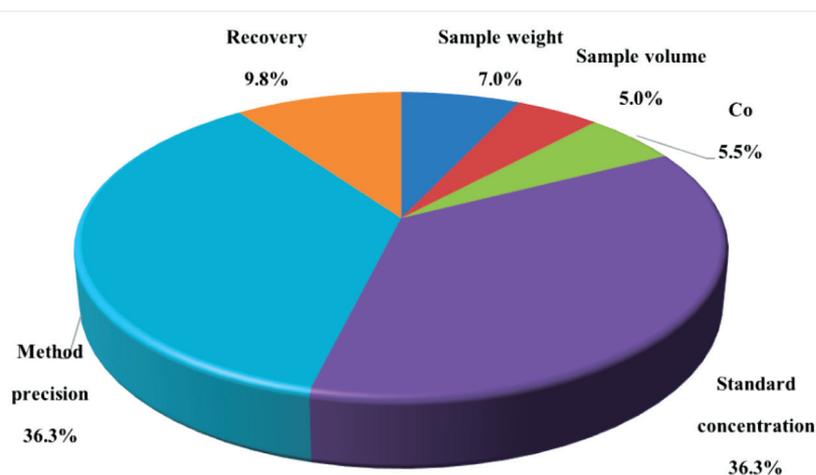
Matrix	Linear equation (R ²)				
	acetamiprid	diuron	indoxacarb	metalaxyl	oxamyl
apple	y = 89689x + 226048 (0.9985)	y = 52489x + 1075 (0.9990)	y = 37589x + 404563 (0.9990)	y = 138396x + 101284 (0.9992)	y = 49346x + 23043 (0.9988)
cabbage	y = 31358x + 30632 (1.0000)	y = 5272.x + 220054.19 (0.9926)	y = 26308x + 14621 (0.9988)	y = 109507x + 317990 (0.9933)	y = 36378x + 138561 (0.9901)
carrot	y = 73392x + 406424 (0.9945)	y = 56230x + 294752 (0.9921)	y = 4043261x + 103926 (0.9977)	y = 11753038x - 13295 (0.9938)	y = 46363x + 132805 (0.9973)
cucumber	y = 67514x + 285462 (0.9949)	y = 53456x + 217815 (0.9951)	y = 35945x + 93284 (0.9959)	y = 110431x + 387731 (0.9941)	y = 43661x + 122220 (0.9982)
grapes	y = 95098x + 333708 (0.9985)	y = 48728x + 223415 (0.9905)	y = 37584x + 162191 (0.9937)	y = 120555x + 48788 (0.9978)	y = 50758x + 93579 (1.0000)
lettuce	y = 79172x + 335949 (0.9976)	y = 45116x + 193429 (0.9973)	y = 32251x + 89784 (0.9988)	y = 1121826x + 25760 (0.9994)	y = 41987x + 60370 (0.9999)
lemon	y = 14606x - 10204 (0.9975)	y = 98088x + 3176 (0.9934)	y = 8134x - 10400 (0.9905)	y = 164635x + 883 (0.9900)	y = 23809x - 17997 (0.9959)
mango	y = 55941x + 213735 (0.9962)	y = 58963x - 8962 (0.9925)	y = 11996x + 20166 (0.9979)	y = 112544x + 293017 (0.9977)	y = 15525x + 70750 (0.9924)
strawberry	y = 1.0033x + 0.3902 (0.9967)	y = 1.0041x + 0.8509 (0.9928)	y = 1.0018x + 0.3826 (0.9984)	y = 0.9952x + 0.8337 (0.9972)	y = 0.9998x + 0.0076 (0.9999)
tomato	y = 1102631x + 305788 (0.9920)	y = 122626x + 879648 (0.9905)	y = 36701x + 11881 (0.9970)	y = 180865x + 1932336 (0.9914)	y = 48780x + 192210 (0.9962)

ตารางที่ 3 ความแม่นยำ (Mean %recovery) ความเที่ยง (%RSD) และความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ (linear of working range) ของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้ทั้ง 10 ชนิด

Matrix	S/N at LOD	Accuracy & precision (n = 10)					
		10 ng/g		50 ng/g		100 ng/g	
		%Recovery	%RSD	%Recovery	%RSD	%Recovery	%RSD
apple	> 3	77.2-119.8	3.9-19.1	77.2-119.8	3.9-19.0	77.2-119.8	3.9-19.3
cabbage	> 3	83.1-112.6	3.3-19.3	83.1-112.6	1.3-5.4	83.1-112.6	0.7-17.0
carrot	> 3	73.5-118.5	1.8-18.7	73.5-118.5	1.6-18.6	73.5-118.5	1.3-8.2
cucumber	> 3	74.0-115.1	5.5-19.0	74.0-115.1	1.1-4.6	74.0-115.1	1.1-14.9
grapes	> 3	79.9-119.9	2.0-12.0	79.9-119.9	0.3-3.3	79.9-119.9	0.4-10.9
lettuce	> 3	80.2-119.1	4.8-19.2	80.2-119.1	2.1-15.1	80.2-119.1	0.7-4.5
lemon	> 3	79.1-116.1	1.0-18.8	80.0-116.1	1.8-15.8	79.1-116.1	1.4-10.6
mango	> 3	79.8-119.3	1.8-19.8	79.8-119.3	0.8-6.3	79.8-119.3	1.5-15.2
strawberry	> 3	89.9-117.8	1.9-11.6	89.9-117.8	0.9-13.3	89.9-117.8	0.8-9.2
tomato	> 3	87.2-114.9	1.5-19.6	87.2-115.0	1.0-14.8	87.2-114.9	1.8-19.9

หมายเหตุ: 1) Signal to noise (S/N) ratio at LOD = 5 ng/g (n = 10)

- Apple: สารที่มี accuracy & precision อยู่นอกเหนือเกณฑ์ยอมรับที่ทุกระดับความเข้มข้น ได้แก่ abamectin B1a, anilazine และ carbosulfan สารที่มี linearity of working range อยู่นอกเหนือเกณฑ์ยอมรับ ได้แก่ abamectin B1a, anilazine และ carbosulfan
- Cabbage: สารที่มี accuracy & precision อยู่นอกเหนือเกณฑ์ยอมรับที่ทุกระดับความเข้มข้น ได้แก่ carbosulfan สารที่มี linearity of working range อยู่นอกเหนือเกณฑ์ยอมรับ ได้แก่ carbosulfan และ anilazine
- Cucumber: สาร anilazine มี linearity of working range ในช่วง 20-100 ng/g
- Grapes: สารที่มี accuracy & precision อยู่นอกเหนือเกณฑ์ยอมรับที่ระดับ 10 ng/g ได้แก่ abamectin B1a และ anilazine ที่ทุกระดับความเข้มข้น ได้แก่ carbosulfan สาร abamectin B1a มี linearity of working range ในช่วง 20-100 ng/g และสาร anilazine มีความเป็นเส้นตรงช่วง 50-100 ng/g สาร carbosulfan ไม่มีช่วงความเป็นเส้นตรง
- Lemon: สารที่มี accuracy & precision อยู่นอกเหนือเกณฑ์ยอมรับที่ทุกระดับความเข้มข้น ได้แก่ carbosulfan
- Strawberry: สารที่มี accuracy & precision อยู่นอกเหนือเกณฑ์ยอมรับที่ทุกระดับความเข้มข้น ได้แก่ abamectin B1a และ carbosulfan



ภาพที่ 3 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ carbaryl ในผักและผลไม้ (apple)

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-QTOF/MS กับเครื่อง LC-MS/MS เพื่อประเมินความเท่าเทียมกันของเครื่องมือทั้ง 2 ชนิด โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างในงานประจำ จำนวน 40 ตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างที่ตรวจพบ จำนวน 4 ตัวอย่าง พบสารชนิดเดียวกัน ประเมินผลโดยใช้ค่า %difference

เกณฑ์ยอมรับการทำซ้ำที่ $\leq 20\%$ พบว่าการวิเคราะห์ที่ได้จากเครื่องมือทั้ง 2 ชนิด มี %difference อยู่ระหว่าง 1.60-17.84% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ และตัวอย่างที่ตรวจไม่พบ 36 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบด้วยเครื่องมือทั้ง 2 ชนิด เช่นเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้ ด้วยเครื่อง LC-MS/MS และ LC-QTOF/MS ในงานประจำ

Matrix	Analyte	Concentration found (ng/g)		%Difference
		LC-MS/MS	LC-QTOF/MS	
blue berry	boscalid	20.64	20.97	1.60
	omethoate	54.92	64.72	17.84
	penconazole	78.83	92.42	17.24
Chinese cabbage	pyraclostrobin	9.55	8.73	8.59
grapes	amectotradin	7.39	8.03	8.66
	indoxacarb	6.87	8.03	16.89
water spinach	oxamyl	38.68	37.76	2.38
	propiconazole	67.70	60.00	11.37

การทดสอบความมีนัยสำคัญทางสถิติของการวิเคราะห์สาร indoxacarb และ metalaxyl ใน apple ที่ระดับ LOQ (10 นาโนกรัมต่อกรัม) นำข้อมูลที่ได้จากการทำ method validation ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเครื่องมือ LC-QTOF/MS และ LC-MS/MS โดยการวิเคราะห์ 10 ซ้ำ ($n = 10$) ดังแสดงในตารางที่ 5 สาร indoxacarb มีค่า mean \pm SD ของการวิเคราะห์ ปริมาณโดยเครื่องมือ LC-QTOF/MS และ LC-MS/MS เท่ากับ 9.42 ± 0.48 และ 10.12 ± 0.62 นาโนกรัมต่อกรัม และสาร metalaxyl มีค่าเป็น 11.00 ± 1.37 และ 10.77 ± 0.79 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ทำการทดสอบความมีนัยสำคัญของความแตกต่างระหว่างค่าความแปรปรวน (variance) ของข้อมูล 2 ชุด โดยใช้ F-test คำนวณค่า $F_{\text{calculated}}$ ของสาร indoxacarb และ metalaxyl จากสมการที่ 1 จะได้ค่า $F_{\text{calculated}} = 2.686$ และ 3.084 ตามลำดับ เมื่อ $n_1 = n_2 = 10$ โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ($\alpha = 0.05$) ได้ค่า $F_{\text{critical}} = 3.137^{(18-20)}$

จะได้ $F_{\text{calculated}}$ น้อยกว่า F_{critical} ทั้ง 2 สาร หรือข้อมูล 2 ชุด ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือ LC-QTOF/MS และ LC-MS/MS ไม่มีความแตกต่างของค่าความแปรปรวนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ทำการทดสอบความมีนัยสำคัญโดยใช้ t-test ในการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย (mean) ของข้อมูล 2 ชุด โดยคำนวณค่า $t_{\text{calculated}}$ จากสมการที่ 2 และ SD_{pooled} จากสมการที่ 3 เมื่อ SD_{pooled} ของสาร indoxacarb และ metalaxyl ที่คำนวณได้เท่ากับ 0.556 และ 1.118 ตามลำดับ จะได้ค่า $t_{\text{calculated}} = 0.29$ และ 1.78 ตามลำดับ เมื่อ degrees of freedom = $n_1 + n_2 - 2 = 18$ โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ($\alpha = 0.05$)⁽²¹⁻²³⁾ ได้ค่า $t_{\text{critical}} = 2.101$ จะได้ $t_{\text{calculated}}$ น้อยกว่า t_{critical} ทั้ง 2 สาร หรือข้อมูล 2 ชุด ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือ LC-QTOF/MS และ LC-MS/MS ไม่พบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างผลการวิเคราะห์สาร indoxacarb และ metalaxyl ใน apple ที่ได้จากเครื่อง LC-QTOF/MS และ LC-MS/MS

Replicate	Result (ng/g) Spike at 10 ng/g			
	indoxacarb		metalaxyl	
	LC-QTOF/MS	LC-MS/MS	LC-QTOF/MS	LC-MS/MS
1	9.02	10.50	9.35	11.53
2	10.62	10.65	9.25	11.88
3	9.30	10.23	13.34	11.08
4	9.50	9.88	10.65	10.87
5	9.24	9.80	11.78	11.49
6	8.91	10.33	11.93	11.10
7	9.21	8.56	12.70	10.61
8	9.03	10.05	9.36	9.99
9	9.74	11.01	10.82	9.21
10	9.70	10.21	10.87	9.98
Mean	9.42	10.12	11.00	10.77
SD	0.48	0.62	1.37	0.79
%RSD	5.08	6.15	12.42	7.32
Min	9.02	8.56	9.25	9.21
Max	10.62	10.65	13.34	11.88
Median	9.27	10.22	10.85	10.97

$$F_{calculated} = \frac{(SD_1)^2}{(SD_2)^2} \quad ; SD_1 > SD_2 \quad \text{สมการที่ 1}$$

$$t_{calculated} = \frac{(\text{mean}_1 - \text{mean}_2)}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) SD_{pooled}^2}} \quad \text{สมการที่ 2}$$

$$SD_{pooled} = \sqrt{\frac{(n_1-1) \times SD_1^2 + (n_2-1) \times SD_2^2}{(n_1-1) + (n_2-1)}} \quad \text{สมการที่ 3}$$

สำหรับการควบคุมคุณภาพภายนอก (external quality control) ได้เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญกับหน่วยงานที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2023 ประเมินผลด้วยค่า z-score เกณฑ์ยอมรับ $|z| \leq 2$ ผลพบว่าการวิเคราะห์สารในขอบข่าย 144 ชนิด มีค่า z-score อยู่ระหว่าง -0.67 ถึง 1.18 ซึ่งอยู่

ในเกณฑ์ยอมรับ ดังแสดงในตารางที่ 6 เป็นการยืนยันว่าการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-QTOF/MS มีความถูกต้องเหมาะสมและสอดคล้องกับมาตรฐานห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ ISO/IEC 17025:2017

ตารางที่ 6 ผลการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญกับหน่วยงานต่าง ๆ

PT provider	matrix	analyte	z-score
FAPAS 19409	spring onion	acetamiprid	0.4
		fenhexamid	0.7
		spiroxamine	0.3
		tetraconazole	0.5
Progetto trieste VF4800P	spinach	atrazine	-0.23
		boscalid	-0.02
		linuron	-0.24
NIMT-PT-OA-009	apple	ametryn	-0.67
		atrazine	0.67
Central Lab Thai PT08-6707	choy	carbaryl	1.18
		oxamyl	0.88
DOA: 2566 ME	mango	atrazine	0.7
		azoxystrobin	0.4
		carbaryl	-0.1

วิจารณ์

การพัฒนาวิธีและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 144 ชนิด ในผักและผลไม้ด้วยเทคนิค LC-QTOF/MS โดยใช้วิธีมาตรฐาน QuEChERS ในการสกัดตัวอย่าง ผลการทดสอบพบว่ามีความชัดเจนการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 5 นาโนกรัมต่อกรัม และค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อกรัม มีความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ระหว่าง 10-100 นาโนกรัมต่อกรัม ความแม่นยำและความเที่ยงที่แสดงด้วย %Recovery และ %RSD อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ SANTE⁽²¹⁾ ซึ่งคุณลักษณะของวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้ ตามพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 387 พ.ศ. 2560 เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง⁽³⁾ วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้ค่ากำหนดของปริมาณสารพิษตกค้างที่มีได้ในอาหารสำหรับวัตถุประสงค์สูงสุดหรือ default limit ที่ระดับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (หรือ 10 นาโนกรัมต่อกรัม) เป็นค่าตั้งต้นเพื่อกำหนดค่าขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (target LOQ) แล้วทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง รวมทั้งต้อง

พิจารณา signal to noise ratio ต้องมากกว่า 10 ขึ้นไป นอกจากนี้พบว่าค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ที่คำนวณได้จาก method precision และ standard concentration เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดความไม่แน่นอนของการวัด ซึ่งเป็นความไม่แน่นอน type A สามารถประมาณได้จากการทำซ้ำ และ type B ที่ได้จากการสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา ตามลำดับ ทั้งนี้ค่าที่ประมาณได้นี้สามารถยอมรับได้และมีความสมเหตุสมผล เนื่องจากยังน้อยกว่าค่ามาตรฐานที่ร้อยละ 50 กำหนดโดย SANTE (Fit for purpose)⁽²¹⁾ วิธีการเตรียมตัวอย่างเลือกใช้วิธี QuEChERS สำหรับการสกัดผักและผลไม้ ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์แบบ multi-residue method สามารถสกัดสารหลายชนิดออกจากตัวอย่างได้พร้อมกัน พบว่าวิธีนี้มีผลกระทบของเมทริกซ์ที่มีในตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนการสกัดรบกวนการตรวจวัดด้วยเครื่องมือ เช่น มืองค์ประกอบของแป้ง โปรตีน ไขมัน และกรดไขมัน ทำให้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชบางชนิดถูกสกัดออกจากตัวอย่างได้ยากที่ระดับความเข้มข้นต่ำ แม้จะมีการใช้วัสดุสำหรับการทำให้บริสุทธิ์ (clean up) ที่มีส่วนผสมของ MgSO₄, PSA, GCB และ C18 แล้วก็ตาม สารที่ได้รับผลกระทบดังกล่าว ได้แก่ abamectin B1a, carbosulfan และ

anilazine ในตัวอย่างบางประเภทที่ระดับความเข้มข้นต่ำ จะไม่สามารถตรวจวัดได้ ดังแสดงในตารางที่ 4 เนื่องจาก คุณสมบัติเฉพาะของสารเหล่านี้อาจจำเป็นต้องทำการ วิเคราะห์โดยการเตรียมตัวอย่างแบบ single residue analysis ในกรณีที่ตัวอย่างผักและผลไม้มีเมทริกซ์ ที่ส่งผลกระทบบอย่างรุนแรง (high matrix effect) ดังนั้นการวิเคราะห์สารจำนวนมากพร้อมกันยังคงเป็น ความท้าทายในการทำการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและ เชิงปริมาณ

เนื่องจากเครื่อง LC-QTOF/MS เป็นเครื่องมือ ชนิดใหม่ที่น่าสนใจสำหรับวิเคราะห์เชิงปริมาณ จึงจำเป็นต้องมีการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องมือชนิดนี้ กับเครื่องมือที่ห้องปฏิบัติการใช้ในงานประจำและได้รับการรับรอง ISO/IEC 17025:2017 คือ เครื่องมือ triple quadrupole mass spectrometry หรือ LC-MS/MS โดยได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างในงานประจำในเครื่องมือ ทั้ง 2 ชนิด ใช้วิธีการสกัดเดียวกัน ฉีดสารสกัดที่ได้เข้า เครื่องมือทั้ง 2 ชนิดพร้อมกัน เปรียบเทียบความแตกต่าง ของชนิดและปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้โดยใช้เกณฑ์ %Difference \leq 20% กำหนดให้วิธีมาตรฐาน LC-MS/MS (goal standard) เป็น 100% ผลพบว่าเครื่องมือทั้ง 2 ชนิด สามารถตรวจวัดชนิดสารได้สอดคล้องกันและ ให้ปริมาณที่แตกต่างกันไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนด นอกจากนี้ ทำการทดสอบทางสถิติโดยนำข้อมูลผลการวิเคราะห์ ที่ระดับ LOQ จากเครื่องมือ 2 ชนิด ชนิดละ 10 ข้อมูล ผลการวิเคราะห์ที่ได้จากเครื่องมือทั้ง 2 ชนิด ไม่พบ ความแตกต่างกันของค่าเฉลี่ยและความแปรปรวน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสามารถสรุปได้ว่าเครื่องมือ ชนิดใหม่นี้สามารถใช้งานทดแทนเครื่องมือมาตรฐาน ได้อย่างมีประสิทธิภาพและให้ผลการวิเคราะห์ที่ ไม่แตกต่างกัน เป็นการลดภาระงานของเครื่องมือที่มี อยู่ในห้องปฏิบัติการ ลดรอบการให้บริการ และเพิ่ม ความพึงพอใจของผู้ใช้บริการ อย่างไรก็ตามเครื่องมือ LC-QTOF/MS ยังมีข้อจำกัดสำหรับการใช้งาน คือ เครื่องมือมีช่วงการวิเคราะห์สั้น ระหว่าง 5-100 นาโนกรัม ต่อกรัม ในขณะที่เครื่อง LC-MS/MS มีความเป็นเส้นตรง ในช่วง 5-500 นาโนกรัมต่อกรัม เนื่องจากเครื่อง LC-QTOF/MS มีเครื่องตรวจจับมวลสารที่จะอิ่มตัว เมื่อตรวจวัดสารที่ปริมาณสูง ทำให้เมื่อวิเคราะห์สาร

ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 100 นาโนกรัมต่อกรัม จะได้กราฟ มาตรฐานที่เป็นเส้นโค้งและจะคงที่มีลักษณะเป็นเส้นราบ (plateau) ส่งผลให้การตรวจวัดที่ระดับสูงต้องทำการ dilute สารสกัดหรือการลดปริมาณตัวอย่างเพื่อ ความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ นอกจากนี้ต้องทำการ ยืนยันผลการวิเคราะห์โดยการทำซ้ำ (retest) เมื่อ การตรวจพบสารตกค้างเกินช่วงของการวิเคราะห์การ เป็นเส้นตรงแบบ duplicate test แล้วรายงานโดยใช้ ค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำดังกล่าว และเกณฑ์ยอมรับของ การทำซ้ำ %RPD ต้องไม่เกิน 25%⁽²¹⁾ แม้เครื่อง LC-QTOF/MS จะมีช่วงการวิเคราะห์สั้นแต่มี ข้อได้เปรียบ คือ ให้สัญญาณของสารสูงและมีความละเอียด แม่นยำ (high mass resolution) ที่ดีกว่า LC-MS/MS จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานประเภทการตรวจ คัดกรองที่ไม่ทราบชนิดล่วงหน้า (untargeted screening method) สำหรับการประกันคุณภาพภายนอกได้ เข้าร่วมทดสอบความชำนาญกับหน่วยงานต่างๆ เช่น FAPAS สหราชอาณาจักร, Progetto Trieste สาธารณรัฐอิตาลี, สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ (NIMT), บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด (Central Lab Thai) และกรมวิชาการเกษตร (DOA) เป็นต้น ผล z-score อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ $|z| \leq 2$ เป็นสิ่งบ่งชี้ว่ากระบวนการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ มีความถูกต้องเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการ และสามารถนำวิธีการนี้เข้าสู่กระบวนการขอการรับรอง ความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 เพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นของผลการวิเคราะห์ต่อไป สำหรับการใช้เครื่องมือ LC-QTOF/MS มีความ ยุ่งยากกว่าการใช้เครื่อง LC-MS/MS คือ การทำ instrument set up โดยเฉพาะขั้นตอนการทำ tuning เครื่องมือก่อนการใช้งานจำเป็นต้องมีการ เปลี่ยนหรือเตรียมสารที่ใช้สำหรับการ tuning (tuning solution) ทุก 6 เดือน เป็นการทำให้ เครื่องตอบสนองต่อสัญญาณคงที่และป้องกันไม่ให้ สัญญาณลดลงระหว่างการวัด อาจทำให้ผลการวิเคราะห์ ที่คลาดเคลื่อนได้ นอกจากนี้ต้องทำ tuning calibration ทุก 1 เดือน เพื่อให้ได้ linear range ตรงตาม ที่ต้องการและต้องทำ mass calibration ทุกครั้งก่อน ทำการวิเคราะห์ เพื่อเป็นการ calibrate มวลสารให้

มีความเที่ยงตรงและแม่นยำ โดยสารผสมที่ใช้สำหรับขั้นตอนการทำ tuning และ mass calibration มี mass range อยู่ระหว่าง 200–3000 m/z ซึ่งครอบคลุมชนิดสารที่ต้องการตรวจวัด สำหรับการบำรุงรักษาเครื่องมือต้องมีการทำความสะอาด ion capillary ทุกครั้งก่อนทำการวิเคราะห์ด้วย methanol หรือ 50 %v/v ของ isopropanol เพื่อให้มั่นใจว่าจะไม่มีสิ่งสกปรกเข้าสู่ระบบ เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วพบสารสนใจที่มี signal to noise, $S/N \geq 3$ ต้องตรวจสอบพารามิเตอร์ต่างๆ เพื่อยืนยันชนิดสารก่อนการรายงาน ได้แก่ retention time ($\Delta RT \leq 0.1$ นาที), ion intensity ratio ระหว่าง quantification peak และ qualification peak ของสารสนใจและสารมาตรฐานต้องแตกต่างกันน้อยกว่า 30% และรูปร่างของ peak ที่ได้จากใน extracted ion chromatogram ต้องมีการซ้อนทับกันโดยสมบูรณ์

การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้โดยใช้เครื่องมือ LC-QTOF/MS ที่ทำขึ้นนี้ นอกจากจะสามารถนำไปใช้งานสำหรับการตรวจวิเคราะห์สาร 144 ชนิดได้แล้ว ยังสามารถนำเครื่องมือไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยการขยายขอบข่ายชนิดของสารให้ครอบคลุมเพิ่มขึ้นได้และการตรวจวิเคราะห์แบบคัดกรองที่ไม่ทราบชนิดสาร (untargeted analysis) เชิงคุณภาพได้อีกด้วย รวมถึงการขอการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความน่าเชื่อถือภายใต้ระบบคุณภาพที่เป็นสากล ศักยภาพของเครื่องมือชนิด high resolution นี้สามารถต่อยอดในการตรวจวิเคราะห์อาหารปลอมและการยืนยันประเภทหรือชนิดอาหารในวัตถุประสงค์ต่างๆ (food authenticity) ได้ในอนาคต ทั้งนี้การวิเคราะห์อาหารโดยใช้หลักการทางสถิติและการตรวจวัดมวลสารที่มีความแม่นยำสูงนี้เป็นสิ่งใหม่ในประเทศไทย โดยในปัจจุบันยังไม่มีหน่วยงานใดที่เปิดให้บริการตรวจวิเคราะห์รายการดังกล่าว ซึ่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์สามารถใช้เครื่องมือ LC-QTOF/MS พัฒนาศักยภาพการตรวจวิเคราะห์อาหารในภาพรวมของประเทศต่อไป

สรุป

วิธีวิเคราะห์ที่ได้จากการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 144 ชนิด ในผักและผลไม้ด้วยเทคนิค LC-QTOF/MS มีคุณลักษณะของวิธีสอดคล้องกับมาตรฐานวิธีของประเทศและระหว่างประเทศ โดยมีค่า LOD และ LOQ เป็น 5 และ 10 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ช่วงการวิเคราะห์อยู่ระหว่าง 5–100 นาโนกรัมต่อกรัม เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ สามารถตรวจวิเคราะห์การตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในขอบข่ายได้อย่างถูกต้อง มีความไวและความจำเพาะต่อสารทั้งหมด มีความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ยอมรับตรงตามวัตถุประสงค์เหมาะสมที่จะนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเพื่อควบคุมคุณภาพมาตรฐานและความปลอดภัยของอาหารประเภทผักและผลไม้ นำไปใช้สำหรับเปิดให้บริการของหน่วยงานสำหรับการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ และยังสามารถใช้วิธีตรวจวิเคราะห์อาหารเพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคหรือใช้ในโครงการสำรวจติดตามการตกค้างของสารเคมีอันตรายเพื่อประกอบการบริหารจัดการสารเคมีทางการเกษตรในภาพรวมได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางเลขา ปราสาททอง อดีตผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร สำหรับการสนับสนุนการจัดหาเครื่องมือหลักของงานวิจัยชิ้นนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Sapbamrer R, Kitro A, Panumasvivat J, Assavanopakun P. Important role of the government in reducing pesticide use and risk sustainably in Thailand: current situation and recommendations. *Front Public Health* 2023; 11: 1141142. (11 pages).
2. รัตนา ทรัพย์บำรุง. ผลกระทบของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่อระบบอวัยวะในร่างกาย. เชียงใหม่: คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2565.

3. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 387 (พ.ศ. 2560) เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 134 ตอนพิเศษ 228 ง (วันที่ 18 กันยายน 2560). หน้า 8.
4. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 419 (พ.ศ. 2563) เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 3). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 257 ง (วันที่ 2 พฤศจิกายน 2563). หน้า 27.
5. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 449 (พ.ศ. 2567) เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 4). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 141 ตอนพิเศษ 158 ง (วันที่ 11 มิถุนายน 2567). หน้า 7.
6. Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council. Off J Eur Union 2005 Mar 16; L 70/1.
7. Pongsapitch P. Preparation and submission of data for the establishment of international standard on pesticide residue for important Thai agricultural commodities. Thai Agric Res J 2008; 26(3): 291-306.
8. Rapid Alert System for Food and Feed network (RASFF). RASFF notifications by food hazard category 2020-2022. [online]. 2023; [cited 2025 Sep 5]; [25 screens]. Available from: URL: https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-10/acn_annual-report_2022.pdf.
9. Heena S, Fatih O. Mass spectrometry-based techniques for identification of compounds in milk and meat matrix. Adv Food Nutr Res 2023; 104: 43-76.
10. Stachniuk A, Fornal E. Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of pesticide residues in food. Food Anal Methods 2016; 9(6): 1654-5.
11. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. Clin Biochem Rev 2009; 30(1): 19-34.
12. Yang M, Li J, Zhao C, Xiao H, Fang X, Zheng J. LC-Q-TOF-MS/MS detection of food flavonoids: principle, methodology, and applications. Crit Rev Food Sci Nutr 2021; 63(1): 3750-70.
13. Vázquez PP, Lozano A, Ferrer C, Martínez Bueno MJ, Fernández-Alba AR. Improvements in identification and quantitation of pesticide residues in food by LC-QTOF using sequential mass window acquisition (SWATH[®]). Anal Methods 2018; 10: 2821-33.
14. Liu X, Liu Z, Bian L, Ping Y, Li S, Zhang J, et al. Determination of pesticide residues in chili and Sichuan pepper by high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Food Chem 2022; 387: 132915.
15. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D. Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) approach for the determination of pesticide residues. In: 18th Annual Waste Testing & Quality Assurance Symposium (WTQA), Arlington, VA, August 10-15, 2002. p. 231-241.
16. Poole CF. New trends in solid-phase extraction. TrAC Trends Anal Chem 2003; 22(6): 362-73.
17. Kaufmann A. The current role of high-resolution mass spectrometry in food analysis. Anal Bioanal Chem 2012; 403(5): 1233-49.
18. Chemat F, Rombaut N, Meullemiestre A, Turk M, Perino S, Fabiano-Tixier AS, et al. Review of green food processing techniques: preservation, transformation, and extraction. Innov Food Sci Emerg Technol 2017; 41: 357-77.

19. Kalogiouri NP, Papadakis E-N, Maggalou MG, Karaoglanidis GS, Samanidou VF, Menkissoglu-Spiroudi U. Development of a microwave-assisted extraction protocol for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticide residues in apples by LC-MS/MS. *Appl Sci* 2021; 11(22): 10931. (16 pages).
20. Richter BE, Jones BA, Ezzell JL, Porter NL, Avdalovic N, Pohl C. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Anal Chem* 1996; 68(6): 1033-9.
21. SANTE 11312/2021 v2. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. [online]. 2024; [cited 2024 Nov 4]; [55 screens]. Available from: URL: https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-11/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2021-11312.pdf.
22. BS EN 15662:2018. Foods of plant origin: determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/ partitioning and cleanup by dispersive SPE QuEChERS-method. [online]. 2018; [cited 2025 April 3]; [84 screens]. Available from: URL: http://www.chromnet.net/Taiwan/QuEChERS_Dispersive_SPE/QuEChERS_%E6%AD%90%E7%9B%9F%E6%96%B9%E6%B3%95_EN156622008_E.pdf.
23. Eurachem. EURACHEM/CITAC Guide CG 4: quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. [online]. 2012; [cited 2021 Oct 2]. Available from: URL: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf.

Development and Validation for Analysis of 144 Pesticides in Vegetables & Fruits by LC-QTOF/MS Technique

Akarapitch Siripraparat and Weerawut Wittayanan

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

ABSTRACT In agricultural production, the widespread use of pesticides to prevent, eliminate, or repel pests has been greatly increased. As a result, vegetables and fruits may be contaminated with high tendency for the pesticide residue to remain in the food, creating a risk to humans. Therefore, there are many attempts to monitor this residue in food materials and products. In this study, liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry (LC-QTOF/MS) was selected for the quantitative detection of the simultaneous determination of 144 pesticides in vegetables and fruits by using the high resolution full-scan acquisition method. The extraction experiments were validated with QuEChERS method. The limit of detection and quantification of the validated method were 5 and 10 ng/g for the pesticides, respectively. In particular, each sample underwent ten analyses of fortified pesticides at three different concentration levels: 10, 50, and 100 ng/g. Consequently, the recoveries for most pesticides in particular matrices were within the criteria of 70-120%, with a relative standard deviation (RSD) lower than 20%. Furthermore, this method's linear range can be applied from 10 to 100 ng/g ($R^2 > 0.99$). Participation in the PT program to evaluate the method performance for external quality control showed satisfactory z-scores ($|z| \leq 2$). Additionally, a significant number of routine samples were checked and were compared favorably with those from LC-MS/MS accredited methods. Based on these results, the method's validation to detect and quantify pesticides in vegetable and fruit matrices for regulatory proposals and health warnings was entirely successful.

Keywords: Pesticides, Vegetables and fruits, QuEChERS, LC-QTOF/MS

การประเมินความสามารถห้องปฏิบัติการ ผ่านการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ สารกำจัดวัชพืชกลุ่มควอตในมันฝรั่ง

รัตติยากร ศรีโคตร ภรพรรณ ส่งศรี และ วีรวิทย์ วิทยานันท์

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ สารกลุ่มควอต ได้แก่ paraquat, diquat, chlormequat และ mepiquat เป็นสารกำจัดวัชพืชประเภทไม่เลือกทำลายที่นิยมนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง การวิเคราะห์สารตกค้างเหล่านี้ในอาหารจึงต้องได้รับการตรวจสอบโดยห้องปฏิบัติการที่มีความสามารถ ในปี พ.ศ. 2568 สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ได้ดำเนินการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการการวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชกลุ่มควอตในมันฝรั่ง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสามารถในการวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชกลุ่มควอตในผักและผลไม้ของห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชน โดยจัดหามันฝรั่งที่ตรวจไม่พบสารตกค้างนำมาเติมสารมาตรฐาน 2 ชนิด ได้แก่ paraquat และ chlormequat แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ชุด คือ test sample 1 และ test sample 2 แต่ละชุดนำมาเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นแตกต่างกันใช้เป็นตัวอย่างทดสอบ ทำการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันก่อนการจัดส่งให้กับสมาชิก การเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการใช้การทดสอบทางสถิติตาม ISO 13528:2022 สำหรับ paraquat ใช้ค่ากำหนดที่เป็นค่าพ้องของสมาชิก ส่วน chlormequat ใช้ผลวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเดียว ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ คำนวณจาก Horwitz's equation modified by Thompson ศึกษาความคงตัวของตัวอย่างทดสอบที่ 2 สภาวะ โดยเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ ≤ -15 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน พบว่าตัวอย่างมีความคงตัวเหมาะสม ผลวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วม 11 แห่ง ถูกประเมินด้วยค่า z-scores หรือ z'-scores เพื่อแสดงความสามารถของห้องปฏิบัติการ ผลวิเคราะห์ paraquat จำนวน 14 ค่า และ chlormequat จำนวน 7 ค่า พบว่าผลการประเมินอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้คิดเป็นร้อยละ 92.9 และ 85.7 ตามลำดับ บ่งชี้ว่าโดยรวมแล้วห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมในครั้งนี้มีความสามารถในการวัดและให้ผลวิเคราะห์ที่มีความน่าเชื่อถือ

คำสำคัญ: การเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ, สารกำจัดวัชพืช, สารกลุ่มควอต, มันฝรั่ง

Corresponding author E-mail: srikoterattiyakorn@gmail.com

Received: 28 August 2025

Revised: 14 November 2025

Accepted: 17 November 2025



บทนำ

สารกำจัดวัชพืชกลุ่มควอต (Quaternary ammonium compounds หรือ Quats) เป็นสารกำจัดวัชพืชแบบสัมผัส (contact herbicide)⁽¹⁾ ที่มีคุณสมบัติในการกำจัดวัชพืชได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง โดยทำลายเนื้อเยื่อพืชโดยตรง นิยมใช้กำจัดวัชพืชในพื้นที่การเกษตร เช่น พืชสวน พืชไร่ หรือพื้นที่รกร้าง การใช้สารในกลุ่มนี้อาจมีอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม ในอดีตมีการนำเข้าสู่สารในกลุ่มนี้เป็นจำนวนมาก จากข้อมูลสถิติของกรมวิชาการเกษตร ปี พ.ศ. 2560 มีรายงานสรุปการนำเข้าสาร paraquat ซึ่งเป็นวัตถุอันตรายทางการเกษตร ปริมาณนำเข้าสูงถึง 44,501 ตัน⁽²⁾ แม้ในปัจจุบันได้ถูกยกเลิกการใช้งานในประเทศไทยแล้ว แต่ยังสามารถตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้ โดยสารในกลุ่มนี้จะถูกดูดซับในดินอย่างรวดเร็ว และสามารถตกค้างและย่อยสลายได้ช้ามาก โดยมีค่าครึ่งชีวิตยาวนานกว่า 10 ปี⁽³⁾ แม้สารเคมีเหล่านี้เป็นสารที่ระเหยเป็นไอได้ยาก แต่สามารถลอยลอยอยู่ในอากาศในลักษณะอนุภาค และอาจถูกฝนชะล้างลงสู่พื้นดินหรือแหล่งน้ำได้ สามารถตรวจพบได้ทั้งในน้ำผิวดิน น้ำตื้น และน้ำใต้ดิน ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำได้ การตกค้างของสารเคมีในดินและน้ำจะเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ เช่น ทำลายคลอโรฟิลล์ในพืชน้ำ และเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ สารในกลุ่มนี้มีพิษร้ายแรงหากสัมผัสทางผิวหนังอาจทำให้เกิดการระคายเคือง แต่หากเข้าสู่ร่างกายโดยการกลืนกินหรือสูดดม⁽⁴⁾ จะส่งผลกระทบต่อระบบทางเดินหายใจ ตับ ไต และหัวใจ อาจทำให้เสียชีวิตได้ การใช้สารเคมีกลุ่มนี้โดยไม่มีอุปกรณ์ป้องกันที่เหมาะสม ทำให้เกษตรกรมีความเสี่ยงสูงที่จะได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย paraquat เป็นสารเคมีที่ถูกห้ามในการผลิต⁽⁵⁾ นำเข้า ส่งออก นำผ่าน หรือมีไว้ครอบครอง และจำหน่ายในประเทศไทยตั้งแต่วันที่ 1 มิถุนายน พ.ศ. 2563 เนื่องจากพิษร้ายแรงและอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามสารในกลุ่มควอตอื่นๆ เช่น chlormequat ยังคงมีการใช้อยู่ภายใต้การควบคุมที่เข้มงวด การตรวจวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชกลุ่มควอตควรต้องดำเนินการโดยห้องปฏิบัติการที่มีมาตรฐานและมีความน่าเชื่อถือ เพื่อให้ผลการตรวจวิเคราะห์มีความ

แม่นยำและสามารถใช้ในการตัดสินใจได้อย่างถูกต้อง ห้องปฏิบัติการที่ได้การรับรองมาตรฐาน เช่น ISO/IEC 17025 แสดงให้เห็นว่ามีระบบการจัดการคุณภาพและความสามารถทางเทคนิคในการทดสอบที่ถูกต้องตามหลักสากล การเลือกใช้เทคนิค ห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐานจะใช้เทคนิคการวิเคราะห์ขั้นสูงและมีความจำเพาะเจาะจงสูง เช่น เทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS/MS) หรือ Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS) เพื่อให้สามารถตรวจสอบสารตกค้างได้ในระดับน้อยมาก (trace level) และมีความแม่นยำสูง สอดรับกับการบังคับใช้กฎหมายที่หน่วยงานกำกับดูแลภาครัฐ รวมถึงหน่วยงานต่างประเทศ สามารถใช้เป็นหลักฐานทางกฎหมายในการบังคับใช้มาตรฐานความปลอดภัยของอาหาร เพื่อการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ที่แม่นยำของห้องปฏิบัติการให้ได้มาตรฐาน ในการป้องกันภัยสุขภาพของผู้บริโภค

การเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory comparison; ILC)⁽⁶⁾ คือการประเมินความสามารถและประเมินผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการตั้งแต่ 2 แห่ง หรือมากกว่า ในการทดสอบตัวอย่างเดียวกันตามสภาวะที่กำหนดไว้ เป็นการยืนยันว่าผลวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการต่างๆ สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้อย่างเท่าเทียม หากห้องปฏิบัติการทดสอบ (testing laboratory) ต้องการให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับ จำเป็นต้องมีระบบคุณภาพที่สอดคล้องกับมาตรฐานที่กำหนดไว้ในระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025⁽⁷⁾ ซึ่งเป็นมาตรฐานสากล และได้การรับรองความสามารถจากหน่วยรับรองห้องปฏิบัติการ (accreditation body) เพื่อประกันความสามารถของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ ผู้จัดการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (provider) จะจัดส่งตัวอย่างที่แบ่งมาจากตัวอย่างเดียวกัน ไปยังห้องปฏิบัติการสมาชิกในเวลาเดียวกัน เพื่อให้สมาชิกทำการวิเคราะห์และส่งผลภายในเวลาที่กำหนด การเข้าร่วมการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการเป็นกระบวนการควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ภายนอก จึงเป็นปัจจัยชี้บ่งถึงความสามารถหรือ

ปัญหาในการวิเคราะห์ที่ได้ระดับหนึ่งว่านอกเหนือจากการเลือกใช้วิธีวิเคราะห์ที่มีการทดสอบความใช้ได้ของวิธีและยืนยันความเหมาะสม (validated method) การเลือกใช้เครื่องมือวัดที่ผ่านการสอบเทียบ (calibrated equipment) และการควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control) อีกทั้งต้องมีการควบคุมคุณภาพจากภายนอก (external quality control) โดยเข้าร่วมการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ เพื่อตรวจสอบหรือเฝ้าระวังความสามารถในการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการและให้เป็นไปตามข้อกำหนดของหน่วยงานที่ให้การรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการ การตรวจวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชกลุ่มควอตมีความซับซ้อนและต้องใช้เทคนิควิเคราะห์ที่มีความจำเพาะเจาะจงและแม่นยำสูง หน่วยงานที่เป็นผู้จัดการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการนอกจากจะต้องมีความสามารถในการบริหารจัดการและดำเนินงานภายใต้ระบบคุณภาพ ISO/IEC 17043:2023 แล้ว ยังต้องมีความสามารถในการวิเคราะห์มีประสบการณ์ ทักษะ และทราบเทคนิคการวิเคราะห์เป็นอย่างดี สามารถระบุปัญหาและสิ่งที่ต้องปรับปรุงในกระบวนการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมได้ เป็นการส่งเสริมการพัฒนาและยกระดับคุณภาพของห้องปฏิบัติการในประเทศไทยให้มีคุณภาพเป็นไปตามมาตรฐานสากล สร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภคด้านความปลอดภัยของผักและผลไม้ และส่งเสริมความเข้มแข็งของระบบเฝ้าระวังความปลอดภัยในการคุ้มครองผู้บริโภคของประเทศ อีกทั้งเป็นการแลกเปลี่ยนเรียนรู้ระหว่างห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมซึ่งเป็นภารกิจหนึ่งของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการประกันคุณภาพผลการวิเคราะห์ โดยเป็นผู้ดำเนินการทดสอบความชำนาญด้านการวิเคราะห์ เพื่อศึกษาความเท่าเทียมกันของผลการวิเคราะห์ และลดค่าใช้จ่ายในการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญกับต่างประเทศ

ห้องปฏิบัติการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร เป็นหน่วยงานที่ได้รับการรับรองความสามารถผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043 เวอร์ชัน 2010 และ 2023 จากกองบริหารและรับรองห้องปฏิบัติการ

กรมวิทยาศาสตร์บริการ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 โดยให้บริการทดสอบความชำนาญในขอบข่ายการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชรวม 3 แผน ในตัวอย่างต่างๆ ได้แก่ กัญชา กัญชงและผลิตภัณฑ์ ผักและผลไม้ และไขมันสัตว์ แต่เนื่องจากสารกำจัดวัชพืชหลายชนิดเป็นสารที่ต้องมีการวิเคราะห์แบบ single residue analysis จึงไม่สามารถรวมอยู่ในขอบข่ายที่ให้บริการได้ รวมทั้งปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีหน่วยงานที่ให้บริการทดสอบความชำนาญการวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชในผักและผลไม้ แม้จะมีการให้บริการจากหน่วยงานในต่างประเทศ เช่น Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS)⁽⁸⁾ ซึ่งเป็นโปรแกรมทดสอบความชำนาญ (proficiency testing; PT) สำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบอาหารของสหราชอาณาจักร เป็นรายการทดสอบสารกำจัดวัชพืชกลุ่มควอตในผัก ผลไม้ และธัญพืช แต่ยังคงมีค่าใช้จ่ายในการเข้าร่วมค่อนข้างสูง รวมทั้งมีการร้องขอจากห้องปฏิบัติการจากหลายหน่วยงานในประเทศให้กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เป็นผู้ดำเนินการทดสอบความชำนาญหรือการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ ดังนั้นในปีงบประมาณ พ.ศ. 2568 สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร จึงได้ดำเนินการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการสารกำจัดวัชพืชกลุ่มควอตในมันฝรั่ง รหัสแผน BQSF ILC 01-68 ระหว่างเดือนกันยายน พ.ศ. 2567 ถึง เดือนมีนาคม พ.ศ. 2568 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสามารถทางเทคนิคของห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชนที่ทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารกำจัดวัชพืชกลุ่มควอต โดยมีขอบข่ายเป็นสาร 4 ชนิด ได้แก่ paraquat, diquat, chlormequat และ mepiquat ในผักและผลไม้ ซึ่งมีชนิดตัวอย่างเป็นมันฝรั่ง ผลที่ได้จากการดำเนินงานจะสามารถระบุความแตกต่างของผลที่อาจเกิดจากวิธีวิเคราะห์และสภาวะต่างๆ ที่แตกต่างกัน ใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาความสามารถห้องปฏิบัติการให้มีผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ และมีความน่าเชื่อถือเพิ่มมากขึ้น โดยสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารเป็นผู้เตรียมตัวอย่าง กำหนดค่า assigned value และประเมินผลการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ รวมถึงการจัดทำรายงานให้ห้องปฏิบัติการสมาชิกที่เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: acetonitrile HPLC grade (HPLC, Merck, South Korea), methanol HPLC grade (Supelco, USA), formic acid (AR, Fisher Scientific, UK), ammonium formate AR grade (Sigma-Aldrich, India) และ น้ำ RO Type I มีค่า resistivity ระหว่าง 10-18 มิลลิโอห์ม-เซนติเมตร

