



สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
Food and Drug Administration

วารสารอาหารและยา
ปีที่ 31 ฉบับที่ 1 (2567): มกราคม – เมษายน
<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/index>

THAI FOOD AND DRUG JOURNAL
Vol. 31 No. 1 (2024): January – April



ประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อในขมิ้นในกระบวนการผลิตยาแผนไทยด้วยโอโซน

ด้าย บัณฑิตศักดิ์¹ นันทพันธ์ นภทรานันท์¹ กฤษฎา พชรสิทธิ์¹

¹คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

ที่อยู่ติดต่อ: ด้าย บัณฑิตศักดิ์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง 222 หมู่ที่ 2 ตำบลบ้านพร้าว อำเภอบาปะย้อม จังหวัดพัทลุง 93210 tai.b@tsu.ac.th, bandisak.t@gmail.com

Efficiency of turmeric germs elimination in the traditional Thai medicine production process with ozone

Tai Bandisak¹, Nunthapan Naphattaranun¹, Kritsada Phatcharasit¹

¹Faculty of Engineering, Thaksin University, Thailand

Contact address: Tai Bandisak, Faculty of Engineering, Thaksin University, 222 Moo. 2, Baan Prao Sub-District, Papayom District, Phatthalung, Thailand, tai.b@tsu.ac.th, bandisak.t@gmail.com

Received: 22 October 2023, **Revised:** 1 March 2024, **Accepted:** 5 March 2024

Abstract

Background: Herbal medicinal products are accepted in modern medicine circles as alternatives that are increasingly being used to treat disease. It is important to control the quality of raw materials to control the growth of germs in drug production, such as by baking them with low heat at a temperature of 50 degrees Celsius and sending them for irradiation before being sold, which takes time and costs. Therefore, large quantities must be sent in order to cover the operating costs. However, it is found that currently there are studies that use ozone to control the growth of germs in herbal products and the food industry, but no studies have been found on turmeric. This research therefore proposes a method for eliminating germs in herbs and increasing efficiency in the production of herbal medicines with ozone as an alternative to producing standardized Thai traditional medicines.

Objectives: To study the process of germs eliminating by drying the traditional method, we created a turmeric germs elimination device using ozone that does not affect the important substances in the herb for Thai traditional medicine production and studied to compare the amount of the important substance *curcumin* and the efficiency of germs eliminating in the decontamination process by drying and using ozone.

Methods: Turmeric powder (200 g) was treated with ozone with a production capacity of 60 g/h for a period of 120 minutes in a closed system. Samples of Turmeric powder that was disinfected using ozone were analyzed for the amount of microorganisms (FDA BAM online 2001 (Chapter 3)), yeasts and mold (FDA BAM online 2001 (Chapter 18)). Thin -layer Chromatography was used to indicate the curcumin level with silica gel GF254 for stationary phase and Toluene: chloroform: ethanol (49:49:2) for mobile phase. The curcumin level was investigated in normal light, UV 254 nm, UV 366 nm and Vanillin-sulfuric acid test solution.

Results: Results show that the turmeric powder that has been eliminated by heat treatment (conventional method) found that Microbial levels were at 4.3×10^2 CFU/g, yeast and mold levels were at 1.4×10^2 CFU/g, respectively, while turmeric powder that was treated with ozone for 120 minutes was found to have microbial levels at <250 EAPC. CFU/g, levels of yeast and mold were <10 CFU/g, respectively. The thin-layer chromatography results were confirmed that ozone treatment in turmeric did not affect the curcumin level.

Conclusions: Ozone treatment is effective to eliminate germs in turmeric powder and does not affect the important substance curcumin in turmeric that will be used in the Thai traditional medicine production.

Keywords: sanitization machine, dried herb, ozone, turmeric

บทคัดย่อ

ความสำคัญ: ผลกระทบจากสมุนไพรเป็นที่ยอมรับในวงการแพทย์แผนปัจจุบันซึ่งเป็นทางเลือกที่ถูกนำมาใช้การรักษาโรคมามากขึ้น ขมิ้นนับเป็นหนึ่งในสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตยาแผนไทยหลายตำรับ ซึ่งการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบเพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อในการผลิตยาจึงเป็นเรื่องสำคัญ เช่น การอบด้วยความร้อนต่ำที่อุณหภูมิ 50°C และการส่งไปฉายรังสีก่อนวางจำหน่ายซึ่งต้องใช้ระยะเวลาและค่าใช้จ่ายจึงต้องส่งในปริมาณมากเพื่อให้คุ้มกับค่าใช้จ่ายในการดำเนินการ อย่างไรก็ตาม พบว่าปัจจุบันมีผลการศึกษาที่มีการนำโอโซนมาใช้ควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อผลิตภัณฑ์สมุนไพรและอุตสาหกรรมอาหาร แต่ยังไม่พบการศึกษาของขมิ้นชัน งานวิจัยนี้จึงเสนอวิธีการกำจัดเชื้อสำหรับสมุนไพรและเพิ่มประสิทธิภาพสำหรับการผลิตยาสมุนไพรด้วยโอโซน เพื่อเป็นทางเลือกในการผลิตยาแผนไทยที่ได้มาตรฐาน

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษากระบวนการกำจัดเชื้อด้วยการอบแห้งแบบดั้งเดิมและสร้างอุปกรณ์กำจัดเชื้อในหมื่นด้วยโอโซนที่ไม่กระทบต่อสารสำคัญในสมุนไพรสำหรับใช้ทำยาแผนไทย และศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการให้สารสำคัญ *curcumin* และประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อของหมื่นในกระบวนการกำจัดเชื้อด้วยการอบแห้งและการใช้โอโซน

วิธีการวิจัย: เป็นการวิจัยประยุกต์ดำเนินการตั้งแต่เดือนเมษายนถึงตุลาคม 2566 คัดเลือกตัวอย่างวิธีเจาะจง (purposive sampling) โรงงานผลิตยาแผนไทยที่มีกระบวนการอบแห้งหมื่นชั้นด้วยกรรมวิธีตากแดด 1 แห่ง จากนั้นออกแบบและสร้างเครื่องกำจัดเชื้อในยาสมุนไพรหมื่นแบบโอโซนปริมาณ 60 g/h ในพื้นที่ปิดโดยมีการหมุนเวียนโอโซนเพื่อการกระจายทั่วถึง ดำเนินการเก็บตัวอย่างหมื่นชั้นในพื้นที่อำเภอนวม จังหวัดสุราษฎร์ธานีมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นขนาด 1 cm ปริมาณ 2 kg นำไปตากจนแห้งด้วยวิธีการอบแห้งด้วยแสงแดดธรรมชาติแบบดั้งเดิมที่อุณหภูมิ 50°C นำมาบดละเอียดแล้วแบ่งผงหมื่นเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุมที่ผ่านการอบแห้งด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 50°C และกลุ่มทดลองที่กำจัดเชื้อด้วยการอบโอโซน กลุ่มละ 1 kg และสุ่มดักตัวอย่างหมื่นผงปริมาณ 200 g เพื่อทดสอบเปรียบเทียบการให้สารสำคัญด้วยวิธี Thin-layer Chromatography ในสถานะที่แตกต่างกัน และเปรียบเทียบปริมาณจุลินทรีย์และประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อทั้ง 2 กลุ่มด้วยวิธี FDA BAM online 2001 โดยที่กลุ่มทดลองได้มีการอบด้วยโอโซนที่กำลังการผลิต 60g/h เป็นระยะเวลา 120 นาที

ผลการศึกษา: กระบวนการอบแห้งและกำจัดเชื้อในยาสมุนไพรหมื่นผงในการผลิตยาแผนไทยของกลุ่มตัวอย่างควบคุม พบว่า มีขั้นตอนกระบวนการเริ่มจาก 1.นำหมื่นมาล้างทำความสะอาดและทำการหั่นเป็นชิ้นมีความหนา 1 cm 2.นำหมื่นที่ผ่านการล้างทำความสะอาดไปอบแห้งด้วยความร้อน 50°C 3.นำไปบดละเอียดด้วยเครื่องบดแบบลูกกลิ้งและนำไปผสมตามสูตรต่อไป และ เมื่อสร้างเครื่องกำจัดเชื้อในยาสมุนไพรหมื่นแบบโอโซนปริมาณ 60 g/h ในพื้นที่ปิดโดยได้เพิ่มกระบวนการต่อจากกระบวนการของกลุ่มควบคุม ซึ่งผลการเปรียบเทียบพบว่า กลุ่มควบคุมมีข้อจำกัดของการอบแห้งขึ้นอยู่กับฤดูหรือสภาพอากาศเช่นฤดูฝนจึงต้องใช้กระบวนการให้ความร้อนด้วยไฟฟ้าซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อสารสำคัญในหมื่น ขณะที่การโอโซนใช้ระยะเวลาสั้นกว่าและมีประสิทธิภาพมากกว่า แต่ความสามารถกำจัดเชื้อเฉพาะบริเวณพื้นผิวเท่านั้น สำหรับผลทดสอบการให้สารสำคัญหมื่นผง พบว่า กลุ่มควบคุมมีระดับจุลินทรีย์ ยีสต์และเชื้อราที่ 4.3×10^2 และ 1.4×10^2 CFU/g ขณะที่กลุ่มทดลอง < 250 EAPC CFU/g และ < 10 CFU/g ตามลำดับ ซึ่งผลทั้ง 2 กลุ่มพบเข้ามาตรฐานที่กำหนด ส่วนการทดสอบปริมาณสาร *Curcumin* ในสถานะแสงปกติ ภายใต้ UV 254 nm ภายใต้ UV 366 nm และ Vanillin-sulfuric acid test solution พบว่า ตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มมีการกำจัดเชื้อในหมื่นไม่ส่งผลต่อปริมาณสาร *Curcumin*

สรุป: การใช้กระบวนการอบแบบโอโซนในหมื่นชั้นมีประสิทธิภาพกำจัดเชื้อในปริมาณที่สูงกว่าในระยะเวลาที่สั้นกว่ากระบวนการกำจัดเชื้อด้วยวิธีอบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C โดยไม่ส่งผลกระทบต่อสารสำคัญ *Curcumin* นอกจากนั้น สามารถควบคุมปัจจัยด้านฤดูกาลได้ดีกว่า รวมถึงใช้เวลาและค่าใช้จ่ายน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการกำจัดเชื้อแบบดั้งเดิม

คำสำคัญ: การกำจัดเชื้อ ยาสมุนไพร หมื่น โอโซน

บทนำ

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพร เป็นที่ยอมรับในวงการแพทย์แผนปัจจุบันซึ่งเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ถูกนำมาใช้การรักษาโรคมามากขึ้น โดยเห็นได้อย่างชัดเจนในช่วงที่ประเทศไทยเผชิญกับสถานการณ์ COVID-19 อีกทั้งมีการผลิตยาจากสมุนไพรเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งขม้นถือเป็นหนึ่งในสารตั้งต้นการผลิตยาแผนไทยหลายตำรับ การควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบในการผลิตยาสมุนไพรจึงเป็นเรื่องที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการผลิตที่ได้มาตรฐานควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อที่อาจจะเกิดขึ้นประกอบด้วย การอบด้วยความร้อนต่ำที่อุณหภูมิ 50°C เพื่อให้วัตถุดิบแห้งซึ่งสามารถกำจัดเชื้อที่อาจจะเกิดขึ้นได้ และส่งไปทำการฉายรังสีที่สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) ซึ่งสามารถเลือกกระดับการฉายรังสีได้ตามวัตถุประสงค์ในกรณีที่เป็นยาแผนไทยได้แก่ ลดปริมาณจุลินทรีย์และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค (ปริมาณรังสีดูดกลืน 2-20 kGy) และการปลอดเชื้อ (sterilization) (ปริมาณรังสีดูดกลืน 15-50 kGy) แต่การส่งไปกำจัดเชื้อด้วยรังสีแกมมาก่อนที่จะวางจำหน่ายต้องใช้ระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการขนส่ง ดังนั้นการส่งไปทำการกำจัดเชื้อในแต่ละครั้งจึงต้องส่งในปริมาณมากเพื่อให้คุ้มกับค่าใช้จ่ายในการดำเนินการ

เมื่อพิจารณาถึงกระบวนการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยวิธีอื่น เช่น การใช้โอโซน ซึ่งจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ามีการใช้โอโซนอย่างแพร่หลาย อาทิ การศึกษาการใช้งานในผลิตภัณฑ์อาหาร พบว่าโอโซนมีศักยภาพของในการลดและกำจัดเชื้อ *Salmonella*

บนออริกานัมแห้ง โดยการบำบัดด้วยโอโซนสูงสุด 120 นาที ที่ระดับความเข้มข้นของโอโซนคงที่สองแบบ (2.8 และ 5.3 mg/l) ซึ่งจากการศึกษาพบว่ามีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในการนับเพลตแอโรบิกและยีสต์และจำนวนเชื้อราหลังใช้โอโซนที่ 2.8 mg/l เป็นเวลา 120 นาทีตามลำดับ การทำโอโซนที่ 5.3 mg/l เป็นเวลา 90 นาที พบว่าจำนวนของจุลินทรีย์ลดลง ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการบำบัดด้วยโอโซนเป็นทางเลือกที่มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในออริกานัมแห้ง¹ นอกจากนี้ ได้มีการศึกษาการใช้โอโซนในการกำจัดเชื้อในอุตสาหกรรมสมุนไพรและเครื่องเทศ ซึ่งรากชะเอม และใบสะระแหน่ มีอัตราการเกิดเชื้อราสูงที่สุดในขณะที่ยี่หระดำ และยี่หระมีอัตราการเกิดเชื้อราต่ำที่สุด ซึ่งได้ทำการศึกษาการเกิดเชื้อราและต้านเชื้อราในสมุนไพร และเครื่องเทศตากแห้ง 9 ชนิด พบว่าการใช้โอโซนที่ความเข้มข้น 3 ppm ที่เวลา 280 นาที สามารถลดจำนวนเชื้อราได้ ร้อยละ 96.39 ถึง 98.26 และพบว่าการผลิตสปอร์ของ *A. humicola* และ *Trichoderma viride* ลดลงเมื่อสัมผัสกับก๊าซโอโซน 210 นาที มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ² อีกทั้งการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อในเครื่องเทศ หัวหอม และพริกไทยดำซึ่งเป็นส่วนผสมที่ใช้กันทั่วไปในการปรุงอาหารที่บ้าน³ โดยใช้การผสมผสานเทคโนโลยีการบำบัดด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต โอโซน และแสงอินฟราเรด เพื่อทำการประเมินประสิทธิภาพในการจัดการปนเปื้อนของหัวหอม และพริกไทยดำ โดยทำการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งผลการศึกษาพบว่าเทคโนโลยีการบำบัดด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต โอโซน และ

แสงอินฟราเรด มีประสิทธิภาพมากในการจัดการปนเปื้อนของเครื่องเทศ รวมถึงอาหารแห้ง⁴ และสามารถใช้ในการดำเนินการจัดการปนเปื้อนของแบคทีเรียหลายสายพันธุ์

การศึกษาการใช้โอโซนในเทคโนโลยีการแปรรูปอาหารที่ไม่ใช้ความร้อนที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม⁵⁻⁶ และมีความคุ้มค่า ซึ่งใช้แทนความร้อนในกระบวนการผลิตธัญพืช เนื่องจากสามารถใช้ในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์และย่อยสลายสารพิษจากเชื้อราในธัญพืช และช่วยเพิ่มการงอกของเมล็ด⁷ ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่า การใช้โอโซนสามารถสร้างมั่นใจได้ว่าผลิตภัณฑ์ขั้นตอนสุดท้ายปลอดภัยและความสามารถยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ ดังนั้น โอโซนจึงเป็นเทคโนโลยีที่มีคุณสมบัติในรักษาคุณภาพของเมล็ดธัญพืช และผลิตภัณฑ์จากธัญพืช^{6,8} รวมถึงสามารถกำจัดเชื้อและแมลงศัตรูพืชได้อีกด้วย⁹ นอกจากนั้นโอโซนถูกนำมาใช้ในเห็ดหลินจือ (*G. lucidum*) โดยพบว่า การใช้โอโซนความเข้มข้นของโอโซน 5 ppm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีผลในการเสริมสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดหลินจือ เช่น ปริมาณฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ และกรดกาโนเดอริกมีค่าเพิ่มขึ้น¹⁰

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาถึงกระบวนการผลิตแผ่นไทยโดยใช้หมั่นชั้นอบด้วยพลังงานแสงแดดแบบดั้งเดิม และสร้างกระบวนการอบหมั่นชั้นด้วยวิธีการอบโอโซน เพื่อเปรียบเทียบสารสำคัญของ *Curcumin* และประสิทธิภาพของการกำจัดเชื้อของหมั่นชั้นในกระบวนการผลิตแผ่นไทยทั้งสองแบบ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษากระบวนการกำจัดเชื้อด้วยการอบแห้งแบบดั้งเดิมและสร้างอุปกรณ์กำจัดเชื้อในหมั่นด้วยโอโซนที่ไม่กระทบต่อสารสำคัญในสมุนไพรสำหรับใช้ทำยาแผนไทย
2. เพื่อศึกษาปริมาณการให้สารสำคัญ *Curcumin* ของหมั่นชั้นในกระบวนการกำจัดเชื้อด้วยการอบแห้งและการใช้โอโซน
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อในหมั่นสำหรับใช้ทำยาแผนไทยเปรียบเทียบระหว่างการกำจัดเชื้อด้วยวิธีอบแห้งและการใช้โอโซน

ระเบียบวิธีการวิจัย

วิธีวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการวิจัยประยุกต์ดำเนินการตั้งแต่เดือนเมษายน - ตุลาคม 2566

กลุ่มตัวอย่าง

1. คัดเลือกตัวอย่างสถานที่ผลิตยาแผนไทยที่มีกระบวนการอบแห้งแบบใช้พลังงานอาทิตย์ โดยคัดเลือกใช้วิธีเจาะจง (purposive sampling) จากสถานที่ผลิต 1 แห่ง คือ โรงงานผลิตยาแผนไทย พระพรหมโอสถคลินิกการแพทย์แผนไทย อ.พระพรหม จ.นครศรีธรรมราช
2. ใช้ตัวอย่างหมั่น จากแหล่งปลูกในพื้นที่ อ.พนม จ.สุราษฎร์ธานี จำนวน 2 kg เพื่อทำการตัดอบแห้ง และบดละเอียด กำหนดคุณลักษณะของหมั่นตัวอย่างที่คัดเลือกได้แก่ ไม่มีรอยแตก ไม่มีตำหนิที่ผิว ในกรณีที่มีตำหนิต้องมองเห็นได้ไม่ชัดเจน และไม่มีผลกระทบต่อลักษณะภายนอกของหมั่นชั้น

3. แบ่งกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการอบแห้งและกำจัดเชื้อเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุมที่อบแห้งด้วยความร้อนจากแสงอาทิตย์ด้วยอุณหภูมิ 50°C เพียงอย่างเดียว และกลุ่มที่อบแห้งด้วยความร้อนจากแสงอาทิตย์ด้วยอุณหภูมิ 50°C ร่วมกับการอบโอโซน (กลุ่มทดลอง) กลุ่มละ 1 kg มาสุ่มตัวอย่างผงขมิ้นเพื่อตรวจวิเคราะห์ในปริมาณกลุ่มละ 200 g