สารมาตรฐาน: paraquat และ chlormequat เกรดวัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material; CRM) (Dr. Ehrenstorfer, Germany) เป็นสารมาตรฐานในรูปแบบเกลือคลอไรด์ paraquat dichloride ความบริสุทธิ์ 81.57% ค่าความไม่แน่นอน 1.63% และ chlormequat chloride ความบริสุทธิ์ 98.19% ค่าความไม่แน่นอน 2.33% ก่อนนำไปวิเคราะห์คำนวณความเข้มข้นให้อยู่ในรูปแบบ paraquat cation และ chlormequat cation

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง Liquid Chromatography Mass Spectrometer (LC-MS/MS) สำหรับตรวจวิเคราะห์ ชนิดและปริมาณ LC รุ่น 1260 series (Agilent, Singapore), MS/MS รุ่น 5500 QTRAP (AB Sciex, Canada) analytical column: Atlantis[®]HILIC Silica, (2.1 มิลลิเมตร × 150 มิลลิเมตร, 3 ไมโครเมตร), column oven: 35 องศาเซลเซียส, 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที, volume inject: 10 ไมโครลิตร, mobile phase A:B (20 มิลลิโมลาร์ ammonium formate: acetonitrile)

เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.001 กรัม สำหรับชั่งตัวอย่าง และเครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.01 มิลลิกรัม (Sartorius, Germany) สำหรับชั่งสารมาตรฐาน, เครื่องปั่นตัวอย่าง (Ronic, France), เครื่องปั่นตกตะกอน (centrifuge) (Thermo Fisher, Germany) ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที, เครื่องหมุนปั่นผสมสารละลาย (Vortex-2 Genie, USA), volumetric flask ชนิด polypropylene (Isolab, Germany) ขนาด 10, 25 และ 50 มิลลิลิตร, micropipette (Eppendorf, Germany) ขนาด 20-200 ไมโครลิตร และขนาด 1-10 มิลลิลิตร, screw cap centrifuge

tube ชนิด polypropylene (Vertical, Thailand) ขนาด 50 มิลลิลิตร, micro-spin filters ชนิด nylon (Vertical, Thailand) ขนาด 0.2 ไมครอน, vial สีขาว ชนิด polypropylene (Biofil, China) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และ syringe ขนาด 6 มิลลิลิตร พร้อม SPE adapter

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

การศึกษานี้ใช้มันฝรั่งสดเป็นตัวแทนตัวอย่าง ผักและผลไม้ โดยซื้อจากตลาดค้าส่งน้ำหนัก 5 กิโลกรัม นำมาล้างทำความสะอาด ปอกเปลือก หั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก และบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน นำมาตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นตรวจไม่พบสารตกค้างของสารกำจัดวัชพืชใน ขอบข่ายจากนั้นนำตัวอย่างที่บดละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่งน้ำหนักประมาณ 1.5 กิโลกรัม ใช้เป็น blank sample และส่วนที่สองน้ำหนัก ประมาณ 3.5 กิโลกรัม สำหรับเตรียม ILC samples ได้แก่ test sample 1 เติมสารมาตรฐาน paraquat และ chlormequat ที่ระดับความเข้มข้นชนิดละ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ test sample 2 เติม สารมาตรฐาน paraquat และ chlormequat ที่ระดับ ความเข้มข้น 50 และ 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จากนั้นกวนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันในหม้อสแตนเลส ขนาดบรรจุ 10 ลิตร สุ่มตัวอย่าง blank sample, test sample 1 และ test sample 2 ทำการสุ่มตัวอย่างที่ 3 ตำแหน่งในภาชนะ (บน กลาง ล่าง) ตำแหน่งละ 10 กรัม เพื่อทดสอบเบื้องต้นก่อนแบ่งบรรจุให้สมาชิกผลการ ทดสอบเบื้องต้นกำหนดให้ปริมาณสารที่ตรวจพบ ทั้ง 3 ตำแหน่ง ต้องมีค่า %RSD น้อยกว่า 25%⁽⁶⁾ จึงนำมาแบ่งบรรจุได้ แบ่งบรรจุตัวอย่างโดยชั่ง ILC sample น้ำหนักขวดละ 100 กรัม ปิดฝาแล้วพันทับด้วย แผ่น parafilm ติดฉลากรหัสตัวอย่าง test sample 1, test sample 2 จำนวนตัวอย่างละ 30 ขวด ด้วยรหัส PA1 001 - PA1 030, PA2 001 - PA2 030 และ blank sample จำนวน 15 ขวด ด้วยรหัส PB 001 - PB 015 ดังแสดงในตารางที่ 1 เก็บรักษาในตู้แช่เยือกแข็ง (อุณหภูมิ ≤ -15 องศาเซลเซียส) (Cooling Line Innovation Co., Ltd., Thailand)

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นเป้าหมายของสารกำจัดวัชพืชกลุ่มควอตใน ILC sample

ตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	
		paraquat	chlormequat
test sample 1	PA1 001 - PA1 030	100	100
test sample 2	PA2 001 - PA2 030	50	200
blank sample	PB 001 - PB 015	0	0

การวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชกลุ่มควอต

วิธีที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ใช้วิธี EURL-SRM (QuPPE-PO-Method); Version 10.1 (2019)⁽⁹⁾ ซึ่งตัวอย่างผักและผลไม้ 10.0 กรัม ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 ml เติมน้ำให้ครบ 100% ของตัวอย่าง โดยคำนวณปริมาตรน้ำกลั่นที่เติมตามความชื้นของแต่ละชนิดตัวอย่าง พิจารณาความชื้น (%water) จากตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารไทย กรมอนามัย (2018) ปั่นด้วย vortex mixer นาน 1 นาที เติมน้ำ acidified methanol (1% formic acid ใน MeOH) 10 มิลลิลิตร ปั่นด้วย vortex mixer นาน 1 นาที เชย่ต่อเนืองใน water bath (WB 22, Memmert, Germany) ที่อุณหภูมิ 80±2 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดสารละลาย ส่วนใส ประมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่หลอด micro-spin filter 0.45 ไมโครเมตร ชนิด nylon หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลายที่กรองได้ใส่ขวดพลาสติกสีขาว ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง LC-MS/MS (1260-5500 QTRAP, AB Sciex, Canada) โดยมี LOD = 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ LOQ = 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิธีผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธี และเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชกลุ่มควอต ในตัวอย่างผักและผลไม้ของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร รวมทั้งได้รับการรับรองความสามารถตามระบบคุณภาพมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ มีการควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ทั้งภายในและการควบคุมคุณภาพภายนอก

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity test)⁽¹⁰⁾

ตัวอย่าง ILC sample จำนวน 10 ชุด ถูกสุ่มแบบอิสระ (random sampling) แล้วนำมาวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชกลุ่มควอตในผักและผลไม้ ด้วยวิธี EURL-SRM (QuPPE-PO-Method); Version 10.1 (2019) ที่ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 โดยทำการวิเคราะห์ชุดละ 2 ซ้ำ แบบ random แล้วคำนวณผลทางสถิติโดยใช้ Cochran's test เพื่อทดสอบ within sample variation จากนั้นทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันตาม ISO 13528:2022 คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างตัวอย่าง (between samples standard deviation; S_s) ถ้าพบว่า S_s ของทุกรายการวิเคราะห์มีค่าน้อยกว่า 0.3 ของค่า standard deviation; σ ของ ILC (σ_{ILC}) สรุปได้ว่าตัวอย่างที่เตรียมขึ้นมีความเป็นเนื้อเดียวกันเหมาะสม (adequately homogenous)

การทดสอบความคงตัว (Stability test)⁽¹⁰⁾

ความคงตัวของปริมาณสารกำจัดวัชพืชกลุ่มควอต ในตัวอย่างทดสอบ ดำเนินการที่ 2 สภาวะ ได้แก่ สภาวะเลียนแบบการขนส่ง โดยสุ่ม ILC sample แบบอิสระจำนวน 3 ชุด ใส่ในกล่องโฟมวางไว้ในตู้เย็นที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 2-8 องศาเซลเซียส ในตู้เย็น (Hitachi รุ่น R-Z380VX, Thailand) นาน 3 วัน แล้วเก็บตัวอย่างไว้ในตู้แช่แข็งและสภาวะควบคุมอุณหภูมิที่ตู้แช่แข็ง โดยสุ่ม ILC sample แบบอิสระจำนวน 3 ชุด ที่เก็บรักษาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ ≤ -15 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ชุดละ 2 ซ้ำ หลังจากวันที่กำหนดส่งผลด้วยวิธีวิเคราะห์ EURL-SRM (QuPPE-PO-

Method); Version 10.1 (2019) ที่ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์แล้ว นำค่ามาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์ก่อนส่งตัวอย่าง (\bar{y}_1) ซึ่งได้จากผลการวิเคราะห์ความเป็นเนื้อเดียวกันกับค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์ที่ได้หลังจากวันที่กำหนดให้สมาชิกตอบผล (\bar{y}_2) ถ้าพบว่ามีค่าแตกต่างระหว่าง \bar{y}_1 และ \bar{y}_2 ($|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|$) น้อยกว่า 0.3 ของค่า σ ของ ILC (σ_{ILC}) จึงสรุปได้ว่าตัวอย่างมีความคงตัวเหมาะสม (adequately stable)

การหาค่ากำหนด (x_{ILC}) และการประเมินผล

ค่ากำหนด (assigned value: x_{ILC}) ใช้ค่า x^* (robust average) จากผลการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการสมาชิกที่เข้าร่วมทั้งหมด โดยพิจารณาตัด blunder ที่มีค่ามากกว่า 10 เท่าของค่ากำหนด คำนวณโดยใช้ robust analysis: Algorithm A ตาม ISO 13528:2022⁽¹⁰⁾ ในกรณีที่มีจำนวนข้อมูลน้อยกว่า 12 ค่า จึงใช้ค่ากำหนดที่ได้จากห้องปฏิบัติการ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร โดยใช้ค่า grand mean ที่ได้จากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity test)

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (standard deviation for interlaboratory comparison assessment; σ_{ILC}) ประเมินผลการวิเคราะห์ในตัวอย่างทดสอบที่รายงานจากห้องปฏิบัติการสมาชิก สำหรับการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการนี้ได้เลือกใช้ general model จาก Horwitz's equation modified by Thompson เพื่อคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเป้าหมายสำหรับความเข้มข้นตั้งแต่ 120 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมขึ้นไป คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากสมการที่ 1

$$\sigma_{ILC} = 0.02c^{0.8495} \quad (1)$$

สำหรับความเข้มข้น น้อยกว่า 120 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากสมการที่ 2

$$\sigma_{ILC} = 0.02c \quad (2)$$

โดย c คือ ค่า assigned value แสดงในรูป concentration ratio

ค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่า assigned value (standard uncertainty of the assigned value, $u(x_{ILC})$) สาร paraquat ใช้การประมาณค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่ากำหนดที่เป็นค่าพ้องของสมาชิก (consensus value) จาก robust algorithm A โดยคำนวณจากสมการที่ 3

$$u(x_{ILC}) = \frac{1.25 \times S^*}{\sqrt{p}} \quad (3)$$

โดย S^* คือ robust standard deviation คำนวณโดยใช้ robust algorithm: Algorithm A

p คือ จำนวนข้อมูล

สำหรับสารที่จำนวนข้อมูลน้อยกว่า 12 ค่า ใช้การประมาณค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่ากำหนดที่ได้มาจากห้องปฏิบัติการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ตามวิธี ISO GUM⁽¹¹⁾

การประเมินผลสมาชิกจะใช้ค่า z-score หรือ z'-score ดังนี้

z-score ของห้องปฏิบัติการสมาชิก คำนวณจากสมการที่ 4

$$Z = \frac{x_i - x_{ILC}}{\sigma_{ILC}} \quad (4)$$

z'-score ของห้องปฏิบัติการสมาชิก คำนวณจากสมการที่ 5

$$z' = \frac{x_i - x_{ILC}}{\sqrt{\sigma_{ILC}^2 + u^2(x_{ILC})}} ; \text{เมื่อ } u(x_{ILC}) > 0.3 \sigma_{ILC} \quad (5)$$

x_i คือ reported result

x_{ILC} คือ assigned value

σ_{ILC} คือ standard deviation for ILC assessment

$u(x_{ILC})$ คือ standard uncertainty of assigned value

$\sqrt{\sigma_{ILC}^2 + u^2(x_{ILC})}$ คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก Horwitz's equation รวมกับค่าความไม่แน่นอนของค่ากำหนด

โดยเกณฑ์การประเมินผลสมาชิก พิจารณาดังนี้

$|z|$ หรือ $|z'| \leq 2.0$ แสดงว่าผลวิเคราะห์สามารถยอมรับได้ (acceptable)

$2.0 < |z|$ หรือ $|z'| < 3.0$ แสดงว่าผลวิเคราะห์น่าสงสัย (questionable)

$|z|$ หรือ $|z'| \geq 3.0$ แสดงว่าผลวิเคราะห์ที่ไม่สามารถยอมรับได้ (unacceptable)

ผล

ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเมื่อน้ำมันฝรั่งที่บดละเอียดและผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วมาตรวจวิเคราะห์เบื้องต้น พบว่าตรวจไม่พบการตกค้างของสารกลุ่มควอตที่อยู่ในขอบข่ายการวิเคราะห์ทั้ง 4 ชนิด ดังนั้นสามารถนำมาใช้เป็นตัวอย่าง blank sample ได้นำตัวอย่าง blank sample แบ่งเป็น 2 ส่วน แต่ละส่วนเติมสารมาตรฐาน ดังนี้ test sample 1 เติมสาร paraquat และ chlormequat ระดับความเข้มข้นชนิดละ 100

ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ test sample 2 เติมสาร paraquat และ chlormequat ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ทำการสุ่มตัวอย่าง test sample 1 จำนวน 10 ขวด หมายเลข PA1 004, 007, 008, 011, 014, 019, 020, 023, 028 และ 030 และสุ่มตัวอย่าง test sample 2 หมายเลข PA2 001, 006, 008, 012, 015, 019, 020, 024, 027 และ 030 ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ นำผลการวิเคราะห์มาคำนวณทางสถิติโดยใช้ Cochran's test เพื่อทดสอบ within sample variation ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันตาม ISO 13528:2022 คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างตัวอย่าง (between samples standard deviation; S_s)⁽¹⁰⁾ พบว่า S_s ของทุกรายการวิเคราะห์มีค่าน้อยกว่า 0.3 ของค่า standard deviation (σ_{ILC}) ดังนั้นตัวอย่างที่เตรียมขึ้นนี้มีความเป็นเนื้อเดียวกันเหมาะสม (adequately homogenous) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของน้ำมันฝรั่ง test sample 1 และ test sample 2

รหัสตัวอย่าง	test sample 1 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)				รหัสตัวอย่าง	test sample 2 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)			
	paraquat		chlormequat			paraquat		chlormequat	
	replicate 1	replicate 2	replicate 1	replicate 2		replicate 1	replicate 2	replicate 1	replicate 2
PA1 004	106.7	113.5	109.5	102.4	PA2 001	50.6	49.2	203.9	211.5
PA1 007	101.3	111.4	103.7	110.5	PA2 006	53.9	57.1	215.7	213.8
PA1 008	109.6	104.2	108.3	105.7	PA2 008	53.7	50.0	204.0	208.3
PA1 011	104.9	107.5	102.5	104.4	PA2 012	51.5	52.1	200.8	205.7
PA1 014	104.4	106.3	100.1	103.6	PA2 015	52.4	52.8	205.2	214.3
PA1 019	106.3	107.8	111.3	111.4	PA2 019	52.7	58.4	216.1	206.1
PA1 020	103.3	106.3	106.0	107.7	PA2 020	50.0	48.6	215.4	206.1
PA1 023	111.1	106.8	111.8	108.2	PA2 024	50.9	50.4	205.0	204.9
PA1 028	104.0	107.6	107.1	108.0	PA2 027	54.2	49.6	205.5	201.7
PA1 030	110.3	110.9	105.4	104.1	PA2 030	55.4	49.1	204.4	200.2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของมันฝรั่ง test sample 1 และ test sample 2 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	test sample 1 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)				รหัสตัวอย่าง	test sample 2 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)			
	paraquat		chlormequat			paraquat		chlormequat	
	replicate	replicate	replicate	replicate		replicate	replicate	replicate	replicate
	1	2	1	2		1	2	1	2
Mean _{homo} (\bar{Y}_1)	107.2		106.6		Mean _{homo} (\bar{Y}_1)	52.1		207.4	
Cochran _{crit}	0.602		0.602		Cochran _{crit}	0.602		0.602	
Cochran _{cal}	0.442		0.366		Cochran _{cal}	0.325		0.247	
X_{ILC}	91.5		106.6		X_{ILC}	47.8		207.4	
σ_{ILC}	20.1		23.5		σ_{ILC}	10.5		42.0	
S_s	0 ^a		2.1		S_s	1.1		2.6	
0.3 σ_{ILC}	6.0		7.0		0.3 σ_{ILC}	3.2		12.6	
$S_S < 0.3 \sigma_{ILC}$	Passed		Passed		$S_S < 0.3 \sigma_{ILC}$	Passed		Passed	

หมายเหตุ: ^aMean Square Between (MSB) < Mean Square Within (MSW)

Mean_{homo} (\bar{Y}_1) คือ ค่าเฉลี่ยจากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

Cochran_{crit} คือ Cochran critical value at 95% confidence level ($p = 0.05$)

Cochran_{cal} คือ Cochran critical value จากการคำนวณ

จากนั้นทำการส่งตัวอย่างทดสอบไปให้ห้องปฏิบัติการ (sample distribution) มีห้องปฏิบัติการที่แจ้งความประสงค์ขอสมัครเข้าร่วมทดสอบการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ สารกำจัดวัชพืชกลุ่มควอตินมันฝรั่ง จำนวน 11 ห้องปฏิบัติการ ทำการสุ่มตัวอย่างที่ซั้งแล้ว สำหรับส่งให้สมาชิกที่เข้าร่วมและจัดส่งตัวอย่างพร้อมเอกสารที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ รายการเอกสารที่ห้องปฏิบัติการได้รับ แบบตอบรับตัวอย่าง คำแนะนำแบบรายงานผลการวิเคราะห์ที่ให้กับห้องปฏิบัติการที่สมัครเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ โดยการนำส่งบริการจัดส่งแบบรักษาอุณหภูมิที่ 2-8 องศาเซลเซียส ในวันที่ 13 มกราคม พ.ศ. 2568 และแจ้งกำหนดส่งผลกลับภายในวันที่ 31 มกราคม พ.ศ. 2568 ห้องปฏิบัติการสมาชิกทุกแห่งตอบรับและแจ้งว่าได้รับตัวอย่างที่อยู่ในสภาพเหมาะสมกับการวิเคราะห์

หลังจากห้องปฏิบัติการสมาชิกเข้าร่วมเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการรายงานผลการวิเคราะห์แล้ว นำตัวอย่างมาทดสอบความคงตัวภายใน 7 วัน หลังจากวันสุดท้ายที่กำหนดให้สมาชิกตอบผล โดยสุ่มตัวอย่าง

แบบอิสระ เพื่อทดสอบความคงตัวของตัวอย่างที่ 2 สภาวะสภาวะละ 3 ขวด ทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ ในแต่ละตัวอย่างได้แก่ ที่สภาวะอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อเลียนแบบสภาวะขนส่ง โดย test sample 1 สุ่มตัวอย่าง หมายเลข PA1 002, 016 และ 027 และ test sample 2 หมายเลข PA2 003, 011 และ 023 และที่สภาวะอุณหภูมิ ≤ -15 องศาเซลเซียส โดย test sample 1 สุ่มตัวอย่าง หมายเลข PA1 013, 022 และ 026 และ test sample 2 หมายเลข PA2 017, 018 และ 029 วิเคราะห์ด้วยวิธีเดียวกับการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำค่าที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์ที่ก่อนส่งตัวอย่าง (\bar{y}_1) ซึ่งได้จากผลการวิเคราะห์ความเป็นเนื้อเดียวกันกับค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์ที่ได้หลังจากวันที่กำหนดให้สมาชิกตอบผล (\bar{y}_2) พบว่ามีค่าแตกต่างระหว่าง \bar{y}_1 และ \bar{y}_2 ($|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|$) น้อยกว่า 0.3 ของค่า standard deviation ของ ILC (σ_{ILC}) ดังนั้นตัวอย่างมีความคงตัวเหมาะสม (adequately stable) ดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4⁽¹⁰⁾

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความคงตัวของมันฝรั่ง test sample 1 และ test sample 2 ที่สภาวะอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

รหัสตัวอย่าง	test sample 1 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)				รหัสตัวอย่าง	test sample 2 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)			
	paraquat		chlormequat			paraquat		chlormequat	
	replicate	replicate	replicate	replicate		replicate	replicate	replicate	replicate
	1	2	1	2		1	2	1	2
PA1 002	102.3	96.7	104.4	104.0	PA2 003	51.7	52.7	206.0	206.6
PA1 016	104.4	106.1	105.1	102.9	PA2 011	51.7	49.5	204.8	200.5
PA1 027	108.5	99.8	106.1	99.5	PA2 015	50.1	50.0	199.6	204.9
Mean _{sta} (\bar{y}_2)	102.2		102.6		Mean _{sta} (\bar{y}_2)	51.0		203.7	
Mean _{homo} (\bar{Y}_1)	107.2		106.6		Mean _{homo} (\bar{y}_2)	52.1		207.4	
σ_{ILC}	20.2		23.5		σ_{ILC}	10.5		42.0	
0.3 σ_{ILC}	6.1		7.0		0.3 σ_{ILC}	3.2		12.6	
$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 $	5.1		4.0		$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 $	1.1		3.7	
$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 $	Passed		Passed		$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 $	Passed		Passed	
$< 0.3 \sigma_{ILC}$					$< 0.3 \sigma_{ILC}$				

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความคงตัวของมันฝรั่ง test sample 1 และ test sample 2 ที่สภาวะอุณหภูมิ ≤ -15 องศาเซลเซียส

รหัสตัวอย่าง	test sample 1 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)				รหัสตัวอย่าง	test sample 2 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)			
	paraquat		chlormequat			paraquat		chlormequat	
	replicate	replicate	replicate	replicate		replicate	replicate	replicate	replicate
	1	2	1	2		1	2	1	2
PA1 013	101.3	99.7	103.4	101.0	PA2 017	51.7	52.7	202.0	202.6
PA1 022	103.4	101.1	106.1	99.9	PA2 018	51.7	49.5	199.8	200.6
PA1 026	107.5	99.9	105.4	99.6	PA2 029	50.1	50.0	199.9	203.9
Mean _{sta} (\bar{y}_2)	102.2		102.6		Mean _{sta} (\bar{y}_2)	51.0		201.5	
Mean _{homo} (\bar{Y}_1)	107.2		106.6		Mean _{homo} (\bar{y}_2)	52.1		207.4	
σ_{ILC}	20.2		23.5		σ_{ILC}	10.5		42.0	
0.3 σ_{ILC}	6.1		7.0		0.3 σ_{ILC}	3.2		12.6	
$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 $	5.1		4.0		$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 $	1.1		5.9	
$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 $	Passed		Passed		$ \bar{y}_1 - \bar{y}_2 $	Passed		Passed	
$< 0.3 \sigma_{ILC}$					$< 0.3 \sigma_{ILC}$				

การเข้าร่วมการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ ในครั้งนี้มีห้องปฏิบัติการเข้าร่วม จำนวน 11 แห่ง และตอบผลกลับมาทั้ง 11 แห่ง รายการทดสอบสาร paraquat ใน test sample 1 และ test sample 2 มีห้องปฏิบัติการ

รายงานผลการทดสอบทุกแห่ง โดยห้องปฏิบัติการ รหัส 00004 รายงานผลวิเคราะห์ จำนวน 2 ค่า และห้องปฏิบัติการ รหัส 00011 รายงานผลวิเคราะห์ จำนวน 3 ค่า ทำให้มีจำนวนข้อมูลจากห้องปฏิบัติสมาชิก

ที่ใช้ประเมินทั้งสิ้นรวม 14 ค่า ในรายการทดสอบสาร chlormequat มีห้องปฏิบัติการเข้าร่วมรายงานผลการทดสอบเพียง 5 แห่ง และห้องปฏิบัติการ รหัส 00011 รายงานผลวิเคราะห์ จำนวน 3 ค่า ทำให้มีจำนวนผลจากห้องปฏิบัติสมาชิกที่ใช้ประเมินทั้งสิ้นรวม 7 ค่า ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์มันฝรั่ง test sample 1 และ test sample 2 ของสมาชิกที่เข้าร่วมการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ

รหัสห้องปฏิบัติการ	test sample 1 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)		test sample 2 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	
	paraquat	chlormequat	paraquat	chlormequat
00001	68.90	NT	38.05	NT
00002	91.15	95.45	47.75	197.14
00003	83.69	59.07	51.24	113.20
00004A	98.80	NT	53.30	NT
00004B	97.69	100.26	51.04	204.52
00005	89.90	52.79	46.60	92.83
00006	4162.12	NT	4086.82	NT
00007	89.29	NT	42.66	NT
00008	58.23	NT	31.99	NT
00009	81.30	NT	40.60	NT
00010	121.35	NT	61.55	NT
00011A	100.10	98.58	52.16	201.89
00011B	100.94	100.00	49.27	196.56
00011C	104.48	98.44	53.46	207.26

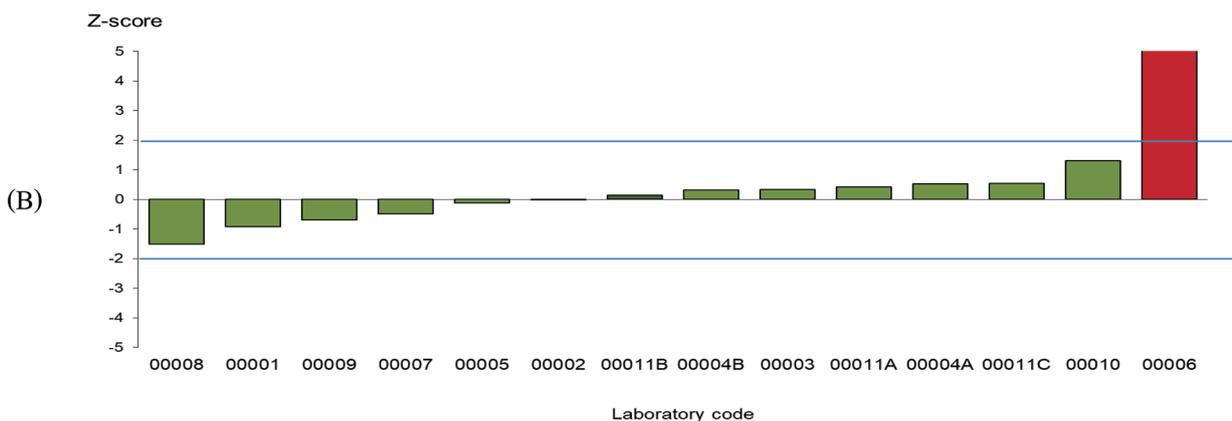
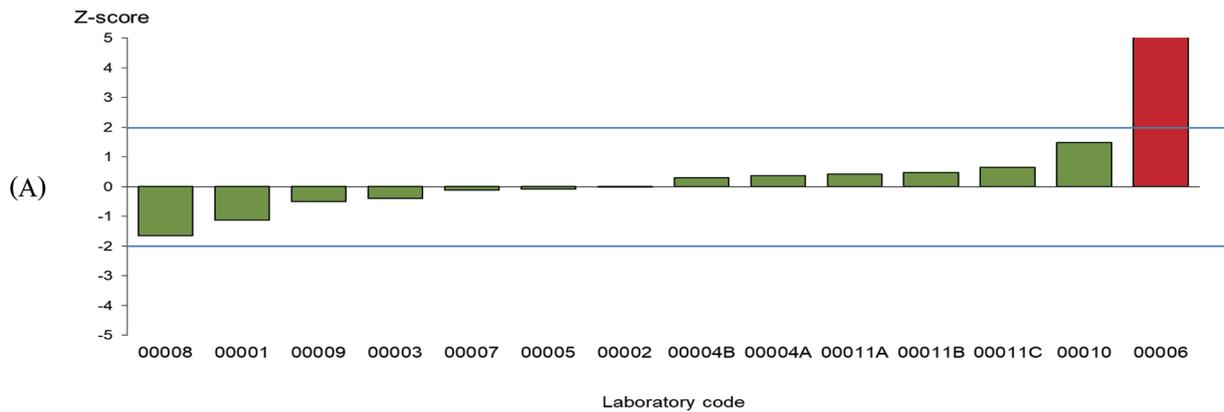
หมายเหตุ: NT คือ not test

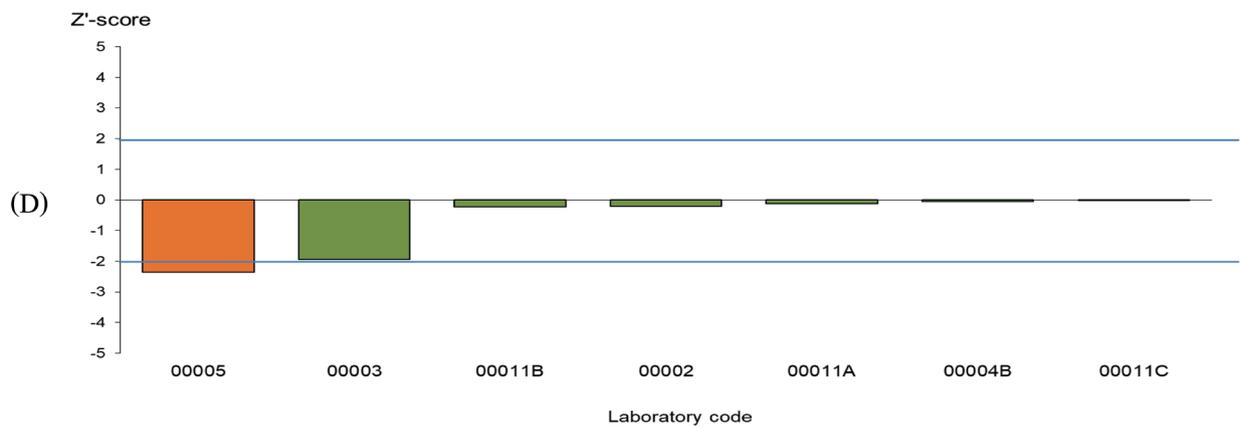
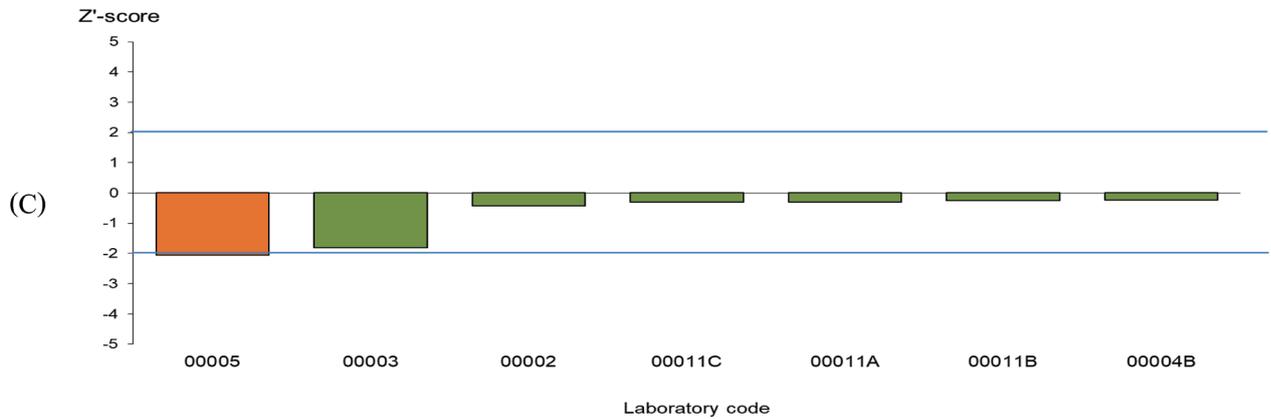
รายการทดสอบ paraquat ในตัวอย่าง test sample 1 และ test sample 2 มีค่ากำหนด (X_{ILC}) เป็น 91.5 และ 47.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และ standard deviation ของ ILC (σ_{ILC}) มีค่าเป็น 20.1 และ 10.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จำนวนค่าที่รายงานจากห้องปฏิบัติสมาชิก มีจำนวน 14 ค่า มีผลการประเมินอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ 13 ค่า คิดเป็นร้อยละ 92.9 และอยู่ในเกณฑ์ไม่สามารถยอมรับได้ 1 ค่า คิดเป็นร้อยละ 7.1 ส่วนรายการทดสอบสาร chlormequat ในตัวอย่าง test sample 1 และ test sample 2 มีค่ากำหนด (X_{ILC}) เป็น 106.6 และ 207.4

ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และ standard deviation ของ ILC (σ_{ILC}) รวมกับค่าความไม่แน่นอนของค่ากำหนด $u(x_{ILC})$ มีค่าเป็น 26.2 และ 48.7 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ มีจำนวนค่าที่รายงานจากห้องปฏิบัติสมาชิก จำนวน 7 ค่า ผลการประเมินอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ 6 ค่า คิดเป็นร้อยละ 85.7 อยู่ในเกณฑ์น่าสงสัย 1 ค่า คิดเป็นร้อยละ 14.3 การประเมินผลสาร paraquat ทั้ง 2 ตัวอย่างประเมินโดยใช้ z-score และสาร chlormequat ประเมินโดยใช้ z'-score ดังแสดงในตารางที่ 6 และภาพที่ 1 และ 2

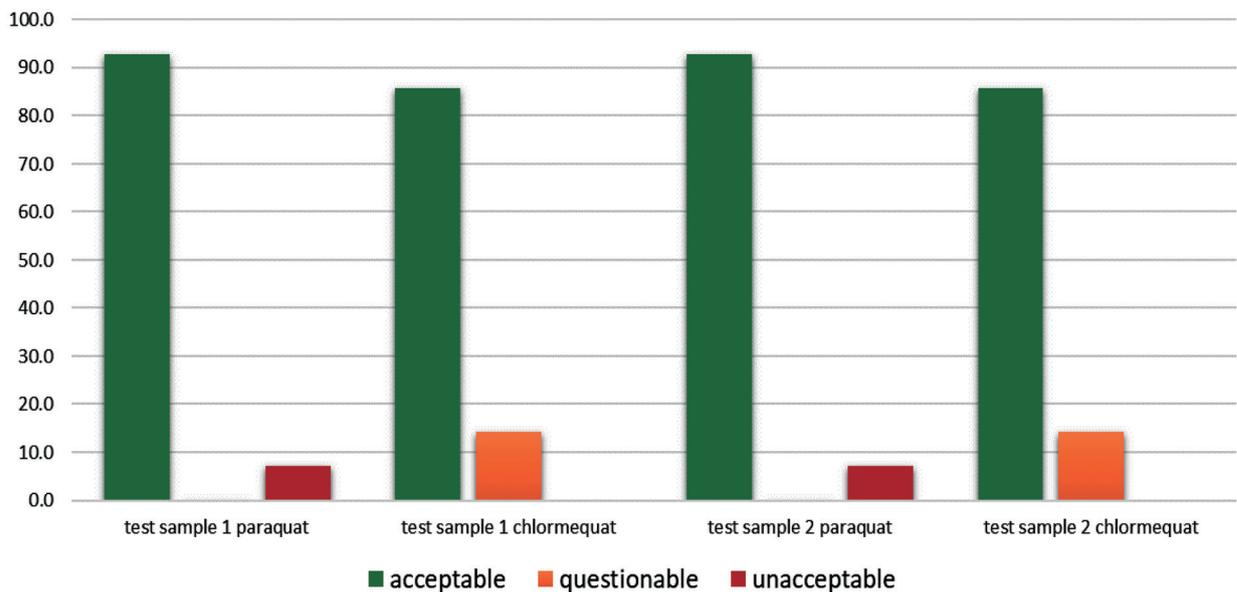
ตารางที่ 6 ค่า z-score และ z'-score ของสมาชิกที่เข้าร่วมทดสอบผลระหว่างห้องปฏิบัติการวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชกลุ่มควอติน้ำมันฝรั่ง

รหัส ห้องปฏิบัติการ	test sample 1		test sample 2	
	Paraquat	chlormequat	paraquat	chlormequat
	$x_{ILC} = 91.5$	$x_{ILC} = 106.6$	$x_{ILC} = 47.8$	$x_{ILC} = 207.4$
	$\sigma_{ILC} = 20.1$	$\sqrt{\sigma_{ILC}^2 + u^2(x_{ILC})} = 26.2$	$\sigma_{ILC} = 10.5$	$\sqrt{\sigma_{ILC}^2 + u^2(x_{ILC})} = 48.7$
	Z-score	Z'-score	Z-score	Z'-score
00001	-1.1	-	-0.9	-
00002	0.0	-0.4	0.0	-0.2
00003	-0.4	-1.8	0.3	-1.9
00004A	0.4	-	0.5	-
00004B	0.3	-0.2	0.3	-0.1
00005	-0.1	-2.1	-0.1	-2.4
00006	202.5	-	384.7	-
00007	-0.1	-	-0.5	-
00008	-1.7	-	-1.5	-
00009	-0.5	-	-0.7	-
00010	1.5	-	1.3	-
00011A	0.4	-0.3	0.4	-0.1
00011B	0.5	-0.3	0.1	-0.2
00011C	0.6	-0.3	0.5	0.0





ภาพที่ 1 z-score ของ paraquat ในมันฝรั่ง test sample 1 (A) และ test sample 2 (B) z'-score ของ chlormequat ในมันฝรั่ง test sample 1 (C) และ test sample 2 (D)



ภาพที่ 2 ร้อยละของค่า z-score ของสาร paraquat และ z'-score ของสาร chlormequat ใน test sample 1 และ test sample 2

วิจารณ์

การเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ ในครั้งนี้ ค่า assigned value จะไม่ถูกเปิดเผยแก่สมาชิกจนกว่าการประเมินผลจะแล้วเสร็จ ซึ่งเป็นการรักษาความลับของข้อมูลผลการทดสอบของแต่ละห้องปฏิบัติการ⁽¹⁾ สมาชิกแต่ละแห่งจะได้รับรหัสห้องปฏิบัติการเฉพาะ โดยการรายงานผลการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการจะไม่มี การระบุรหัสห้องปฏิบัติการพร้อมกับชื่อห้องปฏิบัติการ หากมีความจำเป็นในการนำผลหรือผลสรุปไปเผยแพร่ต่อสาธารณะ ผู้จัดจะไม่ระบุชื่อห้องปฏิบัติการใดๆ ในการเผยแพร่ นั้นๆ ในส่วนของห้องปฏิบัติการสมาชิกควรมีความรับผิดชอบ ในการรายงานผลด้วยความซื่อสัตย์ โดยไม่ควรเปิดเผยผลการวิเคราะห์ของตนเองหรือสอบถามคำตอบกับสมาชิกอื่น ทั้งนี้เพื่อให้สมาชิกสามารถใช้ประโยชน์จากการเข้าร่วมแผนทดสอบการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการได้ตรงตามวัตถุประสงค์และเกิดประโยชน์สูงสุด ในการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ ในครั้งนี้ กำหนดให้สาร paraquat เป็นสารเคมีเป้าหมายของการทดสอบ เนื่องจากในประเทศไทยมีการประกาศให้ paraquat เป็นสารห้ามใช้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2563⁽¹²⁾ แล้วนั้น ถึงแม้จะมีการยกเลิกการใช้งาน ยังคงมีข้อกังวลเรื่องการตกค้างในผักและผลไม้ รวมถึงสารกลุ่มควอตอื่น ๆ เช่น chlormequat ซึ่งมีการกำหนดค่าดีฟอลต์ลิมิต (default limits) ที่ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไว้ในบัญชีหมายเลข 3⁽¹³⁾ ในประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 460) พ.ศ. 2568 เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 3) การตรวจวิเคราะห์สารเหล่านี้ในผักและผลไม้จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ คือ มันฝรั่งที่เป็น spiked sample เพื่อประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์นั้นเป็นตัวแทนผักผลไม้กลุ่ม root and tuber vegetables⁽¹⁴⁾ เนื่องจากขอบข่ายการวิเคราะห์เป็นสารกำจัดวัชพืช ซึ่งอาจมีการตกค้างในดินและมีโอกาสปนเปื้อนมายังพืช หัวที่อยู่ในดินได้ง่าย ทำให้ห้องปฏิบัติการสมาชิกมีโอกาส ทวนสอบประสิทธิภาพของการสกัด

ในขั้นตอนการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันก่อนส่งตัวอย่างให้สมาชิกทดสอบ จำเป็นต้องทำการทดสอบเบื้องต้นในการควบคุมคุณภาพของตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เตรียมขึ้นโดยห้องปฏิบัติการอ้างอิงที่มีความเชี่ยวชาญ โดยใช้วิธีตามห้องปฏิบัติการของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ด้วยวิธีวิเคราะห์ EURL-SRM (QuPPe-PO-Method); Version 10.1 (2019)⁽⁹⁾ ที่ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อยืนยันความถูกต้องของชนิดและปริมาณสารกำจัดวัชพืช และความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างก่อนแบ่งบรรจุตัวอย่าง โดยการสุ่มตัวอย่างมันฝรั่งที่บดละเอียดแล้วเติมสารมาตรฐานและทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน จำนวน 3 ตำแหน่งของภาชนะ (บน กลาง ล่าง) เพื่อทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันในการวิเคราะห์เบื้องต้น ผลที่ได้ต้องมีค่าใกล้เคียงกันจึงจะสามารถแบ่งบรรจุตัวอย่างทดสอบได้ (%RSD \leq 25%) ในขั้นตอนการทดสอบความคงตัว ทำการสุ่มตัวอย่างแบบอิสระ (random sampling) จำนวน 3 ขวด โดยจะนำตัวอย่างมาทดสอบความคงตัวภายใน 7 วัน⁽⁶⁾ หลังจากวันสุดท้ายที่กำหนดให้สมาชิกตอบผลวิเคราะห์หาปริมาณสารกำจัดวัชพืช วิเคราะห์ขวดละ 2 ซ้ำ ที่ 2 สภาวะ ได้แก่ ที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 2-8 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน และที่อุณหภูมิ \leq -15 องศาเซลเซียส นำผลวิเคราะห์มาคำนวณทางสถิติเพื่อพิจารณาความคงตัวของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้หรือไม่ จากการประเมินพบว่าตัวอย่างทั้ง 2 สภาวะ มีความคงตัว การทดสอบความคงตัวทำที่ 2 สภาวะ โดยสภาวะแรกเป็นการเลียนแบบการขนส่งจัดส่งตัวอย่างโดยบริการขนส่งพัสดุแบบแช่แข็ง ซึ่งบริษัทขนส่งรับประกันการควบคุมอุณหภูมิที่ \leq -15 องศาเซลเซียส และสภาวะที่ 2 ทดสอบที่สภาวะแช่เย็นที่ 2-8 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบในกรณีที่มีการควบคุมอุณหภูมิไม่เป็นไปตามมาตรฐาน อย่างไรก็ตามพบว่าทั้ง 2 สภาวะ สามารถเก็บรักษาตัวอย่างให้มีความคงตัวที่เหมาะสมได้

จากรายงานผลการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการสมาชิกในการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการในครั้งนี้ สามารถชี้บ่งถึงปัจจัยหรือแนวโน้มของปัญหาการวิเคราะห์ สารกำจัดวัชพืชกลุ่มควอติน้ำมันฝรั่งของห้องปฏิบัติการ เนื่องจากห้องปฏิบัติการสมาชิกมีการใช้เทคนิคและวิธีการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นผู้ดำเนินแผน จึงได้ศึกษาการกระจายตัวของข้อมูลผลวิเคราะห์ของสมาชิกของสาร paraquat โดยใช้วิธี kernel density plot พบว่าข้อมูลมีการกระจายแบบปกติ แสดงว่าเทคนิคที่ใช้และวิธีการวิเคราะห์ที่ต่างกัน ไม่มีผลต่อการประเมินทางสถิติ สามารถนำมาประเมินร่วมกันได้ สำหรับสาร chlormequat ไม่สามารถแสดงการกระจายตัวของข้อมูลได้ เนื่องจากมีจำนวนข้อมูลน้อยกว่า 8 ข้อมูล⁽¹⁰⁾ การจำแนกชนิดและปริมาณสารตกค้างสะท้อนความสามารถให้บริการในงานวิเคราะห์ประจำการประเมินความสามารถการวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการสมาชิก สำหรับ paraquat ใช้ค่าอ้างอิงเป็นค่ากำหนดจากค่าพ้องของสมาชิก (consensus value) โดย robust analysis: Algorithm A⁽¹⁰⁾ แต่กรณีของ chlormequat มีจำนวนข้อมูล 7 ค่า ซึ่งน้อยกว่า 12 ค่า จึงใช้ค่ากำหนดที่ได้มาจากห้องปฏิบัติการเดียว ซึ่งเป็นค่าจากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของห้องปฏิบัติการสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ค่าความไม่แน่นอนของค่ากำหนด $u(x_{ILC})$ ที่คำนวณโดยใช้ค่า relative expanded standard uncertainty ร้อยละ 23.8 (ค่าจากการทำ method validation ของรายการทดสอบ chlormequat)⁽¹¹⁾ ซึ่งน้อยกว่าเกณฑ์ยอมรับของ SANTE ที่ร้อยละ 50⁽¹⁵⁾ ห้องปฏิบัติการสมาชิกที่เข้าร่วมทดสอบการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการใช้วิธีการวิเคราะห์ที่อ้างอิงจาก 2 แหล่ง ได้แก่ Association of Official Analytical Chemists (AOAC) และห้องปฏิบัติการอ้างอิงของสหภาพยุโรป (EURLs) ซึ่งมีหลักการเดียวกัน คือ สารเคมีที่ใช้ในการสกัด มีการนำกรดเข้ามาทำปฏิกิริยาได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) หรือกรดฟอร์มิก (formic acid) เพื่อให้สารกลุ่มควอตแตกตัวเป็น cation และเครื่องมือที่ใช้ตรวจ

วิเคราะห์ คือ LC-MS/MS หรือ LC-MS ที่สามารถตรวจจับสัญญาณของ cation ของสารกลุ่มควอต แต่มีห้องปฏิบัติการ 1 แห่ง ที่การใช้เครื่อง HPLC ซึ่งเป็นเครื่องมือวิเคราะห์ที่แตกต่างจากห้องปฏิบัติการอื่น โดยเครื่องมือต่างชนิดกันจะมีขีดจำกัดการตรวจวัดและความไวที่ต่างกัน อาจมีผลต่อปริมาณที่วิเคราะห์ได้ การเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการในครั้งนี้ ห้องปฏิบัติการสมาชิกทุกแห่งรายงานชนิดสารได้ถูกต้อง แต่มีห้องปฏิบัติการ 1 แห่ง ที่รายงานปริมาณความเข้มข้นของ paraquat อยู่เหนือเกณฑ์ยอมรับ $|z| \geq 2$ ความเข้มข้นที่ห้องปฏิบัติการรายงานมีค่ามากกว่า 10 เท่าของค่ากำหนด ซึ่งถือเป็น blunder⁽⁶⁾ ของกลุ่มข้อมูล ได้มีการตัด blunder ออก ไม่นำมาคำนวณผลวิเคราะห์ทางสถิติ ห้องปฏิบัติการอาจมีการรายงานผลในหน่วยที่ผิดพลาดหรือมีวิธีการคำนวณผลไม่ถูกต้อง ดังนั้นห้องปฏิบัติการจึงควรทวนสอบกระบวนการวิเคราะห์ เตรียมมาตรฐานที่เหมาะสมในการสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อเป็นการปรับปรุงสร้างความมั่นใจกับผลวิเคราะห์ที่ให้บริการในงานประจำ

สรุป

การเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการในครั้งนี้ มีห้องปฏิบัติการสมัครเข้าร่วม จำนวน 11 แห่ง มีห้องปฏิบัติการสมาชิกตอบผลกลับ จำนวน 11 แห่ง การประเมินผลสำหรับ paraquat ใน test sample 1 และ test sample 2 ใช้ค่ากำหนด (assigned value; x_{ILC}) เป็นค่าพ้องของสมาชิก (consensus values from participants)⁽¹⁰⁾ จาก robust average ที่มีการตัด blunder ออก มีค่าเท่ากับ 91.5 และ 47.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (σ_{ILC}) จาก Horwitz's equation modified by Thompson มีค่าเท่ากับ 20.1 และ 10.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ค่าความไม่แน่นอนของค่ากำหนด $u(x_{ILC})$ เท่ากับ 5.2 และ 2.6 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ใช้ค่า z-score เพื่อประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการ พบว่าห้องปฏิบัติการสมาชิกมีผลการประเมินอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ ร้อยละ 92.9 และไม่สามารถยอมรับได้ ร้อยละ 7.1 ทั้ง 2 ตัวอย่าง สำหรับ

สาร chlormequat ใน test sample 1 และ test sample 2 มีจำนวนข้อมูลน้อยกว่า 12 ค่า จึงใช้ค่ากำหนดที่ได้จากห้องปฏิบัติการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร มีค่ากำหนด (assigned value; X_{ILC}) เท่ากับ 106.6 และ 207.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (σ_{ILC}) มีค่าเท่ากับ 23.5 และ 42.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และมีค่า $u(x_{ILC})$ เท่ากับ 11.7 และ 24.7 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ใช้ค่า z'-score ประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการพบว่าผลการประเมิน chlormequat ของ test sample 1 และ test sample 2 อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ ร้อยละ 85.7 และ นำสงสัย ร้อยละ 14.3 ทั้ง 2 ตัวอย่าง สำหรับห้องปฏิบัติการที่ได้รับการประเมินผลการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการแล้วพบว่าอยู่ในเกณฑ์ unacceptable ควรค้นหาสาเหตุของปัญหาและดำเนินการแก้ไขให้เสร็จสิ้นโดยเร็ว เพื่อป้องกันการเกิดซ้ำโดยพิจารณาเรื่อง วิธีที่ใช้ เครื่องมือ สารมาตรฐาน การควบคุมคุณภาพภายใน รวมทั้งระบบการตรวจสอบความถูกต้องของการถ่ายโอนข้อมูลและการรายงาน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางสาวพนาวัลย์ กลิ่งกลางตอน สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องในการประเมินผลและการวิเคราะห์ทางสถิติ ตลอดจนตรวจสอบความถูกต้องของรายงานฉบับสมบูรณ์ก่อนส่งผลให้สมาชิกที่เข้าร่วมในการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

1. National Pesticide Information Center. Paraquat. [online]. 2025; [cited 2025 Aug 5]; [12 screens]. Available from: URL: <https://npic.orst.edu/factsheets/paraquat.pdf>.
2. สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. รายงานสรุปการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร ปี พ.ศ. 2560. [ออนไลน์]. 2560; [สืบค้น 6 ส.ค. 2568]; [33 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://thaipan.org/stat/728>.

3. นพดล กิตนะ. รู้ลึกกับจุฬาฯ: ทำไมต้องเลิกใช้ “พาราควอต”. [ออนไลน์]. 2561; [สืบค้น 6 ส.ค. 2568]; [11 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.chula.ac.th/cuinside/10196>.
4. ศูนย์พิษวิทยารามาธิบดี คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาล รามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล. ภาวะเป็นพิษจาก paraquat. [ออนไลน์]; [สืบค้น 5 ส.ค. 2568]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.rama.mahidol.ac.th/poisoncenter/th/pois-cov/PQ>.
5. พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่องบัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย ฉบับที่ 6 (พ.ศ. 2563). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 117 ง (วันที่ 19 พฤษภาคม 2563). หน้า 56.
6. ISO/IEC 17043:2023. Conformity assessment-general requirements for the competence of proficiency testing providers. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2023.
7. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.
8. Fapas Proficiency Testing. [online]. 2025; [cited 2025 Jul 16]; [7 screens]. Available from: URL: <https://proficiencytesting.fapas.com/proficiency-testing>.
9. QuPPE-PO-Method. Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in food involving extraction with acidified methanol and LC-MS/MS measurement. [online]. 2019; [cited 2025 Aug 25]; [87 screens]. Available from: URL: [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPE_PO_V10_1\(1\).pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPE_PO_V10_1(1).pdf).
10. ISO 13528:2022. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2022.

11. ISO/IEC Guide 98-3:2008. Uncertainty of measurement Part 3: guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM:1995). Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2008.
12. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 419 (พ.ศ. 2563) เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 3). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 257 ง (วันที่ 2 พฤศจิกายน 2563). หน้า 27.
13. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 460 (พ.ศ. 2568) เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 142 ตอนพิเศษ 240 ง (วันที่ 7 กรกฎาคม 2568). หน้า 29.
14. Codex Alimentarius International Food Standard. Codex pesticides residues in food online database. [online]. 2025; [cited 2025 Aug 25]; [1 screen]. Available from: URL: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/en>.
15. SANTE 11312/2021 v2. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. [online]. 2025; [cited 2025 Jul 14]; [55 screens]. Available from: URL: https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-11/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2021-11312.pdf.

Laboratory Performance Assessment via Interlaboratory Comparison on Analysis of Quat Herbicides in Potatoes

Rattiyakorn Srikote, Phornphan Songsri, and Weerawut Wittayanan

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

ABSTRACT Quat compounds, including paraquat, diquat, chlormequat, and mepiquat, are widely used as non-specific herbicides. The residue analysis of these substances in food must be controlled by competent laboratories. In 2025, the Bureau of Quality and Safety of Food conducted an interlaboratory comparison (ILC) for the analysis of quat herbicides in potatoes. The objective was to assess the analytical performance of both government and private laboratories for the determination of quat herbicides in fruits and vegetables. For the ILC sample preparation, potato blank samples were procured and fortified with two standards, including paraquat and chlormequat. The homogenized samples were divided into two sets (test sample 1 and test sample 2), and each set was spiked with different standard concentrations. Homogeneity tests were performed before distribution to participating laboratories. The interlaboratory comparison results were evaluated using statistical methods based on ISO 13528:2022. The assigned value for paraquat was determined following the consensus value of the participants, while the value for chlormequat originated from a single laboratory result. The standard deviation for interlaboratory comparison assessment was calculated using Horwitz's equation modified by Thompson. The ILC sample stability was studied under two storage conditions, including at $\leq -15^{\circ}\text{C}$ and at $2-8^{\circ}\text{C}$ for 3 days. The results revealed that the ILC samples were adequately stable. The analytical results from 11 participating laboratories were assessed using z-scores or z'-scores to demonstrate the laboratories competence. Among the 14 results of paraquat and the 7 results of chlormequat, 92.9% and 85.7% were "acceptable", respectively. The results indicate that the measurement capabilities in these laboratories can be considered mostly trustworthy and reliable.

Keywords: Interlaboratory comparison, Herbicides, Quat pesticides, Potatoes

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ Alliin ในกระเทียม โดยวิธี Ultra Performance Liquid Chromatography

ณิชภัทร ปัตตะพงศ์ อภิรักษ์ ศักดิ์เพชร วิไลลักษณ์ ชื่นนางสี สิริกาญจน์ ธนอริยโรจน์ และ นุจรี ศรีสนาม
สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ Alliin เป็นสารสำคัญหลักที่พบในกระเทียม (*Allium sativum* L.) มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ต้านอักเสบ และช่วยลดภาวะความดันโลหิตสูง ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียมจึงสามารถนำมาใช้ในการประเมินคุณภาพของกระเทียม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียม โดยวิธี Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) โดยซึ่งตัวอย่างกระเทียม 150 มิลลิกรัม เติมน้ำ 50% methanol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สกัดโดยการผสมแบบ vortex เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสเหนือตะกอนมากรองผ่าน syringe filter ชนิด PTFE ฝัดสารละลายตัวอย่างที่ได้ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟี ประกอบด้วยคอลัมน์ Acquity™ BEH® Amide 2.1 × 100 มิลลิเมตร, 1.7 ไมโครเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ ส่วนผสมของ acetonitrile และน้ำ โดยระยะแยกอยู่ในช่วงเวลา 0.00–2.30 นาที เริ่มต้นที่อัตราส่วน 85:15 นาน 0.65 นาที จากนั้นปรับเป็น 75:25 และ 86:14 ภายในเวลา 1.42 นาที และ 1.52 นาที ตามลำดับ และคงที่ที่อัตราส่วน 86:14 จนถึงนาทีที่ 2.30 ด้วยอัตราการไหล 0.55 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส ตรวจวัดสารด้วยตัวตรวจวัดชนิด Photodiode Array (PDA) ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร ค่า retention time ของ alliin เท่ากับ 2.02 นาที และเมื่อทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่ากราฟมาตรฐานของ alliin มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.049–0.582 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.999791 ค่าความแม่นยำในช่วงร้อยละ 98.64–106.02 ค่าความเที่ยงอยู่ในช่วงร้อยละ 0.51–1.19 มีค่าขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาปริมาณ เท่ากับ 0.006 และ 0.033 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาปริมาณ alliin ในกระเทียม จำนวน 8 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 9.87 ± 2.75 มิลลิกรัมต่อกรัม การศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียมเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพ รวมถึงใช้ในการคัดเลือกกระเทียมที่มีคุณภาพเพื่อเข้าสู่กระบวนการผลิตยาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพต่อไป

คำสำคัญ: กระเทียม, *Allium sativum*, Alliin, UPLC

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

Received: 8 August 2025

Revised: 17 November 2025

Accepted: 19 November 2025

บทนำ

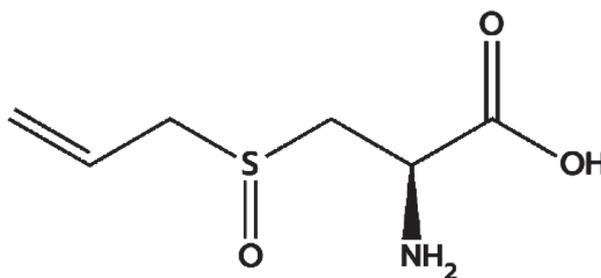
กระเทียมมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Allium sativum* L. จัดอยู่ในวงศ์ Amaryllidaceae⁽¹⁾ ชื่อสามัญว่า Garlic ชื่ออื่นๆ ได้แก่ กระเทียมขาว เทียม หัวเทียม หอมเทียม เป็นต้น⁽²⁾ จัดเป็นไม้ล้มลุก สูงประมาณ 30-60 เซนติเมตร หัวใต้ดินกลมแบน มีเยื่อสีขาวหรือสีม่วงอมชมพูหุ้มอยู่ซึ่งลอกออกได้ แต่ละหัวประกอบด้วยหลายกลีบ รูปไข่ ขอบเหลี่ยม 3-4 เหลี่ยม ลักษณะกลีบโค้ง ด้านนอก ด้านอื่นๆ ค่อนข้างตรง ผิวและเนื้อด้านในสีนวลถึงสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นฉุนเฉพาะตัว รสเผ็ดร้อน ใบเดี่ยว ขึ้นมาจากดิน เรียงซ้อนสลับ แบน ปลายแหลม ข้อดอกแบบช่อซี่ร่ม ส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์ทางยา คือ ลำต้นใต้ดิน (หัว) หรือกลีบ โดยในตำราสรรพคุณยาไทย กระเทียมมีรสร้อน เป็นยาแก้ไข้ ขับปัสสาวะ ขับโลหิตระดู เป็นยาระบาย แก้ไอ แก้กืดเสมหะ แก้กโรคผิวหนัง บางอย่าง เป็นยาขับลมในลำไส้ ขับเนื้อร้าย บำรุงธาตุ ใช้ภายนอกคั้นเอาน้ำจากหัวกระเทียมเป็นยาหยอดหู แก้ปวดหูและหูอื้อ ขับพยาธิในท้อง บ้วนปากฆ่าเชื้อโรคในปาก จากข้อมูลการวิจัยพรีคลินิก พบว่ากระเทียมสดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา มีฤทธิ์ขับพยาธิ ลดไขมันในเลือด ลดภาวะความดันโลหิตสูง ต้านการจับตัวของเกล็ดเลือด สลายไฟบริน ลดน้ำตาลในเลือด ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ข้อมูลจากการศึกษาวิจัยทางคลินิก พบว่ากระเทียมและหรือผลิตภัณฑ์จากกระเทียมมีฤทธิ์ลดการจับตัวของเกล็ดเลือด เพิ่มความสามารถในการสลายไฟบริน มีฤทธิ์อ่อนๆ ในการลดไขมันในเลือดและลดความดันโลหิต ช่วยลดการเกิดออกซิเดชันของไลโปโปรตีน จึงอาจช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดไขมันอุดตันในหลอดเลือด ดังนั้นจึงมีการใช้กระเทียมเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เพื่อช่วยบรรเทาภาวะไขมันในเลือดสูง ป้องกันโรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว และช่วยลดความดันโลหิตในผู้ป่วยที่ความดันโลหิตสูงเล็กน้อย (mild hypertension)^(2,3) หัวกระเทียมสด ประกอบด้วย น้ำ (~65%) คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน (Arginine, glutamic acid, aspartic acid, leucine) ใยอาหาร กรดไขมัน (Palmitic acid, oleic acid, linoleic acid,

linolenic acid) สารประกอบฟีนอล วิตามิน (B1, B6, C) และสารที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ (Organosulfur) โดยสารตั้งต้นที่พบในธรรมชาติ ได้แก่ alliin แต่เมื่อกระเทียมถูกบด สับ หรือเคี้ยว เซลล์จะแตก ทำให้ alliin และเอนไซม์ alliinase ที่อยู่ในเซลล์สัมผัสกันเกิดปฏิกิริยาทำให้ alliin เปลี่ยนเป็น allicin ที่มีความเสถียรต่ำและสลายตัวอย่างรวดเร็วกลายเป็นสารอื่นๆ เช่น ajoene, dithiols, allyl methyl trisulfide, diallyl sulfide, diallyl disulfide, diallyl trisulfide, S-allyl L-cysteine เป็นต้น⁽³⁻¹²⁾ ดังนั้นในงานวิจัยต่างๆ จึงสนใจสาร alliin ที่เป็นสารตั้งต้นและมีความเสถียรมากกว่า จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่ามีการใช้วิธีวิเคราะห์ที่หลากหลายในการหาปริมาณ alliin ในกระเทียม ซึ่งเทคนิคที่นำมาใช้โดยส่วนมากจะใช้หลักการทางโครมาโทกราฟี ได้แก่ โครมาโทกราฟีชนิดผิวบางประสิทธิภาพสูง (HPTLC)⁽¹³⁻¹⁵⁾ แก๊สโครมาโทกราฟี⁽¹⁶⁾ โครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ชนิด C₁₈^(15,17,18) และจำเป็นต้องเตรียม alliin ให้อยู่ในรูปอนุพันธ์เชิงซ้อนกับ o-phthalaldehyde⁽¹⁵⁾ หรือ 4-mercapto-pyridine⁽¹⁸⁾ ก่อนวิเคราะห์ (Pre-column derivatization) รวมถึงมีการเลือกใช้ตัวตรวจวัดเป็นชนิด MS/MS⁽¹⁹⁾

จากโครงสร้างของ alliin ซึ่งเป็น S-allyl-L-cysteine sulfoxide ดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่ามีหมู่ฟังก์ชันหลักเป็น sulfoxide (S=O), amino (-NH₂) และ carboxylic acid (-COOH) ซึ่งมีความเป็นขั้วสูง สามารถละลายในน้ำได้ดี (Freely soluble) แต่ไม่ละลายใน ethanol, chloroform, acetone, ether และ benzene (Practically insoluble)⁽²⁰⁾ โดยเมื่อพิจารณาจากลักษณะทางเคมีฟิสิกส์ดังกล่าว พบว่าการเลือกใช้คอลัมน์ชนิด polar มีความเหมาะสมสำหรับการแยก alliin และง่ายต่อการพัฒนาวิธี เมื่อเปรียบเทียบการเตรียมให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ก่อนการวิเคราะห์ ซึ่งเป็นการวัดทางอ้อม (Indirect method) หรือใช้เครื่องมือขั้นสูง เช่น LC-MS/MS ที่มีความยุ่งยากและซับซ้อนในการปฏิบัติมากกว่า

ปัจจุบันมีการนำสมุนไพรกระเทียมมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย ดังนั้นเพื่อยกระดับด้านมาตรฐานคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรและสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ผู้บริโภค จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบกระเทียม อย่างไรก็ตามมโนกราฟของกระเทียมในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ฉบับปี พ.ศ. 2564

ยังไม่มีวิธีวิเคราะห์และข้อกำหนดมาตรฐานของปริมาณสารสำคัญ⁽¹⁾ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในวัตถุดิบกระเทียม เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของกระเทียม รวมถึงใช้ในการคัดเลือกกระเทียมที่มีคุณภาพเพื่อเข้าสู่กระบวนการผลิตยาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพต่อไป



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ alliin

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐาน: Alliin (Chengdu Biopurify Phytochemicals, China) ความบริสุทธิ์ $\geq 98\%$

สารเคมี: Acetonitrile ชนิด LCMS (J.T.Baker, USA) และ Methanol ชนิด AR (Merck®, Germany)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เตาอบร้อน รุ่น ULE 800 (Memmert, Germany), เครื่องบดป่น รุ่น 1029-C (Yoshida Seisakusho, Japan), แร่ง ASTM E11 เบอร์ 180 (Endecotts, England), เครื่อง UPLC-PDA detector รุ่น Acquity™ (Waters®, USA), โปรแกรมจัดการข้อมูลโครมาโทกราฟี Empower 2 Build No. 2154 (Waters®, USA), คอลัมน์ รุ่น Acquity™ UPLC BEH Amide, 2.1×100 มิลลิเมตร, 1.7 ไมโครเมตร (Waters®, USA), เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 0.01 มิลลิกรัม รุ่น XPR205DR (Mettler-Toledo, Switzerland), เครื่องผสมสาร รุ่น 37600 Mixer (Thermolyne, USA), ขวดรูปชมพู่ รุ่น DURAN (Schott AG, Germany), ปิเปตวัดปริมาตร Class A (Witeg, Germany), ขวดวัดปริมาตร Class A (Witeg, Germany) และ syringe filter ชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร รุ่น Acrodisc (Waters®, USA)

ตัวอย่าง

รวบรวมตัวอย่างกระเทียมจากแหล่งต่างๆ จากแหล่งธรรมชาติและร้านขายยาสมุนไพร จำนวน 8 ตัวอย่าง ในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2564 แปรรูปตัวอย่างกระเทียมโดยการลอกเปลือกออก ผ่านกลีบตามแนวยาวเป็นแผ่นบางๆ ตากในที่ร่มและมีอากาศถ่ายเทสะดวกเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส วันละ 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน นำตัวอย่างที่ได้ไปบดเป็นผงละเอียด ผ่านแร่งเบอร์ 180 และเก็บในภาชนะแก้วสีขาปิดฝาสนิทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียม

การสำรวจเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี (Chromatographic scouting) ชนิดของคอลัมน์

เปรียบเทียบคอลัมน์ที่มีชนิดของวัฏภาคคงที่ (Stationary phase) แตกต่างกันได้แก่ amide, C_8 , C_{18} และ phenyl โดยใช้วิธี scouting แบบ isocratic เพื่อหาคอลัมน์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกสาร alliin ในตัวอย่าง

วัฏภาคเคลื่อนที่

ศึกษาชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลายที่จะใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยพิจารณาจากรูปร่างของพีค alliin และ retention time ของสารดังกล่าว

การหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี (Chromatographic optimization)

ใช้วิธี segmented gradient และ focused gradient โดยศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลาย และ flow rate ที่เหมาะสม โดยคำนึงถึงความสามารถในการแยกพีคของ alliin ออกจากสารอื่นๆ ในสารละลาย ตัวอย่าง การล้างคอลัมน์หลังการแยก (Post separation wash) และขีดจำกัดของคอลัมน์ นอกจากนี้ได้ศึกษาความยาวคลื่นในการตรวจวัดที่เหมาะสม

การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์

จากการทบทวนงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าเมื่อละลายผงกระเทียมในน้ำ alliin จะถูกเปลี่ยนเป็น allicin ผ่านเอนไซม์ alliinase กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นโดยสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 0.2–0.5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง⁽²¹⁾ และการใช้ methanol สามารถยับยั้งการทำงานของ alliinase โดยการทำให้โปรตีนเสียสภาพ (Denature) และลดกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว⁽²²⁾

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด alliin ในกระเทียม จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ น้ำ และ 50% methanol โดยใช้วิธีสกัด จำนวน 4 วิธี ได้แก่ วิธีผสมแบบ vortex วิธีแช่สกัด วิธีหมุนเหวี่ยง และวิธีการใช้คลื่นอัลตราโซนิก ในขั้นตอนการเตรียมสารละลายตัวอย่างก่อนฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟี ต้องมีการกรองสารละลายตัวอย่าง จึงทำการเปรียบเทียบผลกระทบของชนิดตัวกรองต่อปริมาณ alliin ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Specificity)

เตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นใกล้เคียงกัน วิเคราะห์โดยใช้สภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบค่า retention time และ UV spectrum ที่ได้

การทดสอบช่วงของการวัด และความเป็นเส้นตรง (Working range and linearity)

เตรียมสารละลาย stock ของสารมาตรฐาน alliin จำนวน 3 stock ที่ความเข้มข้น 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัม

ต่อมิลลิลิตร โดยซึ่งสารมาตรฐาน ปริมาณ 25, 37.5 และ 50 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย 50% methanol เตรียมสารละลายมาตรฐาน จำนวน 6 ระดับ จากแต่ละ stock โดยปิเปตสารละลาย stock ปริมาตร 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 50% methanol กรองผ่าน syringe filter ชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ทำการวิเคราะห์โดยใช้สภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่พัฒนาขึ้น สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ alliin และค่า response area พิจารณาความเป็นเส้นตรงจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination; R^2) และ residual plots

การทดสอบผลกระทบของเมทริกซ์ (Matrix effect)

เตรียม spiked sample โดยการเติมสารมาตรฐาน ให้มีความเข้มข้นระดับต่างๆ ในช่วงของการวัด จำนวน 6 ระดับ ระดับละ 2 ซ้ำ ประเมินผลกระทบของเมทริกซ์ โดยการทดสอบความเป็นเส้นตรงของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ alliin ในสารละลายมาตรฐาน (x) และ ปริมาณ alliin ใน spiked sample (y) และการทดสอบด้วย paired *t*-test

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงในสภาวะการทวนซ้ำ (Repeatability) ทำโดยการวิเคราะห์ spiked sample ที่ได้จากการเติมสารมาตรฐาน alliin ลงใน unspiked sample (ที่ทราบปริมาณ alliin ที่แน่นอน) ให้มีความเข้มข้น 3 ระดับ ครอบคลุมช่วงของการวัด วิเคราะห์ระดับละ 6 ซ้ำ คำนวณค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) และร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD_r)

ทดสอบ within laboratory reproducibility โดยวิเคราะห์ตัวอย่างจากนักวิเคราะห์ 2 คน จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณความแตกต่างร้อยละสัมพัทธ์ (Relative percent difference; RPD)

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection; LOD) และขีดจำกัดของการหาปริมาณ (Limit of quantitation; LOQ)

จากกราฟมาตรฐานสามารถหาค่า LOD และ LOQ โดยคำนวณจากค่า $y_{Intercept} + 3S_{y/x}$ และ $y_{Intercept} + 10S_{y/x}$ ตามลำดับ และยืนยันค่า LOQ โดยวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นที่คำนวณได้ จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณ %Error และค่าร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

การวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียม

ซั่งตัวอย่าง ปริมาณ 150 มิลลิกรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ปิเปต 50% methanol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สกัดโดยการผสมแบบ vortex เป็นเวลา 1 นาที กรองผ่าน syringe filter ชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร นำสารละลายตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

การทดสอบความคงตัวของสารละลายตัวอย่าง

ซั่งตัวอย่าง ปริมาณ 150 มิลลิกรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ปิเปต 50% methanol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สกัดโดยการผสมแบบ vortex เป็นเวลา 1 นาที ตูดส่วนใสเหนือตะกอนมากรองผ่าน syringe filter ชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร นำสารละลายตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ระยะเวลาเริ่มต้น 15 นาที 30 นาที

และ 24 ชั่วโมงหลังการเตรียม จำนวนละ 3 ซ้ำ คำนวณค่าร้อยละโดยเปรียบเทียบกับผลวิเคราะห์เริ่มต้น (%Compare) และร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (Estimation of measurement uncertainty)

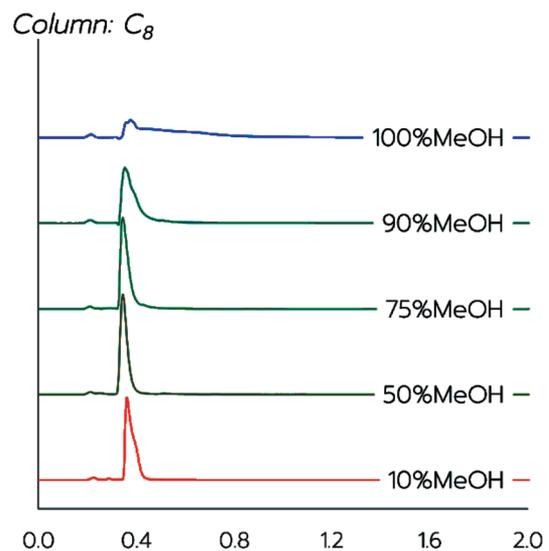
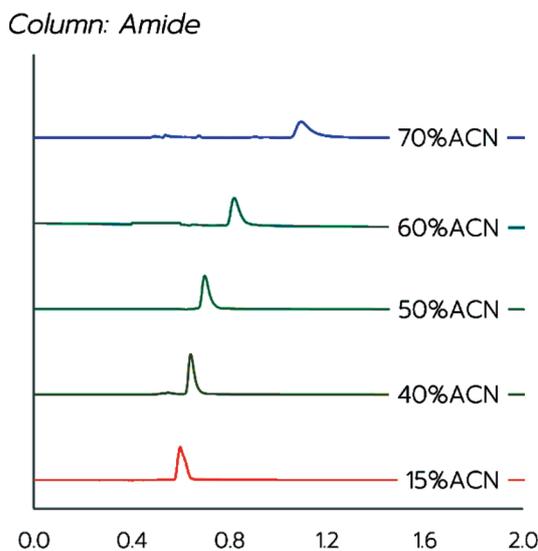
ศึกษาโดยการระบุสิ่งที่ต้องการวิเคราะห์ในที่นี้หมายถึง ปริมาณ alliin ระบุแหล่งที่มา องค์ประกอบ และปริมาณของความไม่แน่นอน คำนวณค่าไม่แน่นอนรวม (Combined standard uncertainty) และความไม่แน่นอนขยาย (Expanded uncertainty)

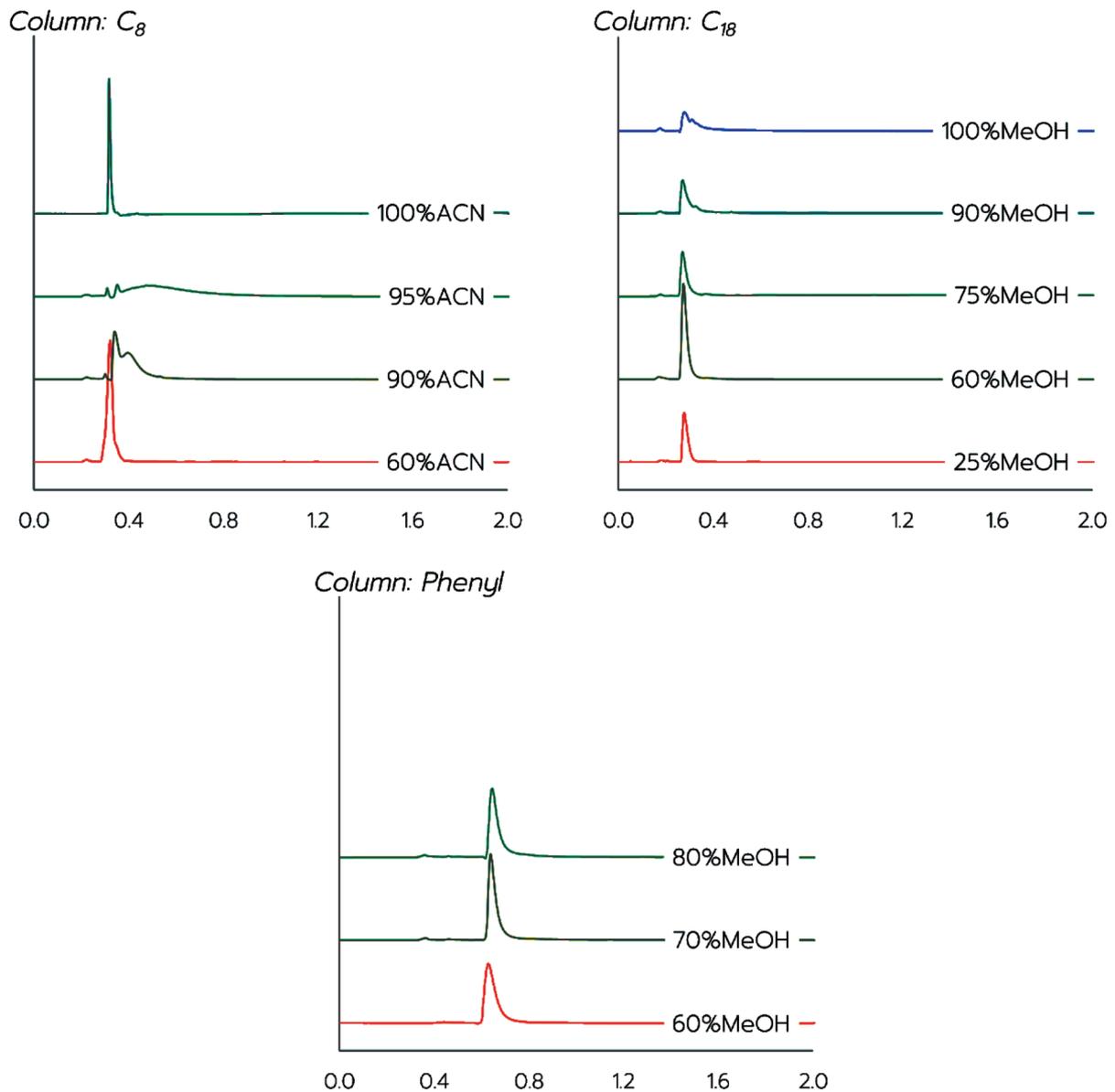
ผล

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียม

การสำรวจเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ (Chromatographic scouting) ชนิดของคอลัมน์

ผลการเปรียบเทียบคอลัมน์ พบว่าวัสดุภาคคงที่ชนิด amide มีความเหมาะสมสำหรับการแยกสารในตัวอย่าง เนื่องจากมีความสามารถในการกักเก็บ alliin โดยขึ้นกับชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ ในขณะที่วัสดุภาคคงที่ชนิด C_8 , C_{18} และ phenyl ไม่สามารถกักเก็บสารดังกล่าวได้ ดังแสดงในภาพที่ 2





ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของ alliin ที่ได้จากการ scouting โดยคอลัมน์ชนิด amide, C₈, C₁₈ และ phenyl

วัสดุภาคเคลื่อนที่

ผลการศึกษานิตและอัตราส่วนของตัวทำละลายที่จะใช้เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ พบว่าชนิดและอัตราส่วนของ acetonitrile/water เหมาะสมสำหรับการใช้ในระบบ

โครมาโทกราฟ เมื่อเปรียบเทียบกับ methanol/water หรือ acetonitrile/methanol/water เนื่องจากให้ช่วงของ retention time ที่กว้างกว่ารูปร่างของพีคที่ยอมรับได้ และความหนืดต่ำกว่า ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการศึกษานิตและอัตราส่วนของตัวทำละลายที่จะใช้เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่

Flow rate: 0.45 mL/min, Column temp: 40°C

Acetonitrile (%)	Water (%)	Retention time (min)	Pressure (psi)	Peak shape
40	60	0.641	6830	Good
50	50	0.699	6320	Good
60	40	0.819	5840	Good

ตารางที่ 1 ผลการศึกษาชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลายที่จะใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (ต่อ)

Acetonitrile (%)	Water (%)	Retention time (min)	Pressure (psi)	Peak shape
70	30	1.093	4970	Tail
80	20	2.022	4240	Tail
85	15	3.632	3900	Tail

Flow rate: 0.4 mL/min, Column temp: 40°C

Methanol (%)	Water (%)	Retention time (min)	Pressure (psi)	Peak shape
40	60	0.694	10240	Good
50	50	0.706	10345	Good
60	40	0.725	9900	Tail
70	30	0.755	9050	Tail
80	20	0.804	7830	Tail
90	10	0.904	6440	Tail

Flow rate: 0.65 mL/min, Column temp: 40°C

Acetonitrile (%)	Methanol/Water; 3:1 (%)	Retention time (min)	Pressure (psi)	Peak shape
40	60	0.588	8120	Fail
50	50	0.698	7175	Fail
60	40	0.942	6360	Fail
70	30	1.581	5690	Fail
80	20	4.118	5200	Fail
85	15	9.352	5020	Fail

Acetonitrile/Methanol; 1:1 (%)	Water (%)	Retention time (min)	Pressure (psi)	Peak shape
50	50	0.440	12000	Good
65	35	0.476	10570	Fair
75	25	0.523	9240	Tail
85	15	0.626	7680	Tail
95	5	0.932	6000	Tail

การหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี (Chromatographic optimization)

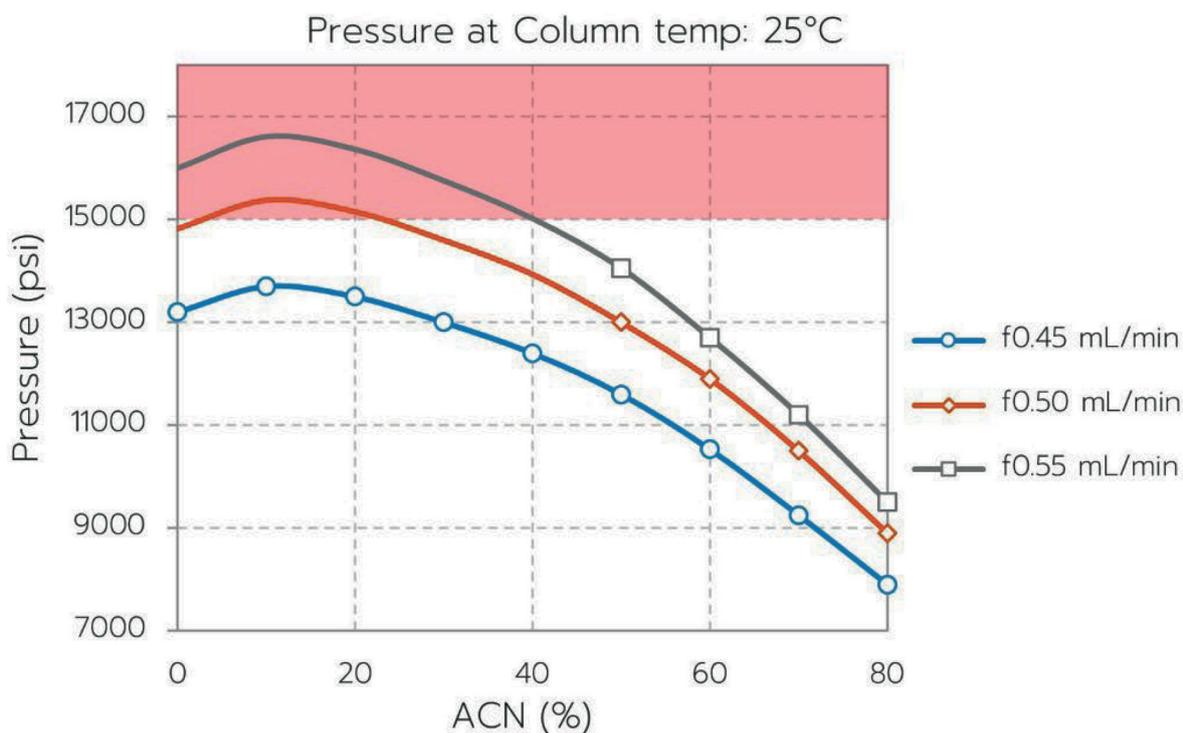
ผลการศึกษาอัตราส่วนของ acetonitrile/water และ flow rate ที่เหมาะสม โดยคำนึงถึงความสามารถในการแยกพีคของ alliin ออกจากสารอื่นๆ ในสารละลายตัวอย่าง การล้างคอลัมน์หลังการแยก (Post separation wash) และซีตจำกัดของคอลัมน์ นอกจากนี้ได้ศึกษา

ถึงความยาวคลื่นในการตรวจวัดที่เหมาะสม พบว่าอัตราส่วนของ acetonitrile/water ที่ประมาณ 10:90 มีความหนืดสูงสุด และจากการประมาณค่า Backpressure ที่ flow rate ตั้งแต่ 0.50 มิลลิลิตรต่อนาทีขึ้นไป พบว่ามีค่ามากกว่า 15,000 psi (ที่อุณหภูมิคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส) ซึ่งเกินขีดจำกัดของคอลัมน์และเครื่องมือ ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 3

ตารางที่ 2 Backpressure ของระบบที่อัตราส่วน acetonitrile/water และ flow rate ต่าง ๆ

Column temp: 25°C

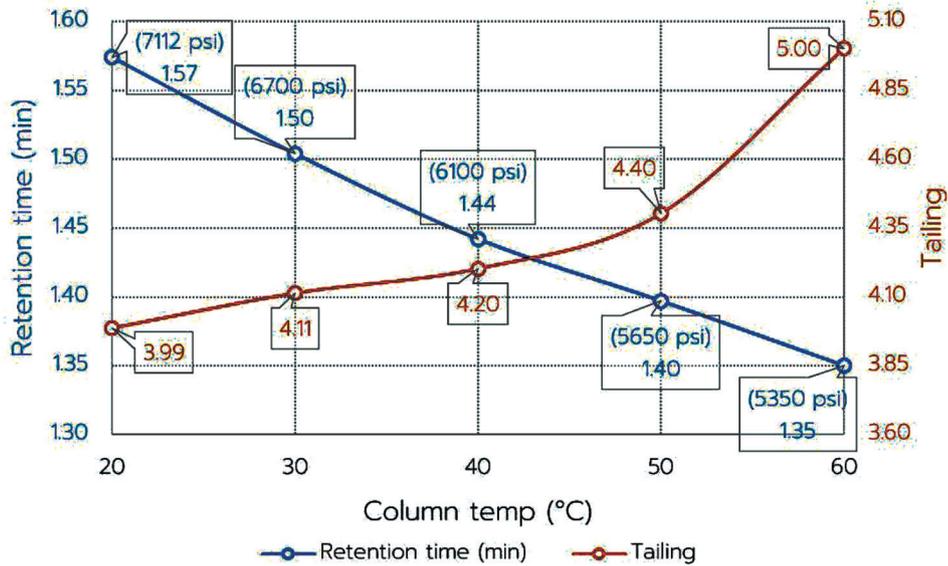
Acetonitrile (%)	Water (%)	Pressure (psi)		
		0.45 mL/min	0.50 mL/min	0.55 mL/min
0	100	13200	-	-
10	90	13700	-	-
20	80	13500	-	-
30	70	13000	-	-
40	60	12400	-	-
50	50	11600	13000	14050
60	40	10530	11900	12700
70	30	9250	10500	11200
80	20	7900	8900	9500



ภาพที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %acetonitrile และ backpressure ของระบบ

ผลการศึกษาอุณหภูมิคอลัมน์ที่อัตราส่วนของ acetonitrile/water 20:80 และ flow rate 0.60 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

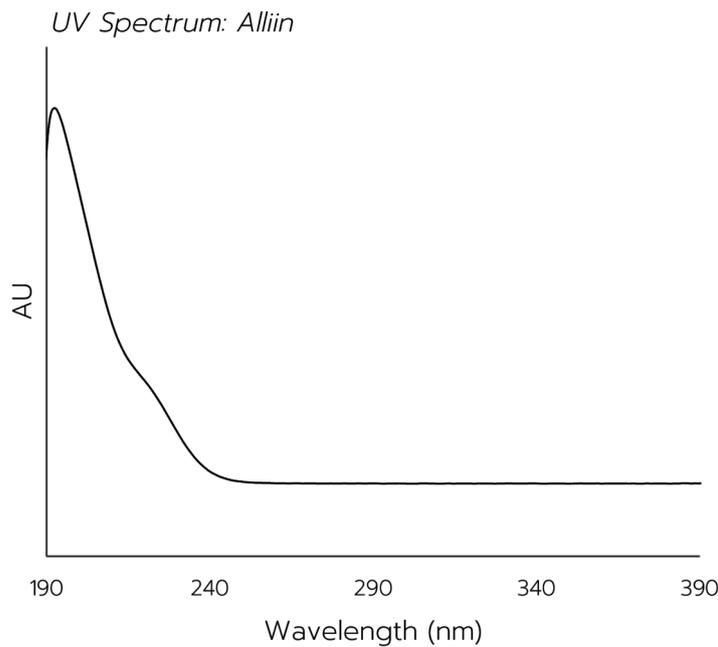
ให้ค่า retention time และ tailing เหมาะสมที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิคอลัมน์ backpressure ของระบบ retention time และ tailing ของ alliin

จากผลการศึกษา UV spectrum ของ alliin ในช่วงความยาวคลื่น 190–390 นาโนเมตร พบว่าที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร มีความเหมาะสมเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ alliin

เนื่องจากให้ค่า Intensity สูง ค่า $d\lambda/dAU$ ต่ำ และไม่ถูกรบกวนสัญญาณจากค่า UV cutoff ของ acetonitrile ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 UV spectrum ของ alliin

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบโครมาโตกราฟ โดยใช้วิธี segmented gradient

และ focused gradient ได้ระบบที่เหมาะสม ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สภาวะของระบบโครมาโทกราฟี

Stationary phase	Acquity™ UPLC BEH® Amide, 2.1×100 mm, 1.7 μm column					
Mobile phase	A: Acetonitrile, B: Water					
	Gradient table					
	Phase	Time (min)	Flow rate (mL/min)	%A	%B	Curve
		Initial	0.55	85	15	-
	Separation	0.65	0.55	85	15	6
		1.42	0.55	75	25	6
		1.52	0.55	86	14	6
		2.30	0.55	86	14	6
		Post separation	2.31	0.40	86	14
	wash	3.00	0.40	40	60	6
		4.00	0.40	40	60	6
	Equilibrate	4.30	0.40	85	15	6
		4.60	0.55	85	15	6
Injection volume	1 μL					
Needle wash	Strong needle wash: 10% methanol Weak needle wash: 50% methanol					
Column temp	40°C					
Detection	220 nm					

การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์

ผลการเปรียบเทียบตัวอย่างที่ละลายที่ใช้ในการสกัด alliin ในกระเทียม เมื่อนำสารละลายที่สกัดด้วยน้ำและ 50% methanol มาวิเคราะห์ พบว่าสารสกัดด้วย 50% methanol ให้รูปร่างของพีคที่ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ และวิธีสกัดที่เหมาะสม คือ วิธีการผสมแบบ vortex เป็นเวลา 1 นาที ซึ่งให้ผลเทียบเท่ากับวิธีการผสมแบบ vortex เป็นเวลา 1 นาที และนำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดังแสดงในภาพที่ 6 และตารางที่ 4

ผลการเปรียบเทียบผลกระทบของชนิดตัวกรองต่อปริมาณ alliin พบว่าไม่แตกต่างกัน โดยตัวกรองชนิด