เครื่องมือ

1. การศึกษาดูงานใช้เครื่องมือในการบันทึก ซึ่งประกอบด้วยแบบบันทึกน้ำหนักขมิ้นและระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษากระบวนการกำจัดเชื้อด้วยโอโซน

2. อุปกรณ์ผลิตโอโซนปริมาณ 60 g/h ในพื้นที่ปิดขนาดกว้าง 0.75 m ยาว 0.70 m สูง 1.50 m และมีการออกแบบระบบการหมุนเวียนโอโซน เพื่อเพิ่มการกระจายตัวของโอโซนนำไปสู่การเพิ่มพื้นที่สัมผัสของโอโซนและขมิ้นผง

3. อุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้อบแห้งด้วยความร้อนจากแสงอาทิตย์ ได้แก่ ห้องอบสมุนไพรด้วยความร้อนจากพลังงานแสงอาทิตย์

4. อุปกรณ์ที่ใช้ ได้แก่ เครื่องชั่งน้ำหนักและตะแกรงสำหรับกรองผงขมิ้น

ขั้นตอนดำเนินการ

1. ศึกษากระบวนการอบแห้งและกำจัดเชื้อที่ใช้ในการผลิตยาแผนไทยในปัจจุบันโดยการลงพื้นที่ไปศึกษา ณ โรงงานผลิตยาแผนไทย พระพรหมโอสถคลินิกการแพทย์แผนไทย อ.พระพรหม จ.นครศรีธรรมราช เพื่อทำการศึกษาและวิเคราะห์ขั้นตอนการทำงาน

2. ออกแบบและสร้างเครื่องกำจัดเชื้อในยาสมุนไพรขมิ้นผงแบบโอโซนปริมาณ 60 g/h ในพื้นที่ปิด ซึ่งการออกแบบให้โอโซนมีการหมุนเวียนเพื่อการกระจายที่ทั่วถึง เพื่อประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อของโอโซน

3. นำตัวอย่างขมิ้นที่เก็บตัวอย่างจากพื้นที่ อ.พนม จ.สุราษฎร์ธานี มาล้างทำความสะอาดหั่นเป็นชิ้นขนาดความหนา 1 cm ในปริมาณ 2 kg นำไปตากจนแห้งด้วยวิธีการอบแห้งด้วยพลังแสงอาทิตย์แบบดั้งเดิมที่อุณหภูมิ 50°C จนขมิ้นมีลักษณะแห้ง จากนั้นนำเข้าสู่กระบวนการบดละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร จากนั้นแบ่งตัวที่บดละเอียดแล้วอย่างเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 1 kg ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 50°C เพียงอย่างเดียว (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มตัวอย่างที่จะถูกนำไปกำจัดเชื้อด้วยการอบโอโซน เป็นระยะเวลา 120 นาที (กลุ่มทดลอง)

4. วิเคราะห์และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อ โดย

- วัดระดับของจุลินทรีย์ (Aerobic Plate Count) ด้วยวิธี FDA BAM online 2001 (Chapter 3)(11)

- วัดปริมาณ *Escherichia coli* ด้วยวิธี AOAC(2019) 991.14¹²

- วัดปริมาณ *Salmonella spp* ด้วยวิธี ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020(E)¹³

5. วิเคราะห์ Yeasts และ Molds ด้วยวิธี FDA BAM online 2001 (Chapter 18)¹⁴

6. ทดสอบ Curcumin และผลการกระทบที่อาจจะเกิดขึ้นต่อสารสำคัญที่ใช้เป็นตัวยาโดยวิธี

ทางเภสัชศาสตร์นำสมุนไพรที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยโอโซนไปทำการทดสอบด้วยวิธี Thin-layer Chromatography โดยใช้ silica gel GF254 เป็นวัฏภาคคงที่และใช้ Toluene: chloroform: ethanol (49:49:2) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยจะตรวจสอบผลด้วยการสังเกตภายใต้แสงปกติ, ภายใต้แสง UV 254 nm, ภายใต้แสง UV 366 nm และสเปรย์ด้วย Vanillin-sulfuric acid Test solution¹⁵

การวิเคราะห์ข้อมูล

เป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ โดย

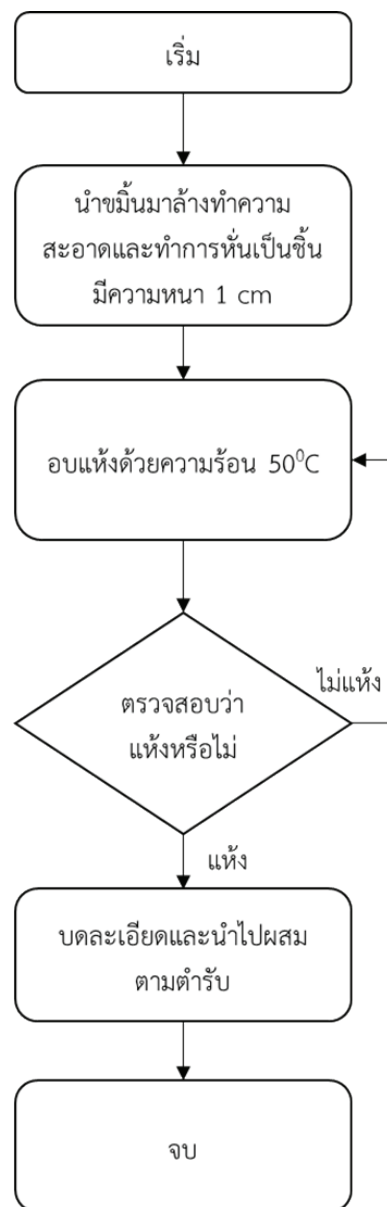
- กำหนดค่าสารสำคัญมาตรฐานของผงขมิ้น ที่ 1 mg/1 ml methanol
- วิเคราะห์ประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อ โดยกำหนดค่ามาตรฐานจุลินทรีย์ Aerobic plate count ไม่มากกว่า 5×10^4 CFU/g ค่า Yeasts และ Molds ไม่มากกว่า 5×10^2 CFU/g ต้องไม่พบ เชลล์โมเนลลา (*Salmonella spp.*) ใน 25 g หรือ 25 ml และไม่พบเอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*)¹⁶ ใน 1 กรัม หรือ 1 มิลลิลิตร

ผลการศึกษา

1. กระบวนการอบแห้งและกำจัดเชื้อในยาสมุนไพรขมิ้นผงในการผลิตยาแผนไทย

จากการศึกษากระบวนการอบแห้งและกำจัดเชื้อในยาสมุนไพรขมิ้นผงในการผลิตยาแผนไทยของกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษา พบว่ามีขั้นตอนกระบวนการเริ่มจาก 1.นำขมิ้นมาล้างทำความสะอาดและทำการหั่นเป็นชิ้นมีความหนา 1 cm 2.นำขมิ้นที่ผ่านการล้างทำความสะอาด

ไปอบแห้งด้วยความร้อน 50°C 3.นำไปบดละเอียดด้วยเครื่องบดแบบลูกกลิ้งและนำไปผสมตามสูตรตำรับต่อไป (ดังรูปที่ 1)



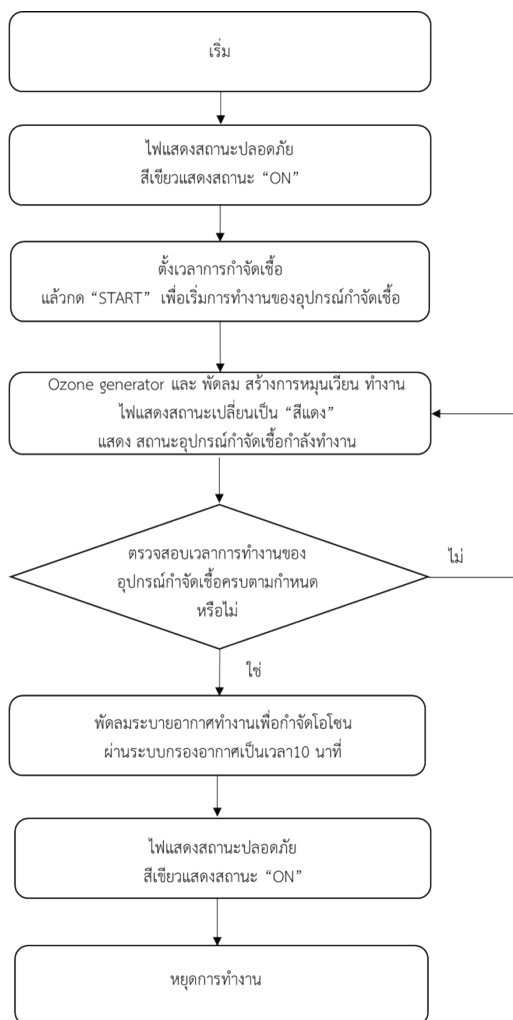
รูปที่ 1 กระบวนการอบและกำจัดเชื้อในยาสมุนไพรขมิ้นผงในการผลิตยาแผนไทย

2. อุปกรณ์ที่สร้างขึ้นในกระบวนการรอบโดยใช้โอโซนกำจัดเชื้อในยาสมุนไพรขมิ้นผงในการผลิตยาแผนไทย

สร้างอุปกรณ์ในกระบวนการการรอบโดยใช้โอโซนเพื่อการศึกษาในครั้งนี้ โดยอุปกรณ์ที่สร้างขึ้นคือ อุปกรณ์กำจัดเชื้อด้วยโอโซนซึ่งเป็นอุปกรณ์กำจัดเชื้อในยาสมุนไพรขมิ้นผงด้วยโอโซนปริมาณ 60 g/h ในพื้นที่ปิดที่ทำหน้าที่กำจัดเชื้อที่ปนเปื้อนในขมิ้นผง (ดังรูปที่ 2) สำหรับกระบวนการรอบโดยใช้โอโซนและกำจัดเชื้อเริ่มจาก 1.นำขมิ้นมาล้างทำความสะอาดและทำการหั่นเป็นชิ้นมีความหนา 1 เซนติเมตร 2.นำขมิ้นที่ผ่านการล้างทำความสะอาดไปอบแห้งด้วยความร้อน 50°C 3.นำไปบดละเอียดด้วยเครื่องบดแบบลูกกลิ้ง 4.นำขมิ้นผงไปอบด้วยโอโซน 5.นำขมิ้นผงไปผสมตามสูตรตำรับต่อไป (ดังรูปที่ 3)



รูปที่ 2 อุปกรณ์ที่สร้างขึ้นในกระบวนการรอบโดยใช้โอโซนและกำจัดเชื้อในยาสมุนไพรขมิ้นผงในการผลิตยาแผนไทย



รูปที่ 3 กระบวนการอบแห้งและกำจัดเชื้อในยาสมุนไพรขมิ้นผงในการผลิตยาแผนไทย

เมื่อเปรียบเทียบขั้นตอนกระบวนการรอบทั้งสองวิธี (ดังตารางที่ 1) พบว่า ในกระบวนการการอบแห้งด้วยแสงแดด มีข้อดีของการอบแห้งคือสามารถทำให้สมุนไพรแห้ง และสามารถกำจัดเชื้อได้ด้วยไม่ส่งผลกระทบต่อสารสำคัญในขมิ้น แต่มีข้อจำกัดของการอบแห้ง คือประสิทธิภาพของกระบวนการอบแห้งขึ้นอยู่กับสภาพอากาศ เช่น

เมื่ออยู่ในฤดูฝน ก็จะทำให้กระบวนการนี้ไม่สามารถดำเนินการได้ ทางผู้ผลิตยาสมุนไพรจำเป็นต้องใช้กระบวนการให้ความร้อนด้วยไฟฟ้า ซึ่งอาจจะส่งผลต่อสารสำคัญในขมิ้น

ส่วนกระบวนการหรือขั้นตอนกรรมวิธีการกำจัดเชื้อด้วยโอโซน พบว่า มีข้อดีของการกำจัดเชื้อด้วยโอโซน คือ สามารถทำได้ในระยะเวลาอันสั้น

และมีประสิทธิภาพ เมื่อเทียบกับการกำจัดเชื้อด้วยแสงแดดธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดของการกำจัดเชื้อด้วยโอโซนคือ โอโซนมีความสามารถในการกำจัดเชื้อบริเวณพื้นผิวเท่านั้น ไม่มีความสามารถในการทะลุทะลวงได้ ดังนั้นสมุนไพรที่จะนำมากำจัดเชื้อด้วยโอโซนควรจะเป็นลักษณะเป็นชิ้นเล็ก ๆ

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบขั้นตอนกระบวนการกำจัดเชื้อแบบอบแห้งและการใช้โอโซน

ขั้นตอนกระบวนการกำจัดเชื้อ	ระยะเวลาที่ใช้	ข้อดี	ข้อจำกัด
การอบแห้งด้วยแสงธรรมชาติ	ไม่สามารถระบุได้ขึ้นกับสภาพอากาศ ซึ่งในทางปฏิบัติจะทำการอบด้วยความร้อนจนแห้ง	สามารถดำเนินการอบแห้งพร้อมกับการกำจัดเชื้อได้พร้อมกัน	- ใช้เวลานาน ไม่สามารถทำนายได้ - ทั้งนี้ขึ้นกับสภาพอากาศ
การใช้โอโซน (ในกรณีที่วัตถุดิบได้รับการอบแห้งมาแล้ว)	120 นาที	สามารถกำจัดเชื้อปนเปื้อนได้ในระยะเวลาที่สั้นกว่า	- สามารถกำจัดได้เฉพาะบริเวณพื้นผิว ไม่สามารถทะลุทะลวงได้ - ไม่สามารถในการใช้ออบแห้งได้ - สามารถกำจัดเชื้อได้เฉพาะพื้นผิว ไม่สามารถทะลุทะลวงได้

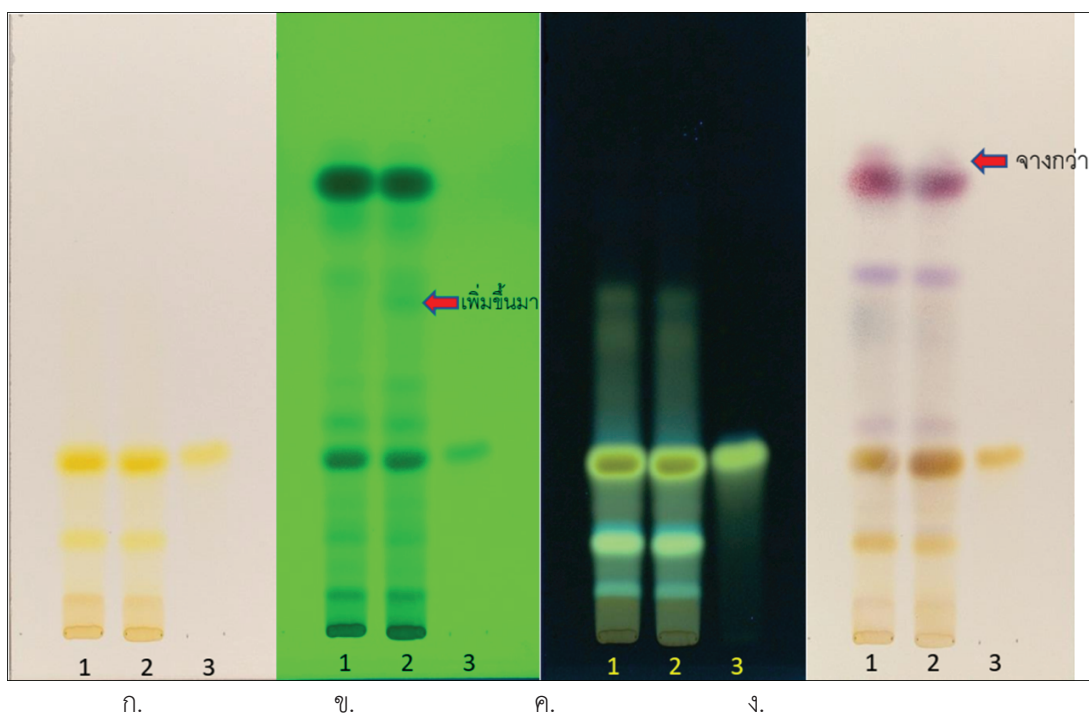
3. ผลทดสอบการให้สารสำคัญและประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อในขมิ้น

3.1 การให้สารสำคัญหรือการเปลี่ยนแปลงของสาร *Curcumin*

ผลการทดสอบการให้สารสำคัญของสาร *Curcumin* และผลการกระทบที่อาจจะเกิดขึ้นต่อสารสำคัญที่ใช้เป็นตัวยาโดยวิธีทางเภสัชศาสตร์ด้วยวิธี Thin-layer Chromatography ในกลุ่มที่ 1 ตัวอย่างควบคุม (ตัวอย่างขมิ้นผงที่ได้รับการกำจัดเชื้อด้วยความร้อน 50°C) กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลอง (ตัวอย่างขมิ้นผงที่ได้รับการกำจัดเชื้อด้วยโอโซน) และกลุ่มที่ 3 *Curcumin* (Standard) ซึ่งถูกนำมาใช้ในการอ้างอิง โดยทดสอบในสถานะที่แตกต่างกัน 4 สถานะ ได้แก่ ก.การสังเกตภายใต้แสงปกติ ข.การสังเกตภายใต้แสง UV 254 nm ค.การสังเกต

ภายใต้แสง UV 366 nm และ ง.การสเปรย์ด้วย Vanillin-sulfuric acid Test solution เพื่อทำการเปรียบเทียบการมีอยู่ของสาร *Curcumin* ในสถานะที่แตกต่างกัน พบว่ากระบวนการกำจัดเชื้อในขมิ้นทั้ง 2 วิธีไม่ส่งผลต่อปริมาณสาร *Curcumin* เมื่อเปรียบเทียบกับ standard

อย่างไรก็ตามพบว่ามีเปลี่ยนแปลงของสารบางตัวที่มีการเพิ่มขึ้นและลดลงซึ่งไม่สามารถระบุได้ด้วยวิธี Thin-layer Chromatography (ดังรูปที่ 4) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการทดสอบในสถานะที่ 2 (รูปที่ 4 ข.) จะพบสารบางตัวที่เพิ่มขึ้นและในการทดสอบในสถานะที่ 4 (รูปที่ 4 ง.) มีสารบางตัวที่ลดลง ในตัวอย่างกลุ่มที่ใช้โอโซนในการกำจัดเชื้อ



รูปที่ 4 ผลทดสอบสาร Curcumin ในขมิ้นผงด้วยวิธี Thin-layer Chromatography ในสถานะที่แตกต่างกัน

3.2 ประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อ

ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อโดยการวัดปริมาณ *Escherichia coli* ด้วยวิธี AOAC(2019) 991.14¹² ในตัวอย่างกลุ่มที่ 1 ตัวอย่างควบคุม และกลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลอง พบว่ามีค่า <10 CFU/g ในตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนด¹⁶

เมื่อทดสอบการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อโดยการวัดปริมาณ *Salmonella spp.* ด้วยวิธี ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020(E)¹³ ในกลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม พบว่าไม่สามารถตรวจวัดได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ให้ความสำคัญในส่วนประกอบของเชื้อปนเปื้อนในส่วนที่วัดได้ด้วย