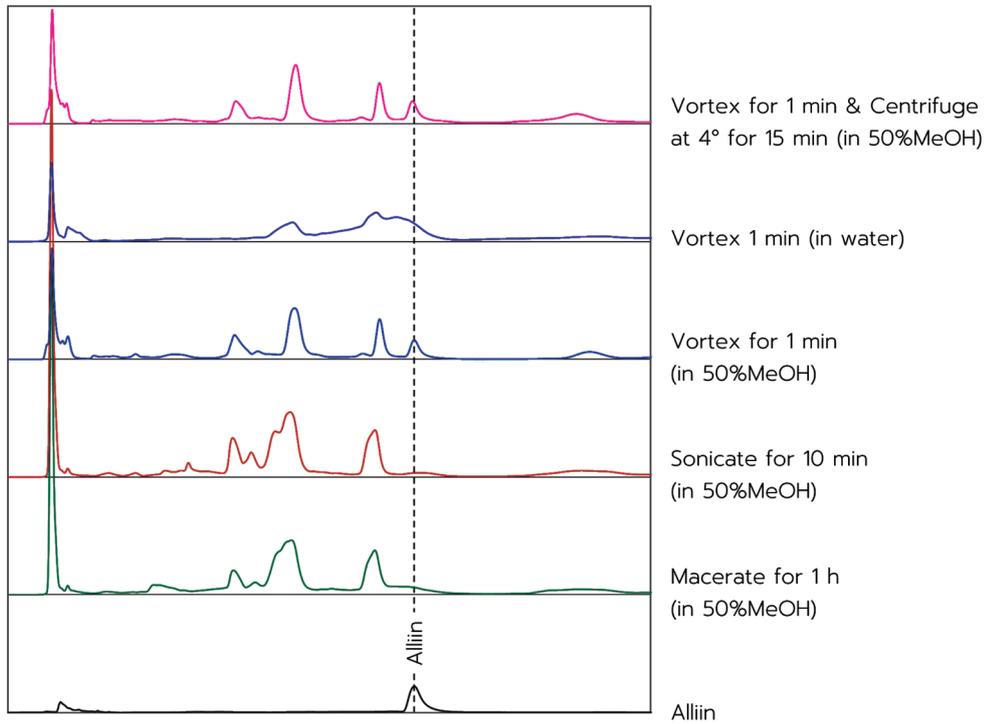
PTFE (100%) ให้ค่า response area มากกว่าตัวกรองชนิด PVDF (99.78%) และ nylon (99.78%) เล็กน้อย ดังแสดงในภาพที่ 7

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี

จากการเปรียบเทียบ alliin ในสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง พบว่า UV spectrum ไม่แตกต่างกัน และค่า spectral similarity (R^2) ในช่วงความยาวคลื่น 200–260 นาโนเมตร เท่ากับ 0.999959 ดังแสดงในภาพที่ 8–12

Sample preparation

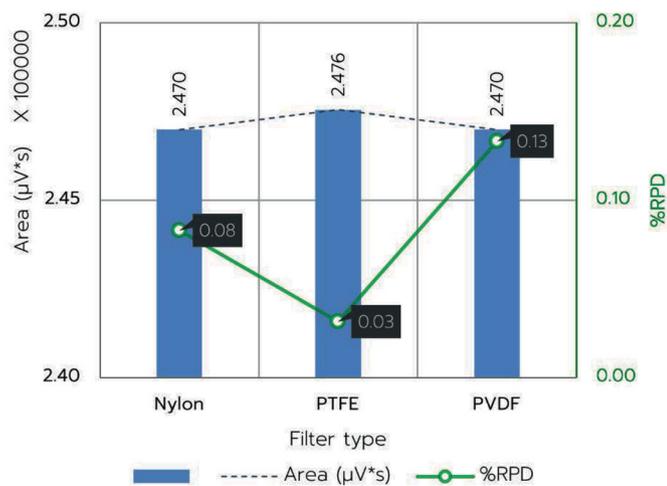


ภาพที่ 6 เปรียบเทียบโครมาโทแกรมที่ได้จากการศึกษาวิธีเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์

ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบวิธีเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์

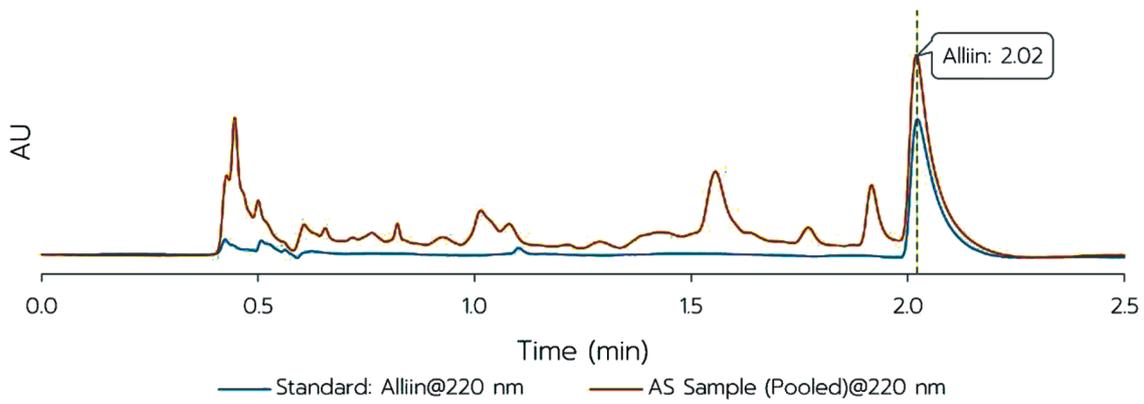
Solvent	Extraction		Centrifuge at 4°C for 15 min	Alliin (mg/g)				Average±SD
	Method	Time		#1	#2	#3	#4	
Water	Vortex mixing	1 min	No	-	-	-	-	-
50%MeOH	Vortex mixing	1 min	No	9.03	8.99	9.31	9.49	9.21±0.24
50%MeOH	Vortex mixing	1 min	Yes	9.47	9.23	9.71	8.83	9.31±0.37
50%MeOH	Maceration	60 min	No	-	-	-	-	-
50%MeOH	Sonication	10 min	No	-	-	-	-	-

Filter effect: Alliin

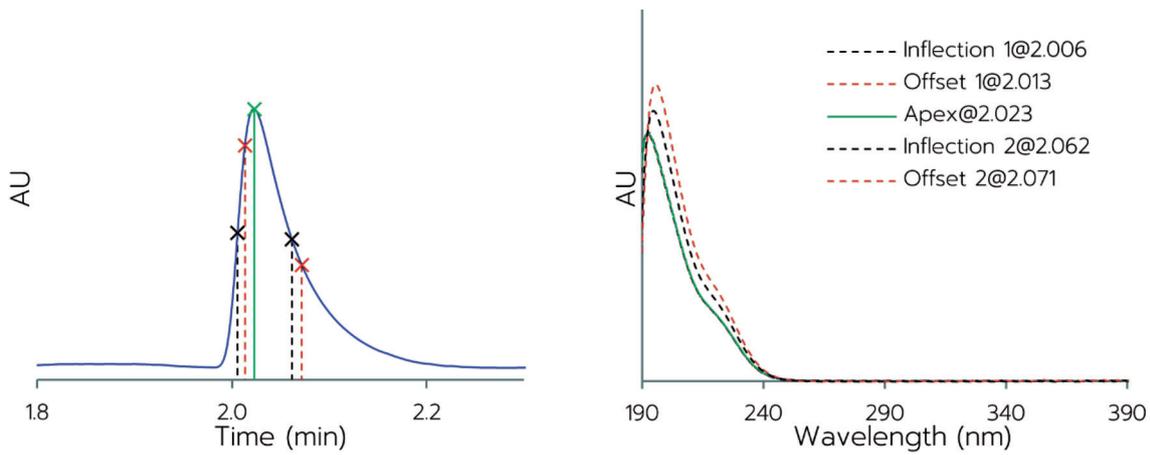


ภาพที่ 7 ผลการเปรียบเทียบผลกระทบของชนิดตัวกรองต่อปริมาณ alliin

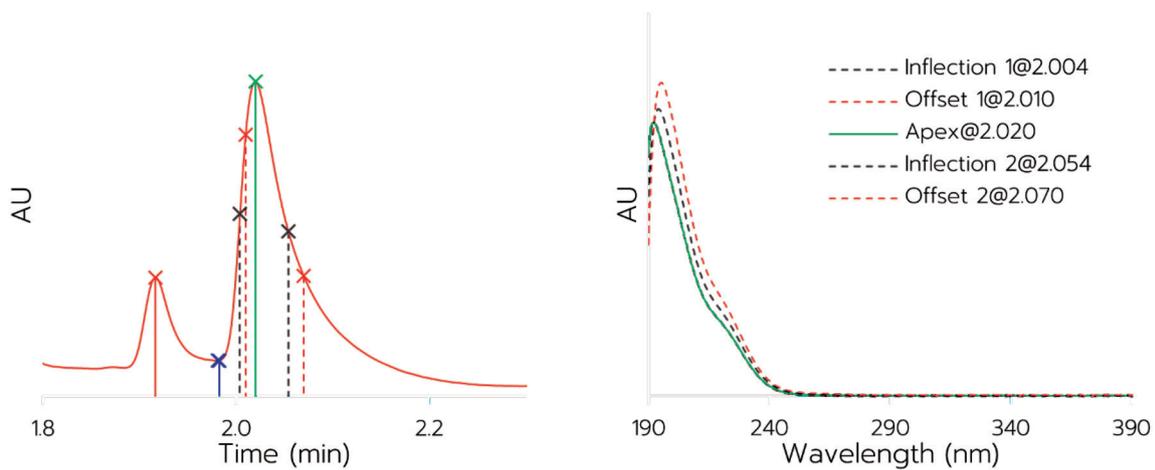
Overlaid chromatogram



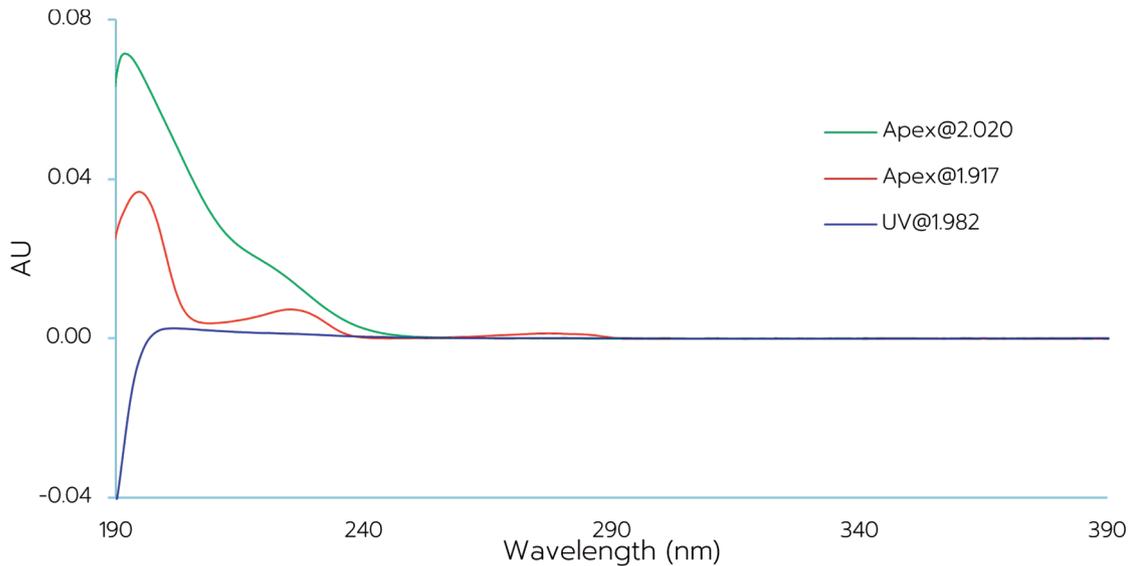
ภาพที่ 8 โครมาโทแกรมของ alliin ในสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง



ภาพที่ 9 UV spectrum ของ alliin ในสารละลายมาตรฐาน

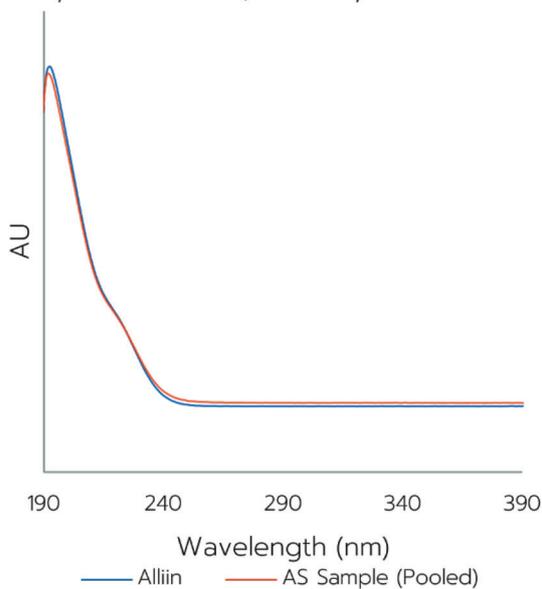


ภาพที่ 10 UV spectrum ของ alliin ในสารละลายตัวอย่าง

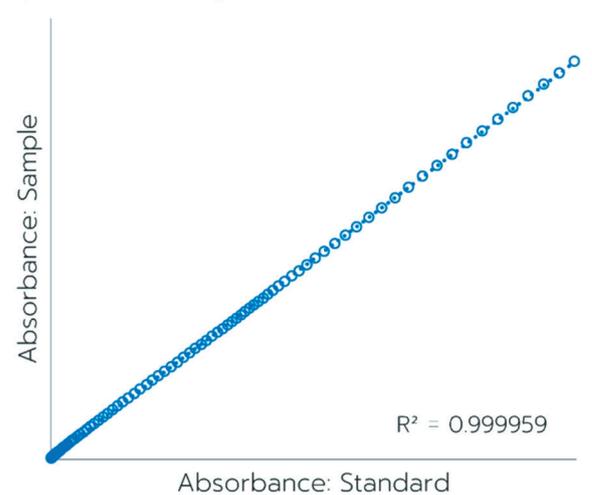


ภาพที่ 11 ผลการเปรียบเทียบ UV spectrum ระหว่างพีคข้างเคียง (1.917 นาที) baseline (1.982 นาที) และ alliin (2.020 นาที) ในสารละลายตัวอย่าง

UV Spectrum: Alliin | AS Sample



Spectral similarity: Alliin@2.02 min



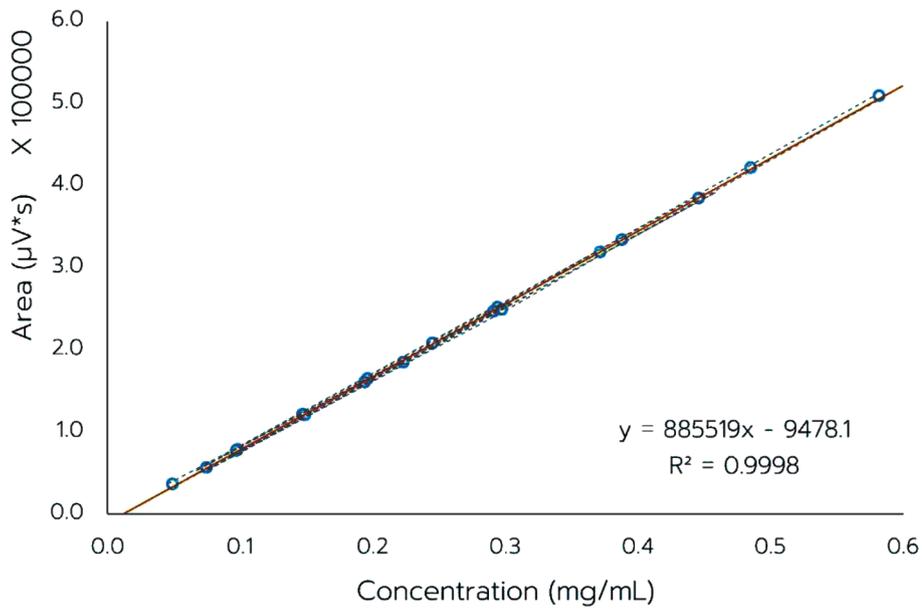
ภาพที่ 12 ค่า spectral similarity (R^2) ในช่วงความยาวคลื่น 200–260 นาโนเมตร

การทดสอบช่วงของการวัด และความเป็นเส้นตรง

ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน alliin ในช่วงระหว่าง 0.049 ถึง 0.582 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ากราฟมาตรฐานที่ได้มีความเป็นเส้นตรง โดย

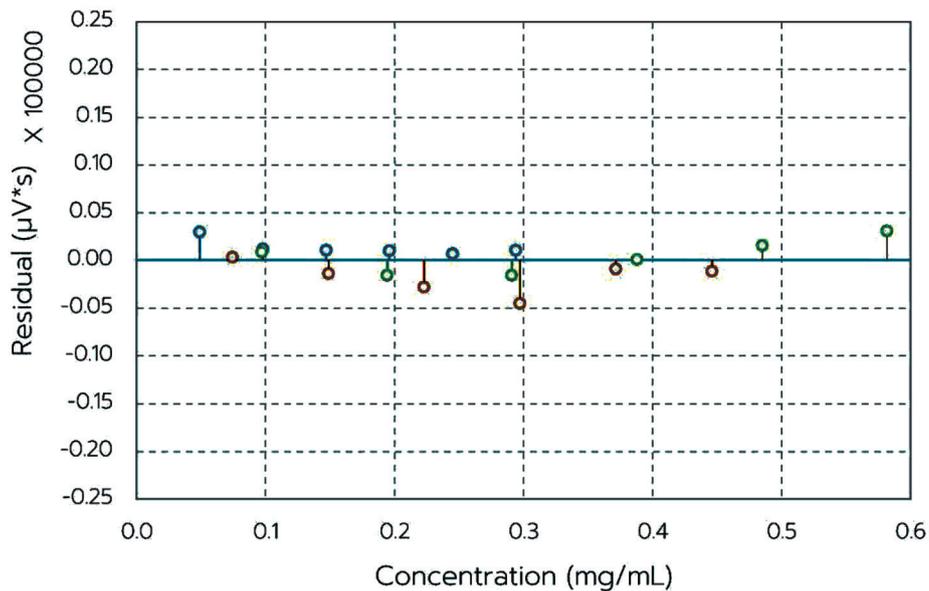
ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.999791 และค่า y-residuals ที่ได้จาก residual plots มีการกระจายครอบคลุมค่าศูนย์ โดยไม่พบค่าสุดต่าง (Outlier) ดังแสดงในภาพที่ 13 และ 14

Calibration curve: Alliin



ภาพที่ 13 กราฟมาตรฐาน alliin

Residual Plot: Alliin

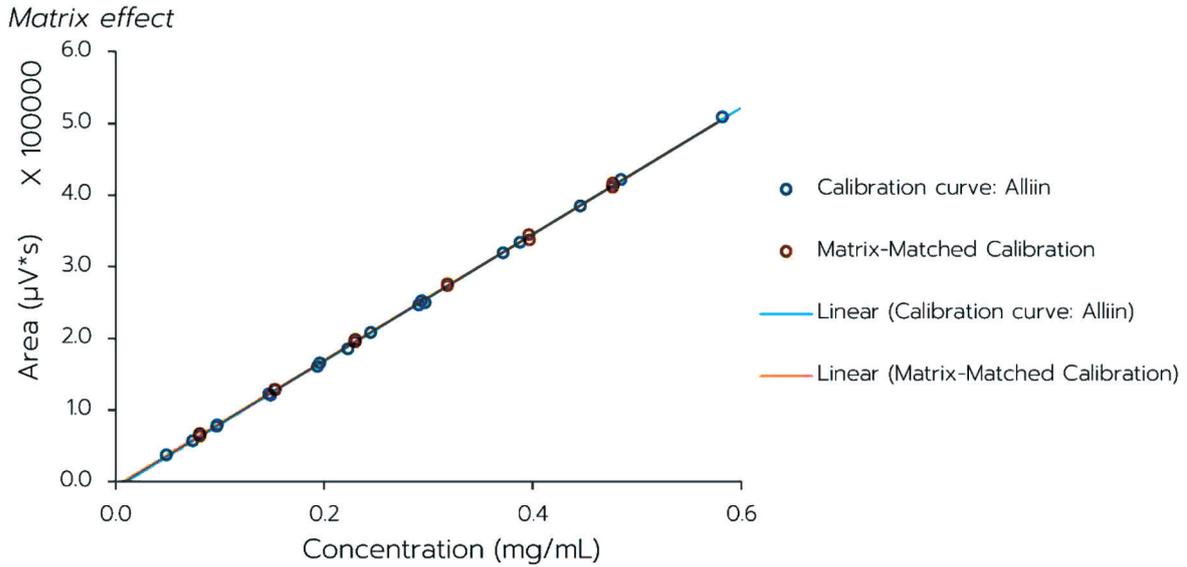


ภาพที่ 14 Residual plots ของกราฟมาตรฐาน alliin

การทดสอบผลกระทบของเมทริกซ์

พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ alliin ในสารละลายมาตรฐานและปริมาณ alliin ใน spiked sample มีความเป็นเส้นตรงตลอดช่วงของการวัด ($R^2 = 0.999964$) การทดสอบด้วย paired *t*-test พบว่าค่า *t* จากการ

คำนวณ (2.479) น้อยกว่าค่าวิกฤต (2.571) แสดงว่าไม่มีผลกระทบของเมทริกซ์ และเมื่อประเมินผลพบว่าเมทริกซ์ทำให้ปริมาณ alliin ลดลง น้อยกว่า 20% (Suppressed 0.88%) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้⁽²³⁾ ดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 Matrix effect

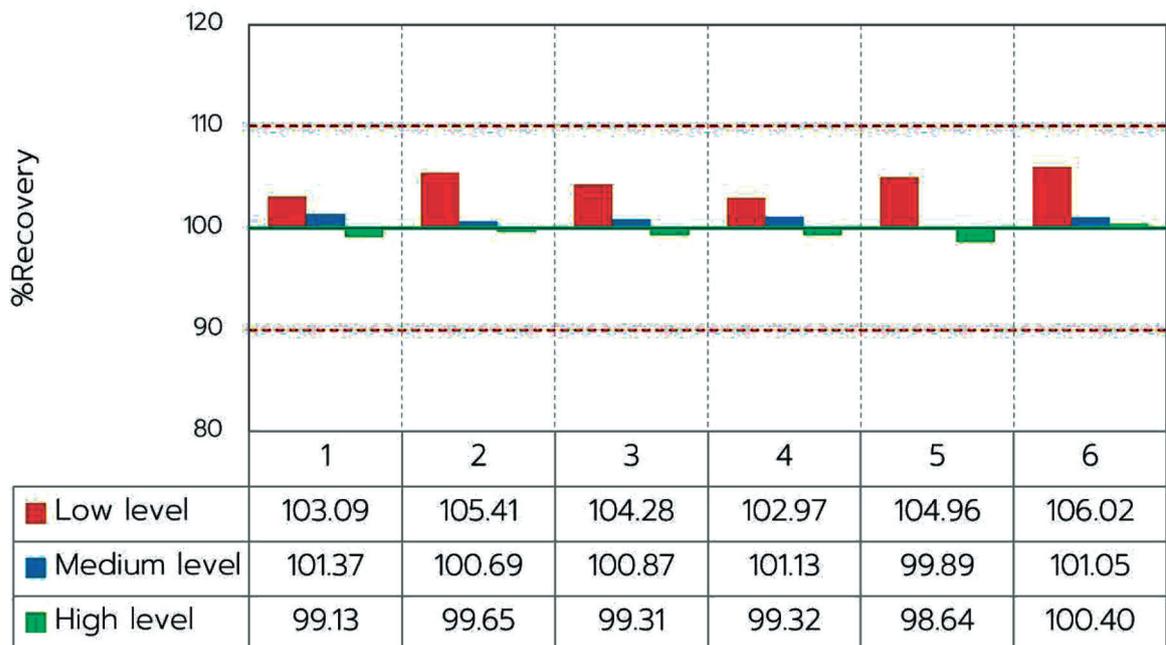
การทดสอบความแม่นยำ และความเที่ยง

ผลการวิเคราะห์ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.08, 0.23 และ 0.48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับละ 6 ซ้ำ พบว่าค่า %Recovery เท่ากับ 102.97–106.02, 99.89–101.37 และ 98.64–100.40 ตามลำดับ

และ %RSD_r เท่ากับ 1.19, 0.51 และ 0.59 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 16 และตารางที่ 5

ผลการทดสอบ within laboratory reproducibility พบว่า RPD เท่ากับ 2.39

Accuracy & Precision



ภาพที่ 16 %Recovery ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียมที่พัฒนาขึ้น

Spiked sample	%Recovery	%RSD
Low level (0.08 mg/mL)	104.46	1.19
Medium level (0.23 mg/mL)	100.83	0.51
High level (0.48 mg/mL)	99.41	0.59

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และ ขีดจำกัดของการหาปริมาณ (LOQ)

ผลจากการคำนวณ พบว่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.006 และ 0.033 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การยืนยันค่า LOQ ที่ระดับความเข้มข้น 0.029 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ พบว่า %Error อยู่ในช่วง 14.5–16.3 และ %RSD เท่ากับ 4.28

การวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียม

เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างกระเทียม จำนวน 8 ตัวอย่าง ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ได้ค่าเฉลี่ย เท่ากับ 9.87 ± 2.75 มิลลิกรัมต่อกรัม ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียม

Sample No.	Weight of sample (kg)		Yield (%)	Alliin (mg/g)			As is
	Raw	Dried powder		On dried basis			
				#1	#2	Average	
R024/64	2.1	0.84	40.00	4.89	4.82	4.85	1.94
R025/64	3.9	1.00	25.64	12.55	12.00	12.28	3.15
R026/64	2.1	0.70	33.33	13.58	13.57	13.57	4.52
R027/64	2.8	0.90	32.14	9.77	9.75	9.76	3.14
R028/64	2.2	0.83	37.73	9.51	9.74	9.62	3.63
R029/64	2.8	1.00	35.71	11.37	11.33	11.35	4.05
R031/64	2.3	0.83	36.09	7.34	7.51	7.42	2.68
R032/64	1.4	0.51	36.43	10.21	10.06	10.13	3.69
Average			34.63	9.90	9.85	9.87	3.35
SD			4.37	2.79	2.71	2.75	0.81

การทดสอบความคงตัวของสารละลายตัวอย่าง

ผลการทดสอบความคงตัวของสารละลายตัวอย่าง โดยการวิเคราะห์ซ้ำที่ระยะเวลา 15 นาที 30 นาที และ 24 ชั่วโมงหลังการเตรียม พบว่า %Compare เฉลี่ย เท่ากับ

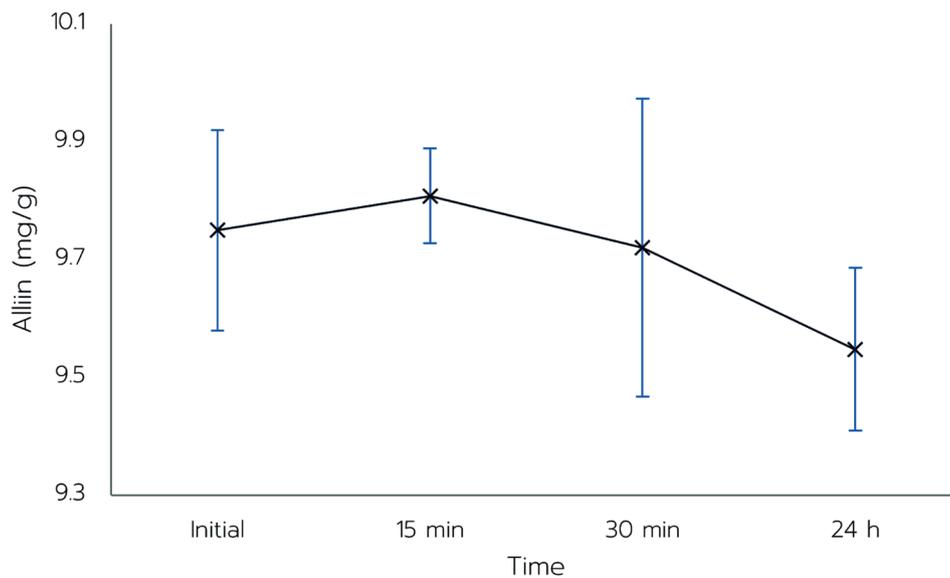
100.32, 99.98 และ 96.69 ตามลำดับ และ %RSD เท่ากับ 0.30, 0.04 และ 0.57 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7 และภาพที่ 17

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความคงตัวของสารละลายตัวอย่าง

Sample No.	Alliin (mg/g)				%Compare*			
	Initial	15 min	30 min	24 h	Initial	15 min	30 min	24 h
1	9.607	-	9.607	-	100.00	-	100.00	-
5	9.725	9.725	-	-	100.00	100.00	-	-
7	9.543	-	9.543	-	100.00	-	100.00	-
13	9.848	9.885	-	9.461	100.00	100.37	-	96.07
17	9.757	9.815	-	9.474	100.00	100.59	-	97.10
19	10.018	-	10.010	9.707	100.00	-	99.92	96.90
Average	9.750	9.808	9.720	9.548	100.00	100.32	99.97	96.69
SD	0.17	0.08	0.25	0.14	-	0.30	0.04	0.55
%RSD	1.75	0.82	2.60	1.45	-	0.30	0.04	0.57

หมายเหตุ: * เปรียบเทียบกับผลวิเคราะห์เริ่มต้น (Initial)

Stability of sample solution



ภาพที่ 17 ผลวิเคราะห์ปริมาณ alliin ของสารละลายตัวอย่าง ณ เวลาต่างๆ หลังการเตรียม

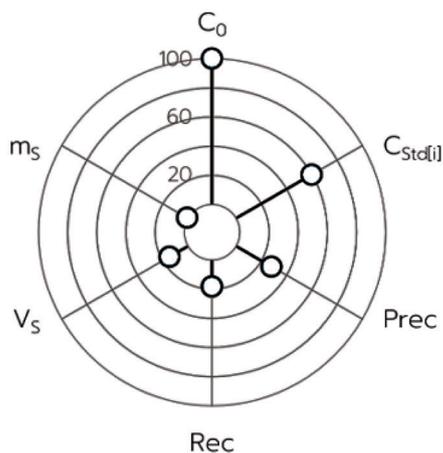
การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์
ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนในตัวอย่าง

ดังแสดงในตารางที่ 8 และสัดส่วนแหล่งที่มาของ
ความไม่แน่นอน ดังแสดงในภาพที่ 18

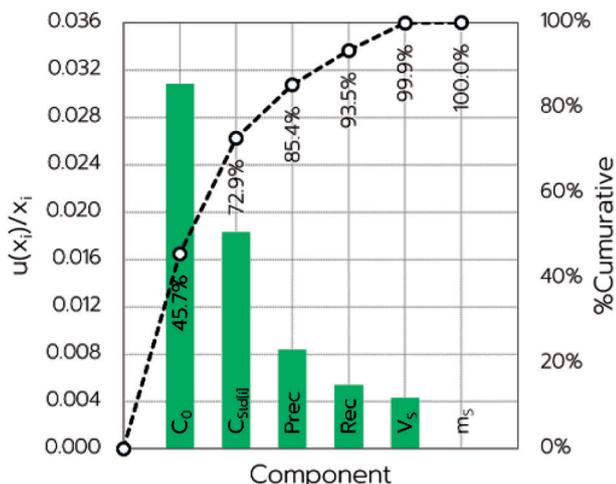
ตารางที่ 8 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียม

Component	Value; x_i	Unit	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$
Weight of sample; m_s	150	mg	0.00665225	0.00004435
Volume of sample; V_s	25	mL	0.10891750	0.00435670
Concentration of standard; $C_{Std[i]}$ (i = 1 to 6)				0.01833027
Purity of standard; $Purity_{Std}$	98	% w/w	0.57735027	0.00589133
Weight of standard; m_{Std}	37.47	mg	0.00642550	0.00017148
Volume of stock standard; V_{Std}	50	mL	0.21783499	0.00435670
Pipette for standard (level 1); $P_{Std[1]}$	1	mL	0.00631143	0.00631143
Pipette for standard (level 2); $P_{Std[2]}$	2	mL	0.01036034	0.00518017
Pipette for standard (level 3); $P_{Std[3]}$	3	mL	0.01554051	0.00518017
Pipette for standard (level 4); $P_{Std[4]}$	4	mL	0.01926171	0.00481543
Pipette for standard (level 5); $P_{Std[5]}$	5	mL	0.02318450	0.00463690
Pipette for standard (level 6); $P_{Std[6]}$	6	mL	0.02722187	0.00453698
Volume of working standard; $V_{Std[i]}$	10	mL	0.11113280	0.01111328
Concentration of sample preparation; C_0	0.0592	mg/mL	0.00182325	0.03077696
Precision; $Prec$	100	%	0.84119647	0.00841196
Recovery; Rec	101.57	%	0.54877567	0.00540312
Combined standard uncertainty				
Alliin content; C_s	9.873	mg/g		
Relative standard uncertainty; $u(C_s)/C_s$	0.03744540			
Standard uncertainty; $u(C_s)$	0.36971463	mg/g		
Expanded standard uncertainty				
$U(C_s)$	0.73942926	mg/g		
Reporting				
Alliin content:	9.87±0.74 mg/g (k = 2)			

%Distribution of U



Contribution of U



m_s : Weight of sample, V_s : Volume of sample, $C_{Std[i]}$: Concentration of standard; (i = 1 to 6)
 C_0 : Concentration of sample preparation, $Prec$: Precision, Rec : Recovery;

ภาพที่ 18 สัดส่วนแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียม

วิจารณ์

การศึกษาในครั้งนี้เมื่อพิจารณา alliin ที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็น S-allyl-L-cysteine sulfoxide ควรเลือกใช้คอลัมน์ชนิด polar ซึ่งน่าจะให้ผลการแยกที่ดีกว่าและง่ายกว่าการใช้คอลัมน์ชนิด C₈, C₁₈ หรือ phenyl ที่เป็น end-capped ชนิด non-polar ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ และพบว่าผลการทดสอบเป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ ทั้งนี้การใช้งานคอลัมน์ชนิด amide ซึ่งเป็น Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) ต้องใช้เวลาในการ equilibrate คอลัมน์ที่นานกว่า ตัวอย่างที่เตรียมต้องมีสัดส่วนของ organic solvent สูง และการดูแลรักษาที่ยุงยากกว่าคอลัมน์ทั่วไป

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิคอลัมน์ ในช่วงอุณหภูมิ 20–60 องศาเซลเซียส พบว่าค่า tailing factor ของ alliin ลดลงตามอุณหภูมิที่ลดลง แต่ส่งผลให้ความหนืดในระบบสูงขึ้น และค่า retention time ที่นานขึ้น ผู้วิจัยจึงเลือกที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นจุดสมดุลระหว่างค่า retention time และ tailing factor และจากการหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี เนื่องจากสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ค่อนข้างหนืด ดังนั้นในช่วงการล้างคอลัมน์หลังการแยกของ alliin ได้ทำการปรับ gradient ของ flow rate จาก 0.55 มิลลิลิตรต่อนาที เป็น 0.40 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อลด backpressure ของระบบ โดยมีจุดประสงค์เพื่อยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์และระบบภายในเครื่อง การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียมโดยวิธี UPLC หัวข้อการทดสอบช่วงของการวัดและความเป็นเส้นตรงทำการออกแบบการทดลองให้ซึ่งสารมาตรฐานของ stock ให้แตกต่างกัน 3 ช่วงน้ำหนัก โดยนักวิเคราะห์ 3 คน เพื่อลดอคติ (bias) ของการวิเคราะห์และทำให้ช่วงของการวัดครอบคลุมกว้างขึ้น ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียมโดยวิธี UPLC ที่พัฒนาขึ้น พบว่ากราฟมาตรฐานของ alliin มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.049–0.582 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R²) เท่ากับ 0.999791 ค่าความแม่นยำในช่วงร้อยละ 98.64–106.02 ค่าความเที่ยงอยู่ในช่วงร้อยละ 0.51–1.19 ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบและ

ขีดจำกัดของการหาปริมาณ เท่ากับ 0.006 และ 0.033 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และผลการวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในตัวอย่างกระเทียม จำนวน 8 ตัวอย่าง พบว่าค่าเฉลี่ย เท่ากับ 9.87±2.75 มิลลิกรัมต่อกรัม อย่างไรก็ตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นอาจใช้ไม่ได้กับตัวอย่างที่แปรรูปด้วยวิธีการต่างกันหรือเมทริกซ์ที่ต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลให้ fingerprint ที่ได้แตกต่างกัน และทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนได้ ดังนั้นในการจัดทำข้อกำหนดทางเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียม จึงควรระบุวิธีการแปรรูปตัวอย่างให้ชัดเจน และจากผลการทดสอบความคงตัวของสารละลายตัวอย่าง พบว่าสารละลายตัวอย่างมีความคงตัวเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์จนจบกระบวนการ แต่ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการเตรียมมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย (ลดลง 3.31%) ดังนั้นในการปฏิบัติงานจริงควรเตรียมสารละลายตัวอย่างและวิเคราะห์ให้แล้วเสร็จภายในวันเดียวกัน

จากการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียม พบว่าแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนส่วนใหญ่ (> 99%) มาจากองค์ประกอบของความเข้มข้นสารละลายตัวอย่าง (C₀) ที่ 45.72% ความเข้มข้นสารมาตรฐาน (C_{Std(ii)}) ที่ 27.23% ความเที่ยง (Prec) ที่ 12.49% ความแม่นยำ (Rec) ที่ 8.03% และปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ 6.47% โดยที่ความไม่แน่นอนที่เกิดจากน้ำหนักตัวอย่างมีค่าน้อยมาก ซึ่งผลรวมของค่าความไม่แน่นอนขยายที่คำนวณได้มีค่าไม่เกิน 10% ของปริมาณ alliin ที่วิเคราะห์ได้ (0.74/9.87 = 7.50%) และหากต้องการลดความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ ควรพิจารณาที่ค่า C₀ และ C_{Std(ii)} เป็นหลัก โดยการเลือกใช้สารมาตรฐานที่มีความบริสุทธิ์สูง เพิ่มจำนวนจุดบนกราฟมาตรฐานหรือเพิ่มจำนวนซ้ำของการวัด แต่ผลที่ตามมา คือ ค่าใช้จ่ายที่สูงขึ้น ดังนั้นควรคำนึงถึงความคุ้มค่าและความเหมาะสมต่อการใช้งาน

สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีข้อกำหนดหรือเกณฑ์มาตรฐานของ alliin ในกระเทียม ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาจากการศึกษานี้สามารถนำไปต่อยอดสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในตัวอย่างกระเทียม โดยหากนำไปใช้กำหนดเป็นเกณฑ์มาตรฐานของปริมาณ

สารสำคัญในกระเทียม ควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างอย่างน้อย 12 ตัวอย่าง

สรุป

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ alliin ในกระเทียมโดยวิธี UPLC และทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความจำเพาะเจาะจง ถูกต้อง และแม่นยำ สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียมเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพ รวมถึงใช้ในการคัดเลือกกระเทียมที่มีคุณภาพเพื่อเข้าสู่กระบวนการผลิตยาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ศูนย์ตรวจสอบและรับรองคุณภาพสมุนไพรทุกท่าน ที่ช่วยให้สามารถดำเนินการจนประสบความสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Krathiam (*Allium sativum* L.). In: Thai herbal pharmacopoeia 2021, Vol I. Bangkok: Bureau of Drug and Narcotic; 2021. p. 350–356.
- คณะกรรมการจัดทำตำราอ้างอิงยาสมุนไพรไทย. รายงานลักษณะทางเภสัชพฤกษศาสตร์และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกระเทียม (*Allium sativum* L.). ว การแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก 2563; 18(1): 203–8.
- Ahmed S, Fahim J, Abdelmohsen U. Chemical and biological studies on *Allium sativum* L. (1952–2020): a comprehensive review. J Adv Biomed Pharm Sci 2022; 5(1): 1–22.
- Zhang Y, Liu X, Ruan J, Zhuang X, Zhang X, Li Z. Phytochemicals of garlic: promising candidates for cancer therapy. Biomed Pharmacother. [serial online]. 2020; [cited 2025 Oct 17]; 123: 109730. Available from: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332219353521>.
- Mandal SK, Das A, Dey S, Sahoo U, Bose S, Bose A, et al. Bioactivities of allicin and related organosulfur compounds from garlic: overview of the literature since 2010. Egyptian J Chem 2019; 62(Spec Part 1): 1–11.
- Shang A, Cao SY, Xu XY, Gan RY, Tang GY, Corke H, et al. Bioactive compounds and biological functions of garlic (*Allium sativum* L.). Foods 2019; 8(7): 246. (31 pages).
- Singh P, Sachan M. A review on chemical constituents and biological activities of garlic (*Allium sativum*). J Emerg Technol Innov Res 2025; 12(1): b415–20.
- Moses RJ, Edo GI, Jikah AN, Agbo JJ. Bioactive compounds and biological activities of garlic. Curr Food Sci Technol Rep 2024; 2: 111–20.
- Janská P, Knejzlík Z, Perumal AS, Jurok R, Tokárová V, Nicolau DV, et al. Effect of physicochemical parameters on the stability and activity of garlic alliinase and its use for in-situ allicin synthesis. PLoS ONE 2021; 16(3): e0248878. (20 pages).
- Fujisawa H, Suma K, Origuchi K, Seki T, Ariga T. Thermostability of allicin determined by chemical and biological assays. Biosci Biotechnol Biochem 2008; 72(11): 2877–83.
- Zhou S, Yan X, Qiao X, Qiu Z, Zhu W, Lu X, et al. Evaluate the stability of synthesized allicin and its reactivity with endogenous compounds in garlic. NPJ Sci Food 2025; 9: 18. (9 pages).
- Zhang M, Zou X, Du Y, Pan Z, He F, Sun Y, et al. Integrated transcriptomics and metabolomics reveal the mechanism of alliin in improving hyperlipidemia. Foods 2023; 12(18): 3407–7.
- Kanaki NS, Rajani M. Development and validation of a thin-layer chromatography-densitometric method for the quantitation of alliin from garlic (*Allium sativum*) and its formulations. J AOAC Int 2005; 88(5): 1568–70.
- Siddiqui NA, Mothana RA, Alam P. Quantitative determination of alliin in dried garlic cloves

- and products by high-performance thin-layer chromatography. *Trop J Pharm Res* 2016; 15(8): 1759-65.
15. อาทิมนต์ แพทยานนท์. การวิเคราะห์หาปริมาณอัลลิอินในหัวกระเทียมและผลิตภัณฑ์กระเทียมโดยเทคนิคที่แอลซี-เดนมิตโรเมตรี. [วิทยานิพนธ์เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. [ออนไลน์]. 2538; [สืบค้น 17 ต.ค. 2568]; เข้าถึงได้จาก: URL: <https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd/30373>.
 16. Hayashi T, Sano K, Ohsumi C. Gas chromatographic analysis of alliin in the callus tissues of *Allium sativum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1993; 57(1): 162-3.
 17. Apawu AK. Reversed-phase HPLC determination of alliin in diverse varieties of fresh garlic and commercial garlic products [dissertation]. Johnson City, TN: East Tennessee State University. [online]. 2009; [cited 2025 Aug 6]. Available from: URL: <https://dc.etsu.edu/etd/1803>.
 18. Miron T, Shin I, Feigenblat G, Weiner L, Mirelman D, Wilchek M, et al. A spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thio-sulfinates. *Anal Biochem* 2002; 307(1): 76-83.
 19. Charoenchai L, Luprasong C, Kraisintu K. Comparison of bioactive sulfur containing compounds in fresh garlic and garlic products. In: Rangsit University International Research Conference 2018. [online]. 2018; [cited 2025 Oct 17]. [9 screens]. Available from: URL: <https://rsucon.rsu.ac.th/files/proceedings/inter2018/G1-IN18-020.pdf>.
 20. Budavari S, editor. *Alliin*. In: *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 11th ed. Rahway, NJ: Merck & Co., Inc.; 1989. p. 257.
 21. Lawson LD. Bioactive organosulfur compounds of garlic and garlic products: role in reducing blood lipids. In: *Nutraceuticals: designer foods III garlic, soy and licorice*. ACS symposium series 546. Washington, DC: American Chemical Society; 1993. p. 306-330.
 22. Fernández A, Sinanoglu O. Denaturation of proteins in methanol/water mixtures. *Biophys Chem* 1985; 21(3-4): 163-6.
 23. McCall E. Understanding sample complexity: determining matrix effects in complex food samples. Milford, MA: Waters Corporation. [online]. 2020; [cited 2025 Aug 6]; [5 screens]. Available from: URL: <https://legacy-stage.waters.com/blog/understanding-sample-complexity-determining-matri>.

Method Development of Determination of Alliin in Garlic Using Ultra Performance Liquid Chromatographic Technique

Nichapat Pattapong, Apirak Sakpetch, Vilailuk Chuennangchee,
Sirikarn Thana-ariyaroj, and Nuchjaree Seesanam

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

ABSTRACT Alliin is a major bioactive compound found in garlic (*Allium sativum* L.). It exhibits pharmacological activities including antibacterial, anti-inflammatory, and antihypertensive effects. Therefore, the quantitative determination of alliin in garlic can be used to evaluate its quality. The objective of this study was to develop an analytical method for the quantitation of alliin in garlic using Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). A 150 mg sample of garlic was extracted with 25 mL of 50% methanol by vortex mixing for 1 minute. The supernatant was filtered through a PTFE syringe filter, and a 1 μ L aliquot of the filtrate was injected into the chromatographic system. The separation was performed on an AcquityTM BEH[®] Amide column (2.1 \times 100 mm, 1.7 μ m). The mobile phase consisted of acetonitrile and water, beginning at a ratio of 85:15 for 0.65 minutes, then adjusted to 75:25 at 1.42 minutes, and subsequently to 86:14 at 1.52 minutes, and maintained at 86:14 until 2.30 minutes. The flow rate was 0.55 mL/min, the column temperature was maintained at 40°C and detection was carried out with a Photodiode Array (PDA) detector at 220 nm. It was found that the retention time of alliin was 2.02 minutes. As a result, the method validation demonstrated that the calibration curve for alliin was linear over the concentration range of 0.049–0.582 mg/mL with a coefficient of determination (R^2) of 0.999791. Accuracy ranged from 98.64% to 106.02%, while precision (RSD) was between 0.51% and 1.19%. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were 0.006 mg/mL and 0.033 mg/mL, respectively. Analysis of eight garlic samples revealed an average alliin content of 9.87 \pm 2.75 mg/g. This study demonstrates that the developed UPLC method is suitable for the quantification of alliin in garlic and can be applied for quality control as well as for the selection of high-quality garlic for pharmaceutical or health product manufacturing.