Aerobic Plate Count ด้วยวิธี FDA BAM online 2001 (Chapter 3)¹¹ ผลการทดสอบพบว่า ในตัวอย่างกลุ่มที่ 1 ตัวอย่างควบคุม และกลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลอง มีค่า Aerobic Plate Count 4.3×10^2 CFU/g และ <250 EAPC CFU/g ตามลำดับ 11 ในขณะที่ผลการทดสอบ Yeasts และ Molds ด้วยวิธี FDA BAM online 2001 (Chapter 18)¹⁴ พบว่า ในตัวอย่างกลุ่มที่ 1 ตัวอย่างควบคุม และกลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลอง มีระดับของ Yeasts และ Molds อยู่ที่ 1.4×10^2 CFU/g และ <10 CFU/g ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนด¹⁶ (ดังตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อของไขมันผงในกลุ่มตัวอย่างแบบอบแห้งและโอโซน

รายการทดสอบ	ตัวอย่างอบแห้ง	ตัวอย่างโอโซน	ค่ามาตรฐาน
Aerobic Plate Count	4.3×10^2 CFU/g	<250 EAPC CFU/g	ไม่มากกว่า 5×10^4 CFU/g
<i>Escherichia coli</i>	<10 CFU/g	<10 CFU/g	ไม่พบ <i>Escherichia coli</i> ใน 1 กรัม หรือ 1 มิลลิลิตร
<i>Salmonella spp</i>	Not detected	Not detected	ไม่พบ <i>Salmonella spp.</i> ใน 25 กรัม หรือ 25 มิลลิลิตร
Yeasts และ Molds	1.4×10^2 CFU/g	<10 CFU/g	ไม่มากกว่า 5×10^2 CFU/g

อภิปรายผล

งานวิจัยนี้ได้เริ่มต้นจากการวิเคราะห์ไขมันเนื่องจากไขมันเป็นสมุนไพรพื้นฐานที่ใช้เป็นส่วนผสมในยาหลายตำรับ จากผลการวิเคราะห์ Aerobic Plate Count และ Yeasts และ Molds พบต่ำกว่ามาตรฐานความปลอดภัยที่กำหนดในประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง เกณฑ์มาตรฐานค่าความบริสุทธิ์หรือคุณลักษณะอื่นอันมีความสำคัญต่อคุณภาพสำหรับตำรับผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ขึ้นทะเบียน แจ้งรายละเอียด หรือจดแจ้ง พ.ศ. 2564 เนื่องจากโอโซนมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดเชื้อในระยะเวลาที่สั้นกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกำจัดเชื้อปนเปื้อนด้วยวิธีอบด้วยความร้อนธรรมชาติ จากผลการทดลองที่พบว่าไขมันผงที่ผ่านการอบด้วยโอโซนพบว่ามีระดับของจุลินทรีย์ที่ต่ำกว่าวิธีอบด้วยความร้อน ซึ่งวิธีอบด้วยความร้อนมีระดับจุลินทรีย์ 4.3×10^2 CFU/g ในขณะที่ไขมันผงที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยโอโซนมีระดับจุลินทรีย์ <250EAPC CFU/g จากผลการวิเคราะห์พบว่าระดับของจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ได้รับการกำจัดเชื้อด้วยโอโซนมีระดับเชื้อปนเปื้อนลดลงประมาณ 100 เท่า สอดคล้องหรือแตกต่างจากงานวิจัยของ Torlak E¹ ซึ่งมีการใช้โอโซนในการกำจัดเชื้อ *Salmonella* และ microbial ในออริกานัมแห้ง รวมถึง Ouf SA² ที่ได้นำโอโซนไปใช้ในการต้าน

การปนเปื้อนของเชื้อราในสมุนไพรตากแห้ง ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อปนเปื้อนต่าง ๆ บนสมุนไพรแห้งของโอโซน

นอกจากนั้น ไขมันผงที่ผ่านการอบด้วยโอโซนที่พบว่ามีระดับของยีสต์และเชื้อราที่ต่ำกว่าวิธีอบด้วยความร้อน ซึ่งวิธีอบด้วยความร้อน มีระดับยีสต์และเชื้อรา 1.4×10^2 CFU/g ในขณะที่ไขมันผงที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยโอโซนมีระดับยีสต์และเชื้อรา <10 CFU/g จากผลการวิเคราะห์ระดับยีสต์และเชื้อรา พบว่าระดับยีสต์และเชื้อรา ในกลุ่มที่ได้รับการกำจัดเชื้อด้วยโอโซนมีระดับเชื้อปนเปื้อนลดลงประมาณ 100 เท่า สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ระดับจุลินทรีย์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้โอโซนมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับกำจัดเชื้อปนเปื้อนโดยใช้ความร้อนจากธรรมชาติ

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าผลการวิเคราะห์สามารถบอกได้ว่าไม่มีผลกระทบกับระดับ Curcumin ในตัวอย่างไขมันผง แต่ก็ยังพบการเปลี่ยนแปลงของสารในไขมันผง โดยที่มีการเพิ่มขึ้นและลดลงของสารบางตัว โดยสังเกตได้จากความเข้มของแถบสีที่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งการใช้ Thin-layer Chromatography ไม่สามารถระบุได้ว่าสารที่เกิดการเปลี่ยนแปลงคือสารอะไรที่อยู่ในไขมันผง

เนื่องจากในขั้นตอนการวิเคราะห์ได้ทำการใช้ *Curcumin* standard เพียงชนิดเดียวจึงไม่สามารถวิเคราะห์สารชนิดอื่น ๆ ได้ ดังนั้นจึงต้องทำการวิจัยเชิงลึกเพื่อทำการค้นหาโดยใช้วิธี High performance liquid Chromatography เพื่อทำการวิเคราะห์หาสารที่ไม่ทราบค่าในเชิงลึกต่อไป

เมื่อพิจารณาถึงข้อจำกัดของกระบวนการแบบดั้งเดิมที่พบว่าในฤดูฝนหรือในกรณีที่ไม่มีการแสดงแดดจะทำให้เวลาในกระบวนการอบแห้งเพิ่มขึ้นและไม่สามารถที่จะกำหนดได้ และในกรณีที่ฝนตกต่อเนื่องส่งผลให้ไม่มีแสงแดดและมีความชื้นเกิดขึ้นทำให้ทางผู้ประกอบการจำเป็นต้องใช้กระบวนการกำจัดเชื้อด้วยความร้อนที่ใช้ไฟฟ้าหรือแก๊สธรรมชาติ ทำให้เป็นการสิ้นเปลืองเป็นอย่างมาก นอกจากนั้นยังต้องควบคุมความร้อนให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมที่จะไปส่งผลกระทบต่อสารสำคัญในสมุนไพร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้โอโซน จะมีข้อได้เปรียบได้แก่สามารถกำจัดเชื้อปนเปื้อนได้ในระยะเวลาที่สั้นกว่ากระบวนการกำจัดเชื้อด้วยความร้อนที่สามารถดำเนินการได้ตลอดเวลาโดยไม่มีผลกระทบจากฤดูกาล ส่งผลให้ผู้ผลิตสามารถเพิ่มกำลังการผลิตยาสมุนไพรได้มากขึ้นโดยไม่ส่งผลกระทบต่อสารสำคัญในตัวสมุนไพร

สรุปผล

การใช้กระบวนการกำจัดเชื้อด้วยโอโซนในหมักหมมมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อปนเปื้อนที่สูงกว่าในระยะเวลาที่สั้นกว่ากระบวนการกำจัดเชื้อแบบดั้งเดิม โดยสามารถลดปริมาณเชื้อปนเปื้อนได้ประมาณ 100 เท่า โดยที่ไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณสารสำคัญ *Curcumin* อีกด้วย นอกจากนั้น

กระบวนการกำจัดเชื้อด้วยโอโซน สามารถควบคุมปัจจัยด้านฤดูกาล และ ระยะเวลาในการกำจัดเชื้อได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการกำจัดเชื้อแบบดั้งเดิม ส่งผลให้สามารถควบคุมคุณภาพของยาแผนไทยให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานได้

ข้อเสนอแนะ

1. กระบวนการกำจัดเชื้อด้วยโอโซนในการผลิตสมุนไพรจากหมักหมมสามารถไปใช้กับการกำจัดเชื้อในสมุนไพรอื่น ๆ ได้ในรูปแบบของสมุนไพรที่มีลักษณะเป็นชิ้นขนาดเล็กเพื่อทำให้เกิดพื้นที่ผิวสัมผัสมาก ๆ เนื่องจากโอโซนมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อในบริเวณพื้นผิวเท่านั้น ไม่สามารถทะลุทะลวงได้

2. ควรวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของโอโซนและระยะเวลาในการกำจัดเชื้อที่เหมาะสมในกระบวนการกำจัดเชื้อ เพื่อใช้ในการกำจัดเชื้อสมุนไพรชนิดต่าง ๆ และ สร้างสภาพแวดล้อมของระบบมีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดเชื้อสำหรับสมุนไพรชนิดต่าง ๆ

3. ควรวิจัยเชิงลึกเพื่อทำการค้นหาโดยใช้วิธี High performance liquid Chromatography เพื่อทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารในหมักหมมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยโครงการวิจัยเงินรายได้มหาวิทยาลัยทักษิณ กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ประเภททุนพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566

เอกสารอ้างอิง

1. Torlak E, Sert D, Ulca P. Efficacy of gaseous ozone against Salmonella and microbial population on dried oregano. *Int J Food Microbiol* 2013;165(3):276–80.
2. Ouf SA, Ali EM. Does the treatment of dried herbs with ozone as a fungal decontaminating agent affect the active constituents?. *Environ Pollut* 2021;277:116715.
3. El Darra N, Xie F, Kamble P, Khan Z, Watson I. Decontamination of Escherichia coli on dried onion flakes and black pepper using Infra-red, ultraviolet and ozone hurdle technologies. *Heliyon* 2021;7(6):e07259.
4. Sheng L, Wang L. Approaches for a more microbiologically and chemically safe dried fruit supply chain. *Curr Opin Biotechnol* 2023;80:102912.
5. Bigi F, Maurizzi E, Quartieri A, De Leo R, Gullo M, Pulvirenti A. Non-thermal techniques and the “hurdle” approach: How is food technology evolving?. *Trends Food Sci Technol*. 2023 Feb;132:11–39.
6. Sivaranjani S, Prasath VA, Pandiselvam R, Kothakota A, Mousavi Khaneghah A. Recent advances in applications of ozone in the cereal industry. *LWT* 2021;146:111412.
7. Afsah-Hejri L, Hajeb P, Ehsani RJ. Application of ozone for degradation of mycotoxins in food: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2020;19(4):1777–808.
8. Dolci P, Ingegno BL, Mangia E, Ghirardello D, Zaquini L, Costarelli S, et al. Electrolyzed water and gaseous ozone application for the control of microbiological and insect contamination in dried lemon balm: Hygienic and quality aspects. *Food Control* 2022;142:109242.
9. Ingegno BL, Tavella L. Ozone gas treatment against three main pests of stored products by combination of different application parameters. *J Stored Prod Res* 2022;95:101902.
10. Sudheer S, Yeoh WK, Manickam S, Ali A. Effect of ozone gas as an elicitor to enhance the bioactive compounds in Ganoderma lucidum. *Postharvest Biol Technol* 2016;117:81–8.
11. Bacteriological Analytical Manual (BAM) [Internet]. [cited 2023 Apr 2]. Bacteriological Analytical Manual (BAM). Available from: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>
12. AOAC 991.14-1994(2002), Coliform and escherichia coli counts in [Internet].

2015. [cited 2023 Apr 2]. Available from: http://www.aoacofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&products_id=849
13. ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020, Microbiology of the food chain Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* [Internet]. 2017. [cited 2023 Apr 2]. Available from: <https://www.iso.org/standard/76671.html#lifecycle>
14. BAM Chapter 18: Yeasts, Molds and Mycotoxins [Internet]. 2022. [cited 2023 Apr 2]. Available from: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins>
15. Czernicka L, Grzegorzczak A, Marzec Z, Antosiewicz B, Malm A, Kukula-Koch W. Antimicrobial Potential of Single Metabolites of *Curcuma longa* Assessed in the Total Extract by Thin-Layer Chromatography-Based Bioautography and Image Analysis. *Int J Mol Sci* 2019 19;20(4):898.
16. กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2564 เรื่อง เกณฑ์มาตรฐานค่าความบริสุทธิ์ หรือคุณลักษณะอื่นอันมีความสำคัญต่อคุณภาพสำหรับตำรับผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ขึ้นทะเบียน แจ้งรายละเอียด หรือจดแจ้ง พ.ศ. 2564. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 138, ตอนพิเศษ 294 ง (ลงวันที่ 1 ธันวาคม 2564).

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
Food and Drug Administrationวารสารอาหารและยา
ปีที่ 31 ฉบับที่ 1 (2567): มกราคม – เมษายน
<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/index>THAI FOOD AND DRUG JOURNAL
Vol. 31 No. 1 (2024): January – April

การตรวจสอบความเป็นพิษเฉพาะจากที่อกซินไอกรนที่หลงเหลือในวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์เป็นองค์ประกอบ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงของเซลล์รังไข่หนูแฮมสเตอร์จีน

อภิชัย ศุภสารสาทร¹ สุภาภรณ์ ชุมพล¹ สุกัลยาณี ไชยมี¹ วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม¹ สุภาพร ภูมิอมร¹¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรีที่อยู่ติดต่อ: อภิชัย ศุภสารสาทร สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
apichai.s@dmisc.mail.go.th

Specific Toxicity Testing of Residual Pertussis Toxin in Acellular Pertussis Vaccine Using Chinese Hamster Ovary Cells

Apichai Supasansatorn¹, Supaporn Chumpol¹, Sukanlayanee Chaimee¹, Wereyamarst Jaroenkunathum¹,
Supaporn Phumiamorn¹¹Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi, Thailand**Contact address:** Apichai Supasansatorn, Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Mueang District, Nonthaburi, 11000, Thailand, apichai.s@dmisc.mail.go.th**Received:** 8 August 2022, **Revised:** 6 March 2024, **Accepted:** 15 March 2024

Abstract

Background: Pertussis is prevented by a combined acellular pertussis vaccine that contains Pertussis Toxoid (PTs) and Filamentous Haemagglutinin (FHA) as the main constituents. PTd is an inactivated Pertussis toxin (PT). The specific toxicity test of residual PT remaining in the vaccine must be controlled in order to meet the standard requirements to ensure the safety of vaccines. Some traditional methods were tested toxicity in mice which caused animal suffering. Therefore, the alternative CHO cell assay was developed for replacement of animal testing by In vitro assay following 3Rs concept. CHO-K1 cells had a specific response to PT. Then, the exposure of residual PT caused CHO-K1 cells morphological changes to rosette their shapes.

Objectives: To develop and use this as the alternative method for the determination of specific toxicity of PT in the combined vaccine which contains acellular pertussis by Chinese Hamster Ovary (CHO) cell assay by monitoring residual PT in finished product.

Methods: A validation method study of specific toxicity of PT in combined vaccine which contains acellular pertussis by CHO cell assay was conducted. The qualitative assay was examined in two parameters of specificity and limits of detection which was based on the international ICH guideline. One sample of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, acellular pertussis combined vaccine (Tdap) was used to study optimal conditions and examined the validity of the method.

Results: The results of validation with pertussis toxin (JN1H-5, NIBSC) were proved that the methods were specific to pertussis toxin that showed rosette-shaped clusters of CHO cells. The lowest limit of detection of pertussis toxin was 0.0015 IU/mL. One sample of Diphtheria -Tetanus - acellular Pertussis Vaccine combined vaccine was removed adjuvant and was tested by CHO cell assay. The negative presented results indicated that the vaccine sample absented residual pertussis toxin.

Conclusion: This assay was appropriate to be adapted as a standard method for specific toxicity based on residual pertussis toxin in a combined vaccine containing acellular pertussis in both local and imported vaccine products.

Keywords: acellular pertussis vaccine, pertussis toxin, specific toxicity, Chinese Hamster Ovary (CHO) cell

บทคัดย่อ

ความสำคัญ: โรคไอกรนสามารถป้องกันได้ด้วยวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์ (Acellular pertussis: aP) ที่มี Pertussis toxoid (PTd) และ Filamentous Haemagglutinin (FHA) เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่ง PTd คือท็อกซอยด์ที่ได้มาจากการทำให้ Pertussis toxin (PT) หมดความเป็นพิษลง เพื่อให้มั่นใจในความปลอดภัยของวัคซีน จึงต้องควบคุมระดับความเป็นพิษจาก PT ที่อาจหลงเหลืออยู่ในวัคซีน ให้ตามข้อกำหนดมาตรฐาน โดยการทดสอบ Specific toxicity ที่ใช้หนูถีบจักรเป็นสัตว์ทดลอง (*In vivo*) แต่ก่อให้เกิดความทรมานต่อสัตว์ทดลอง ดังนั้นวิธีทางเลือก Chinese Hamster Ovary (CHO) cell assay จึงได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อทดแทนการใช้สัตว์ทดลองตามหลักการ 3R โดยเซลล์ CHO-K1 มีความจำเพาะต่อ PT หากพบ PT หลงเหลืออยู่ ส่งผลทำให้เซลล์ CHO-K1 เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเกาะกลุ่มคล้ายรูปดอกกุหลาบ

วัตถุประสงค์: เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษจากท็อกซินไอกรนในวัคซีนรวมสำเร็จรูปที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์เป็นองค์ประกอบโดยใช้วิธีทางเลือก CHO cell assay สำหรับใช้ตรวจติดตามท็อกซินไอกรนที่อาจหลงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์วัคซีน

วิธีการวิจัย: ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ความเป็นพิษเฉพาะจากท็อกซินไอกรนที่หลงเหลือในวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์เป็นองค์ประกอบ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง CHO cells ซึ่งเป็นวิธีตรวจสอบในเชิงคุณภาพจึงดำเนินการศึกษาความถูกต้องของวิธีใน 2 พารามิเตอร์ คือ การตรวจสอบความจำเพาะของวิธี และขีดจำกัดของการตรวจพบ โดยอ้างอิงตามข้อกำหนดสากล ICH guideline เพื่อศึกษาสถานะที่เหมาะสมและความถูกต้องของวิธี และดำเนินการทดสอบความเป็นพิษเฉพาะจากท็อกซินไอกรนที่หลงเหลือในวัคซีนรวม Tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, acellular pertussis vaccine (Tdap) จำนวน 1 ตัวอย่าง

ผลการศึกษา: ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีด้วยสารมาตรฐานท็อกซินไอกรน (JN1H-5, NIBSC) พบว่าวิธีมีความจำเพาะต่อท็อกซินไอกรน พบการเกาะกลุ่มของเซลล์เป็นรูปดอกกุหลาบอย่างชัดเจน จึงเป็นวิธีที่มีความจำเพาะ และขีดจำกัดของปริมาณ PT ต่ำสุดที่สามารถตรวจพบจากการอ่านผลการทดสอบ มีค่าเท่ากับ 0.0015 IU/mL และเมื่อนำวิธีมาใช้ทดสอบกับวัคซีนป้องกันโรคคอตีบ บาดทะยัก และไอกรนชนิดไร้เซลล์ จำนวน 1 ตัวอย่างที่กักตุนสำรองไว้เพื่อทดสอบพบว่าตัวอย่างให้ผลเป็นลบ แสดงว่าวัคซีนตัวอย่างไม่มีท็อกซินไอกรนหลงเหลือ

สรุป: วิธีการตรวจวิเคราะห์ความเป็นพิษเฉพาะจากที่อกซินไกรนที่หลงเหลือในวัคซีนรวมที่มีไกรนชนิดไร้เซลล์เป็นองค์ประกอบ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง CHO cell มีความจำเพาะเหมาะสมสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการดำเนินการตรวจวิเคราะห์ความเป็นพิษเฉพาะจากที่อกซินไกรนที่หลงเหลือในวัคซีนรวมที่มีไกรนชนิดไร้เซลล์ทั้งผลิตภัณฑ์วัคซีนภายในประเทศและนำเข้ามาจากต่างประเทศได้

คำสำคัญ: วัคซีนไกรนชนิดไร้เซลล์ ที่อกซินไกรน ความเป็นพิษเฉพาะ เซลล์เพาะเลี้ยง Chinese Hamster Ovary (CHO)

บทนำ

โรคไกรน (Pertussis) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Bordetella pertussis* ซึ่งก่อโรคในคนเท่านั้น โรคไกรนในเด็กโตและผู้ใหญ่ มักมีอาการไม่รุนแรง และแยกได้ยากจากการติดเชื้ออื่น ๆ ที่ทำให้มีอาการของระบบทางเดินหายใจ แต่ในเด็กเล็กอาการไกรจะรุนแรงจนหยุดหายใจ และมีอาการไอแบบ paroxysms (ไอเป็นชุด ๆ อย่างรุนแรง) อาการหายใจเข้ามีเสียงดัง (whooping) และจากข้อมูลรายงานผู้ป่วยสงสัยโรคคอตีบในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2560 พบว่าได้รับรายงานผู้ป่วยจำนวน 32 ราย อัตราป่วย 0.01 ต่อประชากรแสนคน โดยมีผู้ป่วยเสียชีวิต 1 ราย¹

วัคซีนไกรนผลิตจากแอนติเจนของเชื้อไกรนที่นำมาผลิตวัคซีน ได้แก่ Pertussis toxin (PT), Filamentous hemagglutinin (FHA), Pertactin (PRN) และ Fimbria agglutinin (FIM) ซึ่งวัคซีนมี 2 ชนิด ได้แก่ วัคซีนไกรนชนิดทั้งตัวเซลล์ (whole cell: wP) และวัคซีนไกรนชนิดไร้เซลล์ (acellular: aP) ซึ่งเป็นวัคซีนที่ผลิตจากส่วนสารสกัดเฉพาะบางส่วนของตัวเชื้อไกรน

ตั้งแต่ 2 ถึง 4 ส่วนประกอบที่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันโรคได้ โดยจะมี PT และ FHA เป็นส่วนประกอบหลัก และใช้ร่วมกับที่อกซอยด์ของเชื้อคอตีบและบาดทะยักเป็นวัคซีนรวมคอตีบ-บาดทะยัก-ไกรนชนิดไร้เซลล์ (Diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine: Tdap) ข้อดีของวัคซีนไกรนชนิดไร้เซลล์ (aP) อาการไม่พึงประสงค์จากการใช้วัคซีนน้อยกว่าวัคซีนชนิดทั้งเซลล์ (whole cell)¹

ในการผลิตวัคซีนต้องผ่านการตรวจสอบคุณภาพวัคซีนทางห้องปฏิบัติการจากผู้ผลิต และผ่านการทดสอบด้านความปลอดภัย (safety) การทดสอบด้านประสิทธิภาพ (efficacy) และการทดสอบด้านเคมี-กายภาพ (Physical-chemistry) และได้รับการอนุญาตขึ้นทะเบียนจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ทั้งนี้วัคซีนของแต่ละบริษัทจะมีความแตกต่างกัน ได้แก่ ความหลากหลายของสายพันธุ์ตัวเชื้อไกรน วิธีที่ใช้ในการผลิต วิธีการทำให้ PT หมดพิษ (detoxified) กลายเป็น Pertussis toxoid (PTxd) และปริมาณ PT และ

FHA ที่ใช้ผลิตวัคซีน ทำให้วัคซีนมีข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ต่างกัน (product-specification) ส่งผลต่อประสิทธิภาพและความปลอดภัยของวัคซีนที่ผู้บริโภครจะได้รับ การควบคุมคุณภาพวัคซีน

อย่างไรก็ตามการทดสอบด้านความปลอดภัยและประสิทธิภาพของวัคซีน จำเป็นต้องใช้สัตว์ทดลองเป็นจำนวนมากในการทดสอบต่อครั้งเพื่อการทดสอบความเป็นพิษ (Abnormal toxicity) ความเป็นพิษเฉพาะ (Specific toxicity) และความแรงหรือการทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Potency/Immunogenicity test) ของวัคซีน ดังนั้นการลดการใช้สัตว์ทดลองลงในการทดสอบผลิตภัณฑ์ เป็นเรื่องที่ควรดำเนินการให้สอดคล้องตามหลักนโยบาย 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement) ที่ ลด ละ เลิก การใช้สัตว์ทดลอง² ซึ่งการตรวจสอบความเป็นพิษเฉพาะจากท็อกซินไอกรนที่หลงเหลือในวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์เป็นองค์ประกอบ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง Chinese Hamster Ovary (CHO)⁴⁻⁵ เป็นการทดสอบที่สามารถนำมาปรับใช้แทนวิธีการทดสอบความเป็นพิษเฉพาะจากท็อกซินไอกรนชนิดไร้เซลล์ที่ใช้สัตว์ทดลอง โดยการตรวจสอบความเป็นพิษจากท็อกซินไอกรนในวัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์ โดยใช้เซลล์ CHO-K1 ที่ใช้ในการตรวจหา pertussis toxin (PT) ที่อาจหลงเหลืออยู่ใน purified pertussis bulk หลังจากผ่านกระบวนการทำให้หมดพิษ (detoxification) โดยองค์การอนามัยโลก³ กำหนดให้เป็นวิธีทดสอบ

ทางเลือกสำหรับติดตามความสม่ำเสมอของผลิตภัณฑ์ (in-house monitoring pertussis toxicity) แต่มีข้อจำกัดของวิธีคือ สารเสริมฤทธิ์ (Aluminium adjuvant) ในวัคซีนมีความเป็นพิษต่อเซลล์ CHO-K1 จึงเป็นที่มาในการพัฒนาวิธีตรวจสอบความเป็นพิษจากท็อกซินไอกรนที่ใช้ทดสอบในวัคซีน (final product) เพื่อใช้ทดแทนการทดสอบในสัตว์ทดลองตามหลัก 3Rs และนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานตรวจสอบความเป็นพิษจากท็อกซินไอกรนในผลิตภัณฑ์วัคซีนรวมสำเร็จรูปได้ โดยปัจจุบันยังไม่มี การนำมาใช้ทดสอบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัคซีนชนิดนี้ มีเพียงข้อมูลจากงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศเท่านั้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษจากท็อกซินไอกรนในวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์เป็นองค์ประกอบโดยใช้วิธีทางเลือก CHO cell assay
2. เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบคุณภาพด้านความปลอดภัยของวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์

ระเบียบวิธีวิจัย

วิธีการวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงทดลอง โดยศึกษาความถูกต้องของวิธีด้วยสารมาตรฐาน WHO International Standard Bordetella Pertussis Toxin

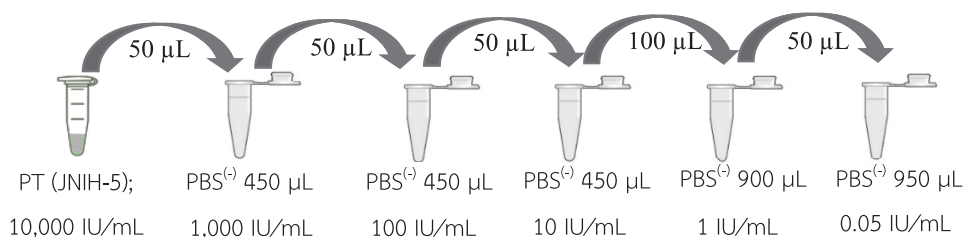
(LPF) PT 1st NIBSC Code: JN1H-5 และตัวอย่าง
วัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์ tetanus toxoid,
reduced diphtheria toxoid, acellular
pertussis vaccine (Tdap) เป็นองค์ประกอบ
จำนวน 1 ตัวอย่าง ใช้เซลล์เพาะเลี้ยง Chinese
Hamster Ovary (CHO-K1) ทำการตรวจสอบ
3 ซ้ำที่เป็นอิสระต่อกันใน 1 ชุดการทดสอบ

ขั้นตอนการศึกษา

1. นำตัวอย่างวัคซีนวัคซีนไอกรนชนิด
ไร้เซลล์ จำนวน 3 ขวด ขวดละ 0.5 mL รวมเป็น
ปริมาตร 1.5 mL มาผสมกันด้วย vortex mixer
จนเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenized vaccine)
ดูดวัคซีนปริมาตร 0.5 mL ใส่ใน Protein LoBind
tube ขนาด 1.5 mL เติม 10% W/V Solution of
tri-sodium citrate in 2xPBST ปริมาตร 0.5 mL
ลงไป ผสมกันด้วย vortex mixer บ่มที่อุณหภูมิ
37°C เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง นำออกมาผสมกัน
ด้วย vortex mixer แล้วจึงปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm
เป็นเวลา 2 นาที เก็บส่วนใส (supernatant)

ที่ได้ใน Protein Lo-bind tube ขนาด 1.5 mL
ทำการเจือจางความเข้มข้นของตัวอย่าง 1:10
ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ F-12K medium ที่เติม 10%
(w/v) FBS และ 1% Penicillin-Streptomycin
โดยเติม supernatant ปริมาตร 300 μ L ลงในอาหาร
เลี้ยงเซลล์ F-12K medium ปริมาตร 1,200 μ L
แบ่งตัวอย่างที่ผ่านการเจือจาง 1:10 ออกเป็น 2 ส่วน
คือ Unspiked และ Spiked sample โดย
Unspiked sample คือ ตัวอย่างวัคซีนที่ไม่เติม
PT ลงไป ขณะที่ Spiked sample คือ ตัวอย่าง
วัคซีนที่เติม PT ลงไป โดยเติม PT ความเข้มข้น
2 IU/mL ปริมาตร 16.25 μ L ลงในตัวอย่างวัคซีน
ปริมาตร 633.75 μ L ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเก็บ
ที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนการทดสอบ

2. เตรียมสารมาตรฐานเพื่อใช้เป็น positive
control ทำการเจือจาง WHO International
Standard Bordetella Pertussis Toxin (LPF)
PT 1st NIBSC Code: JN1H-5 ด้วย PBS(-) ให้ได้
ความเข้มข้นตั้งต้น 0.05 IU/mL ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แบบการเจือจาง WHO International Standard Bordetella pertussis toxin (LPF) PT 1st
NIBSC Code: JN1H-5 ด้วย PBS⁽⁻⁾

3. เตรียมเพลททดสอบ โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ F-12K medium ที่เติม 10% (w/v) FBS และ 1% Penicillin-Streptomycin ปริมาตร หลุมละ 100 μ l ลงในเพลท Sterile Tissue culture 96 wells plate, Flat bottom with Lid ในแถว B ถึง H ตั้งแต่คอลัมน์ที่ 1-9 เติมนสารมาตรฐาน (Positive control) ซึ่งเตรียมได้จากข้อ 10.3.1 ปริมาตร 200 μ l ลงในเพลททดสอบ ตำแหน่ง A1, A2 และ A3 (3 ซ้ำ) เติมน Spiked sample ซึ่งเตรียมได้จากข้อ 10.2.9 ปริมาตร 200 μ l ลงในเพลททดสอบตำแหน่ง A4, A5 และ A6 (3 ซ้ำ) เติมน Unspiked sample ซึ่งเตรียมได้จากข้อ 10.2.8 ปริมาตร 200 μ l ลงในเพลททดสอบตำแหน่ง A7, A8 และ A9 (3 ซ้ำ) เจือจางสารมาตรฐานด้วย F-12K medium ที่เติม 10% (w/v) FBS และ 1% Penicillin-Streptomycin โดยเจือจางแบบ 2-fold serial dilution เริ่มจากแถว A ถึง G ในคอลัมน์ที่ 1, 2 และ 3 จะได้ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 7 ค่า ได้แก่ 0.05, 0.025, 0.0125, 0.0063, 0.0031, 0.0016 และ 0.0008 IU/mL เจือจาง Spiked sample ด้วย F-12K medium ที่เติม 10% (w/v) FBS และ 1% Penicillin-Streptomycin โดยเจือจางแบบ 2-fold serial dilution เริ่มจากแถว A ถึง G ในคอลัมน์ที่ 4, 5 และ 6 จะได้ความเข้มข้นท้ายสุดที่ spiked PT ลงไป เท่ากับ 0.05, 0.025, 0.0125, 0.0063, 0.0031, 0.0016 และ 0.0008 IU/mL เจือจาง Unspiked sample ด้วย F-12K medium ที่เติม

10% (w/v) FBS และ 1% Penicillin-Streptomycin โดยเจือจางแบบ 2-fold serial dilution เริ่มจากแถว A ถึง G ในคอลัมน์ที่ 7, 8 และ 9 จะได้ระดับเจือจางความเข้มข้นของตัวอย่างวัคซีน 1:10-1:640

4. เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง นำเซลล์ CHO-K1 เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร F-12K ที่เติม 10% (w/v) FBS และ 1% Penicillin-Streptomycin บ่มในตู้บเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37°C โดยทำการ passage cell 1:10 แล้วนำไปบ่มในตู้บเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง ย่อยเซลล์ด้วย 0.05% Trypsin-EDTA solution นาน 1-2 นาทีแล้ว re-suspense ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ F-12K ที่เติม 10% (w/v) FBS และ 1% Penicillin-Streptomycin นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยวิธี Trypan blue exclusion ด้วย hemacytometer และปรับความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 2×10^4 cells/mL

5. ทดสอบ โดยเติมเซลล์ CHO-K1 ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 100 μ l ลงในเพลททดสอบ โดยเติมเซลล์ลงทุกหลุมในตำแหน่ง A1-A9 จนถึง H1-H9 และก่อนนำเพลทไปบ่มโดยตั้งทิ้งไว้เพื่อความสะดวกในการมองเห็นสัญญาณวิทยาของเซลล์ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำเพลททดสอบไปบ่มในตู้บเพาะเชื้อแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) อุณหภูมิ 37°C นาน 40-48 ชั่วโมง การอ่านผล เมื่อครบเวลา นำเพลททดสอบเคาะเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ และล้างเซลล์ 1 รอบ ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ F-12K medium ที่ไม่เติม

FBS แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ F-12K medium ที่ไม่เติม FBS ปริมาตร 200 ul ต่อหลุม แล้วจึงนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast ที่กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 10x เพื่อสังเกตลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยง CHO-K1 หากพบการเกาะกลุ่มของเซลล์ CHO-K1 เป็นรูปดอกกุหลาบมากกว่าหรือเท่ากับ 10 clustering ขึ้นไป ให้รายงานผลเป็นบวก (+) ในขณะที่หากไม่พบการเกาะกลุ่มของเซลล์ CHO-K1 หรือพบการเกาะกลุ่มของเซลล์ CHO-K1 เป็นรูปดอกกุหลาบน้อยกว่าหรือเท่ากับ 9 clustering ให้รายงานผลเป็นลบ (-)

6. ศึกษาความถูกต้องของวิธี (Validation method)⁴ โดยการตรวจสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity) นำ WHO 1st International standard for pertussis toxin (JN1H-5) มาเตรียมให้มีความเข้มข้น 1 IU/mL มาเติม (spike) ลงในตัวอย่างวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์ (Tdap) โดยเติมลงในอัตราส่วน 1:10 (V/V) เพื่อทดสอบความจำเพาะของวิธีด้วยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์ CHO-K1 ทำการทดสอบพร้อมกับ Positive control (สารมาตรฐาน WHO 1st International standard for pertussis toxin; NIBSC code JN1H-5), Negative control (F-12K Medium) และตัวอย่างวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์ (Tdap) ที่ไม่มีการ spike PT โดยทำการตรวจสอบความจำเพาะของวิธีทดสอบ 3 ซ้ำ ใน 1 ชุดการทดสอบ และผู้อ่านผลการทดสอบจำนวน 3 คน โดยมีเกณฑ์การทดสอบดังนี้

1. Positive control (JN1H-5, NIBSC) ต้องตรวจพบการเกาะกลุ่มของเซลล์ CHO-K1 เป็นรูปดอกกุหลาบ (rosette shapes) มากกว่าหรือเท่ากับ 10 กลุ่ม ภายใน 1 หลุมทดสอบ แสดงว่าเป็นผลบวก (ต้องเกิดผลบวกเท่านั้น)

2. Negative control (อาหารเลี้ยงเซลล์) ต้องไม่พบการเกาะกลุ่มรูปดอกกุหลาบของเซลล์ CHO-K1 หากพบการเกาะกลุ่มต้องมีจำนวนน้อยกว่าหรือเท่ากับ 9 กลุ่ม ภายใน 1 หลุมทดสอบ แสดงว่าเป็นผลลบ (ต้องเกิดผลลบเท่านั้น)

3. ตัวอย่างวัคซีนที่มีการ spike pertussis toxin ต้องตรวจพบการเกาะกลุ่มของเซลล์ CHO-K1 เป็นรูปดอกกุหลาบ (rosette shapes) มากกว่าหรือเท่ากับ 10 กลุ่ม ภายใน 1 หลุมทดสอบ แสดงว่าเป็นผลบวก (ต้องเกิดผลบวกเท่านั้น)

4. ตัวอย่างวัคซีนที่ไม่มีการ spike ต้องไม่พบการเกาะกลุ่มของเซลล์ CHO-K1 รูปดอกกุหลาบ หากพบการเกาะกลุ่มต้องมีจำนวนน้อยกว่าหรือเท่ากับ 9 กลุ่ม ภายใน 1 หลุมทดสอบ แสดงว่าเป็นผลลบ (ต้องเกิดผลลบเท่านั้น)

และตรวจสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection) โดยนำ WHO 1st International standard for pertussis toxin เจือจางให้มีความเข้มข้นตั้งต้นเท่ากับ 4 IU/mL ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ F-12K แล้วทำการเจือจาง PT reference ต่อเนื่องแบบ Two-fold serial dilution ให้มีความเข้มข้น 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.0063, 0.0031, 0.0016, 0.0008, 0.0004 และ 0.0002 IU/mL และ

ทำการทดสอบเทียบกับ Negative control ซึ่งการตรวจสอบชี้แจงจำกัดของวิธีดำเนินการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง เป็นอิสระต่อกัน โดยทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และผู้อ่านผลการทดสอบจำนวน 3 คน อ่านค่า LOD จากระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ต้องตรวจพบการเกาะกลุ่มของเซลล์ CHO-K1 เป็นรูปคล้ายดอกกุหลาบ (rosette shapes) มากกว่าหรือเท่ากับ 10 กลุ่ม ภายใน 1 หลุมทดสอบ แสดงว่าผลเป็นบวก