Keywords: Garlic, *Allium sativum*, Alliin, UPLC

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเทคนิค การตรวจเชิงปริมาณทางจุลชีววิทยาในอาหาร

กมลวรรณ กันแต่ง และ อัจฉรา อยู่คง

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ต้องดำเนินการเกี่ยวกับการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดตามข้อกำหนดที่ 7.6 เพื่อนำมาใช้รายงานร่วมกับผลการทดสอบในกรณีที่เป็นความต้องการของผู้ใช้บริการหรือเมื่อผลการทดสอบให้ค่าคาบเกี่ยวในช่วงเกณฑ์การยอมรับ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ดำเนินการรวบรวมข้อมูลผลการทำการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา ระหว่างปี พ.ศ. 2564-2567 เพื่อนำมาหาค่าความไม่แน่นอนเชิงเทคนิค (Technical Uncertainty; u_{tech}) ตาม ISO 19036:2019 จำนวน 203 ตัวอย่าง รวม 11 รายการทดสอบ ได้แก่ จำนวนจุลินทรีย์ตาม APHA 2015, Chapter 6&8 จำนวนจุลินทรีย์ตาม BAM 2001, Chapter 3 จำนวนยีสต์และราตาม AOAC 2019; 997.02 จำนวนยีสต์และราตาม BAM 2001, Chapter 18 จำนวนแลกติกแอซิดแบคทีเรียตาม ISO 15214:1998, Coliforms ตาม BAM 2020, Chapter 4, *Bacillus cereus* ตาม BAM 2020, Chapter 14, *Clostridium perfringens* ตาม BAM 2001, Chapter 16, *Staphylococcus aureus* ตาม BAM 2016, Chapter 12 หน่วยการทดสอบเป็น CFU ต่อกรัม ส่วน Coliforms ตาม BAM 2020, Chapter 4 และ *Escherichia coli* ตาม BAM 2020, Chapter 4 หน่วยการทดสอบเป็น MPN ต่อกรัม ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนเชิงเทคนิค มีค่า u_{tech} เท่ากับ 0.0620, 0.0647, 0.1041, 0.0677, 0.0988, 0.0517, 0.0919, 0.9210, 0.0794, 0.1412 และ 0.1412 ตามลำดับ ทำให้ห้องปฏิบัติการสามารถนำค่า u_{tech} มาใช้คำนวณหาค่าความไม่แน่นอนรวมเพื่อใช้ในการรายงานร่วมกับผลการทดสอบ และนำไปใช้เปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานเพื่อตัดสินผลการทดสอบได้อย่างมั่นใจ

คำสำคัญ: ความไม่แน่นอนของการวัดทางจุลชีววิทยา, ความไม่แน่นอนของการวัดทางเทคนิค, ความไม่แน่นอนรวม, การทำซ้ำภายในห้องปฏิบัติการ

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

Received: 17 January 2025

Revised: 18 August 2025

Accepted: 19 August 2025

บทนำ

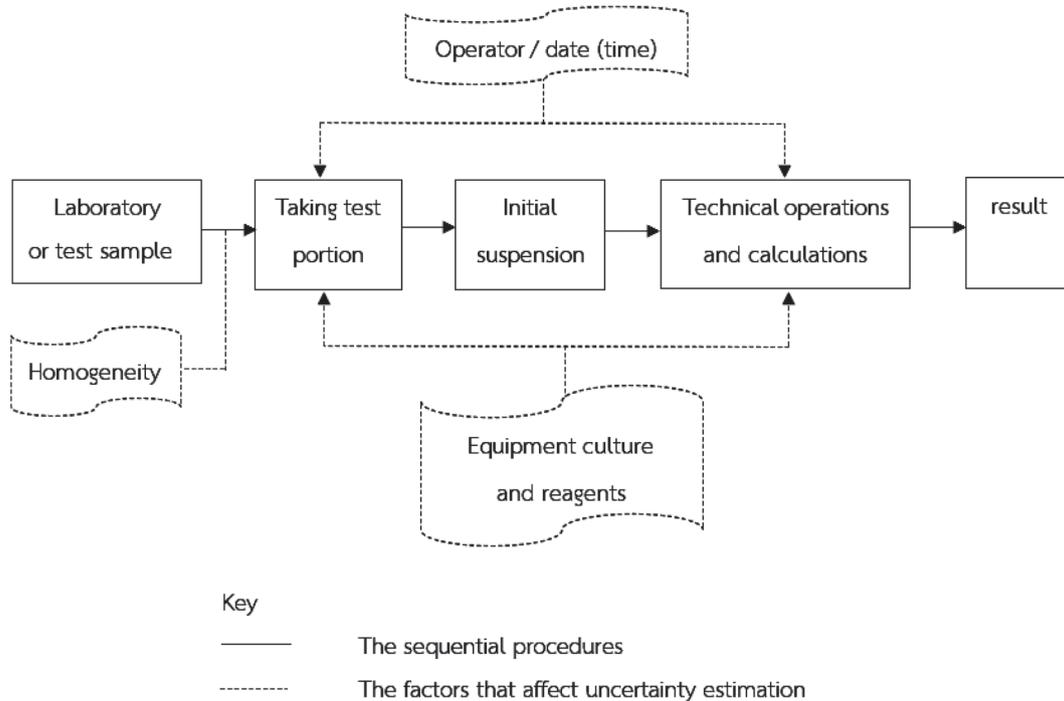
การตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่ได้จะเป็นค่าประมาณของค่าจริงและมีค่าความคลาดเคลื่อนของการวัด เนื่องจากปัจจัยที่ควบคุมได้หรือควบคุมไม่ได้เกิดขึ้นเสมอ ทำให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความไม่แน่นอน การประมาณค่าความไม่แน่นอนอย่างสมเหตุสมผลและถูกต้องตามหลักวิชาการทำให้ค่าที่รายงานนั้นมีความครบถ้วนสมบูรณ์ และน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น ลดข้อโต้แย้งกรณีเกิดความไม่สอดคล้องของผลการวิเคราะห์จากตัวอย่างเดียวกันโดยห้องปฏิบัติการที่ต่างกัน ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ได้ดำเนินการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางจุลชีววิทยา ตามข้อกำหนดที่ 7.6⁽¹⁾ เพื่อให้มีข้อมูลพร้อมที่จะนำค่าความไม่แน่นอนของการวัดมารายงานร่วมกับผลการวิเคราะห์ ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ซ้ำลดปริมาณงาน แสดงความเสี่ยง และความเหมาะสมของการนำผลการตรวจวิเคราะห์ไปใช้ ทำให้เกิดการพัฒนาและปรับปรุงกระบวนการตรวจวิเคราะห์ รวมถึงแสดงความสามารถในการสอบกลับได้ของการวัด⁽²⁾

เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์จุลชีววิทยาในอาหารเชิงปริมาณ สอบกลับได้ถึงมาตรฐานอ้างอิงที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อผลการทดสอบให้ค่าคาบเกี่ยวในช่วงเกณฑ์การยอมรับโดยค่าความไม่แน่นอนรวม (Combine Uncertainty) จากรากที่สองของผลรวมของความไม่แน่นอนมาตรฐานยกกำลังสอง (root-sum-of-squares) ตาม ISO 19036:2019⁽³⁾ มี 3 องค์ประกอบหลักคือ Technical Uncertainty (u_{tech}), Matrix Uncertainty (u_{matrix}) และ Distributional Uncertainty ($u_{distrib}$) โดย Technique Uncertainty เป็นการหาค่าความไม่แน่นอนด้วยแนวคิดแบบ top-down approach ซึ่งได้จากการประมาณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทำซ้ำได้ภายในห้องปฏิบัติการเดียวกัน (Intra-laboratory Reproducibility Standard Deviation; S_{IR})

โดยค่า S_{IR} ที่คำนวณได้จากมีองค์ประกอบของ matrix และความแปรปรวนภายในที่เกี่ยวข้องกับการกระจายของเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่าง (distributional) ทำให้ค่าความไม่แน่นอนของการวัดเกิดการประมาณค่าที่สูงเกินไป (overestimate) ดังนั้นเพื่อลดการทับซ้อนดังกล่าว ห้องปฏิบัติการสามารถเลือกใช้ค่า Intra-laboratory reproducibility standard deviation, corrected by subtraction of matrix and distributional component ($S_{IR:corr}$) คือ ค่า S_{IR} หักลบด้วยส่วนประกอบของเมทริกซ์และส่วนประกอบของการกระจายตัวแทน S_{IR} เมื่อค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของส่วนประกอบที่ไม่พึงประสงค์ยกกำลังสอง (Standard Uncertainty of Unwanted Component²; $u_{unwanted}^2$) มีค่าน้อยกว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทำซ้ำได้ภายในห้องปฏิบัติการเดียวกันยกกำลังสอง (S_{IR}^2) ซึ่งแนวทางนี้ห้องปฏิบัติการสามารถรายงานค่าความไม่แน่นอนของการวัดร่วมกับการรายงานผลได้ในกรณีนี้จึงได้ดำเนินการรวบรวมข้อมูลการทำซ้ำของการตรวจวิเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นรายการที่ได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ทั้งสิ้นจำนวน 11 รายการทดสอบ ได้แก่ จำนวนจุลินทรีย์ (APHA 2015, Chapter 6&8)⁽⁴⁾ จำนวนจุลินทรีย์ (BAM 2001, Chapter 3)⁽⁵⁾ จำนวนยีสต์และรา (AOAC 2019 (997.02))⁽⁶⁾ จำนวนยีสต์และรา (BAM 2001, Chapter 18)⁽⁷⁾ จำนวนแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (ISO 15214:1998)⁽⁸⁾ Coliforms (BAM 2020, Chapter 4)⁽⁹⁾ *Bacillus cereus* (BAM 2020, Chapter 14)⁽¹⁰⁾ *Clostridium perfringens* (BAM 2001, Chapter 16)⁽¹¹⁾ *Staphylococcus aureus* (BAM 2016, Chapter 12)⁽¹²⁾ หน่วยการทดสอบเป็น CFU ต่อกรัม Coliforms (BAM 2020, Chapter 4)^(9,13) และ *Escherichia coli* (BAM 2020, Chapter 4)^(9,13) หน่วยการทดสอบเป็น MPN ต่อกรัม นำไปคำนวณหาค่า Technical Uncertainty ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนรวม โดยความ

ไม่แน่นอนนี้เกิดจากความแปรปรวนที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนทางเทคนิคของกระบวนการตรวจวิเคราะห์ รวมถึงการแปรปรวนของการเตรียม การเจือจาง การเติมเชื้อ เครื่องมืออาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยา

ที่ใช้การบ่ม การนับจำนวนโคโลนี การตรวจพบ การเจริญและการตรวดยืนยันสิ่งต่างๆ ดังกล่าวนี้อธิบายเป็นแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนโดยทั่วไป^(14,15) ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แหล่งที่มาหลักของความไม่แน่นอนในการทดสอบทางจุลชีววิทยา (ISO 19036:2019)⁽³⁾

วัสดุและวิธีการ

รวบรวมข้อมูลผลการทำซ้ำภายในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างปี พ.ศ. 2564–2567 ทั้งหมด 11 รายการทดสอบ จำนวนรวม 203 ตัวอย่าง โดยวิธี Colony count technique เลือกเฉพาะผลการนับที่มีจำนวนโคโลนีรวมตั้งแต่ 30 โคโลนี ($\sum C \geq 30$) โดยพิจารณาช่วงของการนับตามข้อกำหนดของแต่ละวิธีทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 1

ส่วนวิธี MPN technique เลือกข้อมูลที่ได้ผลบวกรวมทุกระดับความเจือจางไม่น้อยกว่า 5 หลอด โดยต้องมีข้อมูลอย่างน้อย 10 ตัวอย่าง ($n \geq 10$) ตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวอย่างที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน แต่ละตัวอย่างแบ่งเป็น 2 ส่วน (Test portion) เพื่อให้ห้วิเคราะห์ต่างคนกันเป็นผู้ทดสอบ ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยทุกรายการมีการเติมเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายลงไป

สารละลายเจือจางตั้งต้น (Initial suspension) ยกเว้นรายการทดสอบจำนวนแลกดิกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์เป้าหมายอยู่แล้ว ในตัวอย่าง โดยกำหนดให้มีสถานะแตกต่างกันในแต่ละขั้นตอนการวิเคราะห์ เช่น เครื่องจักร ฐานการผลิตของอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายเจือจาง น้ำยา เครื่องผสม เวลาการตรวจวิเคราะห์ ตู้บ่มเพาะเชื้อ เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยต้องมีผลที่ตรวจยืนยันแล้ว (n_c) มากกว่าครึ่งหนึ่งของจำนวนโคโลนีที่ทดสอบ (n_p) ($n_c \geq n_p/2$) คำนวณผลการทดสอบตามแต่ละวิธีทดสอบเป็นหน่วย CFU ต่อกรัม หรือ MPN ต่อกรัม และแปลงค่าเป็น \log_{10} ก่อนนำมาคำนวณหาค่า S_{IR} (สมการที่ 1) โดยค่า S_{IR} ที่ได้จากการทดสอบอาจมีการรวมองค์ประกอบของ matrix (u_{matrix}) โดยกำหนดให้ u_{matrix} เท่ากับ 0.1⁽¹⁶⁾ เนื่องจากทุกตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวอย่างที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน และ

Distributional Uncertainty ($u_{distrib}$) ทำให้ค่าความไม่แน่นอนของการวัดเกิด overestimate ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดการซ้อนทับดังกล่าว จึงต้องหาค่า Unwanted Uncertainty ($u_{unwanted}$) (สมการที่ 2, 3, 4, 5 และ 6) ซึ่งองค์ประกอบของ $u_{unwanted}$ (Unwanted Uncertainty Component) ขึ้นอยู่กับแต่ละวิธีทดสอบดังนี้

ประเภทที่ 1 วิธีการนับจำนวนโคโลนีที่ไม่มีการตรวจยืนยันผลใช้ 2 องค์ประกอบ คือ Matrix Uncertainty (u_{matrix}) และ Poission Uncertainty ($u_{poisson}$) ได้แก่ รายการทดสอบจำนวนจุลินทรีย์ (APHA 2015, Chapter 6&8)⁽⁴⁾ จำนวนจุลินทรีย์ (BAM 2001, Chapter 3)⁽⁵⁾ และจำนวนยีสต์และรา (AOAC 2019 (997.02))⁽⁶⁾

ประเภทที่ 2 วิธีการนับจำนวนโคโลนีที่มีขั้นตอนการตรวจยืนยันผล (Colony count methods, with partial confirmation) ใช้ 3 องค์ประกอบ คือ Matrix Uncertainty (u_{matrix}) Poisson

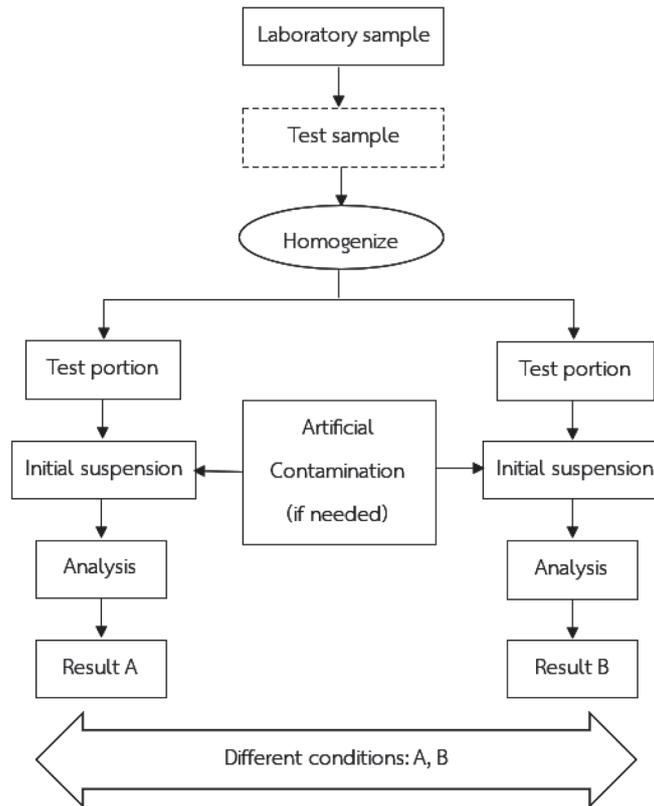
Uncertainty ($u_{poisson}$) และ Confirmation Uncertainty (u_{conf}) ได้แก่ รายการทดสอบจำนวนยีสต์และรา (BAM 2001, Chapter 18)⁽⁷⁾ จำนวนแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (ISO 15214:1998)⁽⁸⁾ Coliforms (BAM 2020, Chapter 4)⁽⁹⁾ *Bacillus cereus* (BAM 2020, Chapter 14)⁽¹⁰⁾ *Clostridium perfringens* (BAM 2001, Chapter 16)⁽¹¹⁾ และ *Staphylococcus aureus* (BAM 2016, Chapter 12)⁽¹²⁾

ประเภทที่ 3 วิธี Most Probable Number (MPN technique) ใช้ 2 องค์ประกอบ คือ Matrix Uncertainty และ Most Probable Number Uncertainty ได้แก่ รายการทดสอบ Coliforms (BAM 2020, Chapter 4)^(9,13) และ *Escherichia coli* (BAM 2020, Chapter 4)^(9,13)

จากนั้นคำนวณหาค่า $S_{IR:corr}$ (สมการที่ 7 และ 8) ห้องปฏิบัติกรสามารถเลือกใช้ค่า $S_{IR:corr}$ แทนค่า S_{IR} ได้ เมื่อ $u_{unwanted}^2$ มีค่าน้อยกว่า (S_{IR}^2)

ตารางที่ 1 รายการทดสอบวิธีวิเคราะห์และข้อมูลต่าง ๆ ที่ใช้ในการหาค่าความไม่แน่นอนเชิงเทคนิคของการวัดทางจุลชีววิทยา

ลำดับที่	รายการทดสอบ	วิธีวิเคราะห์	จำนวนข้อมูล (n)	ช่วงการนับ	ประเภทของวิธี
1	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU ต่อกรัม)	APHA 2015 (Chapter 6&8) ⁽⁴⁾	23	25-250	1
2	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU ต่อกรัม)	FDA BAM Online. 2001 (Chapter 3) ⁽⁵⁾	23	25-250	1
3	จำนวนยีสต์และรา (CFU ต่อกรัม)	AOAC 2019 (997.02) ⁽⁶⁾	16	1-150	1
4	จำนวนยีสต์และรา (CFU ต่อกรัม)	FDA BAM Online. 2001 (Chapter 18) ⁽⁷⁾	20	10-150	2
5	จำนวนแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (CFU ต่อกรัม)	ISO 15214:1998 ⁽⁸⁾	11	15-300	2
6	Coliforms (CFU ต่อกรัม)	FDA BAM Online. 2020 (Chapter 4) ⁽⁹⁾	19	25-250	2
7	<i>Bacillus cereus</i> (CFU ต่อกรัม)	FDA BAM Online. 2020 (Chapter 14) ⁽¹⁰⁾	21	15-150	2
8	<i>Clostridium perfringens</i> (CFU ต่อกรัม)	FDA BAM Online. 2001 (Chapter 16) ⁽¹¹⁾	17	20-200	2
9	<i>Staphylococcus aureus</i> (CFU ต่อกรัม)	FDA BAM Online. 2016 (Chapter 12) ⁽¹²⁾	21	20-200	2
10	Coliforms (MPN ต่อกรัม)	FDA BAM Online. 2020 (Chapter 4) ^(9,13)	16	$n_c > 5$	3
11	<i>Escherichia coli</i> (MPN ต่อกรัม)	FDA BAM Online. 2020 (Chapter 4) ^(9,13)	16	$n_c > 5$	3



ภาพที่ 2 วิธีปฏิบัติในการทำซ้ำภายในห้องปฏิบัติการของการตรวจทางจุลชีววิทยา (ISO 19036:2019)⁽³⁾

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2} \quad \text{สมการที่ 1}$$

$$u_{poisson} = \frac{0.4343}{\sqrt{\sum C}} \quad \text{สมการที่ 2}$$

$$u_{conf} = \frac{1}{2.303} \sqrt{\frac{(n_c + 0.5)(n_p - n_c + 0.5)n_p^2}{(n_p + 1)^2 (n_p + 2)n_c^2}} \quad \text{สมการที่ 3}$$

$$u_{MPN} = \frac{1/\ln(10)}{\mu \sqrt{\sum_{i=1}^k \frac{x_i \times m_i^2 \exp(-m_i \times \mu)}{(1 - \exp(-m_i \times \mu))^2}}} \quad \text{สมการที่ 4}$$

$$S_{unwanted} = u_{matrix}^2 + u_{distrib}^2 \quad \text{สมการที่ 5}$$

$$u_{unwanted}^2 = \frac{S_{unwanted}}{N} \quad \text{สมการที่ 6}$$

$$S_{IR:corr}^2 = S_{IR}^2 - u_{unwanted}^2 \quad \text{สมการที่ 7}$$

$$S_{IR:corr} = \sqrt{S_{IR}^2 - u_{unwanted}^2} \quad \text{สมการที่ 8}$$

เมื่อ	i	คือ จำนวนของตัวอย่าง, $i = 1$ ถึง n เมื่อ ($n \geq 10$)
	y_{iA}, y_{iB}	คือ ผลการทดสอบที่แปลงค่าเป็น \log_{10}
	n_p	คือ จำนวนโคโลนีทั้งหมดที่นำมาตรวจยืนยัน
	n_c	คือ จำนวนโคโลนีของที่ยืนยันแล้ว
	μ	คือ ค่า MPN/g หรือ ml จากผลทดสอบ ไม่อยู่ในรูป \log_{10}
	m_i	คือ จำนวนของระดับการเจือจาง
	x_i	คือ ปริมาณตัวอย่าง (กรัมหรือมิลลิลิตร) ที่เติมในระดับการเจือจาง i
	N	คือ จำนวนของ test portions

ผล

ผลการทำซ้ำภายในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ในอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างปี พ.ศ. 2564–2567 ทั้งหมด 11 รายการทดสอบ จำนวนรวม 203 ตัวอย่าง โดยวิธี Colony Count Technique และ MPN Technique ของแต่ละรายการทดสอบได้ดังนี้ จำนวน จุลินทรีย์ (APHA 2015, Chapter 6&8) จำนวนจุลินทรีย์ (BAM 2001, Chapter 3) จำนวนยีสต์และรา (AOAC 2019; 997.02) จำนวนยีสต์และรา (BAM 2001,

Chapter 18) จำนวนแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (ISO 15214:1998) Coliforms (BAM 2020, Chapter 4) *Bacillus cereus* (BAM 2020, Chapter 14) *Clostridium perfringens* (BAM 2001, Chapter 16) *Staphylococcus aureus* (BAM 2016, Chapter 12) หน่วยการทดสอบเป็น CFU ต่อกรัม ส่วน Coliforms (BAM 2020, Chapter 4) และ *Escherichia coli* (BAM 2020, Chapter 4) หน่วยการทดสอบเป็น MPN ต่อกรัม มีค่า S_{IR}^2 , $u_{unwanted}^2$ และ S_{IR} ดังแสดงในตารางที่ 2 ส่วนค่า $S_{IR:corr}$ ไม่สามารถคำนวณได้เนื่องจาก S_{IR} มีค่าน้อยกว่า $u_{unwanted}^2$

ตารางที่ 2 ค่า Technical Uncertainty; $u_{tech}(S_{IR})$ ของแต่ละรายการทดสอบทางจุลชีววิทยา ระหว่างปี พ.ศ. 2564–2567 จำนวน 11 รายการทดสอบ

ลำดับที่	รายการทดสอบ	S_{IR}^2	$u_{unwanted}^2$	$u_{tech}(S_{IR})$
1	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU ต่อกรัม) (APHA)	0.0039	0.0120	0.0647
2	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU ต่อกรัม) (BAM)	0.0042	0.0120	0.0620
3	จำนวนยีสต์และรา (CFU ต่อกรัม) (AOAC)	0.0046	0.0150	0.0677
4	จำนวนยีสต์และรา (CFU ต่อกรัม) (BAM)	0.0108	0.0138	0.1041
5	จำนวนแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (CFU ต่อกรัม) (ISO)	0.0034	0.0134	0.0988
6	Coliforms (CFU ต่อกรัม) (BAM)	0.0029	0.0129	0.0517
7	<i>Bacillus cereus</i> (CFU ต่อกรัม) (BAM)	0.0085	0.0130	0.0919
8	<i>Clostridium perfringens</i> (CFU ต่อกรัม) (BAM)	0.0105	0.0116	0.9210
9	<i>Staphylococcus aureus</i> (CFU ต่อกรัม) (BAM)	0.0094	0.0151	0.0794
10	Coliforms (MPN ต่อกรัม) (BAM)	0.0199	0.1171	0.1412
11	<i>Escherichia coli</i> (MPN ต่อกรัม) (BAM)	0.0199	0.1171	0.1412

วิจารณ์

การเลือกใช้ค่า u_{tech} จากการหาค่า $S_{IR:corr}$ เพื่อลดการประมาณค่าที่สูงเกินไป (overestimate) แต่พบค่า S_{IR}^2 มีค่าน้อยกว่า $u_{unwanted}^2$ ส่งผลให้ไม่สามารถคำนวณค่า $S_{IR:corr}$ ได้เนื่องจากจะทำให้ค่าผลต่างติดลบ จึงไม่สามารถหารากที่สองของผลต่างออกมาได้ ซึ่งอาจเกิดจากจำนวนตัวอย่างที่นำมาคำนวณน้อยเกินไป ตามทฤษฎีค่า S_{IR}^2 ไม่ควรน้อยกว่า $u_{unwanted}^2$ เพราะจะส่งผลให้ $S_{IR:corr}$ กลายเป็นค่าลบ หากพบว่า S_{IR}^2 ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่า $u_{unwanted}^2$ แสดงว่าความไม่แน่นอนมาตรฐานที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ u_{tech} และ u_{matrix} มีค่าน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับความไม่แน่นอนที่ไม่พึงประสงค์ ($u_{unwanted}$) ดังนั้นสามารถกำหนดค่าเหล่านี้เป็นศูนย์ได้ในการประเมินความไม่แน่นอนรวม

ค่า u_{tech} ที่คำนวณได้ส่วนใหญ่มีค่าน้อยกว่า 0.1 ซึ่งต่ำกว่าค่าความไม่แน่นอนของเมทริกซ์ (u_{matrix}) โดยทั่วไปแล้วค่า u_{tech} ควรค่าสูงที่สุด⁽³⁾ เนื่องจากความไม่แน่นอนเชิงเทคนิคมักเกิดจากกระบวนการทดสอบที่ซับซ้อนและมีปัจจัยหลายอย่างที่ส่งผลต่อผลลัพธ์ อย่างไรก็ตามสาเหตุที่ค่า u_{tech} มีค่าต่ำอาจเนื่องจากจำนวนตัวอย่างน้อยเกินไปหรือช่วงค่าการปนเปื้อนแคบ นอกจากนี้ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างที่มีความเป็นเนื้อเดียวกันสูง (homogeneous) และมีการปนเปื้อนต่ำ ซึ่งช่วยลดผลกระทบจากเมทริกซ์ของตัวอย่าง (matrix effect) ได้ดีอยู่แล้ว วิธีทดสอบที่ใช้เทคนิค Most Probable Number (MPN) พบค่า u_{tech} มีค่ามากกว่า 0.1 ซึ่งโดยเทคนิคของวิธีแล้วมีหลักการ คือ จุลินทรีย์จะมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในสารละลายเจือจาง แล้วแบ่งออกเป็นส่วนๆ เท่าๆ กัน แต่ละส่วนจะมีปริมาณจุลินทรีย์ใกล้เคียงกัน โดยใช้ระดับความเจือจางละ 3 หลอดอย่างน้อย 3 ระดับความเจือจางต่อเนื่อง ซึ่งจะแสดงผลบวกจากการเกิดแก๊สในหลอดทดลอง จากนั้นทดสอบยืนยันตามแต่ละวิธี แล้วใช้ตาราง Table 1: For 3 tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula, the MPN per gram and 95 percent confidence interval ตาม BAM Appendix 2: Most Probable Number from

Serial Dilutions⁽¹³⁾ เพื่ออ่านค่าจากในตาราง หน่วยเป็น MPN ต่อกรัม ซึ่งค่าที่ได้ในแต่ละค่ามีความต่างกัน ทำให้เมื่อนำข้อมูลมาคำนวณหาค่า S_{IR} จะมีค่ามากกว่าเป็นแบบ Colony Count Technique ที่เป็นการนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะในการเจริญ หน่วยในการรายงานผลเป็น Colonies Forming Unit (CFU) ซึ่งวิธีที่ห้องปฏิบัติการใช้มี 2 วิธี คือแบบ spread plate และ pour plate ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับค่า Target Standard Deviation (σ_{pt})⁽¹⁷⁾ ที่ใช้ในการประเมินค่า z-score ในงานทดสอบความชำนาญทางจุลชีววิทยาที่กำหนดค่า σ_{pt} ของการทดสอบแบบ Colony Count Technique เป็น 0.25 หรือ 0.35 ส่วนการทดสอบแบบ MPN Technique แบบ 3-3-3 กำหนดค่าเป็น 0.43 ซึ่งเป็นค่าที่มากกว่าเพื่อให้สามารถประเมินค่า z-score ได้เหมาะสมกับเทคนิคของแต่ละวิธี ส่วนค่า Robust Standard Deviation (s^*) จากการที่ห้องปฏิบัติการได้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญในรอบการทดสอบแบบ MPN Technique จะมีค่ามากกว่า Colony Count Technique เช่น รอบ NFI-PTM 36-2024: Enumeration of Coliforms (MPN/g)⁽¹⁸⁾ มีค่า s^* เท่ากับ 0.408 ส่วนรอบ NFI-PTM 08-2024: Total Plate Count (CFU/g)⁽¹⁹⁾ และ NFI-PTM 03-2024: Enumeration of *Staphylococcus aureus* (CFU/g)⁽²⁰⁾ มีค่า s^* เท่ากับ 0.318 และ 0.149 เป็นต้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากวิธี MPN จะมีค่ามากที่สุด

เมื่อนำค่า Intra-laboratory Reproducibility Standard Deviation; S_{IR} เท่ากับ 0.1041 ของรายการทดสอบ Yeasts and molds count ด้วยวิธี AOAC 997.02⁽⁶⁾ มาเปรียบเทียบกับค่า Reproducibility Standard Deviation; S_R จากการศึกษาระหว่างห้องปฏิบัติการ inter-laboratory study ในแต่ละ product ทั้งหมด 6 กลุ่มพบค่าต่ำสุด คือ 0.17 ในผลิตภัณฑ์ orange juice และค่าสูงสุด คือ 2.61 ในผลิตภัณฑ์ ketchup พบว่าค่า S_{IR} ที่ห้องปฏิบัติการคำนวณได้มีค่าน้อยกว่า ซึ่งการทำซ้ำภายในห้องปฏิบัติการเดียวกันควรมีค่าน้อยกว่าการทำซ้ำของระหว่างห้องปฏิบัติการ ซึ่งอาจมาจากภายในประเทศเดียวกันหรือต่างประเทศ

สรุป

ค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเทคนิค (U_{tech}) ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้มาจากค่า S_{IR} ทุกรายการทดสอบ โดยพิจารณาการเกิด Overestimate จากการหาค่า $S_{IR:corr}$ แต่ไม่สามารถคำนวณได้ ค่า U_{tech} ต้องนำไปรวมกับองค์ประกอบความไม่แน่นอนอื่นๆ เช่น $U_{poisson}$, U_{conf} และ U_{MPN} เพื่อคำนวณเป็นค่าความไม่แน่นอนรวม (Combined Standard Uncertainty) ก่อนรายงานผลการทดสอบ เมื่อลูกค้าร้องขอหรือเมื่อผลการทดสอบอยู่ในช่วงใกล้เคียงกับเกณฑ์กำหนด เพื่อช่วยในการตัดสินใจ ดีความผลอย่างถูกต้อง ค่า U_{tech} สะท้อนถึงความแปรปรวนภายในห้องปฏิบัติการ จึงสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลอ้างอิงสำหรับการตรวจสอบความแม่นยำของวิธีการทดสอบ กรณีค่า U_{tech} สูงผิดปกติ อาจบ่งชี้ถึงความจำเป็นในการปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์หรือควบคุมปัจจัยก่อนความแปรปรวน การคำนวณค่า U_{tech} ปฏิบัติตามมาตรฐานซึ่งสอดคล้องกับข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025:2017 และ ISO 19036:2019 ช่วยเสริมความน่าเชื่อถือของห้องปฏิบัติการในการรายงานผลเชิงปริมาณทางจุลชีววิทยา

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในอาหาร สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความช่วยเหลืองานวิจัยนี้ให้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.
2. เพ็ญศรี รอดมา, และคณะ. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดเชิงปริมาณทางจุลชีววิทยา. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2553.

3. ISO 19036:2019. Microbiology of the food chain – Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2019.
4. Chapter 6, Culture methods for enumeration of microorganisms; Chapter 8, mesophilic aerobic plate count. In: APHA. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 5th ed. Washington, DC: American Public Health Association; 2015.
5. U.S. Food and Drug Administration. Chapter 3, Aerobic plate count. In: Bacteriological analytical manual. [online]. 2001; [cited 2022 Dec 1]. Available from: URL: <http://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-aerobic-plate-count>.
6. Chapter 17.2.09. AOAC official method 997.02 yeast and mold counts in foods. In: Latimer GW Jr, editor. Official method of analysis of AOAC international. 22nd ed. Rockville, MD: AOAC International; 2023. p. 19–21.
7. U.S. Food and Drug Administration. Chapter 18, Yeasts, molds and mycotoxins. In: Bacteriological analytical manual. [online]. 2001; [cited 2023 Jun 19]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins>.
8. ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria-Colony-count technique at 30°C. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 1998.
9. U.S. Food and Drug Administration. Chapter 4, Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria In: Bacteriological analytical manual. [online]. 2020; [cited 2022 Nov 1]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>.

10. U.S. Food and Drug Administration. Chapter 14, *Bacillus cereus*. In: Bacteriological analytical manual. [online]. 2001; [cited 2022 Oct 20]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-14-bacillus-cereus>.
11. U.S. Food and Drug Administration. Chapter 16, *Clostridium perfringens*. In: Bacteriological analytical manual. [online]. 2001; [cited 2023 Oct 30]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-16-clostridium-perfringens>.
12. U.S. Food and Drug Administration. Chapter 12, *Staphylococcus aureus*. In: Bacteriological analytical manual. [online]. 2016; [cited 2022 Nov 24]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-staphylococcus-aureus>.
13. U.S. Food and Drug Administration. Appendix 2: Most probable number from serial dilutions. In: Bacteriological analytical manual. [online]. 2023; [cited 2023 Nov 1]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-appendix-2-most-probable-number-serial-dilutions>.
14. Ellison SLR, Williams A, editors. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. London: Eurachem; 2012.
15. Weissfeld AS. Estimation of uncertainty of measurement in microbiology. Clin Microbiol Newsl 2010; 32(22); 171-5.
16. Ah Soon C, Cornu M. Report of 2003/2004, ISO Trials about uncertainty measurement. [online]. 2004; [cited 2021 Oct 6]. Available from: URL: <https://sitesv2.anses.fr/en/system/files/Report%20ISO%202003-2004%20trials%20on%20MU.pdf>.
17. ISO 22117:2019. Microbiology of the food chain – Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2024.
18. National Food Institute. Final report NFI-PTM 36-2024: Enumeration of coliforms (MPN/g) in lyophilized cultures. [online]. 2024; [cited 2025 Apr 10]; [31 screens]. Available from: URL: <https://pt.nfi.or.th/DocFile/20241226091206.pdf>.
19. National Food Institute. Final report NFI-PTM 08-2024: NFI-PTM 08-2024: Total plate count (CFU/g) in freeze dried shrimp. [online]. 2024; [cited 2025 Apr 10]; [31 screens]. Available from: URL: <https://pt.nfi.or.th/DocFile/20240531050558.pdf>.
20. National Food Institute. Final report NFI-PTM 03-2024: Enumeration of *Staphylococcus aureus* (CFU/g) in lyophilized cultures. [online]. 2024; [cited 2025 Apr 10]; [30 screens]. Available from: URL: <https://pt.nfi.or.th/DocFile/20240322050312.pdf>.

Estimation of Measurement Uncertainty in Food Quantitative Microbiological Techniques

Kamonwan Kantaeng and Atchara Ukong

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

ABSTRACT Accredited laboratories, as per ISO/IEC 17025:2017, must estimate measurement uncertainty under the requirements of clause 7.6 to report measurement uncertainty values alongside test results, when requested by clients or when test results overlap within the acceptance range. The Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Thailand, has collected intra-laboratory reproducibility of food microbiological test results from 2021 to 2024 to derive technical uncertainty (u_{tech}) of microbiological tests according to ISO 19036:2019. A total of 203 samples covering 11 test items were analyzed, including aerobic plate count (APHA 2015, Chapter 6&8), aerobic plate count (BAM 2001, Chapter 3), yeasts and molds (BAM 2001, Chapter 18), yeasts and molds (AOAC 2019; 997.02), lactic acid bacteria (ISO 15214:1998), Coliforms (BAM 2020, Chapter 4), *Bacillus cereus* (BAM 2020, Chapter 14), *Clostridium perfringens* (BAM 2001, Chapter 16), *Staphylococcus aureus* (BAM 2016, Chapter 12), of which the units of measurement are CFU per gram, except Coliforms (BAM 2020, Chapter 4) and *Escherichia coli* (BAM 2020, Chapter 4) are MPN per gram. The results of the measurement uncertainty estimation were 0.0620, 0.0647, 0.1041, 0.0677, 0.0988, 0.0517, 0.0919, 0.9210, 0.0794, 0.1412, and 0.1412, respectively. Therefore, the laboratories can use these u_{tech} values to calculate the combined standard uncertainty in reporting, along with the test results, which can be compared with the standard criteria to assess the test results confidently.

Keywords: Measurement uncertainty in food microbiological tests, Technical measurement uncertainty, Combined standard uncertainty, Intra-laboratory reproducibility

การวิเคราะห์กระบวนการ โครงสร้างพื้นฐาน และ สิ่งไม่สอดคล้องที่พบในกระบวนการรับรอง ความสามารถของธนาคารชีวภาพในประเทศไทย ตามมาตรฐาน ISO 20387:2018

นัฐกาญจน์ ละเอียดดี¹ สิริชมา ตูลยากร¹ สิริพรรณ แสงอรุณ² เสาวนีย์ อารมย์สุข¹ และ สุรศักดิ์ หมั่นพล¹

¹สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

²สำนักผู้ทรงคุณวุฒิกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ธนาคารชีวภาพเป็นโครงสร้างพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่มีความสำคัญ เพื่อสนับสนุนการอนุรักษ์ทรัพยากรชีวภาพระยะยาวในระดับชาติ โดยมีมาตรฐาน ISO 20387:2018 เป็นข้อกำหนดเฉพาะสำหรับธนาคารชีวภาพเพื่อรับรองความสามารถ ความเป็นกลาง และความสม่ำเสมอในการดำเนินงาน เพื่อให้มั่นใจในกระบวนการทั้งหมด ตั้งแต่การรวบรวม รับเข้า ขนส่ง จัดเตรียม รักษาสภาพ จัดเก็บ จัดการข้อมูล และแจกจ่ายวัสดุชีวภาพและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์กระบวนการและโครงสร้างพื้นฐานของธนาคารชีวภาพ และศึกษาความถี่และวิเคราะห์สิ่งไม่สอดคล้องที่พบจากการตรวจประเมินธนาคารชีวภาพในประเทศไทย 5 แห่ง ตามมาตรฐาน ISO 20387:2018 ในปี พ.ศ. 2565-2567 จากการศึกษาพบว่าผลการประเมินและวิเคราะห์ขั้นตอนการดำเนินงานของธนาคารชีวภาพ พบสิ่งไม่สอดคล้องรวม 139 ข้อ จำแนกเป็นข้อกำหนดที่ 4, 5, 6, 7 และ 8 จำนวน 16, 8, 31, 68 และ 16 ข้อ ตามลำดับ โดย 6 อันดับแรกที่พบสูงสุด ได้แก่ ข้อ 6.3 สิ่งอำนวยความสะดวก/พื้นที่เฉพาะและสภาพแวดล้อม, 4.1 ข้อกำหนดทั่วไป, 7.8 การควบคุมคุณภาพ, 5 โครงสร้าง, 7.3 การรับและกระจายวัสดุชีวภาพและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง และ 7.7 การจัดเก็บวัสดุชีวภาพ ธนาคารชีวภาพสามารถใช้ข้อมูลในการศึกษาทั้งหมดนี้เพื่อเป็นแนวทางพัฒนาหรือเพื่อเตรียมความพร้อมในการยื่นขอรับรองทั้งการขอรับรองใหม่และต่ออายุ ซึ่งจะทำให้ธนาคารชีวภาพสามารถนำทรัพยากรวัสดุชีวภาพไปใช้ประโยชน์ ต่อยอดงานวิจัยในอนาคตได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อไป

คำสำคัญ: ธนาคารชีวภาพ, ISO 20387, โครงสร้างพื้นฐานธนาคารชีวภาพ, สิ่งไม่สอดคล้อง

Corresponding author E-mail: nattakarn.l@dmsc.mail.go.th

Received: 23 April 2025

Revised: 19 October 2025

Accepted: 21 October 2025

บทนำ

ธนาคารชีวภาพ หรือ Biobank คือ นิติบุคคล หรือส่วนหนึ่งของนิติบุคคลที่ดำเนินกิจกรรมในการรวบรวม เก็บรักษา และจัดการวัสดุชีวภาพ (Biological materials) และข้อมูลที่เกี่ยวข้อง (Biological Materials and Associated Data: BMaD) อย่างเป็นระบบและมีประสิทธิภาพ^(1,2) ธนาคารชีวภาพถือเป็นโครงสร้างพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาองค์ความรู้ การวิจัยทางการแพทย์ และการอนุรักษ์ทรัพยากรชีวภาพของประเทศ กิจกรรมหลักของธนาคารชีวภาพ ประกอบด้วย การจัดหา (acquisition) การรวบรวม (collection) การเตรียม (preparation) การเก็บรักษา (preservation) การทดสอบ (testing) การวิเคราะห์ (analyzing) และการแจกจ่าย (distributing) วัสดุชีวภาพและข้อมูลที่เกี่ยวข้องอย่างเป็นระบบ⁽³⁾ ธนาคารชีวภาพสามารถจำแนกออกเป็นหลายประเภทตามลักษณะของตัวอย่างที่จัดเก็บ เช่น ธนาคารชีวภาพทางการแพทย์ จัดเก็บตัวอย่างเลือด ดีเอ็นเอ เนื้อเยื่อ หรือสิ่งส่งตรวจจากมนุษย์ ธนาคารพืชและสัตว์ เพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมและความหลากหลายทางชีวภาพ ธนาคารจุลินทรีย์ สำหรับงานวิจัยการผลิต และควบคุมโรค ธนาคารชีวภาพเฉพาะทาง เช่น สำหรับอุตสาหกรรมอาหาร พลังงาน หรือสิ่งแวดล้อม ในการศึกษาที่เรียกรวมๆ ตัวอย่างที่จัดเก็บในธนาคารชีวภาพนี้ว่า วัสดุชีวภาพ

ประเทศไทยนับเป็นหนึ่งในประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงติดอันดับ 1 ใน 10 ของโลก ซึ่งถือเป็นทรัพยากรพื้นฐานที่มีคุณค่าสำหรับการพัฒนาเชิงเศรษฐกิจและสาธารณสุข ตัวอย่างเช่น ประเทศไทยมีพรรณไม้ประมาณ 12,050 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 3 ของพรรณไม้ทั่วโลก และคาดว่ามียูนิคอร์นมากกว่า 200,000 ชนิด หรือราว 1 ใน 10 ของยูนิคอร์นที่มีการรายงานทั่วโลก⁽⁴⁾ ในด้านการแพทย์ธนาคารชีวภาพมีบทบาทสำคัญในการสนับสนุนงานวิจัยและการให้บริการทางการแพทย์สมัยใหม่ เช่น ในแผนปฏิบัติการบูรณาการจีโนมิกส์ประเทศไทย พ.ศ. 2563–2567 (Genomics Thailand) มีเป้าหมายในการจัดเก็บข้อมูลพันธุกรรมจากผู้ป่วย จำนวน 50,000 ราย ใน 5 กลุ่มโรค ได้แก่

โรคมะเร็ง โรคเรื้อรัง โรคติดเชื้อ โรคหายาก และ เกล็ดพันธุศาสตร์ ซึ่งกระบวนการทั้งหมดนี้ต้องอาศัยการจัดการวัสดุชีวภาพอย่างมีประสิทธิภาพจากธนาคารชีวภาพ⁽⁵⁾ ทั้งนี้การรับรองธนาคารชีวภาพตามมาตรฐานสากลจึงมีความสำคัญ เพื่อให้สามารถดำเนินงานได้อย่างมีคุณภาพ น่าเชื่อถือ และสามารถนำทรัพยากรวัสดุชีวภาพไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดในระดับประเทศและระดับนานาชาติ การพัฒนามาตรฐานที่เกี่ยวข้องกับธนาคารชีวภาพ ในปี พ.ศ. 2561 (ค.ศ. 2018) คณะกรรมการวิชาการของ The International Organization for Standardization (ISO) ได้ออกข้อกำหนด ISO 20387:2018 Biotechnology – Biobanking – General Requirements for Biobanking⁽¹⁾ ฉบับแรกเรียกมาตรฐานนี้ว่า มาตรฐานธนาคารชีวภาพ ซึ่งเป็นข้อกำหนดทั่วไปเกี่ยวกับความสามารถ ความเป็นกลาง และการดำเนินการอย่างสม่ำเสมอของธนาคารชีวภาพ รวมถึงข้อกำหนดในการควบคุมคุณภาพ เพื่อให้มั่นใจได้ว่ากระบวนการของธนาคารชีวภาพมีคุณภาพเหมาะสม^(1,6) มาตรฐานธนาคารชีวภาพ ISO 20387:2018 ประกอบด้วยข้อกำหนด 8 ข้อ ได้แก่ 1) ขอบเขต (Scope) 2) การอ้างอิงเชิงบรรทัดฐาน (Normative References) 3) คำศัพท์และคำจำกัดความ (Terms and Definitions) 4) ข้อกำหนดทั่วไป (General requirements) 5) ข้อกำหนดด้านโครงสร้าง (Structural requirements) 6) ข้อกำหนดด้านทรัพยากร (Resource requirements) 7) ข้อกำหนดด้านกระบวนการ (Process requirements) และ 8) ข้อกำหนดด้านระบบบริหารคุณภาพ (Quality management system requirements) การได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO 20387:2018 จะช่วยเพิ่มความน่าเชื่อถือของการบริการด้านธนาคารชีวภาพต่อทั้งผู้บริจาควัสดุชีวภาพ นักวิจัย และหน่วยงานกำกับ⁽⁷⁾

สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีภารกิจสำคัญในการเป็นหน่วยรับรองระบบงานหรือรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการ (Accreditation Body: AB) ส่งเสริม พัฒนา และกำกับดูแลห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุข

เพื่อให้ประชาชนได้รับบริการจากห้องปฏิบัติการที่มีคุณภาพและมาตรฐานอย่างเหมาะสม เท่าเทียมกันทุกพื้นที่⁽⁶⁾ เมื่อปี พ.ศ. 2565 สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการได้เปิดให้บริการใหม่ คือ การรับรองความสามารถธนาคารชีวภาพตามมาตรฐาน ISO 20387:2018 Biotechnology - Biobanking - General Requirements for Biobanking⁽¹⁾ ซึ่งเป็นหน่วยรับรองระบบงานแห่งเดียวในประเทศไทยที่ให้การรับรองมาตรฐานนี้ กระบวนการรับรองความสามารถธนาคารชีวภาพ⁽⁹⁾ มี 9 ขั้นตอน ดังนี้

- 1) ธนาคารชีวภาพยื่นความประสงค์ขอการรับรองโดยส่งเอกสาร/ข้อมูลและหลักฐานตามข้อกำหนดและเงื่อนไขของหน่วยรับรองฯ
- 2) หน่วยรับรองฯ ตรวจสอบข้อมูลและประสานนัดหมายผู้ตรวจประเมิน
- 3) หน่วยรับรองฯ แจ้งกำหนดการและค่าใช้จ่าย
- 4) ธนาคารชีวภาพชำระเงิน
- 5) ผู้ตรวจประเมินดำเนินการตรวจประเมิน ณ ธนาคารชีวภาพและส่งรายงานให้หน่วยรับรองฯ
- 6) หน่วยรับรองฯ แจ้งผลรายงานให้ธนาคารชีวภาพ หากพบผลสิ่งไม่สอดคล้อง ธนาคารชีวภาพต้องดำเนินการแก้ไขภายในเวลาที่กำหนด
- 7) ผู้ตรวจประเมินพิจารณาการแก้ไข
- 8) คณะกรรมการพิจารณาให้การรับรอง และ
- 9) หน่วยรับรองฯ ส่งใบรับรองให้ธนาคารชีวภาพจากการดำเนินงานรับรองตามมาตรฐานธนาคารชีวภาพ

ในการศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์กระบวนการและโครงสร้างพื้นฐานของธนาคารชีวภาพ และศึกษาความถี่และวิเคราะห์สิ่งไม่สอดคล้องที่พบจากการตรวจประเมินในกระบวนการรับรองความสามารถของธนาคารชีวภาพในประเทศไทย

วัตถุประสงค์และวิธีการ

การวิเคราะห์กระบวนการและโครงสร้างพื้นฐานของธนาคารชีวภาพ

ธนาคารชีวภาพในประเทศไทยที่นำมาศึกษาเป็นธนาคารชีวภาพจากภาครัฐและภาคเอกชนที่ขอการรับรองใหม่และได้รับการตรวจประเมินในปี พ.ศ. 2565-2567 มีจำนวนทั้งหมด 5 แห่ง แบ่งเป็นธนาคารชีวภาพที่เก็บวัสดุชีวภาพ (Biological materials) คลังตัวอย่างจากมนุษย์ (ได้แก่ เลือด พลาสมา ดีเอ็นเอ เซลล์เม็ดเลือด และเนื้อเยื่อ) จำนวน 3 แห่ง และธนาคาร

ชีวภาพที่เป็นคลังจุลินทรีย์ (Microorganisms) (ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ) จำนวน 2 แห่ง โดยนำข้อมูลคำขอรับรองและข้อมูลจำเพาะที่ธนาคารชีวภาพยื่นขอการรับรอง ประกอบด้วย ข้อมูลกิจกรรม เครื่องมือ โครงสร้าง ของธนาคารชีวภาพ มาวิเคราะห์กระบวนการทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับธนาคารชีวภาพ และโครงสร้างพื้นฐานที่เป็นปัจจัยที่เอื้อต่อการดำเนินงานของธนาคารชีวภาพ

การศึกษาความถี่ของสิ่งไม่สอดคล้อง (non-conformity: NC) ตามข้อกำหนดของธนาคารชีวภาพตามมาตรฐาน ISO 20387:2018

ข้อมูลสิ่งไม่สอดคล้องเป็นผลรายงานจากการตรวจประเมินธนาคารชีวภาพในประเทศไทยที่ยื่นขอรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO 20387:2018 ในระหว่างปี พ.ศ. 2565-2567 จำนวน 5 แห่ง สิ่งไม่สอดคล้องนี้ นับรวมกันทั้งที่เป็นข้อบกพร่องและข้อสังเกต นำมาศึกษาจำแนกตามข้อกำหนดทั้งหมด (ข้อ 4 ถึง ข้อ 8) เป็นความถี่ จัดกลุ่ม แจกแจง นับจำนวน เรียงลำดับและวิเคราะห์สิ่งไม่สอดคล้องที่มีความถี่สูงสุด 6 อันดับแรกตามหมายเลขข้อกำหนด (clause) แล้ววิเคราะห์สิ่งไม่สอดคล้องเพิ่มเติม โดยเปรียบเทียบระหว่างธนาคารชีวภาพที่เก็บวัสดุชีวภาพต่างประเภทกัน

สิ่งไม่สอดคล้องเฉพาะข้อกำหนดข้อ 7 เรื่องกระบวนการ (Process) นำมาวิเคราะห์ในรายละเอียดตามข้อกำหนดย่อย

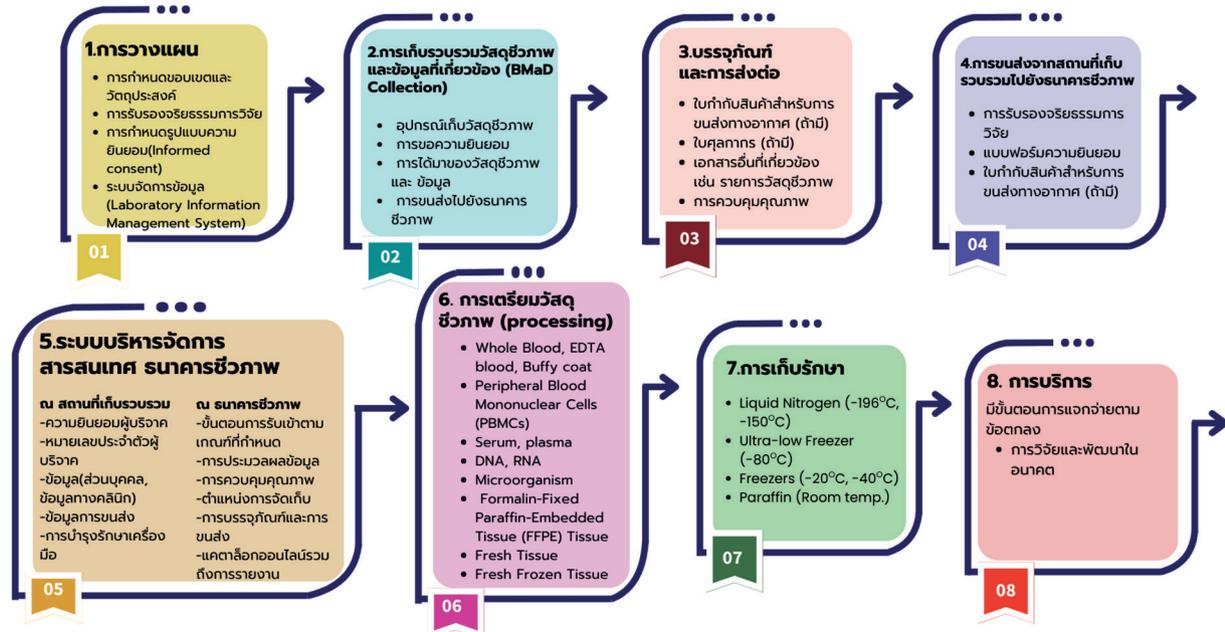
ผล

การวิเคราะห์กระบวนการและโครงสร้างพื้นฐานของธนาคารชีวภาพ

จากการตรวจประเมินธนาคารชีวภาพในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2565-2567 จำนวน 5 แห่ง แบ่งเป็น ธนาคารชีวภาพที่เก็บวัสดุชีวภาพ คลังตัวอย่างจากมนุษย์ จำนวน 3 แห่ง และธนาคารชีวภาพที่เป็นคลังจุลินทรีย์ จำนวน 2 แห่ง ตามข้อกำหนดมาตรฐาน ISO 20387:2018 (ข้อกำหนดที่ 4.1.1) กำหนดให้ธนาคารชีวภาพจัดทำกระบวนการของตนเองในระดับหน่วยงานจากการศึกษาธนาคารชีวภาพทั้ง 5 แห่ง จึงได้วิเคราะห์

เป็นกระบวนการงาน (Workflows) ในภาพรวมของธนาคารชีวภาพในประเทศไทย แบ่งออกเป็น 8 ขั้นตอน โดยไม่ได้จำกัดว่าเป็นธนาคารชีวภาพประเภทใด ดำเนินกิจกรรมประเภทใด และวัสดุชีวภาพคืออะไร รายละเอียดดังแสดงในภาพที่ 1 เริ่มจากกระบวนการที่ 1) การวางแผน

โครงการ 2) การเก็บรวบรวมวัสดุชีวภาพ 3) บรรจุภัณฑ์และการส่งต่อ 4) การขนส่งไปยังธนาคารชีวภาพ 5) ระบบบริหารจัดการสารสนเทศ ณ สถานที่เก็บรวบรวมและธนาคารชีวภาพ 6) การเตรียมวัสดุชีวภาพ (Processing) 7) การเก็บรักษา และ 8) การบริการ



ภาพที่ 1 กระบวนการงานของธนาคารชีวภาพในภาพรวมของธนาคารชีวภาพ 5 แห่ง ในประเทศไทยที่ตรวจประเมินระหว่างปี พ.ศ. 2565–2567

จากการศึกษาธนาคารชีวภาพทั้ง 5 แห่ง พบว่าธนาคารชีวภาพจำเป็นต้องมีปัจจัยที่เอื้อต่อการทำงานเป็นโครงสร้างพื้นฐานของกิจกรรมที่ธนาคารชีวภาพดำเนินการ ดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งธนาคารชีวภาพต้องออกแบบในการปฏิบัติงานตามแนวทางสากลและสอดคล้องกับกฎหมายของประเทศ รวมถึงการดำเนินการตามมาตรฐานความปลอดภัย การตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องมือสำคัญ ระบบไฟระวังและแจ้งเตือน ระบบจ่ายพลังงานไฟฟ้า ระบบสำรองฉุกเฉินและระบบบริหารจัดการข้อมูล (Laboratory Information Management System) ซึ่งจำเป็นต่อกิจกรรมของธนาคารชีวภาพ ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงวัสดุชีวภาพที่ธนาคารชีวภาพจัดเก็บด้วย เช่น ระบบไนโตรเจนเหลวอาจไม่จำเป็นสำหรับวัสดุชีวภาพบางประเภท

ความถี่ของสิ่งไม่สอดคล้อง (nonconformity: NC) ตามข้อกำหนดของธนาคารชีวภาพตามมาตรฐาน ISO 20387:2018

จากการตรวจประเมินธนาคารชีวภาพ 5 แห่ง พบสิ่งไม่สอดคล้องตามข้อกำหนดตามการจัดกลุ่มแจกแจง นับจำนวนตามข้อกำหนดหลัก (clause) จำนวนรวมทั้งหมด 139 ข้อ รายละเอียดหมายเลขข้อกำหนดและความถี่ของสิ่งไม่สอดคล้อง ดังแสดงในภาพที่ 3

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลความถี่ของสิ่งไม่สอดคล้องตามข้อกำหนด พบรายงานสิ่งไม่สอดคล้องตามข้อกำหนดหลักทุกข้อตั้งแต่ข้อ 4 ถึง ข้อ 8 ได้แก่ ข้อกำหนดทั่วไป ข้อกำหนดด้านโครงสร้าง ข้อกำหนดด้านทรัพยากร ข้อกำหนดด้านกระบวนการ และข้อกำหนดด้านระบบการบริหารคุณภาพ จำนวนสิ่งไม่สอดคล้อง คือ 16, 8, 31, 68 และ 16 ข้อ ตามลำดับ และพบสิ่งไม่สอดคล้อง

<p>1. สิ่งอำนวยความสะดวก</p> <ul style="list-style-type: none"> - การควบคุมการเข้าถึง (บัตรประจำตัว, ลายนิ้วมือ เป็นต้น) - ระบบแสงสว่าง/ป้ายสัญลักษณ์ - เซนเซอร์สัญญาณเตือน (ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์, ความเข้มข้นออกซิเจนต่ำ) - ระบบจัดการข้อมูล 	<p>2. ระบบปรับอากาศ</p> <ul style="list-style-type: none"> - การไหลเวียนของอากาศ (อากาศเข้า/ออก) - เครื่องทำความเย็น (Chiller) - เครื่องควบคุมความชื้น (Humidifier) - เซนเซอร์วัดอุณหภูมิและความชื้น 	<p>3. ระบบจ่ายพลังงานไฟฟ้า</p> <ul style="list-style-type: none"> - ถังเก็บไนโตรเจนเหลว - ตู้แช่แข็ง - ห้องปฏิบัติการ - หน่วยควบคุมอากาศ - เครื่องกำเนิดไฟฟ้าสำรอง - ระบบไฟสำรองและสัญญาณเตือน - แผงควบคุมตู้แช่แข็งไนโตรเจนเหลวและอุณหภูมิต่ำพิเศษ - เครื่องมือสำคัญในห้องปฏิบัติการ 	<p>4. ห้องปฏิบัติการธนาคารชีวภาพ (Process Laboratories)</p> <ul style="list-style-type: none"> - ตู้ควบคุมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจน (CO₂/O₂ Incubators) - ตู้ดูดควันสารเคมี (Chemical Hoods) - ตู้ชีวนิภัย (Biological Safety Cabinet) - เซนเซอร์ตรวจจับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจน (CO₂/O₂ Sensors)
<p>5. ระบบไฟสำรองและสัญญาณเตือน</p> <ul style="list-style-type: none"> - การไหลเวียนอากาศ - ถังไนโตรเจนเหลวพร้อมสัญญาณเตือน - ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำพิเศษพร้อมสัญญาณเตือน - ระบบตรวจสอบอุณหภูมิ - สัญญาณเตือนออกซิเจนต่ำ - สัญญาณเตือนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ - เครื่องกำเนิดไฟฟ้าสำรอง 	<p>6. ระบบไนโตรเจนเหลว</p> <ul style="list-style-type: none"> - ถังเก็บไนโตรเจนเหลวภายนอก - ก่อสัญญาณสำหรับไนโตรเจนเหลว - ระบบไฟสำรองระดับไนโตรเจนเหลว - ระบบตรวจสอบอุณหภูมิ - เซนเซอร์ตรวจวัดออกซิเจน - ภาชนะขนส่งไนโตรเจนเหลว 	<p>7. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำพิเศษ</p> <ul style="list-style-type: none"> - ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C และ -40°C - ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80°C และ -150°C - ระบบตรวจสอบอุณหภูมิ - ระบบสำรองไนโตรเจนเหลว/ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (LN₂/CO₂ Back-up) 	<p>8. ระบบสำรองฉุกเฉิน</p> <ul style="list-style-type: none"> - เครื่องกำเนิดไฟฟ้าสำรอง - ระบบสำรองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์/ออกซิเจนสำหรับตู้แช่ - ระบบสำรอง CO₂ สำหรับตู้แช่แข็ง -150°C/-80°C - ระบบสำรอง LN₂ สำหรับตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำพิเศษ

ภาพที่ 2 โครงสร้างพื้นฐานของธนาคารชีวภาพ 5 แห่ง ในประเทศไทยที่ตรวจประเมินระหว่างปี พ.ศ. 2565-2567

ทุกข้อกำหนดย่อย ยกเว้นข้อกำหนดที่ 8.1 Options และ 8.7 Corrective action for nonconforming output (Option A) จากการวิเคราะห์และประมวลผลข้อบกพร่องจากการตรวจประเมินมาตรฐานธนาคารชีวภาพตามข้อกำหนด ISO 20387:2018 ของธนาคารชีวภาพ จำนวน 5 แห่ง พบสิ่งไม่สอดคล้องที่มีจำนวนสูงสุด 6 อันดับแรก คือ ข้อกำหนดที่ 6.3 ข้อกำหนดด้านสิ่งอำนวยความสะดวก/พื้นที่เฉพาะและสภาพแวดล้อม, ข้อกำหนดที่ 4.1 ข้อกำหนดทั่วไป, ข้อกำหนดที่ 7.8 ข้อกำหนดด้านการควบคุมคุณภาพของวัสดุชีวภาพและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง, ข้อกำหนดที่ 5 ข้อกำหนดด้านโครงสร้างและ 7.3 ข้อกำหนดด้านการรับและกระจายวัสดุชีวภาพและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง (จำนวนเท่ากัน) และข้อกำหนดที่ 7.7 ข้อกำหนดด้านการจัดเก็บวัสดุชีวภาพ จำนวน 13, 11, 9, 8, 8 และ 7 ข้อ คิดเป็นร้อยละ 9.3, 8.6, 6.4, 5.7, 5.7 และ 5.0 ของจำนวนสิ่งไม่สอดคล้องทั้งหมด ตามลำดับ โดยได้สรุปละเอียดสิ่งไม่สอดคล้องของข้อกำหนดทั้งหมดที่ตรวจพบสูงสุด 6 อันดับแรก เรียงลำดับ ดังนี้

อันดับที่ 1 ข้อกำหนดที่ 6.3 เป็นข้อกำหนดด้านสิ่งอำนวยความสะดวก/พื้นที่เฉพาะและสภาพแวดล้อม ซึ่งเป็นข้อกำหนดหนึ่งด้านทรัพยากร

พบว่าธนาคารชีวภาพยังไม่ได้กำหนดผู้รับผิดชอบในการดำเนินการและควบคุมดูแลอาคารที่ตั้ง พื้นที่และสิ่งแวดล้อมเป็นไปตามข้อกำหนด ไม่มีการแยกพื้นที่ที่มีกิจกรรมที่ไม่สามารถทำร่วมกันได้เพื่อป้องกันการปนเปื้อนข้าม ไม่มีแผนการขยายกำลังการผลิตในการรองรับวัสดุชีวภาพและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง รวมถึงไม่มีการจัดทำแผนรองรับเหตุฉุกเฉิน

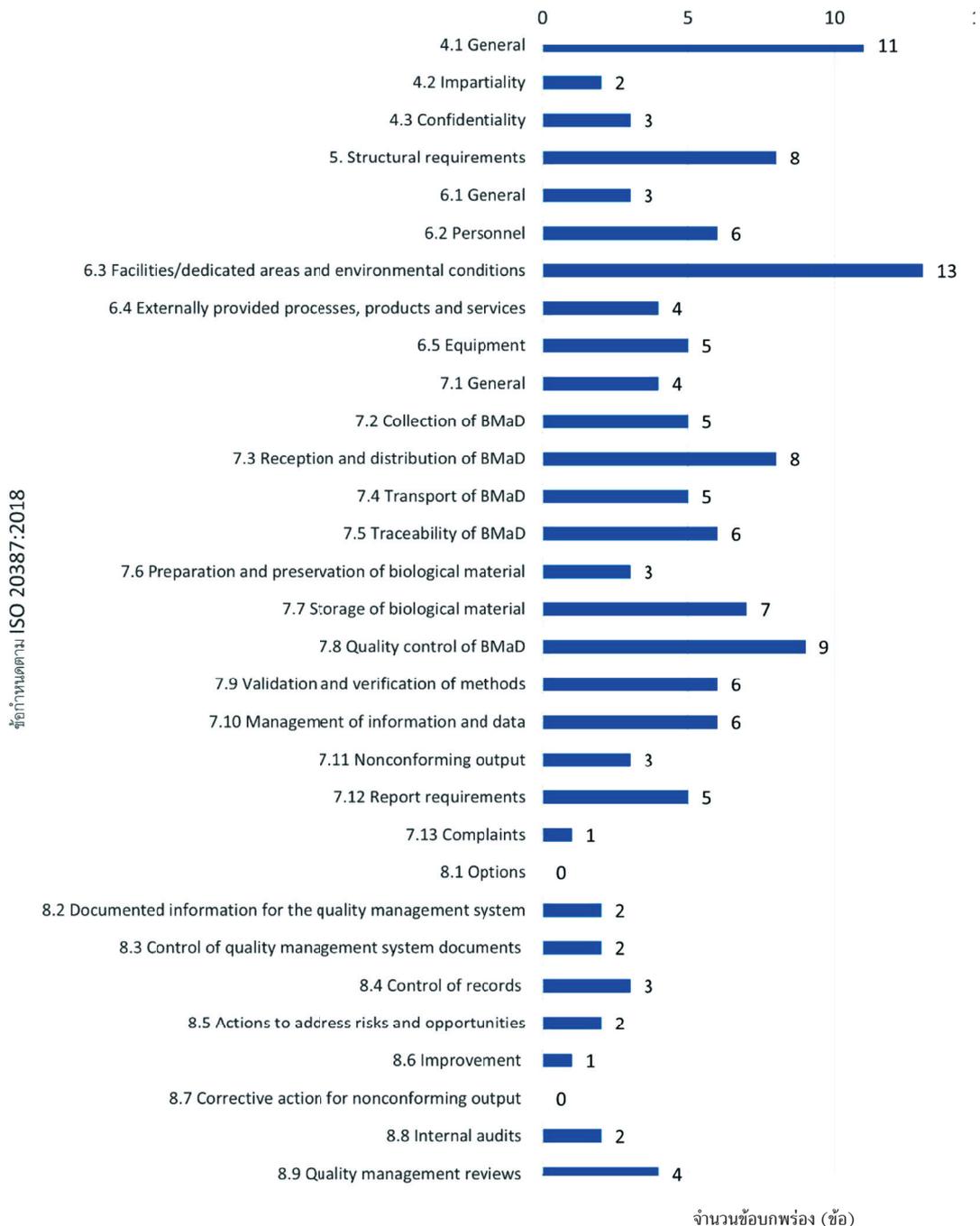
อันดับที่ 2 ข้อกำหนดที่ 4.1 เป็นข้อกำหนดทั่วไปพบว่าธนาคารชีวภาพยังไม่มีรายละเอียดของการปฏิบัติงานภารกิจ บทบาทหน้าที่ของหน่วยงาน และบุคลากรที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของธนาคารชีวภาพในทุกขั้นตอน ไม่มีการระบุระดับความเสี่ยงของแต่ละขั้นตอน ไม่มีการจัดการเรื่องการขนส่งวัสดุชีวภาพอย่างปลอดภัย ทั้งต่อผู้ส่งและสิ่งแวดล้อม ไม่มีเอกสารแสดงขั้นตอนและรายละเอียดการตรวจสอบตัวอย่างตามหลักวิชาการ และยังไม่มีการกำหนดระยะเวลาจัดเก็บรักษาข้อมูลสารสนเทศของวัสดุชีวภาพอย่างชัดเจน หลังจากทีวัสดุชีวภาพชนิดนั้นๆ ได้ถูกแจกจ่ายออกไป กำจัดออกไปหรือถูกนำไปทำลาย

อันดับที่ 3 ข้อกำหนดที่ 7.8 ข้อกำหนดด้านการควบคุมคุณภาพของวัสดุชีวภาพและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง รายละเอียด ดังแสดงในตารางที่ 1

อันดับที่ 4 ข้อกำหนดที่ 5 เป็นข้อกำหนดด้านโครงสร้าง พบว่าธนาคารชีวภาพไม่มีการแสดงโครงสร้างการบริหารคุณภาพ ไม่มีหลักฐานแสดงว่ามีคณะที่ให้คำปรึกษา/แนะนำด้านบริหารจัดการ และด้านวิชาการ หรือมีการกำหนดตำแหน่งสำคัญแล้ว แต่ไม่มีรายละเอียดที่ชัดเจนเกี่ยวกับอำนาจหน้าที่ รวมถึงทรัพยากรที่จำเป็นต้องใช้ของตำแหน่งดังกล่าว

อันดับที่ 5 ข้อกำหนดที่ 7.3 ข้อกำหนดด้านการรับและกระจายวัสดุชีวภาพและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1

อันดับที่ 6 ข้อกำหนดที่ 7.7 ข้อกำหนดด้านการจัดเก็บวัสดุชีวภาพ รายละเอียด ดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 3 ความถี่ของสิ่งไม่สอดคล้องตามมาตรฐาน ISO 20387:2018 ของธนาคารชีวภาพ 5 แห่ง

หมายเหตุ: BMaD: Biological Material and Associated Data หมายถึง วัสดุชีวภาพและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง

มาตรฐานสากลที่เกี่ยวข้องกับห้องปฏิบัติการและการตรวจวิเคราะห์ จะมีโครงสร้างของข้อกำหนดคล้ายกัน แต่จะมีความแตกต่างในข้อกำหนดด้านกระบวนการ (ข้อ 7) การศึกษาที่จึ้้นำข้อกำหนดของมาตรฐานธนาคารชีวภาพข้อ 7 ด้านกระบวนการ มาวิเคราะห์เป็นการเฉพาะ พบว่ามีข้อบกพร่องสูงสุดถึง 3 ข้อ จาก 6 ข้อ ซึ่งเป็นข้อกำหนดที่มีความจำเพาะของมาตรฐานธนาคารชีวภาพ ISO 20387:2018 จึงได้นำตัวอย่างสิ่งไม่สอดคล้องเฉพาะข้อ 7 ด้านกระบวนการมาวิเคราะห์เพิ่มเติม พบว่าสิ่งไม่สอดคล้องที่พบบ่อยจากการตรวจประเมินของธนาคารชีวภาพทั้ง 5 แห่ง คือ เอกสารระเบียบปฏิบัติในกระบวนการต่างๆ ไม่พบ ไม่มี ไม่ครบถ้วน หรือ ไม่สอดคล้องตามข้อกำหนด ซึ่งพบในข้อกำหนดย่อย

ทั้งหมด ตั้งแต่ข้อ 7.1 ถึง 7.13 และมีจำนวนสิ่งไม่สอดคล้องมากที่สุดถึง 68 ข้อ จากทั้งหมด 139 ข้อ คิดเป็นร้อยละ 48.9 และเมื่อวิเคราะห์ข้อกำหนดย่อยในข้อ 7 จากการตรวจประเมินธนาคารชีวภาพทั้ง 5 แห่ง พบว่ามี 5 ข้อกำหนดย่อยที่ไม่สอดคล้องเหมือนกันในทุกแห่ง ได้แก่ ข้อกำหนดที่ 7.2 การจัดเก็บรวบรวมวัสดุชีวภาพและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง ข้อกำหนดที่ 7.3 การรับและการจำหน่ายวัสดุชีวภาพและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง ข้อกำหนดที่ 7.4 การขนส่งวัสดุชีวภาพและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง ข้อกำหนดที่ 7.9 การตรวจสอบและการทวนสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบ และข้อกำหนดที่ 7.10 การจัดการข้อมูลและข้อมูลซึ่งรายละเอียดสิ่งไม่สอดคล้องที่พบบ่อยตามข้อกำหนดข้อ 7 ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสิ่งไม่สอดคล้องในข้อ 7 ด้านกระบวนการของธนาคารชีวภาพ 5 แห่ง ในประเทศไทยที่ตรวจประเมินระหว่างปี พ.ศ. 2565-2567

ข้อกำหนด	สิ่งไม่สอดคล้องที่ตรวจพบ
7.1	พบว่ามีการใช้ระบบสารสนเทศในการควบคุมข้อมูลที่เกี่ยวข้อง แต่ไม่พบคู่มือและขั้นตอนการใช้งานระบบสารสนเทศ รวมถึงการตรวจสอบความถูกต้อง ความครบถ้วน และความใช้ได้ของข้อมูล รวมถึงการทวนสอบระบบสารสนเทศ
7.1.3	พบการบันทึกวันที่และเวลาในทุกกิจกรรมของธนาคารชีวภาพไม่เป็นไปตามมาตรฐาน ISO 8601 (Date and Time – Representations for Information Interchange) ⁽¹⁰⁾
7.2.2.1	ไม่มีเอกสารแสดงขั้นตอนปฏิบัติสำหรับข้อมูลก่อนได้รับมา (Pre-acquisition) และรายละเอียดการเตรียมตัวอย่างทุกประเภทที่ให้บริการ
7.2.3.4	ไม่พบการรับรองด้านจริยธรรมการวิจัย ของทุกตัวอย่างวัสดุชีวภาพจากมนุษย์ที่จัดเก็บ (หมายเหตุ: การรับรองจริยธรรมการวิจัยในคน จะดำเนินการเฉพาะโครงการวิจัยที่มีการวิจัยในคนหรือใช้ตัวอย่างจากคนเท่านั้น)
7.3.1.1	ไม่มีเอกสารที่กำหนดหลักเกณฑ์การเข้าถึงวัสดุชีวภาพและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง ปัจจุบันไม่มีการจัดทำบันทึกแสดงวัน-เวลาที่เจ้าหน้าที่เข้า-ออกห้องที่เก็บรักษาวัสดุชีวภาพรวมถึงบันทึกการเข้าถึงข้อมูล
7.3.2.1	การขนส่งวัสดุชีวภาพภายในพื้นที่ปฏิบัติการไม่ชัดเจน ดังนี้ 1) ไม่มีเอกสารแสดง รายละเอียด ภาชนะบรรจุสถานะแวดล้อมระหว่างการขนส่ง เช่น ระยะเวลา อุณหภูมิ ความชื้น และแสง ตามความเหมาะสมกับวัสดุชีวภาพ 2) ไม่พบขั้นตอนการรับส่งตรวจและเกณฑ์การปฏิเสธวัสดุชีวภาพ และ 3) ไม่มีบันทึกแสดงสถานะแวดล้อมระหว่างการขนส่ง รวมทั้งไม่ได้กำหนดบุคลากรที่มีความสามารถที่รับผิดชอบในการขนส่ง
7.3.3.2	วิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การบริหารจัดการวัสดุชีวภาพ ไม่มีการระบุข้อตกลงระหว่างผู้ให้/ผู้รับวัสดุและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง ซึ่งเป็นข้อมูลที่กำหนดก่อนดำเนินการเก็บวัสดุชีวภาพ
7.4	เอกสารการขนส่งวัสดุชีวภาพและข้อมูล พบการระบุข้อมูลเกี่ยวข้องกับการขนส่งไม่ครบถ้วนตาม Annex B3
7.4.3	ไม่มีขั้นตอนดำเนินการ เรื่อง การขนส่งวัสดุชีวภาพในประเทศและต่างประเทศ ที่กำหนดรายละเอียดตั้งแต่การจัดเตรียมวัสดุชีวภาพและข้อมูลเกี่ยวข้อง วิธีการบรรจุหีบห่อ ภาชนะที่ต้องใช้บรรจุ วิธีการนำออกไปส่งมอบผู้ขนส่ง การติดตามผลการรับมอบ พร้อมทั้งบันทึกต่างๆ ที่จำเป็นต้องรวบรวมจัดเก็บเป็นหลักฐาน
7.5.1	จากการสุ่มตัวอย่างวัสดุชีวภาพที่เก็บไว้ในธนาคารชีวภาพ พบว่าไม่สามารถทวนสอบกลับกระบวนการทั้งหมดที่เกิดขึ้นกับวัสดุชีวภาพได้ และเอกสารที่ใช้ในค้นหาวัสดุชีวภาพไม่ระบุตำแหน่งที่แน่นอนของตัวอย่าง
7.5.3	ไม่มีขั้นตอนดำเนินการในการกำจัดและเคลื่อนย้าย หรือถ่ายโอนวัสดุชีวภาพและ/หรือข้อมูลในกรณีเป็นเหตุการณ์ที่มีแผนไว้แล้ว และในกรณีมีเหตุการณ์ฉุกเฉินขึ้น
7.6	เอกสารบันทึกการเตรียมวัสดุชีวภาพ ไม่พบการบันทึกข้อมูลสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมวัสดุชีวภาพตาม Annex B4

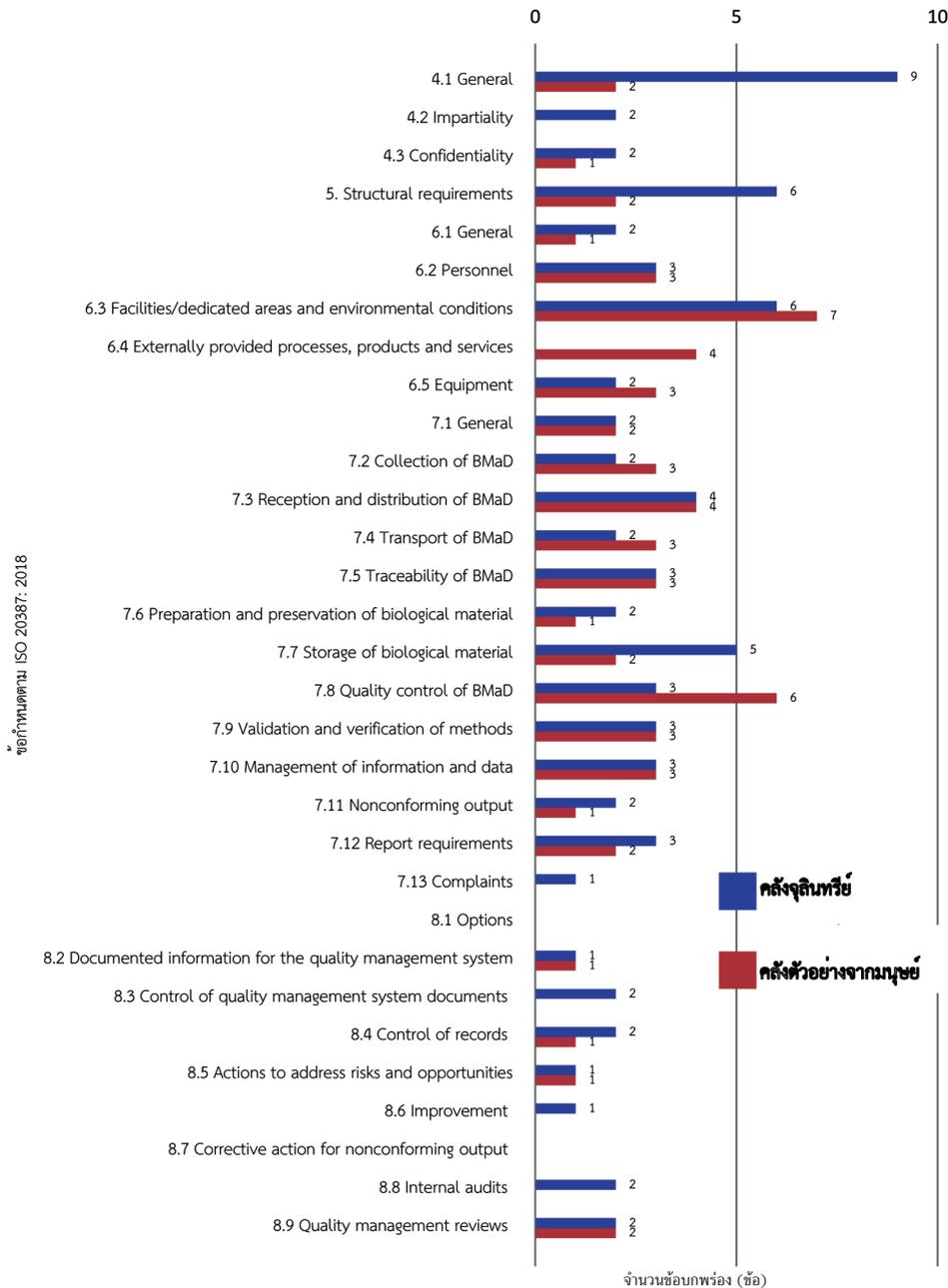
ตารางที่ 1 ตัวอย่างสิ่งไม่สอดคล้องในข้อ 7 ด้านกระบวนการของธนาคารชีวภาพ 5 แห่ง ในประเทศไทยที่ตรวจประเมินระหว่างปี พ.ศ. 2565–2567 (ต่อ)

ข้อกำหนด	สิ่งไม่สอดคล้องที่ตรวจพบ
7.7	เอกสารการเก็บวัสดุชีวภาพ พบว่ามีข้อมูลสำคัญตาม Annex B6 ไม่ครบถ้วน ไม่มี data logger สำหรับ Liquid Nitrogen Tank และไม่พบแผนการตรวจสอบวัสดุชีวภาพและข้อมูลที่จัดเก็บไว้
7.7.1	ไม่มีหลักฐานแผนป้องกันภัยพิบัติ (Disaster Protection Plan) โดยใช้วิธีป้องกันทางเลือกอื่นใดมาทดแทนเพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสียสภาพของวัสดุชีวภาพ
7.7.2	ไม่มีหลักฐานแสดงแผนสำรองระยะสั้นเพื่อรักษาสภาพและอุณหภูมิในการจัดเก็บวัสดุชีวภาพที่ถูกต้อง
7.7.3	ไม่มีหลักฐานบันทึกที่ทวนสอบกลับไปถึงชื่อบุคคล วันที่ เวลา ชนิด และรหัสบ่งชี้ของวัสดุชีวภาพที่ได้มีการนำเข้า-ออกตู้แช่เยือกแข็งในทุก ๆ ครั้งที่ได้นำดำเนินการของธนาคารชีวภาพ
7.7.8	ไม่มีการกำหนดรายละเอียดขั้นตอนการจัดทำคำยินยอมด้วยเงื่อนไขระดับต่าง ๆ รวมทั้งการให้สิทธิอำนาจของผู้ฝาก/ผู้บริจาค/ผู้รับบริการ เพิกถอนความยินยอม (consent) การจัดเก็บและการใช้วัสดุชีวภาพ รวมถึงข้อมูลที่เกี่ยวข้อง
7.8.1	ในคู่มือหน่วยงานธนาคารชีวภาพ ไม่พบการระบุการใช้วัสดุควบคุมคุณภาพวิธีตรวจวิเคราะห์ และไม่พบระเบียบปฏิบัติการควบคุมคุณภาพที่สัมพันธ์กับกิจกรรมของธนาคารชีวภาพ
7.8.2	ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ (Quality Control, QC) ไม่ชัดเจน เช่น มีเอกสารกำหนดวิธีการควบคุมคุณภาพแต่ไม่ได้ขึ้นทะเบียน วิธีการสุ่มตัวอย่างที่กำหนดในเอกสารคุณภาพไม่ตรงกับที่ปฏิบัติจริง และการนำตัวอย่างออกจากห้องเก็บตัวอย่างมาทดสอบ QC ไม่มีบันทึกการยืมหรือคืน
7.8.2.1	เอกสารการควบคุมคุณภาพวัสดุชีวภาพและข้อมูล ไม่พบการระบุ QC criteria และไม่พบการจัดการของการควบคุมคุณภาพที่ไม่เป็นไปตามเกณฑ์ที่ธนาคารชีวภาพกำหนด
7.8.2.9	ไม่พบคู่มือหรือขั้นตอนการประเมินความสามารถห้องปฏิบัติการ
7.8.2.10	ไม่มีแผนการแก้ปัญหา การหาสาเหตุของผลการประเมินคุณภาพภายนอก (External Quality Assessment, EQA) ที่ไม่ผ่าน และผลการตรวจวิเคราะห์หลังจากที่แก้ไขปัญหาแล้ว
7.8.3.1	ไม่มีเอกสารการกำหนดข้อมูลเกี่ยวกับวัสดุชีวภาพที่สำคัญ (critical data) และการกำหนดขั้นตอนดำเนินการควบคุมคุณภาพ (quality control)
7.8.3.2	เอกสารการควบคุมคุณภาพวัสดุชีวภาพและข้อมูล ไม่พบการกำหนดความถี่ในการควบคุมคุณภาพข้อมูล ไม่พบการตรวจสอบข้อมูลในด้านความถูกต้อง ความครบถ้วน และความสอดคล้องของข้อมูลกับวัสดุชีวภาพ
7.9	เอกสารการตรวจสอบความใช้ได้และการทวนสอบวิธี พบการทำ validation และ verification เฉพาะขั้นตอนในการทดสอบคุณภาพ แต่ไม่ครอบคลุมทุก life cycle ของวัสดุชีวภาพ ตั้งแต่ collection ถึง distribution และเพื่อให้ข้อมูลครบถ้วนสามารถตรวจสอบและสอบกลับได้
7.9.3.3	ไม่พบการทำรายงาน method verification report
7.10.3	ไม่มีเอกสารแสดงถึงขั้นตอนการจัดการข้อมูลสารสนเทศในระบบคอมพิวเตอร์ (hardware, software, database) ส่วนที่เกี่ยวข้องหรือเชื่อมโยงกับกระบวนการต่าง ๆ เพื่อมั่นใจว่าข้อมูลมีความถูกต้อง ครบถ้วนสมบูรณ์ ได้รับการรักษาความปลอดภัย (security) มีระบบสำรองข้อมูลที่รองรับการสูญหายหรือเสียหาย
7.10.6	ไม่มีหลักฐานบันทึกทวนสอบได้ว่าผู้มีสิทธิอำนาจได้เข้าถึงข้อมูลเกี่ยวกับวัสดุชีวภาพทั้งในกระดาษและอิเล็กทรอนิกส์ที่มีการควบคุม
7.11	ไม่พบการบันทึกสิ่งไม่สอดคล้องตามระเบียบปฏิบัติการระบุและควบคุมสิ่งไม่สอดคล้อง ไม่พบการกำหนดอำนาจหน้าที่ว่าตำแหน่งใดเป็นผู้พิจารณาสิ่งไม่สอดคล้องว่ามีผลกระทบต่อคุณภาพ ตำแหน่งใดรับผิดชอบเป็นผู้แก้ไข ตำแหน่งใดรับผิดชอบติดตาม อนุมัติปิดการแก้ไข และจากการสอบถามพบว่ามีการแก้ปัญหาเบื้องต้นที่การจัดการและควบคุมสิ่งไม่สอดคล้อง
7.12.1.3	ใน Certificate of Analysis ไม่มีข้อความ “The report (certificate) shall not be reproduced except in full”
7.12.2.1	เนื้อหาของรายงาน (Content of report) ไม่ครบถ้วนตาม 12 หัวข้อ
7.13.2	ในขั้นตอนการปฏิบัติงานเรื่องการรับคำร้องเรียน/ร้องทุกข์/เสนอแนะ กำหนดให้บุคคลภายนอกใช้แบบฟอร์มแบบรับคำร้องเรียน แต่ถ้าเป็นบุคคลภายในใช้แบบแจ้งข้อเสนอแนะของหน่วยงานภายใน โดยไม่พบการกำหนดให้ชัดเจนว่าผู้ดำเนินการทบทวน/อนุมัติผลการแก้ไขข้อร้องเรียนต้องเป็นบุคคลที่ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับข้อร้องเรียนนั้น ๆ

เปรียบเทียบสิ่งที่ไม่สอดคล้อง (nonconformity: NC) ตามข้อกำหนดของธนาคารชีวภาพตามมาตรฐาน ISO 20387:2018 ระหว่างคลังตัวอย่างจากมนุษย์ และคลังจุลินทรีย์

เมื่อวิเคราะห์เพิ่มเติมของสิ่งที่ไม่สอดคล้องและความถี่ของสิ่งที่ไม่สอดคล้องในแต่ละข้อ โดยเปรียบเทียบระหว่างคลังตัวอย่างจากมนุษย์ จำนวน 3 แห่ง และคลัง

จุลินทรีย์ จำนวน 2 แห่ง พบว่าสิ่งที่ไม่สอดคล้องจากธนาคารชีวภาพคลังตัวอย่างจากมนุษย์ ที่มีจำนวนสูงสุดคือ ข้อกำหนดที่ 6.3, 7.8 และ 6.4 ตามลำดับ ในขณะที่สิ่งที่ไม่สอดคล้องจากธนาคารชีวภาพคลังจุลินทรีย์ที่มีจำนวนสูงสุด คือ ข้อกำหนดที่ 4.1, 5 กับ 6.3 (จำนวนข้อเท่ากัน) และ 7.7 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ความถี่ของสิ่งที่ไม่สอดคล้องตามมาตรฐาน ISO 20387:2018 ของธนาคารชีวภาพเปรียบเทียบระหว่างคลังจุลินทรีย์และคลังตัวอย่างจากมนุษย์

หมายเหตุ: BMaD: Biological Material and Associated Data หมายถึง วัสดุชีวภาพและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง

วิจารณ์

ISO 20387:2018 เป็นมาตรฐานสากลที่มีข้อกำหนดที่ช่วยให้ธนาคารชีวภาพแสดงถึงความสามารถความเป็นกลาง และการดำเนินงานที่สม่ำเสมอในการจัดเก็บวัสดุชีวภาพและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง ที่มีคุณภาพเหมาะสมสำหรับการวิจัยและพัฒนา⁽¹⁾ การได้รับการรับรองความสามารถธนาคารชีวภาพตามมาตรฐาน ISO 20387:2018 จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ทำให้ธนาคารชีวภาพได้รับความเชื่อมั่นว่าจะสามารถดำเนินการได้สอดคล้องตามข้อกำหนดมาตรฐานสากล ISO 20387:2018

ธนาคารชีวภาพมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุชีวภาพและประเภทของกิจกรรมที่ธนาคารชีวภาพดำเนินการ ซึ่งธนาคารชีวภาพต้องกำหนดระบบการบริหารคุณภาพ และจัดทำวิธีปฏิบัติงานในแต่ละกระบวนการงานให้ครบถ้วนตามข้อกำหนด การศึกษานี้ได้จัดทำแนวทางในการจัดทำกระบวนการงาน (workflow) และโครงสร้างพื้นฐาน (infrastructure) ในภาพรวมของธนาคารชีวภาพของประเทศไทยขึ้น (ภาพที่ 1 และ 2) เพื่อให้สอดคล้องกับกิจกรรมที่ดำเนินการตามบริบทและขอบเขตของธนาคารชีวภาพ ดังนั้นธนาคารชีวภาพแต่ละแห่งจึงต้องจัดหาจัดเตรียมทรัพยากรให้เพียงพอและเหมาะสมในทุกขั้นตอน และมีการบริหารจัดการระบบคุณภาพ (Quality Management System: QMS) และจัดทำวิธีปฏิบัติงาน (Standard Operating Procedure: SOP) สำหรับแต่ละกระบวนการ รวมถึงจัดเตรียมโครงสร้างพื้นฐานให้ครอบคลุมเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพให้สอดคล้องตามมาตรฐาน ISO 20387:2018 ซึ่งนอกจากให้สอดคล้องตาม ISO 20387:2018 แล้ว ยังเป็นไปตามจริยธรรมการวิจัย ในกรณีตัวอย่างจากมนุษย์ที่ได้รับมานั้นมาจากโครงการวิจัยในมนุษย์ และเป็นไปตามระเบียบข้อบังคับและกฎหมายของประเทศไทย เช่น ในภาพที่ 1 ขั้นตอนที่ 2 และ 5 ต้องเกี่ยวข้องกับข้อมูลส่วนบุคคล การดำเนินงานต้องไม่ขัดกับพระราชบัญญัติคุ้มครองข้อมูลส่วนบุคคล พ.ศ. 2562 เป็นต้น สำหรับขั้นตอนที่ 8 เรื่อง การให้บริการสำหรับงานวิจัยในอนาคต ธนาคารชีวภาพทั้ง 5 แห่ง ในประเทศไทยยังไม่มีข้อมูล แต่อาจจะต้องมีการวางแผน

ในเรื่องการเชื่อมโยงข้อมูลกับเครือข่ายธนาคารชีวภาพในระดับประเทศและระดับนานาชาติ รวมถึงการกำหนดกฎเกณฑ์ในภาพรวมของประเทศเกี่ยวกับการแบ่งปันวัสดุชีวภาพและข้อมูล

ธนาคารชีวภาพที่ยื่นขอการรับรองจากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO 20387:2018 พบสิ่งไม่สอดคล้องตามข้อกำหนดที่ธนาคารชีวภาพต้องดำเนินการแก้ไข วิเคราะห์หาสาเหตุ และวิธีป้องกันการเกิดปัญหาซ้ำ แม้ว่าผลของการศึกษาครั้งนี้มาจากธนาคารชีวภาพจำนวนเพียง 5 แห่ง ที่ตรวจประเมินในปี พ.ศ. 2565–2567 แต่พบว่าข้อมูลสิ่งไม่สอดคล้องที่ตรวจพบสามารถสะท้อนให้เห็นสิ่งที่ดำเนินการที่ยังไม่สอดคล้องตามข้อกำหนด เพื่อใช้เป็นแนวทางในการประเมินตนเอง และส่งเสริมศักยภาพของธนาคารชีวภาพรายใหม่ที่ประสงค์จะยื่นขอการรับรอง และเมื่อวิเคราะห์เพิ่มเติมของสิ่งไม่สอดคล้องเปรียบเทียบระหว่างคลังตัวอย่างจากมนุษย์และคลังจุลินทรีย์ พบว่าส่วนใหญ่ข้อกำหนดสูงสุด 3 อันดับแรกของธนาคารชีวภาพทั้ง 2 ประเภท เป็นสิ่งไม่สอดคล้องที่พบสูงสุด 6 อันดับแรก ในภาพรวมของธนาคารชีวภาพทั้งหมดที่ศึกษา ดังนั้นธนาคารชีวภาพไม่ว่าจะเก็บวัสดุชีวภาพประเภทใดก็ตามสามารถใช้ผลการศึกษานี้ในการเสริมความเข้มแข็งของการดำเนินงาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในข้อ 6.3 ซึ่งเป็นข้อกำหนดด้านสิ่งอำนวยความสะดวก/พื้นที่เฉพาะและสภาพแวดล้อมที่พบเป็น 1 ใน 3 อันดับแรกของธนาคารชีวภาพทั้ง 2 ประเภท โดยสามารถเพิ่มเติมเรื่องการกำหนดบุคลากรรับผิดชอบพื้นที่และสิ่งแวดล้อมทั้งการแยกพื้นที่ที่เหมาะสมเพื่อป้องกันการปนเปื้อนข้าม การควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น ความสะอาด รวมทั้งการจัดทำแผนรองรับทั้งระยะสั้นและระยะยาว เนื่องจากวัสดุชีวภาพในธนาคารชีวภาพนั้นต้องมีคุณภาพและความปลอดภัยตลอดช่วงเวลาที่เก็บรักษา ซึ่งอาจยาวนานหลายปีหรือหลายสิบปี

มาตรฐานธนาคารชีวภาพนี้มีส่วนที่คล้ายกันกับมาตรฐานสากล ISO 15189:2022⁽¹¹⁾ และ ISO/IEC 17025:2017⁽¹²⁾ คือ ข้อกำหนดทั่วไป ด้านโครงสร้างด้านทรัพยากร และด้านระบบบริหารคุณภาพ (ข้อ 4, 5, 6 และ 8 ตามลำดับ) แต่มีความแตกต่างในข้อ 7 คือ

ข้อกำหนดด้านกระบวนการ ดังจะเห็นว่าข้อกำหนดข้อ 7 ด้านกระบวนการเป็นข้อกำหนดที่ธนาคารชีวภาพพบจำนวนสิ่งไม่สอดคล้องมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 48.9 อีกทั้งยังพบทุกข้อกำหนดย่อยทั้งหมดของข้อกำหนดที่ 7 (ข้อ 7.1 ถึง 7.13) ซึ่งสิ่งไม่สอดคล้องที่พบมากที่สุด 3 อันดับแรกของข้อกำหนดที่ 7 เป็นเรื่องการควบคุมคุณภาพ (7.8) การรับและการแจกจ่ายวัสดุชีวภาพและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง (7.3) และการจัดเก็บวัสดุชีวภาพ (7.7) อย่างไรก็ตามข้อกำหนดข้อ 4 ถึง ข้อ 8 มีจำนวนข้อย่อยที่ไม่เท่ากัน โดยข้อ 7 มีจำนวนข้อย่อยมากที่สุด 13 ข้อย่อยจึงอาจทำให้ได้ผลรวมของสิ่งไม่สอดคล้องสูงสุด การควบคุมคุณภาพวัสดุชีวภาพและข้อมูล ซึ่งเป็นข้อกำหนดย่อยที่ 7.8 เป็นเรื่องใหม่ เป็นข้อที่พบสิ่งไม่สอดคล้องจำนวนมากที่สุดของข้อกำหนดข้อ 7 ด้านกระบวนการ โดยธนาคารชีวภาพสามารถพิจารณาดำเนินการตามเอกสาร APAC TEC1-004 Guidance for Accreditation of Biobanks⁽²⁾ ซึ่งระบุให้ธนาคารชีวภาพประเมินการควบคุมคุณภาพสำหรับแต่ละขั้นตอนของวงจรชีวิตของวัสดุชีวภาพและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง จาก 1) ข้อกำหนดสำหรับวัสดุชีวภาพและข้อมูลที่เกี่ยวข้องตามการใช้งานที่ตั้งใจไว้ 2) ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ 3) การประเมินตัวชี้วัดการควบคุมคุณภาพ และ 4) การบำรุงรักษาห่วงโซ่การตรวจสอบย้อนกลับ (traceability chain) นอกจากนี้หน่วยรับรองระบบงาน ANSI National Accreditation Board (ANAB) ประเทศสหรัฐอเมริกา ยังมีเอกสาร AR 2262 Accreditation Requirements: ISO 20387 - Biobanking⁽¹³⁾ ที่กำหนดให้ธนาคารชีวภาพที่ต้องการขอการรับรองตามมาตรฐาน ISO 20387:2018 ต้องมีแผนการควบคุมคุณภาพที่ทำให้มั่นใจว่ามีการเข้าร่วมสำหรับปัจจุบันและไปข้างหน้าอีกอย่างน้อยสามปี โดยครอบคลุมตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของกิจกรรมการเก็บรักษาวัสดุชีวภาพที่ระบุไว้ในขอบเขตการรับรอง

เมื่อวิเคราะห์จำแนกตามข้อกำหนดย่อยของทุกข้อกำหนด พบว่าข้อกำหนดย่อยที่พบสิ่งไม่สอดคล้องสูงสุด คือ ข้อกำหนด 6.3 เรื่องพื้นที่และสภาพแวดล้อม ซึ่งจากรายงานของ Harati MD และคณะ⁽¹⁴⁾ ระบุไว้ชัดเจนว่า การเริ่มต้นจัดตั้งธนาคารชีวภาพต้องการ

จัดเตรียมพื้นที่ เครื่องมือ และสิ่งอำนวยความสะดวก รวมทั้งบุคลากรมีความสามารถอย่างเหมาะสมตามภารกิจโดยรวมของธนาคารชีวภาพ โดยคำนึงถึงปลอดภัยสำหรับเจ้าหน้าที่และวัสดุชีวภาพที่จัดเก็บ นอกจากนี้ใน APAC TEC1-004 Guidance for Accreditation of Biobanks⁽²⁾ ยังระบุให้ธนาคารชีวภาพสามารถพิจารณาเรื่องสิ่งอำนวยความสะดวกและสภาพแวดล้อมโดยดำเนินการให้ครบถ้วนในหัวข้อ 1) การจัดการสิ่งอำนวยความสะดวก 2) ความปลอดภัยของข้อมูล 3) ความปลอดภัยจากอค์คิภัย 4) ความปลอดภัยทางเคมี 5) ความปลอดภัยและความมั่นคงทางชีวภาพ 6) ความปลอดภัยทางกายภาพ 7) การตรวจสอบสภาพแวดล้อม และ 8) การวิเคราะห์ความเสี่ยง สอดคล้องกับ ISO/TR 22758:2020 Biotechnology - Biobanking - Implementation Guide for ISO 20387⁽¹⁵⁾ ที่ระบุว่าสิ่งอำนวยความสะดวกและสภาพแวดล้อมในการดำเนินงานของธนาคารชีวภาพมีผลกระทบต่ออย่างมีนัยสำคัญต่อคุณภาพ ความสมบูรณ์ ความปลอดภัยของวัสดุชีวภาพและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง การออกแบบพื้นที่ใช้งานและโครงสร้างพื้นฐานควรพิจารณาองค์ประกอบทั้งด้านกายภาพและการบริหารจัดการ เช่น อาคาร พื้นที่ปฏิบัติงาน สาธารณูปโภค นโยบายและแนวปฏิบัติภายในธนาคารชีวภาพ รวมถึงระบบเทคโนโลยีสารสนเทศ ระบบรักษาความปลอดภัย การตรวจสอบสภาพแวดล้อม และระบบควบคุมการเข้าถึงอย่างเหมาะสม ทั้งนี้การจัดเตรียมระบบสำรอง เช่น หน่วยจัดเก็บสำรองหรือแหล่งพลังงานสำรองเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อรองรับสถานการณ์ฉุกเฉินและรักษาความต่อเนื่องในการดำเนินงานของธนาคารชีวภาพ จากการศึกษาครั้งนี้ธนาคารชีวภาพทั้งที่ได้รับการรับรองแล้ว ซึ่งต้องมีการตรวจประเมินต่ออายุ รวมทั้งธนาคารชีวภาพรายใหม่ที่ประสงค์จะยื่นขอการรับรองตามมาตรฐาน ISO 20387:2018 สามารถนำไปใช้ประกอบการเตรียมความพร้อมโดยศึกษาข้อกำหนด ISO 20387:2018⁽¹⁾ และจัดทำประเมินตนเองตามเอกสารแบบฟอร์มของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง Application form No.15: ISO 20387:2018 checklist⁽¹⁶⁾ ร่วมกับการศึกษาเอกสาร

เพิ่มเติม ได้แก่ ISO/TR 22758:2020 Biotechnology - Biobanking - Implementation Guide for ISO 20387⁽¹⁵⁾ และ APAC TEC1-004 Guidance for Accreditation of Biobanks⁽²⁾ โดยเน้นศึกษาเนื้อหาที่เกี่ยวข้องกับสิ่งอำนวยความสะดวกและสภาพแวดล้อม และเอกสาร ISO 31000:2018 Risk Management - Guidelines⁽¹⁷⁾ เพื่อเป็นแนวทางในเรื่องการบริหารความเสี่ยง ซึ่งจะเสริมความเข้มแข็งของธนาคารชีวภาพในการพัฒนาและลดการพบสิ่งไม่สอดคล้องจากการตรวจประเมินตามมาตรฐาน ISO 20387:2018 ต่อไป

สรุป

การรับรองธนาคารชีวภาพตามมาตรฐานสากล ISO 20387:2018 เป็นส่วนสำคัญของการสร้างความเชื่อมั่นในการดำเนินงานของธนาคารชีวภาพ รวมถึงความเชื่อมั่นในคุณภาพของวัสดุชีวภาพและข้อมูลที่จัดเก็บ โดยต้องมีกระบวนการที่ช่วยให้เข้าใจกระบวนการภาพรวมของธนาคารชีวภาพ และโครงสร้างพื้นฐานที่ช่วยให้สามารถเตรียมความพร้อมได้อย่างครบถ้วน เพื่อดำเนินการให้สอดคล้องตามมาตรฐานธนาคารชีวภาพ อีกทั้งข้อมูลสิ่งไม่สอดคล้องตามมาตรฐาน ISO 20387:2018 ของธนาคารชีวภาพในประเทศไทยสามารถใช้ในการประเมินความพร้อมของธนาคารชีวภาพทั้งที่ต้องการขอรับรองใหม่หรือขอต่ออายุเพื่อการพัฒนาคุณภาพและป้องกันการเกิดข้อบกพร่องในกระบวนการทำงาน อันจะส่งผลในการเพิ่มความน่าเชื่อถือ การจัดการวัสดุชีวภาพที่มีคุณภาพสูง ส่งเสริมการทำงานวิจัยที่มีจริยธรรม รองรับการวิจัยระดับประเทศและสากลต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้บริหารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่สนับสนุนการทำงานทั้งด้านนโยบายและทรัพยากร ขอขอบคุณธนาคารชีวภาพทั้ง 5 แห่ง ที่เห็นถึงความสำคัญของการรับรองตามมาตรฐานสากล ISO 20387:2018 และเจ้าหน้าที่กลุ่มรับรองห้องปฏิบัติการ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ที่มุ่งมั่นดำเนินงานรับรองอย่างเต็มที่ด้วยดีตลอดมา

เอกสารอ้างอิง

1. ISO 20387:2018. Biotechnology - biobanking - general requirements for biobanking. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2018.
2. Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC). APAC TEC1-004 guidance for accreditation of biobanks Ver 1.0 (20240924). [online]. 2024; [cited 2024 Oct 31]; [10 screens]. Available from: URL: <https://www.apac-accreditation.org/publications/tec1-series/apac-tec1-004-guidance-for-accreditation-of-biobanks-ver-1-0-20240924>.
3. Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC). APAC TEC1-001 APAC guidance on scopes of accreditation for biobanks Vers 1.1 (20220824). [online]. 2022; [cited 2024 Oct 31]; [7 screens]. Available from: URL: <https://www.apac-accreditation.org/publications/tec1-series>.
4. สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. รายงานสถานการณ์คุณภาพสิ่งแวดล้อม พ.ศ. 2566. [ออนไลน์]. 2566; [สืบค้น 1 เม.ย. 2567]; [384 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.onep.go.th/book/soe2566>.
5. สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส.). 'จีโนมิกส์ประเทศไทย' ถอดรหัสพันธุกรรมใกล้ครบ 5 หมื่น เตรียมก้าวสู่การรักษาเฉพาะเจาะจง ป้องกันก่อนเกิดโรค. [ออนไลน์]. 2567; [สืบค้น 16 เม.ย. 2567]; [5 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.hsri.or.th/media-issue/603>.
6. International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC). ISO 20387: accreditation for biobanking facilities. [online]. 2021; [cited 2023 Oct 28]; [4 screens]. Available from: URL: <https://ilac.org/publications-and-resources/ilac-promotional-brochures>.
7. De Blasio P, Biunno I. New challenges for biobanks: accreditation to the new ISO 20387:2018 standard specific for biobanks. BioTech 2021; 10: 13. (7 pages).

8. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานประจำปี 2566. [ออนไลน์]. 2566; [สืบค้น 1 ก.ค. 2567]; [55 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://blqs.dmsc.moph.go.th/page-view/101>.
9. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กระบวนการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. [ออนไลน์]. 2567; [สืบค้น 10 มี.ค. 2568]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://blqs.dmsc.moph.go.th/page-view/630>.
10. ISO 8601:2019. Date and time - representations for information interchange. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2019.
11. ISO 15189:2022. Medical laboratories - requirements for quality and competence. 4th ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2022.
12. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 3rd ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.
13. ANSI National Accreditation Board (ANAB). AR 2262, accreditation requirements: ISO 20387 - biobanking. [online]. 2024; [cited 2024 Oct 31]; [4 screens]. Available from: URL: <https://anab.qualtracxcloud.com/showdocument.aspx?ID=24046>.
14. Harati MD, Williams RR, Movassaghi M, Hojat A, Lucey GM, Yong WH. An introduction to starting a biobank. *Methods Mol Biol* 2019; 1897: 7-16.
15. ISO/TR 22758:2020. Biotechnology - biobanking - implementation guide for ISO 20387. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2020.
16. Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences. Application form No.15: ISO 20387:2018 checklist. [online]. 2024; [cited 2025 June 30]; [27 screens]. Available from: URL: <https://blqs.dmsc.moph.go.th/page-view/171>.
17. ISO 31000:2018. Risk management - guidelines. 2nd ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2018.

Analysis of Workflows, Infrastructure, and Nonconformities in the Accreditation Process of Biobanks in Thailand According to ISO 20387:2018

Nattakarn Laieddee¹, Siratcha Dulyakorn¹, Siriphan Saeng-aroon²,
Saovanee Aromsook¹, and Surasak Muenphon¹

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

²Bureau of Expert Advisory Panels, Department of Medical Sciences, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Biobanks are critical scientific infrastructures that support long-term conservation of biological resources at the national level. The standard ISO 20387:2018 is a requirement for competence, impartiality, and operational consistency. This standard encompasses the entire biobanking process, including collection, reception, transportation, preparation, preservation, storage, data management, and distribution of biological materials and associated data (BMaD). This study aims to analyze the biobanking workflows and infrastructure, as well as to analyze the frequency and types of nonconformities identified during ISO 20387:2018 assessments of five biobanks conducted in Thailand between 2022 and 2024. The analysis of operational workflows provided the biobanks with a comprehensive overview of institutional components, while infrastructure analyses offered insights for optimizing resource allocation to improve process efficiency. A total of 139 nonconformities (NCs) were identified during the assessments, categorized under clauses 4, 5, 6, 7, and 8, with 16, 8, 31, 68, and 16 NCs, respectively. The 6 most frequent nonconformities occurred in: clause 6.3 (Facilities/dedicated Areas and Environmental Conditions), clause 4.1 (General Requirements), clause 7.8 (Quality Control of BMaD), clause 5 (Structural Requirements), clause 7.3 (Reception and Distribution of BMaD), and clause 7.7 (Storage of Biological Materials). Clause 7, Process Requirements, had the highest proportion of NCs, accounting for 48.9% of all findings. This information can be used as guidelines for development and preparation in applying for both initial accreditation and reaccreditation, ultimately promoting the effective utilization of biological resources in future research.

Keywords: Biobank, ISO 20387, Biobank infrastructure, Nonconformities

การพัฒนาหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติ เพื่อการยอมรับร่วมของข้อมูลการประเมินทางเคมี Good Laboratory Practice กับองค์การ เพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา (OECD)

ธัญญารัตน์ สุขสมบุรณ์ สารินี เลนะพันธ์ และ สุรศักดิ์ หมั่นพล
สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ ในปี พ.ศ. 2553 รัฐสภามีมติเห็นชอบให้ประเทศไทยเข้าร่วมเป็นภาคีสมาชิกชั่วคราวการยอมรับร่วมของข้อมูลการประเมินสารเคมีขององค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา (Organization for Economic Co-operation and Development: OECD) ซึ่งมีเงื่อนไขสำคัญให้หน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติ (National Compliance Monitoring Authority: CMA) ต้องผ่านการตรวจประเมินตามเกณฑ์ที่ OECD กำหนด สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ในฐานะ CMA ของประเทศไทย จึงดำเนินการพัฒนาระบบงานโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ผ่านการประเมินและได้เข้าร่วมเป็นภาคีในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลการประเมินสารเคมี (Mutual Acceptance of Data: MAD) อย่างสมบูรณ์ โดยการพัฒนางานองค์ประกอบที่สำคัญไปพร้อม ๆ กัน ได้แก่ CMA (ผู้ตรวจประเมิน บุคลากร กระบวนการตรวจสอบ การจัดเก็บเอกสาร) และหน่วยศึกษา/ทดสอบความปลอดภัย (Test Facility) ดำเนินการให้สอดคล้องตามหลักปฏิบัติที่ดีทางห้องปฏิบัติการ (Good Laboratory Practice: GLP) แนวทางการทดสอบ (Test Guidelines) และกฎหมายของ OECD ผลการดำเนินการ ในปี พ.ศ. 2561 CMA ได้รับการตรวจประเมินจากภาคีสมาชิก OECD และในวันที่ 7 กันยายน พ.ศ. 2563 สภา OECD มีมติเห็นชอบให้ประเทศไทยได้รับการยอมรับร่วมของข้อมูลการประเมินทางเคมีอย่างสมบูรณ์ ประโยชน์ที่ได้ คือ การมีสิทธิและพันธกิจเช่นเดียวกับภาคีสมาชิกเต็มรูปแบบและสามารถแลกเปลี่ยนข้อมูลการทดสอบสารเคมีได้โดยไม่ต้องทดสอบซ้ำ ส่งผลให้ผู้ประกอบการไทยประหยัดเวลา ทรัพยากร ลดการกีดกันทางการค้า ช่วยส่งเสริมการคุ้มครองสุขภาพมนุษย์และสิ่งแวดล้อมได้ดียิ่งขึ้น เป็นการเพิ่มศักยภาพให้ผู้ประกอบการไทยสามารถแข่งขันในตลาดการค้ากับต่างประเทศได้มากขึ้น ปัจจุบันมีหน่วยทดสอบที่ดำเนินการสอดคล้องตามหลักการ OECD GLP ทั้งหมด 7 แห่ง อย่างไรก็ตาม CMA ยังมีความจำเป็นที่ต้องพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อยกระดับมาตรฐานการดำเนินงานเทียบเท่ากับภาคีสมาชิกต่อไป

คำสำคัญ: หน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติ, การยอมรับร่วมของข้อมูลการประเมินทางเคมี, องค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา, หน่วยศึกษา/ทดสอบความปลอดภัย

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

Received: 24 June 2025

Revised: 9 October 2025

Accepted: 10 October 2025

บทนำ

องค์การเพื่อความร่วมมือและการพัฒนาทางเศรษฐกิจ (Organization for Economic Co-operation and Development: OECD) เป็นองค์การเพื่อส่งเสริมความร่วมมือทางเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม ในปี พ.ศ. 2568 OECD มีประเทศสมาชิก (OECD member countries) จำนวน 38 ประเทศ และประเทศที่ไม่ใช่สมาชิก (Non-OECD member countries) อีก 7 ประเทศ⁽¹⁾ หลักการปฏิบัติที่ดีทางห้องปฏิบัติการของ OECD เป็นแนวปฏิบัติที่เกี่ยวข้องกับการได้มาของข้อมูลความปลอดภัยที่มีคุณภาพภายใต้การทดสอบที่สมเหตุสมผล เชื่อถือได้ ทำซ้ำได้ และตรวจสอบได้ มีองค์ประกอบหลัก ดังนี้ 1) หน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติ (National Compliance Monitoring Authority: CMA) 2) หน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ใช่การทดสอบในมนุษย์ (Test Facility: TF) 3) หน่วยกำกับดูแลทางกฎหมาย (Regulatory Authority: RA) และ 4) ผู้ประกอบการ (Sponsor) ซึ่งมีบทบาทหน้าที่เชื่อมโยงกัน

ในปี พ.ศ. 2524 คณะรัฐมนตรีของ OECD มีมติให้ผลการทดสอบความปลอดภัยของสารเคมีจากประเทศสมาชิก OECD ที่ปฏิบัติตาม OECD Test Guidelines และ OECD Principles of Good Laboratory Practice (GLP) ยอมรับผลการทดสอบระหว่างกันในประเทศสมาชิก ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นในการพัฒนาระบบการยอมรับร่วมของข้อมูล (OECD MAD system)⁽²⁾ ต่อมาในปี พ.ศ. 2540 OECD เปิดโอกาสให้ประเทศที่ไม่ได้เป็นสมาชิกเข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูล ส่งผลให้ในปี พ.ศ. 2550 ประเทศไทยได้ประชุมร่วมกันระหว่างกระทรวงสาธารณสุข กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงอุตสาหกรรม กระทรวงพาณิชย์ และกระทรวงการต่างประเทศ เพื่อผลักดันให้ประเทศไทยเข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลเรื่องการประเมินสารเคมี (Full Adherent to MAD) ตาม OECD จากผลการประชุมดังกล่าว คณะรัฐมนตรีมีมติเห็นชอบให้ประเทศไทยเข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลเรื่องการประเมินสารเคมีของ OECD แบบชั่วคราว (Provisional Adherent) โดยมีกระทรวง

อุตสาหกรรมเป็นหน่วยงานหลักในการดำเนินงานเพื่อให้ประเทศไทยเข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลการประเมินสารเคมี โดยได้รับความเห็นชอบจากรัฐสภาเมื่อปี พ.ศ. 2553 ตามที่คณะรัฐมนตรีเสนอเป็นระยะเวลา 3 ปี กระทรวงอุตสาหกรรมได้ทำหนังสือแจ้งเลขที่การ OECD เพื่อยืนยันการเข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลเรื่องการประเมินสารเคมี จากการเข้าร่วมแบบชั่วคราวทำให้ประเทศไทยต้องยอมรับผลการทดสอบแบบฝ่ายเดียวและต้องดำเนินการตามเงื่อนไขที่ OECD กำหนดจึงจะสามารถเข้าร่วมในระบบ แบบสมบูรณ์ (Full Adherent) ได้

สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้รับมอบหมายจากคณะกรรมการมาตรฐานแห่งชาติ ให้เป็นหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติเพียงแห่งเดียวของประเทศไทย รับผิดชอบกำกับดูแลการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการตามหลักปฏิบัติที่ดีทางห้องปฏิบัติการของ OECD ครอบคลุมขอบข่ายผลิตภัณฑ์เภสัชกรรม ผลิตภัณฑ์กำจัดศัตรูพืช ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ยาสำหรับสัตว์ สารปรุงแต่งอาหาร สารปรุงแต่งอาหารสัตว์ สารเคมีอุตสาหกรรมและผลิตภัณฑ์อื่น ซึ่งต้องดำเนินการตาม 1) Decision of the Council Concerning the Mutual Acceptance of Data in the Assessment of Chemicals⁽³⁾ 2) Decision-Recommendation of the Council on Compliance with Principles of Good Laboratory Practice⁽⁴⁾ และ 3) ผ่านการตรวจประเมิน (On-Site Evaluation: OSE) ตามเกณฑ์ที่ OECD กำหนดจากคณะผู้ตรวจประเมินของสมาชิก OECD รวมทั้งการศึกษาเอกสารและรวบรวมข้อมูลผลการดำเนินงานที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ เอกสารวิชาการ OECD Series Document Principles of GLP จำนวน 25 ฉบับ⁽⁵⁾ กฎหมายของ OECD จำนวน 2 ฉบับ เอกสารคุณภาพ ได้แก่ Manual for Thailand GLP Compliance Programme, Requirement and Conditions for GLP Compliance Test Facility, Standard Operation Procedures, Work sheets, Forms จำนวน 38 ฉบับ และข้อมูลผลการดำเนินงานในการเข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลที่ผ่านมา ระหว่างปี พ.ศ. 2552-2563

ในปี พ.ศ. 2555 สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้รับการตรวจประเมินจาก
คณะผู้ตรวจประเมินของประเทศสมาชิก OECD ครั้งที่ 1
เมื่อวันที่ 23-27 มกราคม พ.ศ. 2555 เป็นการตรวจ
ประเมินการดำเนินงานของหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียน
และความสามารถในการทำหน้าที่เป็นผู้ตรวจประเมิน
หน่วยทดสอบความปลอดภัย ซึ่งผลการตรวจประเมิน
พบว่ายังดำเนินการไม่สอดคล้องตามเงื่อนไขของ OECD
ดังนี้ 1) หลักฐานการมอบหมายให้เป็นหน่วยตรวจสอบ
ขึ้นทะเบียนแห่งชาติจากรัฐบาลยังไม่ชัดเจน 2) หน่วย
ทดสอบความปลอดภัยของประเทศไทยไม่สอดคล้องกับ
หลักการของ OECD เพราะเป็นหน่วยทดสอบที่วิเคราะห์
หาปริมาณยาในตัวอย่างชีวภาพ (เลือด พลาสมา) ซึ่ง
เป็นการทดสอบในมนุษย์ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ
จึงจำเป็นต้องหาหน่วยทดสอบความปลอดภัยที่ไม่ใช่การ
ทดสอบในมนุษย์เพิ่มเติม โดยได้รับการขยายระยะเวลา
การเข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลเรื่องการ
ประเมินสารเคมีออกไปอีก 2 ครั้ง ครั้งละ 3 ปี นับจาก
การตรวจประเมินครั้งแรก ดังนั้นสำนักมาตรฐาน
ห้องปฏิบัติการจึงได้ดำเนินการพัฒนาระบบงานของ
CMA เพื่อให้ผ่านเกณฑ์การตรวจประเมิน และได้รับ
การยอมรับร่วมของข้อมูลอย่างสมบูรณ์ จนได้รับการตรวจ
ประเมินอีกครั้งเมื่อปี พ.ศ. 2561 ผลการตรวจประเมิน
พบว่าได้ดำเนินการสอดคล้องตามเงื่อนไขของ OECD
จนได้เข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลเรื่อง
การทดสอบสารเคมีอย่างสมบูรณ์ เมื่อวันที่ 7 กันยายน
พ.ศ. 2563 ซึ่งส่งผลให้ประเทศไทยมีสิทธิและพันธกิจ
เช่นเดียวกับประเทศสมาชิก OECD สามารถแลกเปลี่ยน
ข้อมูลด้านการประเมินสารเคมีโดยไม่ต้องถูกทดสอบซ้ำ
ส่งผลให้ประหยัดเวลา ทรัพยากร ลดการกีดกันทาง
การค้า ส่งเสริมการค้าคุ้มครองสุขภาพมนุษย์และสิ่งแวดล้อม
ได้ดียิ่งขึ้น โดยมีหน่วยทดสอบความปลอดภัยที่ได้
รับการขึ้นทะเบียนแห่งแรกในปี พ.ศ. 2560 และ
มีแนวโน้มเพิ่มจำนวนมากขึ้น ปัจจุบันมีหน่วยศึกษาวิจัย/
ทดสอบความปลอดภัย (TF) ที่ได้รับการขึ้นทะเบียนแล้ว
จำนวน 7 แห่ง ได้แก่ 1) ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ
มหาวิทยาลัยมหิดล 2) ศูนย์ทดสอบผลิตภัณฑ์สุขภาพ
ตามระบบ OECD GLP กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
3) สถานสัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
4) ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมผลิตภัณฑ์สมุนไพร สถาบัน

วิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
5) ศูนย์วิจัยไพโรเมทแห่งชาติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
6) สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ และ 7) ศูนย์ความหลากหลาย
ทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
แห่งประเทศไทย โดยมีผู้ตรวจประเมิน (Inspector)
เพื่อการขึ้นทะเบียนทั้งหมด 5 ท่าน ได้แก่ ดร.สุมล
ปวีตรานนท์ ดร.บุษราวรรณ ศรีวรรณระ ดร.ภัทรวีร์
สร้อยสังวาลย์ ดร.นพ.อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์ และ
ภญ.สารินี เลนะพันธ์

บทความนี้ได้รวบรวมข้อมูลที่ได้ดำเนินการพัฒนา
หน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติ ระหว่างปี พ.ศ.
2552-2563 เพื่อแสดงผลการวิเคราะห์สาเหตุของ
การพัฒนาระบบงาน และผลสำเร็จของการเข้าร่วมใน
ระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลด้านการประเมินสารเคมี
อย่างสมบูรณ์ ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาอย่างต่อเนื่อง
เพื่อยกระดับมาตรฐานการดำเนินงานให้เทียบเท่ากับ
ภาคีสมาชิกต่อไป

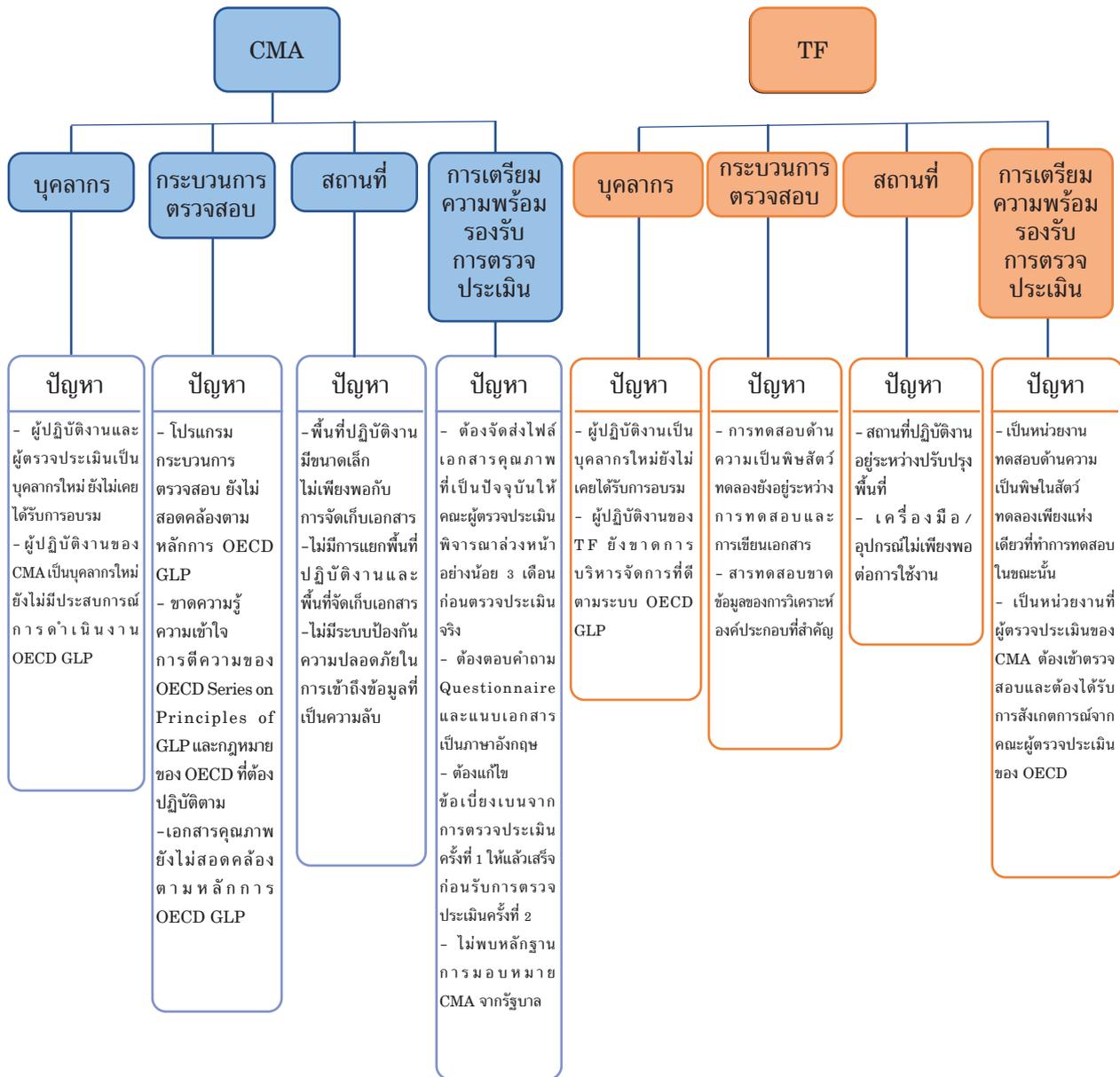
วิธีการ

ศึกษาความเป็นมาและข้อมูลการดำเนินงานของ
สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ในส่วนหน่วยตรวจสอบ
ขึ้นทะเบียนแห่งชาติ (CMA) ระหว่างปี พ.ศ. 2552-2563
และหน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความปลอดภัย (Test
Facility: TF) ระหว่างปี พ.ศ. 2558-2560 และศึกษา
เงื่อนไขและหลักเกณฑ์ที่ OECD กำหนด รวมทั้งปัญหา
ที่พบจากการดำเนินงานที่ผ่านมา

การวิเคราะห์ปัญหาของการพัฒนา CMA และ TF

นำปัญหาที่เขียนแผนผังการวิเคราะห์สาเหตุของ
การพัฒนาที่ยังไม่สำเร็จของการดำเนินงานของ CMA
โดยจำแนกตามองค์ประกอบที่สำคัญ ได้แก่ ผู้ตรวจ
ประเมิน บุคลากร กระบวนการตรวจสอบ และสถานที่
รวมทั้งวิเคราะห์สาเหตุการดำเนินการพัฒนาระบบงาน
โดยนำมาเขียนแผนผังก้างปลา⁽⁶⁾ เพื่อแสดงถึงปัจจัย
ในการพัฒนา ซึ่งจำแนกตามองค์ประกอบที่สำคัญต่อ
ปัญหาของการพัฒนา และติดตามความก้าวหน้าของการ
พัฒนาหน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความปลอดภัย (TF)
ที่อยู่ระหว่างเตรียมความพร้อม เพื่อขอรับการตรวจสอบ
ขึ้นทะเบียนให้สามารถดำเนินการสอดคล้องตามหลักการ
OECD GLP ดังแสดงในภาพที่ 1

แผนผังการวิเคราะห์ปัญหาของการพัฒนาระบบงานของหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติ และหน่วยศึกษาวิจัยทดสอบความปลอดภัย จำแนกตามองค์ประกอบที่สำคัญ



ภาพที่ 1 แผนผังการวิเคราะห์ปัญหาของการพัฒนาระบบงานของหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติ (CMA) และหน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความปลอดภัย (TF) จากการตรวจประเมินของประเทศสมาชิก OECD ครั้งที่ 1 เมื่อปี พ.ศ. 2555

การพัฒนาหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติ (CMA) และ TF

ระหว่างปี พ.ศ. 2555-2558 สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้รับการสนับสนุนงบประมาณการพัฒนาเป็นหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านชีววิทยาศาสตร์ (องค์การมหาชน) และได้จัดทำแผนพัฒนาอย่างต่อเนื่องโดยกิจกรรมที่สำคัญกิจกรรมหนึ่ง คือ การจ้างผู้เชี่ยวชาญจากประเทศเนเธอร์แลนด์ เพื่ออบรมให้ความรู้ความเข้าใจการตรวจสอบขึ้นทะเบียนตามหลักการ OECD GLP แก่ผู้ตรวจสอบ (Inspector) บุคลากรผู้รับผิดชอบการดำเนินงานของ CMA และบุคลากรของหน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความปลอดภัย (TF)

ด้านบุคลากร

ปี พ.ศ. 2556-2562 บุคลากรของ CMA ประกอบด้วย ผู้ตรวจสอบ (Inspectors) และผู้ปฏิบัติงานได้รับการพัฒนาความรู้ ความเข้าใจ ทักษะวิธีการดำเนินงาน และการฝึกฝนอย่างต่อเนื่อง การให้ความรู้หลักการ OECD GLP โดยฝึกอบรม ศึกษาดูงาน และสังเกตการณ์การตรวจประเมิน ได้แก่ ได้รับการอบรมจากผู้เชี่ยวชาญประเทศมาเลเซียและผู้เชี่ยวชาญประเทศเนเธอร์แลนด์ การเข้าร่วมสัมมนา การศึกษาดูงานภายในประเทศและต่างประเทศ รวมทั้งการเข้าร่วมสังเกตการณ์การดำเนินงาน CMA ของต่างประเทศ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 หลักสูตรอบรมจัดโดยสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และหน่วยงานอื่นๆ ภายในประเทศและต่างประเทศ

ปี	หลักสูตร	สถานที่
2556	11 th OECD Training Course for GLP Inspectors	Chiba, Japan
2557	OECD GLP Training Course	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
	สังเกตการณ์ในการตรวจประเมินหน่วยศึกษาวิจัยผลิตภัณฑ์ยา	Drug Safety Testing Center (DSTC), Saitama, Japan
2558	การอบรมเชิงปฏิบัติการการเป็น Inspector ตามหลักการ OECD GLP	โรงแรมศาลายาพาวิลเลียน มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม
	12 th OECD Training Course for GLP Inspectors	Hyderabad, India
2560	Guidance Document for Compliance Monitoring Authority	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
	OECD Principle on Good Laboratory Practice and OECD GLP Inspectors	โรงแรมริชมอนด์ จังหวัดนนทบุรี
	การพัฒนาห้องปฏิบัติการให้สอดคล้องกับ OECD GLP Principles	โรงแรมแมนดาริน กรุงเทพฯ
	13 th OECD Training Course for GLP Inspectors	Kraków, Poland
	Education Course for OECD GLP Training	มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก
2561	OECD GLP Implementation for Test Facility	โรงแรมริชมอนด์ จังหวัดนนทบุรี
	The Strategic OECD - GLP Compliant - Preclinical Collaboration	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
	GLP Inspection of Oral Toxicity Studies	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
	ศึกษาดูงานการดำเนินงานตามหลักการ OECD GLP ของหน่วย CMA ของประเทศสมาชิก OECD	Department of Standards Malaysia และ National Pharmaceutical Regulatory Agency ประเทศมาเลเซีย

ตารางที่ 1 หลักสูตรอบรมจัดโดยสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และหน่วยงานอื่นๆ
 ภายในประเทศและต่างประเทศ (ต่อ)

ปี	หลักสูตร	สถานที่
	ศึกษาดูงานการดำเนินงานตามหลักการ OECD GLP ของหน่วย CMA ของประเทศสมาชิก OECD และฝึกปฏิบัติงานจริง	Department of Standards Malaysia ประเทศมาเลเซีย
2562	14 th OECD Training Course for GLP Inspectors	Cape Town, South Africa

ด้านกระบวนการตรวจสอบขึ้นทะเบียน

ผู้ปฏิบัติงานสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการได้นำกระบวนการตรวจสอบขึ้นทะเบียนและเอกสารคุณภาพมาศึกษาและนำมาใช้ในการปฏิบัติงาน ทบทวนเอกสารคุณภาพให้สอดคล้องตามหลักการ OECD GLP ได้แก่ 1) OECD Principles on Good Laboratory Practice⁽⁷⁾ 2) Guidance for GLP Monitoring Authorities, Revised Guides for Compliance Monitoring Procedures for Good Laboratory Practice⁽⁸⁾ 3) Guidance for GLP Monitoring Authorities, Revised Guidance for the Conduct of Laboratory Inspections and Study Audits⁽⁹⁾ และ 4) Guidance for the Preparation of GLP Inspection Reports⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้ได้ศึกษากฎหมายของ OECD ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ 1) Decision of the Council Concerning the Mutual Acceptance of Data in the Assessment of Chemicals และ 2) Decision-Recommendation of the Council on Compliance with Principles of Good Laboratory Practice โดยกระบวนการตรวจสอบขึ้นทะเบียนและเอกสารคุณภาพได้รับการทบทวนและปรับแก้ไขให้ เป็นปัจจุบันโดยสอดคล้องตามหลักการ OECD GLP จำนวน 38 ฉบับ

ด้านสถานที่

สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ได้รับนโยบายจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ให้ดำเนินการจัดตั้งหน่วยงานภายในสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการเป็นกลุ่ม OECD GLP และได้รับการจัดสรรพื้นที่ใหม่ โดยมีการแยกพื้นที่

ปฏิบัติงาน (Office) กับห้องเก็บรักษาเอกสาร (Archive) และได้รับการอนุมัติจัดจ้างติดตั้งระบบควบคุมการเข้า-ออก ออนไลน์ สำหรับการจัดเก็บเอกสารเพื่อป้องกันการเข้าถึงข้อมูลที่เป็นความลับจากบุคคลภายนอก ซึ่งเป็นเงื่อนไขสำคัญตามหลักการ OECD GLP

การเตรียมความพร้อมรับการตรวจประเมินครั้งที่ 2

ได้จัดเตรียมความพร้อมเพื่อรับการตรวจประเมินจากคณะผู้ตรวจประเมินของประเทศสมาชิก OECD ครั้งที่ 2 ระหว่างวันที่ 3-7 กันยายน พ.ศ. 2561 โดยได้ดำเนินการต่าง ๆ ดังนี้ 1) จัดเตรียมไฟล์เอกสารคุณภาพที่เป็นปัจจุบันให้คณะผู้ตรวจประเมินพิจารณาล่วงหน้าอย่างน้อย 3 เดือนก่อนตรวจประเมินจริง 2) ตอบคำถาม Questionnaire ตาม OECD กำหนด 3) แก้ไขข้อเบี่ยงเบนจากการตรวจประเมินครั้งที่ 1 ในครั้งนี้ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้รับมอบหมายให้ทำหน้าที่เป็นหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติจากรัฐบาลอย่างถูกต้อง รวมทั้งการติดตามความพร้อมของหน่วยทดสอบความปลอดภัยที่ไม่ได้ทดลองในมนุษย์ เพื่อให้คณะผู้ตรวจประเมินของประเทศสมาชิก OECD ได้เข้าประเมินความสามารถคณะ Inspector ของไทยในการตรวจสอบดังกล่าว 4) การติดต่อประสานงานกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทั้งภายในและภายนอกกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และ 5) การประสานงานและอำนวยความสะดวกให้กับคณะผู้ตรวจประเมินของประเทศสมาชิก OECD ที่มาจากประเทศเนเธอร์แลนด์ เบลเยียม และอินเดีย