ผลการศึกษา

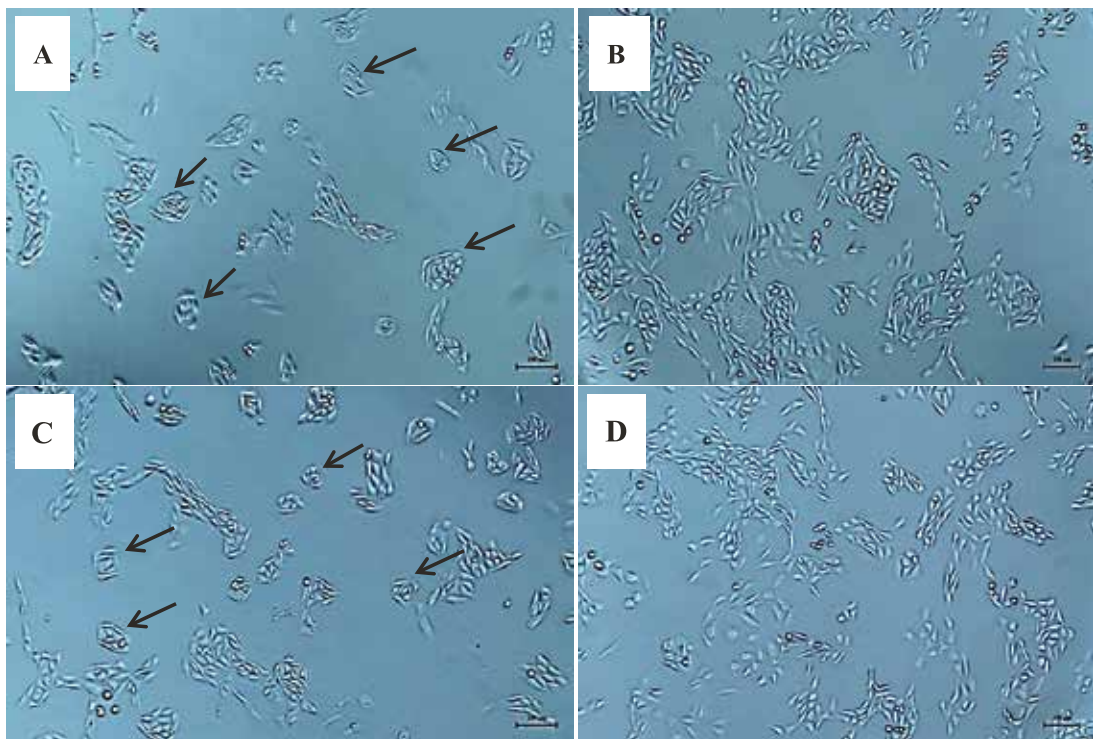
ผลการตรวจสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

พบว่า ผู้วิเคราะห์ทั้ง 3 ท่าน อ่านผลการทดสอบตรงกัน กล่าวคือ Positive control (JN1H-5, NIBSC) ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.05 IU/mL พบว่าผู้อ่านผลการทดสอบทั้ง 3 ท่าน ตรวจพบการเกาะกลุ่มของเซลล์เป็นรูปคล้าย

ดอกกุหลาบ (rosette shape) มากกว่า 10 กลุ่ม/หลุมทดสอบ จึงรายงานผลเป็นบวก (+) (ตารางที่ 1 และรูปที่ 2A) Negative control (อาหารเลี้ยงเซลล์) พบว่าผู้อ่านผลการทดสอบทั้ง 3 ท่าน ตรวจไม่พบการเกาะกลุ่มของเซลล์ CHO-K1 จึงรายงานผลเป็นลบ (-) (ตารางที่ 1 และรูปที่ 2B) ตัวอย่างวัคซีนวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์ (Tdap) ที่มีการ spike pertussis toxin ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.05 IU/mL พบว่าผู้อ่านผลการทดสอบทั้ง 3 ท่าน ตรวจพบการเกาะกลุ่มของเซลล์เป็นรูปคล้ายดอกกุหลาบ (rosette shape) มากกว่า 10 กลุ่ม/หลุมทดสอบ จึงรายงานผลเป็นบวก (+) (ตารางที่ 1 และรูปที่ 2C) ในขณะที่ตัวอย่างวัคซีน วัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์ (Tdap) ที่ไม่มีการ spike pertussis toxin พบว่าผู้อ่านผลการทดสอบทั้ง 3 ท่าน ตรวจไม่พบการเกาะกลุ่มของเซลล์ CHO-K1 จึงรายงานผลเป็นลบ (-) (ตารางที่ 1 และรูปที่ 2D)

ตารางที่ 1 ผลการศึกษาคำจำเพาะของวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษเฉพาะจากท็อกซินไอกรนที่หลงเหลือในวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์เป็นองค์ประกอบ ด้วยวิธี CHO cell assay

ผู้อ่านผลการทดสอบ	คนที่ 1			คนที่ 2			คนที่ 3		
ตัวอย่าง	การตรวจสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)								
จำนวนซ้ำ	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Positive control (0.05 IU/mL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Spiked PT in vaccine (0.05 IU/mL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Unspiked vaccine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Negative control	-	-	-	-	-	-	-	-	-



รูปที่ 2 ผลการศึกษาความจำเพาะของวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษเฉพาะจากท็อกซินไอกรนที่หลงเหลือในวัคซีนรวมที่มีไอกรนชนิดไร้เซลล์เป็นองค์ประกอบ ด้วยวิธี CHO cell assay โดยรูป A: Positive control (0.05 IU/mL), B: Negative control, C: Spiked PT in vaccine (0.05 IU/mL) และ D: Unspiked vaccine ลูกศรสีดำแสดงตัวอย่างตำแหน่งที่พบการเรียงตัวของเซลล์ CHO-K1 การเกาะกลุ่มเป็นรูปดอกกุหลาบ (rosette shape)

ผลการตรวจสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection)

จากการศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบปริมาณท็อกซินไอกรนด้วยวิธีทดสอบ CHO cell assay พบว่าผู้อ่านผลการทดสอบแต่ละท่านสังเกตเห็นการเกาะกลุ่มเป็นรูปดอกกุหลาบในแต่ละซ้ำของการทดสอบที่แตกต่างกัน ซึ่งมีการตรวจพบปริมาณ PT ต่ำสุดเท่ากับ 0.0008 IU/mL (รูปที่ 3) เมื่อคำนวณค่าเฉลี่ยจากทั้ง 3 ครั้งของการทดสอบพบว่ามีความเฉลี่ยเท่ากับ 0.0015 IU/mL (ตารางที่ 2)

โดยการทดสอบในแต่ละครั้งปริมาณ PT ต่ำสุดของการตรวจพบจะอยู่ในช่วง 0.0008–0.0031 IU/mL เนื่องจากการทดสอบ bioassay ที่ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงในการทดสอบ โดยสังเกตการตอบสนองของเซลล์ CHO-K1 ต่อสาร PT และการตอบสนองของเซลล์ในแต่ละครั้งของการทดสอบอาจแตกต่างกัน อีกทั้งผู้อ่านแต่ละท่านมีการสังเกตและนับจำนวนเซลล์รูปดอกกุหลาบที่อาจแตกต่างกันได้ แต่ต้องไม่แตกต่างกันเกินกว่า 2 ระดับการเจือจางความเข้มข้นตามเกณฑ์ที่ยอมรับ (WHO/IVB/11.11, 2013)³

ตารางที่ 2 ผลตรวจสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection) ทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง

ผู้อ่านผลการทดสอบ			คนที่ 1	คนที่ 2	คนที่ 3	ค่าเฉลี่ยในแต่ละครั้ง
ครั้งที่	วันที่	วันที่	ขีดจำกัดของการตรวจพบ PT			ของการทดสอบ
ทดสอบ	ทดสอบ	อ่านผล	(IU/mL)			(IU/mL)
1	08/02/64	10/02/64	0.0011	0.0023	0.0011	0.0015
2	02/03/64	04/03/64	0.0008	0.0011	0.0008	0.0009
3	15/03/64	17/03/64	0.0016	0.0026	0.0021	0.0021
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 ครั้งของการทดสอบ			0.0012	0.0020	0.0013	0.0015



รูปที่ 3 ผลการศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบปริมาณ pertussis toxin (JN1H-5, NIBSC) ด้วยวิธีทดสอบ CHO cell assay

อภิปรายผล

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบความเป็นพิษจากที่อกซินไอรอนที่หลงเหลือในวัคซีนรวมที่มีไอรอนชนิดไรเซิลเป็นองค์ประกอบ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง CHO-K1 ในการทดสอบ เป็นรายการทดสอบในเชิง semi-qualitative สังเกตผลการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ CHO-K1 หากมี PT หลงเหลือในวัคซีน เซลล์ CHO-K1 จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างเกาะกลุ่มคล้ายรูปดอกกุหลาบ (rosette shapes) ซึ่งจากทฤษฎีข้างต้น ทางคณะผู้วิจัยจึงดำเนินการศึกษาพัฒนาวิธีทดสอบเพื่อนำมาใช้ในการตรวจหา PT ที่อาจหลงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์วัคซีนสำเร็จรูป โดยหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ พบว่าจำนวนเซลล์ CHO-K1 ที่เหมาะสมในเพลท 96 หลุม คือ 2×10^4 cells/mL และระยะเวลาในการอ่านผลคือ 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยของ Isbrucker et al., 2016⁵ และ Wagner et al., 2017⁶ ซึ่งศึกษาวิธีทดสอบ CHO cell assay เพื่อนำมาใช้ในการตรวจหา PT ที่อาจหลงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์วัคซีนสำเร็จรูป พบว่าความเข้มข้นเซลล์ CHO-K1 ที่เหมาะสมเท่ากับ 2×10^4 cells/mL เนื่องจากจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมจะส่งผลให้สังเกตการเกิดเซลล์เกาะกลุ่มรูปดอกกุหลาบเมื่อตรวจพบ PT ได้ชัดเจน และระยะเวลาในการอ่านผลควรอ่านผลภายในช่วง 40-48 ชั่วโมง เนื่องจากหากบ่มเพลททดสอบเกินกว่า 48 ชั่วโมงทำให้สังเกตผลการเกาะกลุ่มของเซลล์เป็นรูปดอกกุหลาบยาก ซึ่งเป็นผลมาจากเซลล์สามารถเติบโตเพิ่มจำนวนมากขึ้นได้ตามปกติจนไม่สามารถสังเกตเห็นเซลล์

เกาะกลุ่มรูปดอกกุหลาบได้ ดังนั้นระยะเวลาในการอ่านผลที่เหมาะสมคือ 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาเดียวกันกับการศึกษาของงานวิจัยอื่น⁵⁻⁶ และเมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบคณะผู้วิจัยดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีใน 2 พารามิเตอร์ ได้แก่ การตรวจสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity) และขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection) ซึ่งดำเนินการตามข้อกำหนดมาตรฐาน⁵ ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมพบว่า และผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีด้วยสารมาตรฐานที่อกซินไอรอน (JN1H-5, NIBSC) พบว่าวิธีมีความจำเพาะต่อที่อกซินไอรอน พบการเกาะกลุ่มของเซลล์เป็นรูปดอกกุหลาบอย่างชัดเจน และขีดจำกัดความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบจากการอ่านผลได้เท่ากับ 0.0015 IU/ml และเมื่อนำวิธีมาใช้ทดสอบกับวัคซีนรวมที่มีไอรอนชนิดไรเซิลเป็นองค์ประกอบ พบว่าตัวอย่างให้ผลเป็นลบ แสดงว่าวัคซีนตัวอย่างไม่มีที่อกซินไอรอนหลงเหลืออยู่

สรุปผล

จากผลการศึกษาวิธีตรวจสอบความเป็นพิษจากที่อกซินไอรอนที่หลงเหลือในวัคซีนรวมที่มีไอรอนชนิดไรเซิลเป็นองค์ประกอบ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี CHO cell assay มีความจำเพาะของวิธี พบการเกาะกลุ่มของเซลล์เป็นรูปดอกกุหลาบชัดเจน และขีดจำกัดของการตรวจพบ PT ได้ต่ำสุด 0.0015 IU/ml วิธีนี้จึงเป็นวิธีทางเลือกเพื่อใช้ทดแทนการทดสอบในสัตว์ทดลองตามหลัก 3Rs และนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานตรวจความเป็นพิษจากที่อกซินไอรอนในผลิตภัณฑ์วัคซีนรวมได้

ข้อเสนอแนะ

วิธี CHO cell assay มีข้อจำกัดคือ สารเสริมฤทธิ์ที่มีอยู่ในวัคซีนรวมต้องมีปริมาณ ไม่มากกว่า 1.5 mg/dose จึงสามารถนำมาทดสอบ โดยวิธีนี้ได้ เนื่องจากสารเสริมฤทธิ์ในวัคซีนทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง CHO และ สารเสริมฤทธิ์ในวัคซีนแต่ละตำรับมีปริมาณไม่เท่ากัน จึงต้องมีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในแต่ละ ตำรับยาก่อนนำมาใช้ในการตรวจสอบความเป็นพิษ เฉพาะจากที่ออกซินไฮดรอกซีที่หลงเหลืออยู่ในวัคซีน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการสนับสนุนการดำเนินงาน ในทุกด้าน

เอกสารอ้างอิง

1. กองโรคป้องกันด้วยวัคซีน กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. ตำราวัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค ปี 2562. กรุงเทพฯ: เวิร์คพรีนติ้ง จำกัด; 2562.
2. Lilley E, Isbrucker R, Ragan I, Holmes A. Integrating 3Rs approaches in WHO guidelines for the batch release testing of biologicals. *Biologicals* 2021;(74): 24-7.
3. World Health Organization. Chapter IV. 2.2.1 Chinese Hamster Ovary (CHO) cells assay for pertussis toxin. In: *Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines*. Geneva; 2013. p. 192-7.
4. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use [Internet]. 2005. [cited 2020 Dec 18]:1-17. Available from: [https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2\(R1\).pdf](https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2(R1).pdf)
5. Isbrucker R, Daas A, Wagner L, Costanzo, A. Transferability study of CHO cell clustering assays for monitoring pertussis toxin activity in acellular pertussis vaccine. *Pharmeur Bio Sci Notes* 2016; 97-114.
6. Wagner LD, Corvette LJ, Ngundi MM, Burns DL. Towards replacement of the acellular pertussis vaccine safety test: Comparison of in vitro cytotoxic activity and in vivo activity in mice. *Vaccine* 2017;(35): 7160-5.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
Food and Drug Administrationวารสารอาหารและยา
ปีที่ 31 ฉบับที่ 1 (2567): มกราคม – เมษายน
<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/index>THAI FOOD AND DRUG JOURNAL
Vol. 31 No. 1 (2024): January – April

การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไขกาทหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA

สุภาภรณ์ ชุมพล¹ สุกัลยาณี ไชยมี¹ อภิชัย ศุภสารสาทร¹ สุภาพร ภูมิอมร¹¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี

ที่อยู่ติดต่อ: สุภาภรณ์ ชุมพล สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000 supaporn.c@dmsc.mail.go.th

Method Development and Validation of Identity Test for Meningococcal Conjugate Vaccine by Indirect ELISA

Supaporn Chumpol¹, Sukanlayanee Chaimee¹, Apichai Supasarnsathorn¹, Supaporn Phumiamorn¹¹Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Public Health, Nonthaburi, Thailand**Contact address:** Supaporn Chumpol, Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Mueang District, Nonthaburi, 11000, Thailand, supaporn.c@dmsc.mail.go.th**Received:** 2 December 2023, **Revised:** 14 March 2024, **Accepted:** 14 March 2024

Abstract

Background: An identity test is an important test that is performed on the meningococcal vaccine to verify its identity for quality control of the vaccine. The meningococcal conjugate vaccine consists of purified polysaccharides from *Neisseria meningitidis*, and each serogroup of meningococcal polysaccharide conjugates with a diphtheria toxoid carrier protein that corresponds to the registration dossier, so that vaccine recipients can be confident in the quality of the vaccine according to the product's standards. Therefore, the agency has expanded its ability to validate the identity of meningococcal vaccines. This testing has not been previously available for the quality control service of meningococcal conjugate vaccines.

Objective: To develop and validate method of the identity test of the meningococcal conjugate vaccine for use as standard methods in the laboratory.

Methods: The optimum conditions were determined by the specific reaction between the antigen and the antibody that was suitable for testing. In addition, the method validation was verified for two parameters, including specificity and intermediate precision.

Results: The results of the optimum conditions of the identity test for meningococcal conjugate vaccine by indirect ELISA showed that the optimum dilution level of each antibody has a specified dilution factor. The *N. meningitidis* antiserum group A was diluted at 1:10,000, while the *N. meningitidis* antiserum C, Y, and W135 groups were diluted at 1:5,000, respectively. In addition, this assay must be tested according to the designated plate templates so that it can be a valid analysis because each type of antigen has a specific antibody. Moreover, the result of the validation method was found that this method was highly specific to the reaction between antigen and antibody. These were calculated from the ratio values of each type of antigen, which presented the ratio values in the range of 17.69 - 40.78, while there were no specific reactions between antigen and antibody; the ratio values were very low, in the range of -0.02 - 4.95. Thus, the identity of each antigen can be determined, and there was no cross-reaction among the serogroups. The OD_{450 nm} value of the blank was less than 0.1, which met the acceptance criteria. The results of intermediate precision by two independent analysts showed that the results of both analysts met the criteria, and the average ratios of standard substances and vaccine samples were not significantly different between the two analysts at the 95% confidence interval.

Conclusions: The results of the study revealed that the identity test for the meningococcal conjugate vaccine using the indirect ELISA technique met the requirements for validation. Therefore, it is suitable for use as a standard method for submitting the registration of the meningococcal vaccine in Thailand.

Keywords: Identity test, meningococcal conjugate vaccine, method validation, ELISA technique

บทคัดย่อ

ความสำคัญ: การตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น เป็นรายการทดสอบหนึ่งที่มีความสำคัญในการควบคุมคุณภาพวัคซีน เพื่อยืนยันว่าวัคซีนประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรีย *Neisseria meningitidis* แต่ละซีโรกรุ๊ปเชื่อมต่อกับที่ออกซอยด์เชื้อคอตีบที่ใช้เป็นโปรตีนพาหะ ตรงตามซีโรกรุ๊ปที่ระบุในทะเบียนตำรับยาชีววัตถุ เพื่อสร้างความมั่นใจในคุณภาพของวัคซีนตามมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นหน่วยงานได้ขยายขีดความสามารถในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ซึ่งเป็นรายการทดสอบที่ยังไม่เคยให้บริการมาก่อนสำหรับการตรวจควบคุมคุณภาพวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาสถานะที่เหมาะสม และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการในการตรวจยืนยันเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต

วิธีการวิจัย: การศึกษาสถานะที่เหมาะสมของวิธีด้วยการศึกษาปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี และศึกษาการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์ หัวข้อความจำเพาะ และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

ผลการศึกษา: การศึกษาสถานะที่เหมาะสมของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA พบว่าระดับการเจือจางความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมต่อการทดสอบสำหรับแอนติเจนแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยสารแอนติบอดี *N. meningitidis* antiserum group A เตรียมที่ระดับเจือจางความเข้มข้น 1:10,000 ในขณะที่แอนติบอดี *N. meningitidis* antiserum group C, Y และ W135 เตรียมที่ระดับเจือจางความเข้มข้น 1:5,000 ตามลำดับ และวิธีการทดสอบนี้ต้องการทดสอบตามแม่แบบของเพลททดสอบที่กำหนดไว้ จึงสามารถตรวจวิเคราะห์เอกลักษณ์ของวัคซีนได้อย่างถูกต้อง เนื่องจากแอนติเจนแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อแอนติบอดี และผลการศึกษาความถูกต้องของวิธีนี้ พบว่าวิธีมีความจำเพาะสูง โดยคำนวณจากค่า Ratio ของแอนติเจนแต่ละชนิด ซึ่งมีค่า Ratio อยู่ในช่วง 17.69 – 40.78 ในขณะที่หากไม่เกิดปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ค่า Ratio มีค่าน้อยมากอยู่ในช่วง -0.02 – 4.95 จึงสามารถระบุเอกลักษณ์ของแอนติเจนแต่ละชนิดได้อย่างจำเพาะ โดยไม่มีการเกิด cross reaction ข้ามซีโรกรุ๊ปกัน และค่า OD_{450 nm} ของ blank ในเพลททดสอบมีค่าน้อยกว่า 0.1 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด และผลการศึกษาความเที่ยงของวิธี โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ที่เป็นอิสระต่อกัน พบว่าผลการทดสอบทั้ง 2 คนเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด และค่าเฉลี่ย Ratio ของสารมาตรฐานและตัวอย่างวัคซีนจากการทดสอบของนักวิเคราะห์ทั้ง 2 คน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สรุป: การศึกษานี้พบว่าวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์กำหนด ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับนำวิธีมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้ประกอบการขอขึ้นทะเบียนตำรับยาชีววัตถุจำหน่ายในประเทศ

คำสำคัญ: การตรวจสอบเอกลักษณ์ วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี เทคนิค Indirect ELISA

บทนำ

โรคไข้กาฬหลังแอ่นเกิดจากเชื้อ *Neisseria meningitidis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรัมลบ รูปร่างกลม คล้ายเม็ดถั่ว อยู่กันเป็นคู่ ๆ สามารถแพร่กระจายได้ทางการไอ จาม การสัมผัสกับน้ำมูก น้ำลาย และมักพบในสถานที่ที่คนอยู่รวมกันหนาแน่น และมีสุขาภิบาลสิ่งแวดล้อมไม่ถูกสุขลักษณะ¹ เชื้อ *N. meningitidis* ถูกจำแนกตามโพลีแซคคาไรด์แคปซูล อย่างน้อย 13 ซีโรกรุ๊ป ได้แก่ A, B, C, E, X, Y, Z, W, H, I, K และ L¹ โดยซีโรกรุ๊ปสำคัญในการก่อโรคในคนมี 6 ซีโรกรุ๊ป คือ ซีโรกรุ๊ป A, B, C, W, X และ Y2 วิธีการป้องกันโรคทำได้โดยการฉีดวัคซีนเพื่อสร้างภูมิคุ้มกัน ซึ่งวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นมีความสำคัญมากสำหรับผู้ที่ต้องเดินทางไปยังต่างประเทศในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคเป็นประจำ โดยผู้ที่จะเดินทางควรได้รับการฉีดวัคซีนก่อนการเดินทาง 7-10 วัน³

วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ที่ใช้ในปัจจุบันผลิตมาจากส่วนโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรีย *N. meningitidis* โดยวัคซีนป้องกันโรคป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นมี 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดโพลีแซคคาไรด์และชนิดคอนจูเกต แต่ปัจจุบัน

มีการขึ้นทะเบียนเฉพาะวัคซีนชนิดคอนจูเกต เนื่องจากสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยผ่านระบบ T cell dependent เกิดการตอบสนองได้ดีในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 2 ปี และสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันเมื่อมีการฉีดซ้ำได้⁴ วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นที่มีจำหน่ายในประเทศไทยมีองค์ประกอบของแอนติเจนจากเชื้อ *N. meningitidis* จำนวน 4 ซีโรกรุ๊ป คือ A, C, Y และ W135 จับกับท็อกซอยด์ของเชื้อคอตีบซึ่งใช้เป็นโปรตีนพาหะ และเพื่อให้ผู้ได้รับวัคซีนมีความมั่นใจในความปลอดภัย และประสิทธิภาพ จึงมีความจำเป็นต้องตรวจสอบคุณภาพให้มีความปลอดภัย และประสิทธิภาพในการป้องกันโรค การตรวจสอบคุณภาพของวัคซีนสามารถตรวจสอบโดยใช้วิธีทางด้านชีวภาพ กายภาพ และเคมีในห้องปฏิบัติการ ซึ่งรายการตรวจสอบเอกลักษณ์ เป็นการตรวจวิเคราะห์หนึ่งที่มีความสำคัญในการควบคุมคุณภาพวัคซีน⁴ เพื่อยืนยันว่าวัคซีนนั้นประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ตรงตามซีโรกรุ๊ปที่ระบุในทะเบียนตำรับยาชีววัตถุ และเพื่อสร้างความมั่นใจในคุณภาพของวัคซีนตรงตามมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ ดังนั้น จึงได้ขยาย

ขีดความสามารถทางห้องปฏิบัติการสำหรับการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต ซึ่งเป็นรายการทดสอบที่หน่วยงานยังไม่เคยให้บริการมาก่อน ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาสถานะที่เหมาะสม และดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต โดยใช้เทคนิค Indirect ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการสถาบันชีววัตถุต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสถานะที่เหมาะสม และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA
2. เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA

ระเบียบวิธีการวิจัย

สารมาตรฐาน

สารมาตรฐานที่มีความจำเพาะสำหรับแอนติเจนแต่ละชนิด ได้แก่ WHO International standard for Meningococcal serogroup A polysaccharide (13/246, NIBSC), Meningococcal serogroup C polysaccharide

(08/214, NIBSC), Meningococcal serogroup Y polysaccharide (16/206, NIBSC) และ Meningococcal serogroup W135 polysaccharide (16/152, NIBSC)

ตัวอย่าง

วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต (Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y and W135 Diphtheria Toxoid Conjugate Vaccine) จำนวน 1 รุ่นการผลิต และวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต (Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y and W135 Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine) จำนวน 1 รุ่นการผลิต ซึ่งเป็นตัวแทนตัวอย่างวัคซีนที่มีการนำเข้ามาวางจำหน่ายในประเทศไทย

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (ELISA reader) ยี่ห้อ Tecan รุ่น Infinite F200 Pro, เครื่องล้างไมโครเพลทอัตโนมัติ ยี่ห้อ BIO-RAD รุ่น ImmunoWash 1575, ตู้บเพาะเชื้ออุณหภูมิต่ำ (อุณหภูมิ 25°C), ตู้ชีวนิรภัย (Biological Safety Cabinet, Class II, BSC Type B2), 96 well plate Maxisorp NUNC-IMMUNO PLATE (Cat. No. 439454, Thermo Fisher Scientific), หลอดทดลองพลาสติกฝาเกลียว ขนาด 15 และ 50 ml, หลอดทดลอง Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml, Automatic pipette ขนาด 5-50 µl, 20-200 µl และ 100-1,000 µl และ Multichannel pipette ขนาด 50-300 µl

สารแอนติบอดี

สารแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสำหรับแอนติเจนแต่ละชนิด ได้แก่ *N. meningitidis* antiserum group A (Cat. No. 222281, BD), *N. meningitidis* antiserum group C (Cat. No. 222301, BD), *N. meningitidis* antiserum group Y (Cat. No. 228811, BD), *N. meningitidis* antiserum group W135 (Cat. No. 222531, BD), Rabbit anti-Diphtheria toxin (Ab53828, Abcam), Rabbit anti-Tetanus toxin (Ab53829, Abcam) และ Goat polyclonal antibody to Rabbit IgG (H+L) HRP conjugated (Ab6721, Abcam)

สารเคมีและน้ำยาทดสอบ

สารเคมีและน้ำยาทดสอบที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ 10x phosphate buffered saline pH 7.4, 10% normal goat serum (GNS) ยี่ห้อ Thermo Fisher Scientific, bovine serum albumin (BSA) ยี่ห้อ Sigma-Aldrich, 1x phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 with 0.05% tween 20 (washing buffer), 1x PBS pH 7.4 (diluent), coating buffer for positive control (2 µg/ml BSA in 1x PBS), 1M sulfuric acid (stop solution) ยี่ห้อ Merck และสารสับสเตรท SureBlue Reserve™ TMB 1-Component Microwell Peroxidase Substrate (Cat. No. 5120-0080, KPL)

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรค ใช้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA

1. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง และสารมาตรฐานใช้สำหรับเคลือบกันเพลททดสอบ ทำการเจือจางตัวอย่างวัคซีนให้มีความเข้มข้นของ meningococcal polysaccharide แต่ละซีโรกรุ๊ป ประมาณ 1 µg/ml ด้วย 1x PBS และเตรียมสารมาตรฐานให้มีความเข้มข้นของ meningococcal polysaccharide แต่ละซีโรกรุ๊ป ประมาณ 1 µg/ml ด้วย 1x PBS ที่เติม BSA 2 µg/ml หลังจากนั้นเติมตัวอย่างวัคซีน และสารมาตรฐานลงในเพลททดสอบ (96 well plate) เติมน้ำในตำแหน่งที่กำหนดไว้ ปริมาตรหลุมละ 100 µl โดยเพลททดสอบ 1 plate สามารถตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนได้สูงสุด 7 ตัวอย่าง แล้วนำเพลททดสอบไปบ่มที่ตู้บ่ม อุณหภูมิ 25°C นาน 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเพลททดสอบล้างด้วย washing buffer หลุมละ 300 µl จำนวน 3 ครั้ง โดยใช้เครื่องล้างไมโครเพลทอัตโนมัติ และเคาะเพลทบนกระดาษซับให้แห้ง

2. ขั้นตอน Blocking plate เติมน้ำ 10% GNS ปริมาตรหลุมละ 100 µl แล้วนำเพลททดสอบไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 25°C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเพลททดสอบล้างตามวิธีข้างต้น และเคาะเพลทบนกระดาษซับให้แห้ง

3. ขั้นตอนการเติม Primary antibody เตรียม primary antibody ที่มีความจำเพาะต่อ แอนติเจนแต่ละซีโรกรุ๊ป โดยเจือจางความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย diluent ดังนี้ *N. meningitidis* antiserum group A, Rabbit anti-Diphtheria toxin และ Rabbit anti-Tetanus toxin เจือจางที่ระดับความเข้มข้น 1:10,000 ส่วน *N. meningitidis* antiserum group C, *N. meningitidis* antiserum group Y และ *N. meningitidis* antiserum group W135 เจือจางที่ระดับความเข้มข้น 1:5,000 ตามลำดับ แล้วเติม primary antibody ที่มีความจำเพาะต่อแต่ละแอนติเจน เติมนลงในตำแหน่งที่กำหนดไว้ ปริมาตรหลุมละ 100 μ l แล้วนำเพลททดสอบไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 25°C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเพลททดสอบล้างตามวิธีข้างต้น และเคาะเพลทบนกระดาษซับให้แห้ง

4. ขั้นตอนการเติม Secondary antibody เตรียม Goat polyclonal antibody to Rabbit IgG (H+L) HRP conjugated เจือจางที่ระดับความเข้มข้น 1: 25,000 ด้วย diluent แล้วเติมนลงในเพลททดสอบทุกหลุม ปริมาตรหลุมละ 100 μ l นำเพลททดสอบไปบ่มที่ตู้บ่ม อุณหภูมิ 25°C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเพลททดสอบล้างตามวิธีข้างต้น และเคาะเพลทบนกระดาษซับให้แห้ง

5. ขั้นตอนปฏิกิริยาการเกิดสี และการอ่านผล เติมนสารสับสเตรท (TMB substrate)

ปริมาตรหลุมละ 100 μ l ลงในเพลททดสอบทุกหลุม บ่มให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที มีการป้องกันแสง หากเกิดปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีตรวจติดตามด้วย secondary antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP เมื่อเติมสับสเตรทลงไป สับสเตรทจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ HRP เกิดเป็นสารสีน้ำเงิน และเมื่อครบเวลา 10 นาที เติมน 1M sulfuric acid (stop solution) ปริมาตรหลุมละ 50 μ l เพื่อหยุดปฏิกิริยาโดยจะเกิดการเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง แล้วนำเพลททดสอบไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 450 nm ด้วยเครื่อง ELISA reader และนำผลมาคำนวณ ratio ระหว่างค่า OD_{450 nm} ของตัวอย่างวัคซีน ต่อค่าเฉลี่ย OD_{450 nm} ของ blank รายงานผลบวกเมื่อค่า ratio ของตัวอย่างวัคซีนมีค่ามากกว่า 7.0 และรายงานผลเป็นลบเมื่อค่า ratio มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.0

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีอาศัยหลักการของการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยหาระดับเจือจางความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Primary และ Secondary antibody เพื่อใช้สำหรับการทดสอบทำการเจือจางระดับความเข้มข้นของ primary antibody ในแต่ละชนิด ดังนี้ *N. meningitidis* antiserum group A, *N. meningitidis* antiserum group C, *N. meningitidis* antiserum group Y, *N. meningitidis* antiserum group W135,

anti-diphtheria toxoid และ anti-Tetanus toxin เจือจางความเข้มข้นด้วยสาร diluent ที่ระดับ 1:1,000, 1:5,000 และ 1:10,000 และทำการเจือจางระดับความเข้มข้นของ secondary antibody (anti-rabbit IgG HRP conjugated) ด้วยสาร diluent ที่ระดับ 1:10,000 และ 1:25,000 หลังจากนั้นดำเนินการทดสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไขก้างหลังแอนชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA และพิจารณาค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 450 nm ของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีแต่ละชนิด โดยค่าการดูดกลืนแสง OD_{450 nm} ของสารมาตรฐาน และตัวอย่างวัคซีนจะต้องมีค่าน้อยกว่า 3.0 และค่าการดูดกลืนแสง OD_{450 nm} ของ blank ต้องมีค่าน้อยกว่า 0.16-8

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไขก้างหลังแอนชนิดคอนจูเกตโดยใช้เทคนิค Indirect ELISA เป็นรายการทดสอบเชิงคุณภาพ (qualitative assay) เพื่อระบุความจำเพาะของ Meningococcal polysaccharide ในแต่ละซีโรกรุ๊ป A, C, Y และ W135 ที่เชื่อมต่อกับ Diphtheria Toxoid carrier protein โดยรายงานผลเป็นบวก (positive) หรือลบ (negative) จึงมีการดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีใน 2 พารามิเตอร์ ได้แก่ การตรวจสอบความจำเพาะของวิธี (specificity) และความเที่ยงของวิธี (intermediate precision)⁵

การหาความจำเพาะของวิธี เพื่อยืนยันว่าวิธีมีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่จำเพาะแต่ละชนิดเท่านั้น ต้องไม่เกิด cross reaction ระหว่าง non-target antigen กับ antibody ศึกษาโดยทำการเจือจางความเข้มข้นของตัวอย่างวัคซีน และสารมาตรฐานของแต่ละซีโรกรุ๊ป เท่ากับ 1 µg/ml จากนั้นดำเนินการทดสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA แล้วอ่านผลการทดสอบด้วยการพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า OD_{450 nm} ของตัวอย่าง ต่อค่าเฉลี่ย OD_{450 nm} ของ blank ทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง ซึ่งเกณฑ์กำหนดมีดังนี้ (1) ตัวอย่างวัคซีนและสารมาตรฐานจะต้องมีค่า Ratio มากกว่า 7.0 (2) Non-target จะต้องไม่เกิด cross reaction ระหว่างแอนติเจน polysaccharide กับแอนติบอดีของซีโรกรุ๊ปอื่น ๆ เช่น การเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนซีโรกรุ๊ป A ต่อแอนติบอดี Anti-Men C, Anti-Men Y และ Anti-Men W135 จะต้องมีค่า Ratio น้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.0 (3) Non-target จะต้องไม่เกิด cross reaction ระหว่างแอนติเจน DT carrier protein กับแอนติบอดีของ Anti-Tetanus toxoid จะต้องมีค่า Ratio น้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.0 และ (4) ค่าเฉลี่ย OD_{450 nm} ของ blank จะต้องมีค่าน้อยกว่า 0.1

การทดสอบความเที่ยงของวิธี ทำการทดสอบโดยนักวิเคราะห์ 2 คน ที่เป็นอิสระต่อกัน ใช้ตัวอย่างวัคซีน Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y and W135 Diphtheria Toxoid Conjugate Vaccine จำนวน 1 รุ่นการผลิต และทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง ทดสอบต่างวันกัน

โดยทำการเจือจางความเข้มข้นของตัวอย่างวัคซีน และสารมาตรฐานของแต่ละซีโรกรุ๊ป เท่ากับ 1 µg/ml จากนั้นดำเนินการทดสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA อ่านผลการทดสอบด้วยการพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า OD_{450 nm} ของตัวอย่าง ต่อค่าเฉลี่ย OD_{450 nm} ของ blank ทำการทดสอบ จำนวน 3 ครั้ง ซึ่งเกณฑ์กำหนด ดังนี้ (1) ผลการทดสอบของผู้วิเคราะห์ทั้ง 2 คน ที่เป็นอิสระต่อกัน ต้องมีค่า Ratio ของตัวอย่างวัคซีน และสารมาตรฐาน เป็นไปในรูปแบบเดียวกัน และ (2) ค่าเฉลี่ย OD_{450 nm} ของ blank จะต้องมีย่าน้อยกว่า 0.1 นอกจากนี้ ทำการวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดสอบระหว่าง นักวิเคราะห์ 2 คนทางสถิติ โดยใช้ F-Test Two-Sample for Variances และ T-Test Two-Sample Assuming Equal Variances

การวิเคราะห์ข้อมูล

รายงานผลการทดสอบ แปลผลเป็นบวก (positive) หรือ ลบ (negative) โดยคำนวณจาก สัดส่วนค่า OD_{450 nm} ของตัวอย่างวัคซีนในแต่ละ แอนติเจน ต่อค่าเฉลี่ย OD_{450 nm} ของ blank ตาม สูตรคำนวณ

$$\text{Ratio} = \frac{(A450 \text{ value of sample})}{(\text{Average A450 value of plate blank})}$$

เมื่อสัดส่วนของค่า OD_{450 nm} ของตัวอย่าง ต่อค่าเฉลี่ย OD_{450 nm} ของ blank มีค่ามากกว่า 7.0 ให้รายงานผลเป็นบวก รายงานผลลบเมื่อสัดส่วน ของค่า OD_{450 nm} ของตัวอย่างต่อค่าเฉลี่ย OD_{450 nm} ของ blank มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.0 ทั้งนี้

แอนติเจนแต่ละชนิดที่เป็นส่วนประกอบในวัคซีน ต้องเป็นไปตามที่ได้รับการขึ้นทะเบียนตำรับยา ชีววัตถุ