การพัฒนาองค์ประกอบของหน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบ ความปลอดภัย (Test Facility)

ในปี พ.ศ. 2558 มีหน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความปลอดภัยที่ไม่ได้ทดลองในมนุษย์ (non-clinical safety) ของประเทศไทยเพียงแห่งเดียว ได้แก่ ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งอยู่ระหว่างการพัฒนาขอบข่ายการศึกษา (area of expertise) การทดสอบด้านความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง (toxicity studies) ได้แก่ การทดสอบการประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก ตามวิธีทดสอบ OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Test No. 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method⁽¹¹⁾ และเตรียมความพร้อมเพื่อขอรับการตรวจสอบขึ้นทะเบียนจากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ด้านบุคลากร

บุคลากรของ ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รับการพัฒนาความรู้ ความเข้าใจ ในหลักการ OECD GLP และการทดสอบด้านความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง โดยการฝึกอบรมตามหลักสูตรอบรมที่จัดโดยสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นอกจากนี้ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ยังได้มีการพัฒนาบุคลากรภายในหน่วยงานเอง โดยการฝึกอบรม ฝึกปฏิบัติ และการศึกษาดูงานภายในประเทศและต่างประเทศ

ด้านการทดสอบ

บุคลากรของ ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ศึกษาวิธีการทดสอบและดำเนินการพัฒนาการทดสอบด้านความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง (toxicity study) ได้แก่ การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก ตามวิธีทดสอบ OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Test No. 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method ให้สอดคล้องตามหลักการ OECD GLP นอกจากนี้สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ยังได้แนะนำผู้เชี่ยวชาญจากประเทศมาเลเซีย ให้กับศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อให้คำปรึกษาเรื่องการทดสอบด้านความเป็นพิษในสัตว์ทดลองให้ดำเนินการสอดคล้องตามหลักการ OECD GLP และคอยติดตามความก้าวหน้าของการทดสอบเป็นระยะ

ด้านสถานที่

ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล มีพันธกิจในการดำเนินการทดสอบความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ตามหลักการ OECD GLP จึงได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากมหาวิทยาลัยมหิดลในการบริหารจัดการภายในหน่วยงาน การจัดสรรพื้นที่ และเครื่องมือ/อุปกรณ์สำหรับปฏิบัติงานเพื่อให้เป็นไปตามหลักการ OECD GLP โดยสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ร่วมกับผู้เชี่ยวชาญจากประเทศมาเลเซีย ได้ตรวจเยี่ยมสถานที่ปฏิบัติงาน ห้องรับสารทดสอบ ห้องทดสอบ และห้องเก็บเอกสารของศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อประเมินความพร้อมในการตรวจสอบขึ้นทะเบียนจากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

การพิจารณาความพร้อมของ TF เพื่อรองรับการตรวจสอบของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ภายใต้สังเกตการณ์โดยคณะผู้ตรวจประเมินของประเทศสมาชิก OECD ครั้งที่ 2 ในปี พ.ศ. 2561

สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ได้ตรวจเยี่ยมศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ในการทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง เพื่อพิจารณาความพร้อมของการทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลองและสถานที่ปฏิบัติงานตามหลักการ OECD GLP ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้พัฒนาศักยภาพอย่างต่อเนื่องเพื่อรับการตรวจสอบจากคณะผู้ตรวจสอบของหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติ ภายใต้การสังเกตการณ์ของผู้ตรวจประเมินจากสมาชิก OECD ครั้งที่ 2 ในปี พ.ศ. 2561 การพัฒนาองค์ประกอบของศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ในการพัฒนาการทดสอบด้านความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง ระบบคุณภาพ การบริหารจัดการ บุคลากร สถานที่ สารทดสอบ และเครื่องมือ เพื่อให้ดำเนินการสอดคล้องตามหลักปฏิบัติที่ดีทางห้องปฏิบัติการ (Good Laboratory Practice: GLP) และแนวทางการทดสอบ (Test Guidelines)

การจัดทำทำเนียบหน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความปลอดภัย (Test Facility) ที่ได้รับการขึ้นทะเบียนและการเผยแพร่บนเว็บไซต์

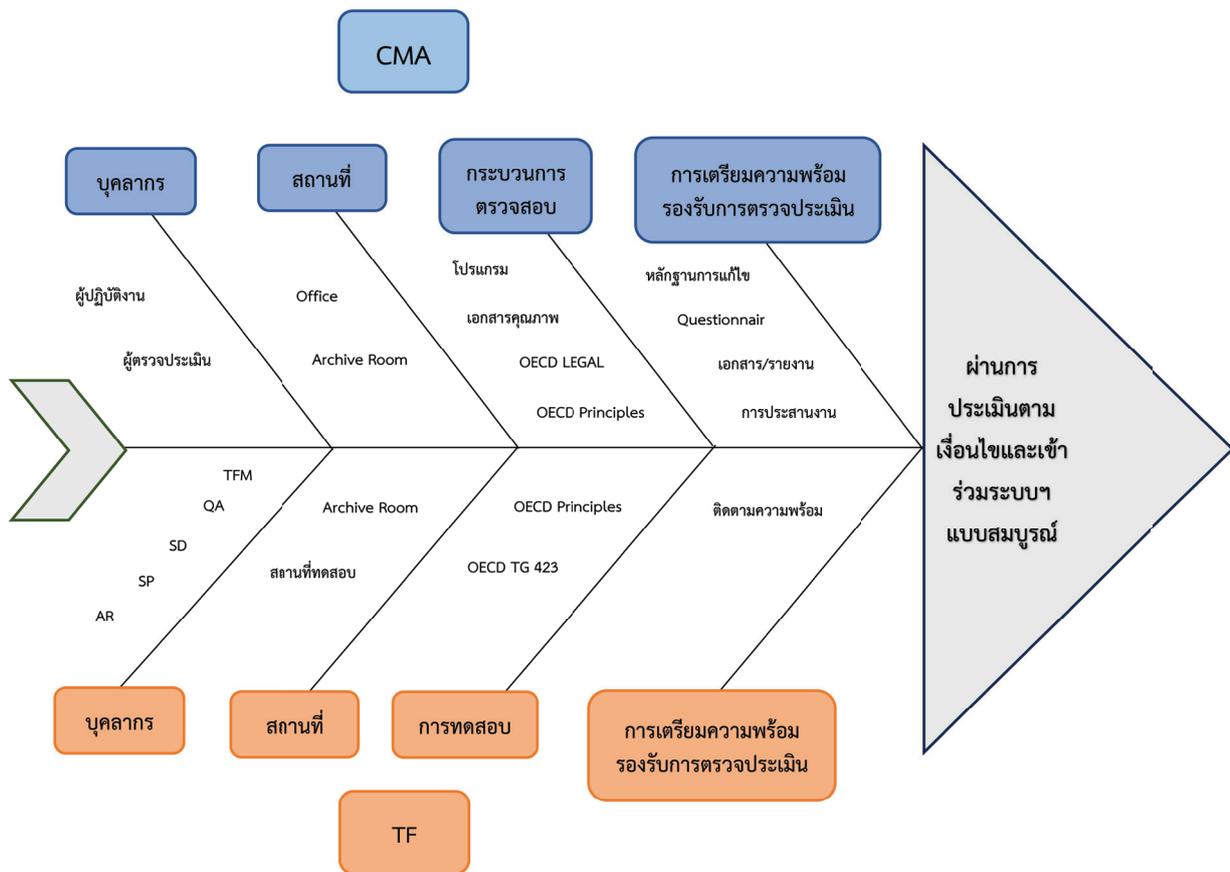
ผู้ปฏิบัติงานสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ได้ดำเนินการจัดทำทำเนียบหน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความปลอดภัย (Test Facility) ที่ได้รับการตรวจสอบขึ้นทะเบียนและมีความสอดคล้องตามหลักการ OECD GLP มีรายละเอียด ดังนี้ 1) ชื่อและที่อยู่ของหน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความปลอดภัย 2) ขอบข่ายการศึกษา 3) ขอบข่ายของผลิตภัณฑ์ 4) สถานะของความสอดคล้องและ 5) วัน/เดือน/ปีที่ทำเนียบการตรวจสอบ โดยข้อมูลดังกล่าวพร้อมกับสำเนา Certificate of Compliance to OECD Principles of GLP จะส่งไปยังผู้บริหาร

จัดการเว็บไซต์สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ เพื่อดำเนินการเผยแพร่รายชื่อของหน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความปลอดภัยที่ดำเนินการสอดคล้องตามหลักการ OECD GLP บนเว็บไซต์ของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ

ผล

การพัฒนา CMA และ TF

จากผลดำเนินงานดังกล่าวสามารถนำมาเขียนแผนผังก้างปลา⁽⁶⁾ โดยจำแนกตามองค์ประกอบที่สำคัญของการพัฒนาระบบงานของหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติ (CMA) และหน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความปลอดภัย (TF) เพื่อนำไปสู่เป้าหมายของความสำเร็จดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แผนผังก้างปลาแสดงปัจจัยการพัฒนาจำแนกตามองค์ประกอบที่สำคัญต่อปัญหาของการพัฒนาระบบงาน

- OECD TG 423 (Organization for Economic Co-operation and Development Test Guidelines 423) หมายถึง การศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันทางปากขององค์กรเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา
- OECD Legal หมายถึง ตราสารทางกฎหมายขององค์กรเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา

- OECD Principles หมายถึง หลักปฏิบัติที่ดีทางห้องปฏิบัติการขององค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา
- CMA (Compliance Monitoring Authority) หมายถึง หน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติ
- TF (Test Facility) หมายถึง หน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความปลอดภัย
- TFM (Test Facility Management) หมายถึง ผู้บริหารสูงสุดของหน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความปลอดภัย
- QA (Quality Assurance Personnel) หมายถึง เจ้าหน้าที่ฝ่ายประกันคุณภาพ
- SD (Study Director) หมายถึง ผู้อำนวยการการศึกษา
- SP (Study Personnel) หมายถึง บุคลากรทางการศึกษา
- AR (Archivist) หมายถึง เจ้าหน้าที่ผู้จัดเก็บข้อมูล

การพัฒนาหน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความปลอดภัย (Test Facility)

ด้านบุคลากร

บุคลากรของหน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความปลอดภัยได้รับความรู้หลักการ OECD GLP ผ่านการฝึกอบรมและฝึกปฏิบัติภายในประเทศและต่างประเทศ รวมทั้งการบริหารจัดการบุคลากรในการปฏิบัติงานมอบหมายงานตามความรู้ ความสามารถ ความเชี่ยวชาญอย่างเพียงพอและเหมาะสม

ด้านการทดสอบ

หน่วยทดสอบได้จัดอบรมและฝึกปฏิบัติภายในองค์กรตาม OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 423 และสื่อสารประชาสัมพันธ์กับผู้ประกอบการ (Sponsor) ที่ประสงค์จะนำสารทดสอบมาทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง ทำให้ผู้ประกอบการสามารถจัดเตรียมข้อมูลของสารทดสอบที่ครบถ้วนและถูกต้อง ซึ่งจะส่งผลให้ผู้ประกอบการได้รับผลการทดสอบความปลอดภัยเพื่อนำไปขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์กับหน่วยกำกับดูแลทางกฎหมายต่อไป สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้รับทราบถึงความก้าวหน้าเรื่องการทดสอบด้านความเป็นพิษในสัตว์ทดลองของศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยคำแนะนำจากผู้เชี่ยวชาญจากประเทศมาเลเซีย เพื่อประเมินความพร้อมในการขอรับการตรวจสอบขึ้นทะเบียนจากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และเป็นการประเมินศักยภาพ ความรู้ ความสามารถของผู้ตรวจสอบในการตรวจสอบขึ้นทะเบียนตามหลักการ OECD GLP

ด้านสถานที่

ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ปรับปรุงพื้นที่ปฏิบัติงาน โดยแยกพื้นที่การทดสอบ และพื้นที่เก็บเอกสารอย่างชัดเจน รวมถึงได้ดำเนินการจัดหาเครื่องมือ/อุปกรณ์สำหรับการปฏิบัติงานที่เพียงพอและเหมาะสมกับการทดสอบ

การตรวจสอบขึ้นทะเบียนหน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความปลอดภัย (TF) โดยสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ภายใต้สังเกตการณ์โดยคณะผู้ตรวจประเมินของประเทศสมาชิก OECD ครั้งที่ 2 ในปี พ.ศ. 2561

จากการตรวจเยี่ยมศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ในการพัฒนาการทดสอบด้านความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง ระบบคุณภาพ การบริหารจัดการ บุคลากร สถานที่ สารทดสอบ และเครื่องมือ เพื่อให้ดำเนินการสอดคล้องตามหลักปฏิบัติที่ดีทางห้องปฏิบัติการ (Good Laboratory Practice: GLP) และแนวทางการทดสอบ (Test Guidelines) พบว่าหน่วยงานได้ดำเนินการสอดคล้องตามหลักการ OECD GLP และได้รับการขึ้นทะเบียนเป็นแห่งแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 20 ธันวาคม พ.ศ. 2560 ทั้งนี้หน่วยงานต้องได้รับการตรวจสอบตามวงรอบในปี พ.ศ. 2561 ซึ่งสอดคล้องกับการเตรียมความพร้อมเพื่อรองรับการตรวจประเมินจากคณะผู้ตรวจประเมินของประเทศสมาชิก OECD เพื่อประเมินความรู้ความสามารถของคณะผู้ตรวจสอบของหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติ ในการดำเนิน

การตรวจสอบหน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความปลอดภัย
ของประเทศไทย จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้น
หน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติได้รับการตรวจ
ประเมินจากคณะผู้ตรวจประเมินของสมาชิก OECD
ได้แก่ ประเทศเนเธอร์แลนด์ เบลเยียม และอินเดีย ระหว่าง
วันที่ 3-7 กันยายน พ.ศ. 2561 พบว่าสำนักมาตรฐาน
ห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ดำเนินการ
ตามเงื่อนไข และผ่านเกณฑ์กำหนดของ OECD โดย
สภาของ OECD มีมติเห็นชอบให้ประเทศไทยเข้าร่วม
ในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลเรื่องการประเมิน
สารเคมีอย่างสมบูรณ์ เมื่อวันที่ 7 กันยายน พ.ศ. 2563⁽¹²⁾

การวิเคราะห์ข้อมูลการพัฒนาหน่วยตรวจสอบ
ขึ้นทะเบียนแห่งชาติ ผลการพัฒนาที่ผ่านมาตั้งแต่ปี พ.ศ.
2552-2563 สามารถสรุปผลสำเร็จของการได้รับการ
เข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลเรื่อง
การประเมินสารเคมีจากองค์การเพื่อความร่วมมือและ
การพัฒนาทางเศรษฐกิจ (OECD) ในแต่ละปี ดังนี้

ปี พ.ศ. 2552 คณะรัฐมนตรีมีมติเห็นชอบให้
ประเทศไทยเข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูล
การประเมินสารเคมีแบบชั่วคราวกับ OECD

ปี พ.ศ. 2553 รัฐสภามีมติเห็นชอบให้ประเทศไทย
เข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลการประเมิน
สารเคมีแบบชั่วคราวกับ OECD

ปี พ.ศ. 2555 สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรม
วิทยาศาสตร์การแพทย์ รับการตรวจประเมิน (On-Site
Evaluation: OSE) จากคณะผู้ตรวจประเมินของสมาชิก
OECD ครั้งที่ 1 เมื่อวันที่ 23-27 มกราคม พ.ศ. 2555

ปี พ.ศ. 2555-2561 สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ดำเนินการพัฒนาหน่วย
ตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติ (CMA)

ปี พ.ศ. 2561 สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รับการตรวจประเมิน
(On-Site Evaluation: OSE) จากคณะผู้ตรวจ
ประเมินของสมาชิก OECD ครั้งที่ 2 เมื่อวันที่ 3-7
กันยายน พ.ศ. 2561

ปี พ.ศ. 2562 ที่ประชุมประจำปี OECD GLP
Meeting of the Working Group ครั้งที่ 33 มีมติ
รับรองให้ประเทศไทยเข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วม

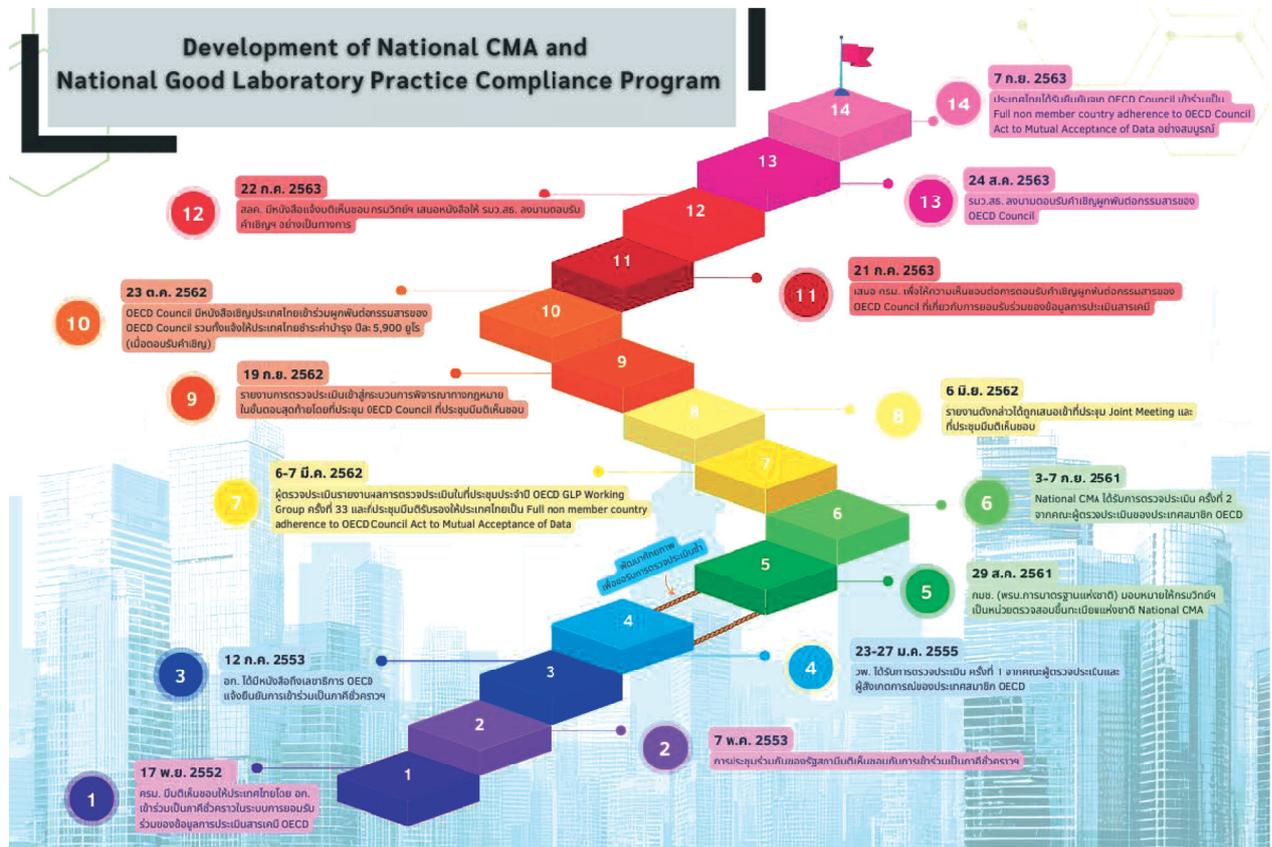
ของข้อมูลการประเมินสารเคมีแบบสมบูรณ์และเชิญ
ประเทศไทยเข้าร่วมผูกพันต่อกรรมการของ OECD
Council

ปี พ.ศ. 2563 ประเทศไทยโดยสำนักมาตรฐาน
ห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวง
สาธารณสุขตอบรับคำเชิญฯ และสภาของ OECD มี
มติเห็นชอบให้ประเทศไทยเข้าร่วมในการยอมรับร่วม
ของข้อมูลเรื่องการประเมินสารเคมีอย่างสมบูรณ์
ดังแสดงในภาพที่ 3

**หน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบที่ได้รับการขึ้นทะเบียนโดย
CMA ประเทศไทย ถึงปี พ.ศ. 2568**

ในปี พ.ศ. 2568 มีหน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความ
ปลอดภัยที่ได้รับการขึ้นทะเบียนโดย CMA ประเทศไทย
จำนวน 7 แห่ง ได้แก่ 1) ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ
มหาวิทยาลัยมหิดล 2) ศูนย์ทดสอบผลิตภัณฑ์สุขภาพ
ตามระบบ OECD GLP กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
3) สถานสัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย มหาวิทยาลัยนครสวรรค์
4) ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมผลิตภัณฑ์สมุนไพร
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
5) ศูนย์วิจัยไพโรเมทแห่งชาติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
6) สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ และ 7) ศูนย์ความหลากหลาย
ทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่ง
ประเทศไทย

โดยสามารถจำแนกตามขอบข่ายการศึกษา/
ทดสอบ ดังนี้ 1) การทดสอบด้านความเป็นพิษ (Toxicity
study) 2) การทดสอบการกลายพันธุ์ (Mutagenicity
study) 3) การทดสอบทางกายภาพและเคมี และ
4) การทดสอบอื่น ๆ ได้แก่ การศึกษาเภสัชวิทยาความ
ปลอดภัย (Safety pharmacology study) สามารถ
นำมาจัดทำเป็นทำเนียบหน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความ
ปลอดภัย (Test Facility) ที่ได้รับการขึ้นทะเบียน
ดังแสดงในตารางที่ 3 และรายชื่อของหน่วยศึกษาวิจัย/
ทดสอบความปลอดภัยที่ได้รับการขึ้นทะเบียนถูกเผยแพร่
บนเว็บไซต์ของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรม
วิทยาศาสตร์การแพทย์ ดังนี้ <https://blqs.dmsc.moph.go.th/page-view/129>



ภาพที่ 3 แสดงเส้นทางแห่งความสำเร็จของการเข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลเรื่องการประเมินสารเคมีอย่างสมบูรณ์ ปี พ.ศ. 2552-2563

ตารางที่ 3 หน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความปลอดภัยที่ได้รับการขึ้นทะเบียนและขอบข่ายที่ได้รับการขึ้นทะเบียนถึงปี พ.ศ. 2568

ลำดับ	หน่วยงาน	ขอบข่ายการศึกษา (Area of Expertise)	ขอบข่ายของผลิตภัณฑ์ (Scope of Products)	หมายเหตุ
1	ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล	Toxicity Study	- Pharmaceuticals - Pesticides	มีความสอดคล้อง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2560
		Physical-chemical testing	- Cosmetic products - Veterinary drug products - Food additives - Feed additives - Industrial chemical products - Medical Devices	มีความสอดคล้อง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2567
2	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	Toxicity Studies	- Pharmaceuticals - Medical Devices - Veterinary drug products - Food additives - Cosmetic products - Household chemicals	มีความสอดคล้อง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2563

ตารางที่ 3 หน่วยศึกษาวิจัย/ทดสอบความปลอดภัยที่ได้รับการขึ้นทะเบียนและขอข่ายที่ได้รับการขึ้นทะเบียน
 ถึงปี พ.ศ. 2568 (ต่อ)

ลำดับ	หน่วยงาน	ขอบข่ายการศึกษา (Area of Expertise)	ขอบข่ายของผลิตภัณฑ์ (Scope of Products)	หมายเหตุ
		Mutagenicity Study	<ul style="list-style-type: none"> - Pharmaceuticals - Pesticides - Cosmetic products - Veterinary drug products - Food additives - Feed additives - Industrial chemical products 	มีความสอดคล้อง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2566
3	สถานสัตว์ทดลอง เพื่อการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร	Toxicity Study	<ul style="list-style-type: none"> - Pesticides - Cosmetic products – Industrial chemicals products - Pharmaceuticals - Household chemicals - Dietary supplement products - Medical Devices - Herbal medicine - Novel Food 	มีความสอดคล้อง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2563
4	ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรม ผลิตภัณฑ์สมุนไพร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยีแห่งประเทศไทย	Toxicity Studies	<ul style="list-style-type: none"> - Pharmaceuticals - Veterinary drug products - Food additives - Feed additives - Industrial chemicals products - Medical Devices - Dietary supplement products - Herbal products - Bio-control products - Household chemicals - Novel Food - Chemical substance - Cosmetic products 	มีความสอดคล้อง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2564
5	ศูนย์วิจัยไพรมิทแห่งชาติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	Safety pharmacology study	<ul style="list-style-type: none"> - Pharmaceuticals - Herbal medicine - Dietary supplement - Functional food 	มีความสอดคล้อง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2564
6	สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์	Toxicity Study	<ul style="list-style-type: none"> - Pharmaceuticals - Herbal medicine - Dietary supplement - Functional food 	มีความสอดคล้อง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2566
7	ศูนย์ความหลากหลาย ทางชีวภาพ สถาบันวิจัย วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งประเทศไทย	Mutagenicity Study	<ul style="list-style-type: none"> - Cosmetic products - Food additives - Feed additives 	มีความสอดคล้อง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2567

วิจารณ์

ผลสำเร็จของการเข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลเรื่องการประเมินสารเคมีอย่างสมบูรณ์ ดังแสดงในภาพที่ 3 ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2552-2563 สืบเนื่องมาจากการพัฒนาระบบงานของหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติและหน่วยทดสอบความปลอดภัยอย่างต่อเนื่อง โดยได้ทำการศึกษาการดำเนินงานที่ผ่านมาและผลการตรวจประเมินของคณะผู้แทนประเทศสมาชิก OECD ครั้งที่ 1 ในปี พ.ศ. 2555 นำมาวิเคราะห์หาสาเหตุที่ยังดำเนินการไม่สอดคล้องตามเงื่อนไขของ OECD จึงนำไปสู่การวางแผนเร่งรัดการพัฒนาองค์ประกอบในทุกด้านที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการดำเนินงาน สร้างความเข้มแข็ง ความรู้ความเข้าใจในทิศทางเดียวกัน เพื่อเตรียมความพร้อมรองรับการตรวจประเมินของสมาชิก OECD ครั้งที่ 2 ในปี พ.ศ. 2561 จากการอบรมทั้งในประเทศและต่างประเทศอย่างต่อเนื่อง และจากการถ่ายทอดประสบการณ์ของที่ปรึกษางาน OECD GLP และผู้ตรวจประเมิน รวมทั้งการศึกษาดูงานหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนในต่างประเทศ การเข้าร่วมฝึกอบรมการเป็นผู้ตรวจประเมินจาก OECD การเรียนรู้จากการเข้าร่วมประชุมประจำปีของ OECD มีความสำคัญอย่างยิ่งในการร่วมกันวางแผนดำเนินงานตามหน้าที่ความรับผิดชอบของแต่ละบุคคล การบริหารจัดการที่เหมาะสม การสร้างความเชื่อมั่นในระบบคุณภาพ การจัดเก็บเอกสารการพัฒนาโปรแกรมกระบวนการตรวจสอบขึ้นทะเบียนของประเทศไทย (Thailand GLP Compliance Programme)⁽¹³⁾ เพื่อดำเนินการให้สอดคล้องตามหลักปฏิบัติที่ดีทางห้องปฏิบัติการ แนวทางการทดสอบและกฎหมายของ OECD รวมถึงการศึกษากิจการดำเนินงานของหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนต่างประเทศ (ประเทศมาเลเซีย) มาเป็นต้นแบบการดำเนินการพัฒนาระบบงาน โดยได้เชิญผู้เชี่ยวชาญจากประเทศดังกล่าวมาให้ความรู้แนะแนวทางการดำเนินงาน การเตรียมความพร้อมขององค์ประกอบที่เกี่ยวข้องเพื่อรองรับการตรวจประเมินของสมาชิก OECD ซึ่งได้รับความร่วมมือเป็นอย่างดีจากผู้บริหารที่เห็นถึงความสำคัญของการเข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลการประเมินสารเคมี ผู้อำนวยการสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรม

วิทยาศาสตร์การแพทย์ ผู้จัดการระบบ ที่ปรึกษางาน OECD GLP ผู้ตรวจสอบ และบุคลากรผู้ปฏิบัติงาน

ตามที่สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้เข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลด้านการประเมินสารเคมีอย่างสมบูรณ์ เมื่อวันที่ 7 กันยายน พ.ศ. 2563 นั้น ส่งผลให้ประเทศไทยมีสิทธิและพันธกิจเช่นเดียวกับภาคีสมาชิกเต็มรูปแบบสามารถแลกเปลี่ยนข้อมูลและได้รับการยอมรับร่วมในข้อมูลการประเมินสารเคมี โดยไม่ต้องถูกทดสอบซ้ำ ส่งผลให้ประหยัดเวลา ทรัพยากร ลดการกีดกันทางการค้า ช่วยส่งเสริมการคุ้มครองสุขภาพมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ได้ดียิ่งขึ้น โดยเงื่อนไขการยอมรับร่วมของข้อมูลมีดังนี้

- 1) หน่วยทดสอบต้องดำเนินการทดสอบตาม OECD Test Guidelines
- 2) ต้องดำเนินการทดสอบโดยหน่วยทดสอบที่ผ่านการตรวจสอบจากหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติ (CMA) และ
- 3) หน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติต้องผ่านการตรวจประเมินจากผู้ตรวจประเมินของประเทศสมาชิกภาคีเครือข่าย OECD

จากการเข้าร่วมในระบบดังกล่าวถือเป็นการเริ่มต้นอย่างแท้จริงในการเข้าร่วมพันธกิจกับประเทศสมาชิก OECD โดยประเทศไทยเข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลเรื่องการทดสอบสารเคมีอย่างสมบูรณ์เป็นลำดับที่ 3 ของกลุ่มประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ต่อจากประเทศสิงคโปร์และประเทศมาเลเซีย ซึ่งเข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลเรื่องการทดสอบสารเคมีอย่างสมบูรณ์ในปี พ.ศ. 2553 และ พ.ศ. 2556 ตามลำดับ สำหรับ 2 ประเทศดังกล่าวนี้ถือเป็นต้นแบบของการพัฒนาการดำเนินงานในระยะเวลาอันสั้นเพื่อเข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลด้านการประเมินสารเคมีอย่างสมบูรณ์

ปัจจุบันหากเปรียบเทียบการดำเนินงานตรวจสอบขึ้นทะเบียนของประเทศสิงคโปร์ ประเทศมาเลเซีย และประเทศไทย พบว่าแนวโน้มการดำเนินงานตรวจสอบขึ้นทะเบียนใกล้เคียงกัน โดยมีจำนวนหน่วยงานทดสอบที่ได้รับการขึ้นทะเบียนใกล้เคียงกันและขอบข่ายการศึกษาครอบคลุมตามที่ OECD กำหนด โดยประเทศสิงคโปร์มีหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนเพียงแห่งเดียวและมีหน่วยทดสอบความปลอดภัยที่

ดำเนินการสอดคล้องตามหลักการ OECD GLP ทั้งหมด 6 แห่ง ประเทศมาเลเซียมีหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียน จำนวน 2 แห่ง และมีหน่วยทดสอบความปลอดภัยที่ดำเนินการสอดคล้องตามหลักการ OECD GLP ทั้งหมด 19 แห่ง ประเทศไทยมีหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนเพียงแห่งเดียวและมีหน่วยทดสอบความปลอดภัยที่ดำเนินการสอดคล้องตามหลักการ OECD GLP ทั้งหมด 7 แห่ง⁽¹⁴⁾ ซึ่งหน่วยทดสอบทั้ง 7 แห่งนี้สามารถทดสอบได้ครอบคลุมขอบข่ายผลิตภัณฑ์เภสัชกรรม ผลิตภัณฑ์กำจัดศัตรูพืช ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ยาสำหรับสัตว์ สารปรุงแต่งอาหาร สารปรุงแต่งอาหารสัตว์ สารเคมีอุตสาหกรรม และผลิตภัณฑ์อื่น เช่น วัคซีน เครื่องมือแพทย์ ผลิตภัณฑ์สมุนไพร เป็นต้น อย่างไรก็ตามสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ยังคงส่งเสริมการพัฒนาเพิ่มขีดความสามารถของหน่วยทดสอบความปลอดภัยในการขยายขอบข่ายการศึกษาด้านอื่นๆ เช่น การทดสอบทางเคมีและกายภาพ (Physical-chemical testing) การทดสอบสารพิษตกค้าง (Residue study) การทดสอบด้านเคมีวิเคราะห์และเคมีคลินิก (Analytical and clinical chemistry testing) เป็นต้น เพื่อให้ประเทศไทยมีการทดสอบที่ครอบคลุมเป็นไปตามขอบข่ายการศึกษาทั้ง 8 ขอบข่ายการศึกษาของ OECD อีกทั้งเพื่อรองรับการทดสอบที่หลากหลายสำหรับผู้ประกอบการทั้งในประเทศและต่างประเทศ แต่ปัจจุบันพบว่ายังไม่มีข้อมูลของผู้ประกอบการในประเทศไทยที่ทดสอบความปลอดภัยแล้วนำผลิตภัณฑ์ไปขึ้นทะเบียนกับประเทศสมาชิก OECD อีก 44 ประเทศ ซึ่งจะส่งผลให้สามารถแลกเปลี่ยนข้อมูลการทดสอบความปลอดภัยได้โดยไม่ต้องทดสอบซ้ำ ตามเงื่อนไขการเข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลเรื่องการทดสอบสารเคมีแบบสมบูรณ์ นับได้ว่าหากหน่วยทดสอบความปลอดภัยของประเทศไทย สามารถดำเนินการทดสอบได้ตรงตามความต้องการของผู้ประกอบการไทยที่ประสงค์ทดสอบและส่งออกผลิตภัณฑ์ไปยังประเทศสมาชิก ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น จำนวน 20 แห่งภายใน 5 ปี ตามแผนพัฒนาหน่วยทดสอบที่มีความ

พร้อมระดับสูงและระดับกลางให้สามารถขึ้นทะเบียนกับหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติได้ ภายใต้นโยบายและยุทธศาสตร์ด้านการมาตรฐานของประเทศไทย (พ.ศ. 2566–2570) (https://www.tisi.go.th/data/accreditation/pdf/nac_210765.pdf) คาดว่า จะช่วยส่งเสริมมูลค่าผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทดสอบความปลอดภัยไม่ต้องทำการทดสอบซ้ำ ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย อีกทั้งยังช่วยส่งเสริมการขับเคลื่อนผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมในอนาคต นอกจากนี้สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการได้มีการสร้างเครือข่ายความร่วมมือกับหน่วยงานหลักที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ หน่วยทดสอบความปลอดภัย หน่วยกำกับดูแลทางกฎหมายและผู้ประกอบการเพื่อสื่อสารและสร้างแนวทางการดำเนินงานร่วมกันในระดับประเทศ รวมทั้งสร้างเครือข่ายความร่วมมือกับประเทศสมาชิกเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ประเทศสิงคโปร์และมาเลเซีย) และประเทศสมาชิกในทวีปเอเชีย (ประเทศอินเดีย ญี่ปุ่น และสาธารณรัฐเกาหลี) ในการดำเนินงานร่วมกัน แลกเปลี่ยนการเรียนรู้กิจกรรมต่าง ๆ ทั้งนี้สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการยังคงมุ่งมั่นพัฒนาการดำเนินงานของบุคลากร ศักยภาพผู้ตรวจประเมิน รวมทั้งสร้างผู้ตรวจประเมินรายใหม่เพิ่มขึ้น จัดหาผู้เชี่ยวชาญในการพิจารณาเอกสารวิชาการจาก OECD เพื่อรองรับจำนวนหน่วยทดสอบความปลอดภัยที่เพิ่มขึ้น การพัฒนาระบบการตรวจสอบขึ้นทะเบียนในส่วนของขั้นตอนการให้บริการ จากการยื่นเอกสารด้วยตัวเองเป็นระบบยื่นเอกสารออนไลน์ (e-submission) การพัฒนาแนวทางการตรวจประเมินออนไลน์ (Remote Inspection) ในกรณีเหตุฉุกเฉินตามที่ OECD กำหนด เพื่ออำนวยความสะดวกให้กับหน่วยทดสอบความปลอดภัย ลดการใช้กระดาษ ลดระยะเวลาการดำเนินงาน โดยคาดว่าการทำงานจะมีความสะดวกและรวดเร็วขึ้นจะทำให้ผู้รับบริการมีความพึงพอใจเพิ่มมากขึ้น รวมถึงการเป็นตัวแทนของประเทศไทยเข้าร่วมประชุมตามพันธกรณีของ OECD จากการพัฒนาระบบงานอย่างต่อเนื่องนับได้ว่าเป็นการช่วยยกระดับมาตรฐานการดำเนินงานของประเทศให้เทียบเท่ากับประเทศสมาชิก OECD ในการเตรียม

ความพร้อมรองรับการตรวจประเมินของสมาชิก OECD ในปี พ.ศ. 2571 เพื่อนำไปสู่การดำรงรักษาการเข้าร่วมเป็นสมาชิกในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลเรื่องการประเมินสารเคมี

สรุป

บทความนี้ได้แสดงถึงข้อมูลที่เป็นความสำเร็จของการดำเนินงานในการพัฒนาศักยภาพ หน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติจนสภาของ OECD มีมติเห็นชอบให้ประเทศไทยได้รับการเข้าร่วมในระบบการยอมรับร่วมของข้อมูลเรื่องการประเมินสารเคมีอย่างสมบูรณ์ จากความสำเร็จนี้ทำให้ประเทศไทยได้รับประโยชน์คือ การมีสิทธิและพันธกิจเช่นเดียวกับประเทศสมาชิก OECD โดยสามารถแลกเปลี่ยนข้อมูลการประเมินสารเคมีได้โดยไม่ต้องทดสอบซ้ำ และเข้าร่วมประชุมกับคณะทำงานที่เกี่ยวข้องของ OECD หากผู้ประกอบการประสงค์จะนำผลิตภัณฑ์ไปขึ้นทะเบียนกับประเทศสมาชิก OECD จะส่งผลให้ประเทศสมาชิก OECD ยอมรับผลการทดสอบความปลอดภัยของสารเคมีในผลิตภัณฑ์ (Safety Study of Data) จากหน่วยทดสอบความปลอดภัยที่ได้รับการตรวจสอบขึ้นทะเบียนจากหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนของประเทศไทย โดยไม่ต้องถูกตรวจสอบซ้ำ ส่งผลให้ประหยัดเวลา ทรัพยากร ลดการกีดกันทางการค้า ช่วยส่งเสริมการคุ้มครองสุขภาพมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ได้ดียิ่งขึ้น โดยเป็นการสร้างความเชื่อมั่นในระบบคุณภาพ และข้อมูล ความปลอดภัย ปัจจุบันภายในประเทศมีหน่วยทดสอบความปลอดภัยที่ดำเนินการสอดคล้องตามหลักการ OECD GLP ทั้งหมด 7 แห่ง อย่างไรก็ตาม หน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติยังมีความจำเป็นที่ต้องพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เพื่อยกระดับมาตรฐานการดำเนินงานเทียบเท่ากับประเทศสมาชิก OECD ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องที่ให้การสนับสนุนด้านนโยบายและงบประมาณ และคณะผู้ตรวจประเมิน (Inspectors)

โดยเฉพาะ ดร.สุมล ปวีตรานนท์ และ ดร.บุษราวรรณ ศรีวรรณะ ในการดำเนินงานของหน่วยตรวจสอบขึ้นทะเบียนแห่งชาติ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รวมทั้งคณะที่ปรึกษามูลนิธิกลุ่ม OECD GLP ที่ให้คำแนะนำและให้ความร่วมมือจนงานบรรลุผลสำเร็จได้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Testing of chemicals. [online]. [cited 2022 Jun 9]. Available from: URL: <https://www.oecd.org/en/topics/testing-of-chemicals.html>.
2. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Mutual acceptance of data system. [online]. [cited 2022 Jun 9]. Available from: URL: <https://www.oecd.org/en/topics/sub-issues/testing-of-chemicals/mutual-acceptance-of-data-system.html>.
3. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Decision of the Council concerning the mutual acceptance of data in the assessment of chemicals, OECD/LEGAL/0194. Paris: OECD; 1981.
4. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Decision-recommendation of the Council on compliance with principles of good laboratory practice, OECD/LEGAL/0252, Paris: OECD; 1989.
5. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Good laboratory practice and compliance monitoring. [online]. [cited 2024 Dec 9]. Available from: URL: <https://www.oecd.org/en/topics/sub-issues/testing-of-chemicals/good-laboratory-practice-and-compliance-monitoring.html>.

6. ประชาสรรณั แสนภักดี. ฟังก้างปลากับแผนภูมิความคิด. [ออนไลน์]. 2565; [สืบค้น 9 มิ.ย. 2565]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://www.prachasan.com/mindmapknowledge/fishbonemm.htm>.
7. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD principles on good laboratory practice. Paris: OECD; 1998.
8. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidance for GLP monitoring authorities, revised guides for compliance monitoring procedures for good laboratory practice. Paris: OECD; 1995.
9. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidance for GLP monitoring authorities, revised guidance for the conduct of laboratory inspections and study audits. Paris: OECD; 1995.
10. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidance for the Preparation of GLP Inspection reports. Paris: OECD; 1995.
11. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidelines for the testing of chemicals No. 423: acute oral toxicity - acute toxic class method. Paris: OECD; 2001.
12. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). National GLP compliance monitoring programmes which participate in the Mutual Acceptance of Data (MAD) system: status and contact information. [online]. [cited 2021 Jan 8]; [24 screens]. Available from: URL: <https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/topics/policy-sub-issues/testing-of-chemicals/national-glp-compliance-monitoring-programmes-which-participate-in-the-mutual-acceptance-of-data.pdf>.
13. Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences. Manual for Thailand GLP compliance programme. Nonthaburi: Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences; 2024.
14. Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences. List of test facilities registered to National OECD GLP compliance programme. [online]. 2024; [cited 2025 Apr 14]. Available from: URL: <https://blqs.dmsc.moph.go.th/page-view/129>.

Development of National Compliance Monitoring Authority to OECD GLP Mutual Acceptance of Data on Chemical Assessment

Thunyarat Sooksomboon, Sarinee Lenapun, and Surasak Muenphon

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

ABSTRACT In 2010, the National Assembly of Thailand decided for the country to become a provisional adherent of the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). This decision was made in relation to the Council Acts related to the Mutual Acceptance of Data (MAD) in the Assessment of Chemicals, with important conditions for the National Compliance Monitoring Authority (CMA) to undergo OECD evaluations. The Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences, as the National Compliance Monitoring Authority (CMA) in Thailand, has developed objectives to pass the on-site evaluation and become a full adherent to the MAD. The development comprised important components simultaneously: CMA (inspectors, personnel, GLP compliance program, and the archive system), as well as test facility compliance with the OECD Principles of Good Laboratory Practice (GLP), OECD Test guidelines, and OECD Council Acts. As a result, in 2018, CMA underwent an on-site evaluation by OECD members. On September 7, 2020, the OECD Council decided that Thailand to become a full adherent to MAD. The benefits as a full adherent were providing the same rights and obligations in Mutual Acceptance of Data (MAD) in the Assessment of Chemicals without duplicative testing, saving time and resources, help to avoid the creation of technical trade barriers, and further improve the protection of human health and the environment, and it is increasing the potential of sponsors to be more competitive in the international trade. Now in 2025, 7 test facilities have been registered in compliance with OECD GLP. However, CMA is further required for continuous development to upgrade operation standards to the same level as other OECD members.

Keywords: National Compliance Monitoring Authority, Mutual Acceptance of Data in the Assessment of Chemicals, Organization for Economic Co-operation and Development, Test Facility

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	Sarawat Boonsuk Phichet Banyati	Watcharapong Kumla
Technical Advisor	Pimjai Naigowit Panadda Silva Sumol Pavitranon	Duanthanorm Promkhatkaew Busarawan Sriwanthana Prapai Wongsinkongman
Executive Editor	Supaporn Phumiamorn	
Editor	Patamaporn Pruksakorn	
Assistant Editor	Siripakorn Sangkitporn Siriphan Saeng-Aroon Decha Pangjai	Panadda Dhepakson Siriwan Chaisomboonpan
Editorial Board	Pilaipan Puthavathana Prasert Auewarakul Danai Tiwawech Padet Siriyasatien Pornpimol Kongtip Srisurang Tantimavanich Sunee Sirivichayakul Chanitra Thuwajit Pintip Pongpech Suwanna Charunut Salakchit Chutipongvivate Usavadee Thavara Suthon Vongsheree Wichuda Chittangkura Supanee Duangteraprecha Nuanchawee Wetprasit Wantana Paveenkittiporn Uruyakorn Chansang	Mahidol University Mahidol University Naresuan University Chulalongkorn University Mahidol University Mahidol University Chulalongkorn University Mahidol University Independent Scholar Independent Scholar
Administration	Numfon Noiprasert Pawinee Sukcharoen Apisara Khomduean Chamaiporn Chumjurn Aphimon Jiraphongsathorn Navy Srivarom	Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences
Office	Bureau of Expert Advisory Panels, Department of Medical Sciences, Department of Medical Sciences 88/7 Soi Tiwanond 14, Tiwanond Rd., Nonthaburi 11000, Thailand. Tel. 0-2951-0000 ext. 99662, 98205, 98206 Fax: 0-2951-1297 E-mail : bull.dmsc@dmsc.mail.go.th	
Printed by	Thanaaroonkarnpim Co., Ltd. 457/6-7 Phra Sumen Road, Bangkok 10200 Tel. 0-2282-6033-4	



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences



 <https://bit.ly/BullDmsc>