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาสถานะที่เหมาะสมของวิธี

พบว่าระดับเจือจางความเข้มข้นของสาร primary antibody ที่เหมาะสมต่อการทดสอบ สำหรับแอนติเจนแต่ละซีโรกรุ๊ปแตกต่างกัน คือ สารแอนติบอดี *N. meningitidis* antiserum group A ต้องเจือจางระดับความเข้มข้นที่ 1:10,000 ในขณะที่แอนติเจนซีโรกรุ๊ป *N. meningitidis* antiserum group C, Y และ W135 ต้องเจือจาง ระดับความเข้มข้นที่ 1:5,000 ตามลำดับ และสาร แอนติบอดี Rabbit anti-Diphtheria toxin และ Rabbit anti-Tetanus toxin ใช้สำหรับตรวจ เอกลักษณะโปรตีนพาหะต้องเจือจางระดับความเข้มข้น ที่ 1:10,000 ซึ่งระดับเจือจางความเข้มข้นของสาร แต่ละชนิดดังกล่าว มีผลโดยตรงต่อค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 450 nm ของแอนติเจนแต่ละชนิด ในขณะที่สารแอนติบอดี secondary antibody (Goat polyclonal antibody to Rabbit IgG (H+L) HRP conjugated) ต้องเจือจางที่ระดับ 1: 25,000 ส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 450 nm ของแอนติเจนแต่ละชนิด และค่า blank ให้เป็นไปตามเกณฑ์กำหนด โดยค่า blank จะต้องมีย่าน้อยกว่า 0.1 หากใช้ความเข้มข้นของ secondary antibody ที่สูงเกินไป จะส่งผลให้ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank มีค่าสูงเกิน 0.1

ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์กำหนด จึงไม่สามารถวิเคราะห์ผลการทดสอบได้

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (specificity) เมื่อทดสอบกับสารมาตรฐาน Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y และ W135 (NIBSC) ที่ใช้เป็น positive control จำนวน 3 ครั้ง เพื่อยืนยันว่าวิธีมีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่จำเพาะแต่ละชนิด ผลการทดสอบพบว่าแอนติเจนแต่ละชนิด มีค่า ratio >7.0 ซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นบวก มีความจำเพาะเจาะจงในแอนติเจนแต่ละชนิด เป็นไปตามเกณฑ์

ที่กำหนด และจากการทดสอบทั้ง 3 ครั้ง ค่าที่ได้เป็นไปในรูปแบบเดียวกัน (ตารางที่ 1) และเมื่อทดสอบกับตัวอย่างวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ชนิดคอนจูเกต ผลการทดสอบพบว่า แอนติเจนแต่ละชนิดของ Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y และ W135 มีค่า ratio >7.0 และผลการทดสอบแอนติเจน Diphtheria toxoid ซึ่งใช้เป็น carrier protein ในตัวอย่างวัคซีนพบว่า มีค่า ratio >7.0 ซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นบวก มีความจำเพาะเจาะจงในแอนติเจนแต่ละชนิด เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด และจากการทดสอบทั้ง 3 ครั้ง ค่าที่ได้เป็นไปในรูปแบบเดียวกัน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ชนิดคอนจูเกต (Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y and W135 Diphtheria Toxoid Conjugate Vaccine) โดยใช้เทคนิค Indirect ELISA

Specificity test	1 st time		2 nd time		3 rd time	
	OD _{450nm}	Ratio	OD _{450nm}	Ratio	OD _{450nm}	Ratio
Diluent buffer	0.0788*	1.00	0.0613*	1.00	0.0494*	1.00
Positive control (NIBSC)						
PS serogroup A	1.8850	23.93	1.5937	25.99	1.0831	21.94
PS serogroup C	1.5916	20.21	1.7086	27.87	1.5152	30.69
PS serogroup Y	1.8815	23.89	1.4601	23.81	1.3017	26.37
PS serogroup W135	1.8301	23.23	1.4252	23.24	1.1743	23.79
Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y and W135						
Diphtheria Toxoid Conjugate Vaccine						
PS serogroup A in vaccine	1.7922	22.75	1.7886	29.17	1.3026	26.39
PS serogroup C in vaccine	2.4035	30.51	2.6168	42.68	2.0133	40.78
PS serogroup Y in vaccine	1.3937	17.69	2.1645	35.30	1.6711	33.85
PS serogroup W135 in vaccine	1.9706	25.02	2.1729	35.44	1.6459	33.34
Diphtheria toxoid in vaccine	2.5599	32.50	2.4845	40.52	1.9178	38.85

*ค่าเฉลี่ยของค่า blank จำนวน 6 หลุม

การทดสอบการเกิดปฏิกิริยา cross reaction ระหว่างแอนติเจน Meningococcal polysaccharide กับสารแอนติบอดีที่ผลิตจากซีโรกรุ๊ปอื่น

ผลการทดสอบพบว่าวิธีนี้ไม่มีการเกิดปฏิกิริยา cross reaction ข้ามซีโรกรุ๊ปกัน ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาขึ้นได้เฉพาะแอนติเจนและแอนติบอดีจำเพาะของซีโรกรุ๊ปตัวมันเองเท่านั้น ไม่เกิดปฏิกิริยากับซีโรกรุ๊ปอื่น ๆ โดยแสดงผลการทดสอบดังนี้

- ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน Men A ต่อแอนติบอดี Anti-Men C, Anti-Men Y และ Anti-Men W135 โดยค่า ratio ≤ 7.0 ซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นลบ เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

- ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน

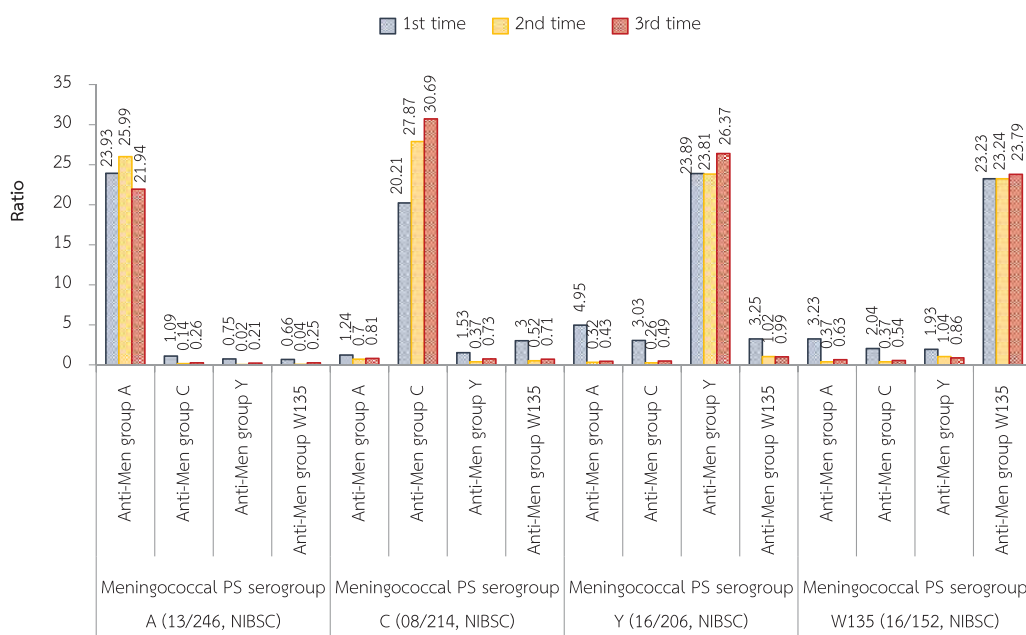
Men C ต่อแอนติบอดี Anti-Men A, Anti-Men Y และ Anti-Men W135 โดยค่า ratio ≤ 7.0 ซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นลบ เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

- ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน

Men Y ต่อแอนติบอดี Anti-Men A, Anti-Men C และ Anti-Men W135 โดยค่า ratio ≤ 7.0 ซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นลบ เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

- ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน

Men W135 ต่อแอนติบอดี Anti-Men A, Anti-Men C และ Anti-Men Y โดยค่า ratio ≤ 7.0 ซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นลบ เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด จึงสามารถยืนยันได้ว่าวิธีนี้มีความจำเพาะสูง (รูปที่ 1)



Antigen and antibody complex in each serogroup of Meningococcal polysaccharide

รูปที่ 1 ผลการทดสอบการเกิดปฏิกิริยา cross reaction ระหว่างแอนติเจน Meningococcal polysaccharide กับสารแอนติบอดีที่ผลิตจากซีโรกรุ๊ปอื่น ๆ

การทดสอบการเกิดปฏิกิริยา cross reaction ระหว่างแอนติเจน Diphtheria toxoid กับแอนติบอดีของ anti-Tetanus

ผลการทดสอบพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยา

cross reaction ระหว่าง DT กับ anti-Tetanus จึงสามารถยืนยันได้ว่าวิธีนี้มีความจำเพาะสูง ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาขึ้นได้เฉพาะแอนติเจนและแอนติบอดีจำเพาะของตัวมันเองเท่านั้น (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาการเกิดปฏิกิริยา cross reaction ระหว่างแอนติเจน Diphtheria toxoid carrier protein ในวัคซีนต่อชนิดของสารแอนติบอดี ได้แก่ Rabbit anti-Diphtheria toxin และ Rabbit anti-Tetanus toxin

Antigen		1 st time	2 nd time	3 rd time
		Ratio	Ratio	Ratio
Diphtheria toxoid (Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y and W135 Diphtheria Toxoid Conjugate Vaccine)	Rabbit anti-Diphtheria toxin	32.50	40.52	38.85
	Rabbit anti-Tetanus toxin	0.16	-0.02	0.12

การทดสอบความเที่ยงของวิธี (Inter-mediate precision)

1. เมื่อทดสอบความเที่ยงของวิธี โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ที่เป็นอิสระต่อกัน ผลการทดสอบพบว่าสารมาตรฐานของแอนติเจนแต่ละชนิด Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y และ W135 (NIBSC) มีค่า ratio > 7.0 ให้เป็นการทดสอบเป็นบวกทุกซีโรไทป์ ซึ่งผู้วิเคราะห์ทั้งสองคนให้ผลการทดสอบไปในรูปแบบเดียวกัน และเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (ตารางที่ 3) และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้สถิติ F-Test

Two-Sample for Variances และ T-Test Two-Sample Assuming Equal Variances ในการวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดสอบระหว่างนักวิเคราะห์ 2 คน พบว่าค่าเฉลี่ย Ratio ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ซีโรกรุ๊ปจากการทดสอบของนักวิเคราะห์ทั้ง 2 คน ค่า $P(T \leq t)$ two-tail = 0.086 ซึ่งมีความมากกว่า p-value ดังนั้นข้อมูลค่าเฉลี่ย Ratio ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ซีโรกรุ๊ปจากการทดสอบของผู้วิเคราะห์ทั้ง 2 คน จึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธี ทดสอบด้วยสารมาตรฐานของแอนติเจนแต่ละชนิด Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y และ W135 (NIBSC)

Serogroup/ Analyst	Ratio of WHO International standard for Meningococcal polysaccharide in each serogroup			
	A	C	Y	W135
Analyst 1	42.74	41.37	43.72	39.74
	32.47	31.90	33.46	31.10
	23.56	22.00	23.19	22.01
Analyst 2	23.20	17.64	19.41	17.43
	29.72	27.67	29.84	29.25
	36.02	33.21	31.59	28.19

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของชุดข้อมูลสารมาตรฐาน โดยใช้สถิติ F-Test Two-Sample for Variances และ T-Test Two-Sample Assuming Equal Variances

F-Test Two-Sample for Variances	ผู้วิเคราะห์ 1	ผู้วิเคราะห์ 2
Mean	32.27166667	26.93083333
Variance	68.30428788	37.68811742
df	11	11
F	1.812356057	
P(F<=f) one-tail	0.169245309	
F Critical one-tail	3.473699051	
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances	ผู้วิเคราะห์ 1	ผู้วิเคราะห์ 2
Mean	32.27166667	26.930833
Variance	68.30428788	37.688117
Pooled Variance	52.99620265	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	22	
t Stat	1.797058747	
P(T<=t) one-tail	0.043034681	
t Critical one-tail	1.717144374	
P(T<=t) two-tail	0.086069361	
t Critical two-tail	2.073873068	

2. เมื่อทดสอบความเที่ยงของวิธี โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ที่เป็นอิสระต่อกัน ผลการทดสอบพบว่าตัวอย่างวัคซีน Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y and W135 Diphtheria Toxoid Conjugate Vaccine มีค่า ratio > 7.0 ให้เป็นการทดสอบเป็นบวก ทุกซีโรไทป์ และแอนติเจน Diphtheria toxoid ในตัวอย่างวัคซีน พบว่ามีค่า ratio > 7.0 ให้เป็นการทดสอบเป็นบวก และผู้วิเคราะห์ทั้งสองคน ให้ผลการทดสอบไปในรูปแบบเดียวกัน ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (ตารางที่ 5) และนำข้อมูล

มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้สถิติ F-Test Two-Sample for Variances และ T-Test Two-Sample Assuming Equal Variances ในการวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดสอบระหว่างนักวิเคราะห์ 2 คน พบว่าค่าเฉลี่ย Ratio ของตัวอย่างวัคซีน ทั้ง 4 ซีโรกรุปจากการทดสอบของนักวิเคราะห์ ทั้ง 2 คน ค่า $P(T \leq t)$ two-tail = 0.6573 ซึ่งมีค่ามากกว่า p-value ดังนั้นข้อมูลค่าเฉลี่ย Ratio ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ซีโรกรุปจากการทดสอบของผู้วิเคราะห์ทั้ง 2 คนจึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธี ทดสอบด้วยตัวอย่างวัคซีน Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y and W135 Diphtheria Toxoid Conjugate Vaccine

Serogroup/ Analyst	Ratio of Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y and W135 Diphtheria Toxoid Conjugate Vaccine				
	A	C	Y	W135	DT
Analyst 1	36.52	43.61	43.33	43.16	44.30
	36.30	45.77	42.49	43.28	45.16
	21.49	28.68	25.29	25.12	29.21
Analyst 2	25.84	35.66	35.31	34.01	36.93
	30.91	38.05	35.62	36.10	40.63
	37.21	47.16	45.39	44.55	48.79

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของชุดข้อมูลตัวอย่างวัคซีน โดยใช้สถิติ F-Test Two-Sample for Variances และ T-Test Two-Sample Assuming Equal Variances

F-Test Two-Sample for Variances	ผู้วิเคราะห์ 1	ผู้วิเคราะห์ 2
Mean	36.914	38.144
Variance	74.10058286	38.73296857
df	14	
F	1.913113959	
$P(F \leq f)$ one-tail	0.118567124	
F Critical one-tail	2.978587524	

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของชุดข้อมูลตัวอย่างวัคซีน โดยใช้สถิติ F-Test Two-Sample for Variances และ T-Test Two-Sample Assuming Equal Variances (ต่อ)

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances	ผู้วิเคราะห์ 1	ผู้วิเคราะห์ 2
Mean	36.914	38.144
Variance	74.10058286	38.73296857
Pooled Variance	56.41677571	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	28	
t Stat	-0.448468157	
P(T<=t) one-tail	0.328633378	
t Critical one-tail	1.701130934	
P(T<=t) two-tail	0.657266756	
t Critical two-tail	2.048407142	

อภิปรายผล

รายการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต (Identity test) เป็นรายการทดสอบที่ใช้ตรวจสอบควบคุมคุณภาพกระบวนการผลิตวัคซีน ตั้งแต่ขั้นตอนระหว่างการผลิตไปจนถึงได้เป็นผลิตภัณฑ์วัคซีน ได้แก่ ขั้นตอนผลิต purified polysaccharide, purified carrier protein, monovalent bulk conjugates และ final product^{4, 6} สำหรับวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต World Health Organization (WHO) แนะนำให้ใช้วิธี Nuclear Magnetic Resonance (NMR) หรือวิธี serological test⁴ ซึ่งวิธี NMR เป็นวิธีที่ใช้เครื่องมือจำเพาะซึ่งไม่ได้เป็นเครื่องมือที่ใช้ทั่วไปจึงเป็นข้อจำกัดในการนำใช้เพื่อการควบคุมคุณภาพในระหว่างกระบวนการผลิต⁶ ในขณะที่วิธี serological test

เป็นวิธีการตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีด้วยเทคนิค enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เครื่องมือที่มีในห้องปฏิบัติการ อาศัยหลักการแอนติเจนที่สนใจจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะ เกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อกัน และตรวจวัดผลการทดสอบด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง จึงเหมาะสำหรับใช้ในการควบคุมคุณภาพกระบวนการผลิต การศึกษาครั้งนี้ได้นำเทคนิค Indirect ELISA มาใช้เป็นวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกต โดยดำเนินการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี โดยกำหนดความเข้มข้นของแอนติเจนแต่ละซีโรกรุ๊ปคงที่ประมาณ 1 µg/ml เพื่อหาระดับเจือจางความเข้มข้นของสาร primary antibody และสาร secondary antibody ที่เหมาะสมสำหรับทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่สนใจ

โดยรายการทดสอบนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์แอนติเจนที่เป็นส่วนประกอบอยู่ในผลิตภัณฑ์วัคซีนป้องกันโรคไขก้างหลังแอนชนิดคอนจูเกต ได้แก่ Meningococcal polysaccharide serogroup A, C, Y และ W135 โดยมีโปรตีนพาหะ ได้แก่ Diphtheria toxoid หรือ Tetanus toxoid ซึ่งชนิดของโปรตีนพาหะที่เป็นส่วนประกอบในวัคซีนขึ้นอยู่กับการศึกษาส่วนประกอบทางการค้าของผู้ผลิต การเกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับปัจจัยจากระดับความเข้มข้นของแอนติบอดี⁵ โดยค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ของตัวอย่างจะต้องมีค่าน้อยกว่า 3.0 หากมีค่า OD มากกว่า 3.0 ส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการอ่านผล และผลการทดสอบไม่มีความน่าเชื่อถือ ต้องมีการเจือจางระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีให้ค่า OD อยู่ในช่วงที่อ่านค่าได้ถูกต้อง⁷ จากการศึกษาอัตราการเจือจางความเข้มข้นของสาร primary antibody และ secondary antibody พบว่าแอนติบอดีแต่ละชนิดมีระดับเจือจางความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปฏิกิริยา antigen-antibody reaction ที่จำเพาะ โดยสารแอนติบอดี *N. meningitidis* antiserum ในแต่ละซีโรกรุ๊ป ระดับการเจือจางความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 1:5,000 (สำหรับซีโรกรุ๊ป C, Y และ W135) และ 1:10,000 (สำหรับซีโรกรุ๊ป A) ส่วนสารแอนติบอดี Rabbit anti-Diphtheria toxin และ Rabbit anti-Tetanus toxin ใช้สำหรับตรวจเอกลักษณ์โปรตีนพาหะ ระดับเจือจางความเข้มข้นที่เหมาะสม

เท่ากับ 1:10,000 ในขณะที่สารแอนติบอดี secondary antibody (Goat polyclonal antibody to Rabbit IgG (H+L) HRP conjugated) ระดับการเจือจางความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 1: 25,000 ส่งผลให้ค่า OD ของตัวอย่างและสารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ อ่านค่า OD_{450nm} อยู่ในช่วง 1.1 - 2.6 ซึ่งอยู่ในช่วงการวัดผลที่มีความถูกต้อง และไม่เกินความสามารถของเครื่อง ELISA reader ในการอ่านค่าได้อย่างถูกต้อง และเกณฑ์กำหนดมาตรฐานค่า OD ของ blank ในเพลททดสอบจะต้องมีค่าน้อยกว่า 0.18 ผลจากการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไขก้างหลังแอนชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA พบว่าค่า OD_{450nm} ของ blank มีค่าน้อยกว่า 0.1 ซึ่งผลการทดสอบเป็นไปตามเกณฑ์กำหนดเมื่อวิธีผ่านการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมแล้ว ดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตาม ICH guideline⁵ ผลการศึกษาความจำเพาะของวิธีให้ผลการทดสอบเป็นไปตามเกณฑ์กำหนด (ตารางที่ 1, 2 และรูปที่ 1) แสดงให้เห็นว่าวิธีมีความจำเพาะสูง โดยแอนติบอดีแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อแอนติเจนชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ไม่มีการเกิด cross reaction ข้ามแอนติเจนกัน เนื่องจากแอนติเจนที่เป็นส่วนประกอบในวัคซีนป้องกันโรคไขก้างหลังแอน ผลิตจากแคปซูลของเชื้อแบคทีเรีย *N. meningitidis* ซึ่งเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ โดยโพลีแซคคาไรด์แต่ละซีโรกรุ๊ป จำแนกจากโครงสร้างโพลีแซคคาไรด์แคปซูลและความจำเพาะทางภูมิคุ้มกัน⁹⁻¹⁰ โดยจากผล

การศึกษาการเกิดปฏิกิริยา cross reaction ระหว่างแอนติเจน Meningococcal polysaccharide กับแอนติบอดีของซีโรกรุ๊ปอื่น ๆ ยืนยันว่าวิธีนี้สามารถระบุเอกลักษณ์ของแอนติเจนแต่ละชนิดอย่างจำเพาะและถูกต้อง และผลการศึกษาความเที่ยงของวิธี โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ที่เป็นอิสระต่อกันพบว่าผลการทดสอบทั้ง 2 คนไปในรูปแบบเดียวกันและเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด (ตารางที่ 3 และ 5) เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์โดยใช้สถิติ F-Test Two-Sample for Variances และ T-Test Two-Sample Assuming Equal Variances พบว่าค่าเฉลี่ย Ratio ของสารมาตรฐานและตัวอย่างวัคซีนจากการทดสอบของนักวิเคราะห์ทั้ง 2 คน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4 และ 6) แสดงว่าวิธีนี้มีความเที่ยงสูง สามารถใช้วิธีนี้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA ได้ และวิธีนี้ได้ถูกนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับตรวจคุณภาพวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตเพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนตำรับยาในประเทศไทย

สรุปผล

การศึกษานี้ได้พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA พบว่าวิธีนี้มีความจำเพาะสูงต่อโพลีแซคคาไรด์ในแต่ละซีโรกรุ๊ป ได้แก่ serogroups A, C, Y and W135 ซึ่งแต่ละซีโรกรุ๊ป

ไม่เกิด cross reaction ต่อกัน จึงสามารถบ่งชี้เอกลักษณ์ของโพลีแซคคาไรด์แต่ละซีโรกรุ๊ปได้ และสามารถบ่งชี้เอกลักษณ์ของโปรตีนพาหะ (carrier protein) ที่เชื่อมต่ออยู่กับโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งวิธีนี้สามารถบ่งชี้โปรตีนพาหะชนิด Diphtheria toxoid และ Tetanus toxoid carrier protein ได้ โดยโปรตีนพาหะแต่ละชนิดไม่เกิด cross reaction ต่อกัน และวิธีนี้มีความเที่ยง โดยผลการทดสอบจากผู้วิเคราะห์ทั้ง 2 คนเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความถูกต้อง และเหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการได้

ข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นชนิดคอนจูเกตด้วยเทคนิค Indirect ELISA เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงต่อแอนติเจนจำเพาะเท่านั้น วิธีนี้จึงสามารถตรวจวิเคราะห์ได้เฉพาะแอนติเจนจำเพาะ ได้แก่ *N. meningitidis* serogroup A, C, Y และ W135 และ carrier protein ชนิด Diphtheria toxoid และ Tetanus toxoid เท่านั้น หากวัคซีนมีส่วนประกอบเป็นแอนติเจนชนิดอื่น ๆ เช่น โพลีแซคคาไรด์ซีโรกรุ๊ปอื่น หรือ carrier protein ชนิดอื่น ต้องดำเนินการศึกษาความเหมาะสมของวิธี และศึกษาความถูกต้องของวิธีให้จำเพาะสำหรับแอนติเจนนั้น ๆ ต่อไป ได้แก่ การเกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสม

ขึ้นอยู่กับ การเจือจางระดับความเข้มข้นของ แอนติบอดี โดยค่าการดูดกลืนของตัวอย่างและ สารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบควรอ่านค่า OD_{450nm} อยู่ในช่วง 1.1 - 2.6 ซึ่งเป็นช่วงการวัดผล ที่มีความถูกต้อง และไม่เกินความสามารถของ เครื่องอ่านผล และค่าการดูดกลืนแสงของ blank ต้องมีค่าน้อยกว่า 0.1 นอกจากนี้การเก็บรักษา สารมาตรฐาน สารแอนติบอดีต้องเก็บรักษาในช่วง อุณหภูมิที่กำหนดไว้ และทำการแบ่งสาร (aliquot) ใส่หลอดทดลอง ปริมาตรให้เพียงพอสำหรับการ นำมาใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้ง เพื่อลดการแช่แข็งและ การละลายหลายครั้ง (Freeze-Thaw cycle) และการทดสอบในแต่ละครั้งควรเตรียมสารเคมี ใหม่ทุกครั้ง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการ ส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกว.) ที่ได้มอบทุนสนับสนุนการพัฒนาภายใต้โครงการ การพัฒนานวัตกรรมควบคุมคุณภาพวัคซีน แบบที่เรียกชนิดโพลีแซ็กคาไรด์ และขอขอบคุณ สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการสนับสนุนการดำเนินงานในทุกด้าน

เอกสารอ้างอิง

1. Mahmoud FM, Harhara T. *Neisseria meningitidis* pneumonia with bacteremia without meningitis: An atypical presentation. IDCases 2020; 21:e00897: 1-3.

2. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. ตำรา วัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค: วัคซีน ป้องกันโรคใช้ภายหลังแอ่น. กรุงเทพฯ: เวิร์ค พรีนท์; 2562.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Meningococcal Disease [Internet]. [cited 2023 Aug 21]; [6 screens]. Available from: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2024/infections-diseases/meningococcal-disease>
4. World Health Organization. Annex 2 Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of group A meningococcal conjugate vaccines. Technical Report Series No. 962, Geneva; 2011. p. 134–7.
5. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) [Internet]. 2005; [cited 2022 Jun 18]; [17 screens]. Available from: [https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2\(R1\).pdf](https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2(R1).pdf)
6. Sharma N, Hanif S, Upadhyay D, Chhikara MK. Inhibition ELISA as a putative tool for the identification and quantification of meningococcal A and X polysaccharides at various stages of vaccine development. J. Immunol Methods 2019; 493: 1-7.

7. Dell EJ. Optical Density for Absorbance Measurements [Internet]. BMG LABTECH; 2021 Oct 22- [cited 2022 Apr 7]. Available from: <https://www.bmglabtech.com/en/blog/optical-density-for-absorbance-assays/>
8. World Health Organization. Training manual for Enzyme linked immunosorbent assay for the quantitation of *Streptococcus pneumoniae* serotype specific IgG (Pn PS ELISA) (007sp Version). Birmingham, AL, University of Alabama [Internet]. 2010; [cited 2022 May 18]; [29 screens]. Available from: [https://www.vaccine.uab.edu/uploads/mdocs/ELISAProtocol\(007sp\).pdf](https://www.vaccine.uab.edu/uploads/mdocs/ELISAProtocol(007sp).pdf)
9. Harrison OB, Claus H, Jiang Y, Bennett JS, Bratcher HB, Jolley KA, et al. Description and nomenclature of *Neisseria meningitidis* capsule locus. Emerg Infect Dis [Internet]. 2013. [cited 2023 Oct 12]. Available from: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1904.111799>
10. Spinoso MR, Progida C, Tala A, Cogli L, Alifano P, Bucci C. The *Neisseria meningitidis* Capsule Is Important for Intracellular Survival in Human Cells. Infect Immun 2007; 75(7): 3594-603.

วารสารอาหารและยา เป็นวารสารด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นสื่อกลางและเป็นเวทีทางวิชาการในการเผยแพร่ผลงานวิจัย และบทความวิชาการด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพของนักวิชาการ ภาครัฐ มหาวิทยาลัย องค์กรเอกชน และประชาชน มีกำหนดพิมพ์เผยแพร่วารสารปีละ 3 ฉบับ คือ ฉบับที่ 1 เดือนมกราคม-เมษายน ฉบับที่ 2 เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม และฉบับที่ 3 เดือนกันยายน-ธันวาคม โดยมีข้อกำหนดการพิจารณารับและเผยแพร่บทความวิจัย และบทความวิชาการดังนี้

1. เป็นบทความที่ไม่เคยตีพิมพ์ เผยแพร่ หรือเผยแพร่ด้วยสื่อหรือวิธีการใด ๆ และที่ใดมาก่อน
2. เป็นผลงานที่มีระยะเวลาดำเนินการแล้วเสร็จนับถึงวันที่ส่งเรื่องไว้พิจารณาไม่เกิน 5 ปี
3. กรณีที่ผู้พิมพ์ต้องการยกเลิกหรือไม่ประสงค์ลงตีพิมพ์ ต้องแจ้งพร้อมทั้งส่งแบบฟอร์มยกเลิกการตีพิมพ์ส่งมาที่กองบรรณาธิการ
4. กองบรรณาธิการ ขอสงวนสิทธิ์ในการเปลี่ยนแปลงและตัดสินใจในการรับเรื่องไว้พิจารณา ตระงวดงาน ตีพิมพ์ หรือลำดับการตีพิมพ์ตามความสำคัญก่อนหลังตามความเหมาะสม

การส่งต้นฉบับ

ส่งบทความออนไลน์ผ่านเว็บไซต์วารสารอาหารและยา <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/index> หรือ QR Code เท่านั้น โดยทำการสมัครสมาชิก และเข้าสู่ระบบ เพื่อส่งต้นฉบับและแบบฟอร์มลงตีพิมพ์

วารสารอาหารและยา กำหนดรูปแบบตัวอักษรต้นฉบับตามที่วารสารกำหนด จัดพิมพ์ด้วยโปรแกรม Microsoft Word ขนาดกระดาษ A4 แบบแนวตั้ง ใช้ตัวอักษร TH SarabunPSK ขนาด 16 point (ยกเว้นหัวข้อใหญ่ใช้ 18 point) และใส่เลขหน้าด้านขวาล่าง



การจัดทำชื่อบทความและข้อมูลผู้พิมพ์

1. ชื่อบทความ

ให้ใช้ภาษาเป็นทางการ ความยาวไม่เกิน 125 ตัวอักษร ขนาด 18 point ด้วยตัวอักษรหนา ชัดขอบด้านซ้าย โดยที่ชื่อบทความควรให้กระชับ ไม่ใช่คำฟุ่มเฟือย สอดคล้องกับเนื้อหาที่ชัดเจน ตรงไปตรงมา ครอบคลุมประเด็นของเรื่อง สื่อสารถึงเนื้อหาของเรื่องก่อน preposition และ article

2. ข้อมูลผู้พิมพ์

ใช้ตัวอักษรขนาด 14 point ประกอบด้วย

2.1 ชื่อและนามสกุลจริง (first name and family name) โดยไม่ใส่คำนำหน้าชื่อ ให้เรียงลำดับความสำคัญชื่อแรกเป็นผู้พิมพ์หลัก ตามด้วยชื่อผู้พิมพ์ลำดับรองจนครบ และใส่ตัวเลข

ยกขึ้น (superscript) แสดงหน่วยงานต้นสังกัดไว้ท้ายชื่อผู้พิมพ์ ทั้งนี้ สำหรับชื่อภาษาอังกฤษให้ใส่เครื่องหมายจุลภาค (,) ด้านหลังชื่อผู้พิมพ์แต่ละคน

2.2 หน่วยงานต้นสังกัด ให้ใส่ตัวเลขยกขึ้นหน้าชื่อหน่วยงานเรียงลำดับเริ่มจากเลข 1 โดยแสดงชื่อหน่วยงานระดับรอง และหน่วยงานหลัก ตามด้วยจังหวัด ส่วนภาษาอังกฤษ ให้มีเครื่องหมายจุลภาค (,) คั่นในแต่ละข้อความ และมี Thailand ต่อท้ายจังหวัด และใส่เครื่องหมาย full stop (.) ด้านท้ายของแต่ละคน ยกเว้นชื่อผู้พิมพ์ลำดับสุดท้ายไม่ต้องใส่เครื่องหมาย full stop

2.3 ที่อยู่ติดต่อ และ Contact address: ให้แสดงชื่อผู้ติดต่อหลักตามด้วยหน่วยงาน ถนน อำเภอ จังหวัด รหัสไปรษณีย์ และอีเมล ส่วนภาษาอังกฤษ ให้เพิ่ม Thailand หลังรหัสไปรษณีย์

การเขียนบทความวิจัย

เป็นงานวิจัยที่เป็นองค์ความรู้ โดยมีเนื้อหาความยาวไม่ควรเกิน 10-13 หน้า ประกอบด้วย

1. Abstract ภาษาอังกฤษ และบทคัดย่อภาษาไทย

ความยาวของแต่ละภาษาไม่ควรเกิน 350-450 คำ เป็นการย่อสาระสำคัญเฉพาะที่จำเป็น ระบุตัวเลขทางสถิติที่สำคัญ ไม่ต้องมีเชิงอรรถอ้างอิง ใช้ภาษาที่รัดกุมด้วยประโยคสมบูรณ์ มีการเขียน tense ไวยากรณ์ภาษาอังกฤษเป็นแบบ past tense (ยกเว้นข้อเสนอแนะ) บทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษต้องมีเนื้อหาที่ถูกต้องตรงกัน (ตัวอย่างบทความวิจัยหน้าเว็บไซต์)

Tips:

1. ตัวอย่างวัตถุประสงค์ เช่น The purposes of this study were to examine/ investigate/explore/find out/compare ..., ..., and ...
2. วิธีการวิจัย เป็นการนำเสนอข้อมูลเกี่ยวกับรูปแบบการวิจัย ประชากร กลุ่มตัวอย่าง เครื่องมือวิจัย และการรวบรวมข้อมูล ตัวอย่างการเขียน เช่น The study was a quantitative/ qualitative/documentary/survey/experimental research....
3. ผลการวิจัย เพื่อนำเสนอข้อค้นพบหรือผลวิจัยหลัก ๆ ที่เป็นคำตอบของงานวิจัย โดยนำเสนอเป็นข้อ ๆ ให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ ไม่ต้องนำเสนอเกี่ยวกับข้อมูลทั่วไปของประชากรหรือกลุ่มตัวอย่าง ยกเว้นเป็นงานวิจัยที่เกี่ยวกับคุณลักษณะของประชากรหรือกลุ่มตัวอย่างโดยตรง

ตัวอย่าง The result (s) was/were as follow: ..., ..., and ...

The study revealed that ..., ..., and ...

4. สรุป เป็นการสรุปผลการศึกษาที่เป็นข้อค้นพบสำคัญ พร้อมทั้งอาจมีข้อเสนอแนะเพิ่มเติมเพื่อการนำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ นำเสนอเฉพาะที่เห็นว่าสำคัญเป็นข้อ ๆ

ตัวอย่าง The study suggested that ...

It was recommended that ...

5. คำสำคัญ หรือ key words 3-5 คำ หมายถึง คำหรือวลีที่แสดงประเด็นหรือสาระในระดับกว้างที่ผู้พิมพ์กำหนดขึ้นเพื่อใช้แทนเนื้อหาใจความสำคัญของงานวิจัย ให้ง่ายต่อการสืบค้น ทำให้อ่านสามารถคัดเลือกบทความวิจัย หรือจัดกลุ่มเอกสารวิจัยตามประเภทหรือใจความสำคัญได้รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ

2. บทนำ

ความยาวประมาณ 1 หน้าครึ่ง เป็นการเสนอปัญหา เหตุผล หรือที่มาของงานวิจัย มีข้อมูลมูลฐานที่ชี้ให้เห็นปัญหา โดยอาจ ยกสถานการณ์มาประกอบเหตุผลของการนำมาแก้ไขปัญหานั้น ๆ และเน้นเหตุผลที่ศึกษาเพื่อนำเข้าสู่การศึกษาให้ได้ผลเพื่อแก้ปัญหา การวิจัยหรือตอบคำถามที่ตั้งไว้

3. วัตถุประสงค์

ระบุเป็นข้อ

4. ระเบียบวิธีการวิจัย

ความยาวประมาณ 1 หน้าครึ่ง อธิบายวิธีการวิจัย ระยะเวลา การศึกษา พื้นที่ แหล่งที่มาของข้อมูล ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง เครื่องมือในการวิจัย การรวบรวมข้อมูล การวิเคราะห์ข้อมูล การใช้สถิติ และนิยาม (กรณีจำเป็นต้องมี)

5. ผลการศึกษา

ความยาวประมาณ 5 หน้าครึ่ง อธิบายสิ่งที่ได้จากการวิจัย โดยเสนอหลักฐาน และข้อมูลอย่างเป็นระเบียบ ไม่ซับซ้อน บรรยาย เป็นร้อยแก้ว มีลำดับการนำเสนอผลการศึกษามาตามวัตถุประสงค์ ที่ตั้งไว้ด้วยภาษาที่เข้าใจง่าย หากมีตัวเลขและตัวแปรมากควรใช้ ตารางหรือรูป โดยให้อธิบายความหมายของผลที่ค้นพบหรือ วิเคราะห์ข้อมูลสำคัญที่ต้องการนำเสนอ อาจมีการอภิปรายผล ไปพร้อมกันได้ โดยที่ชื่อตาราง ให้อยู่บนตาราง และชื่อรูปให้อยู่ ใต้รูป ทั้งนี้ จำนวนตารางและรูปรวมกันไม่ควรเกิน 5 ภาพ

6. อภิปรายผล

ความยาวประมาณ 1 หน้าครึ่ง เป็นการแปลผลข้อค้นพบ จากผลการศึกษาในลักษณะการตีความและประเมินผลการวิจัย เพื่อยืนยันผลที่ได้ว่าน่าเชื่อถือ ถูกต้อง เป็นจริงหรือไม่ อย่างไร ทำให้ไม่ผลจึงเป็นอย่างนี้ และเขียนอภิปรายโดยอาศัยแนวคิด ทฤษฎี และผลการวิจัยคนอื่นเพื่อชี้ให้เห็นว่าผลวิจัยไปสอดคล้องหรือ ขัดแย้งกับผลการวิจัยของผู้อื่นอย่างไร สอดคล้องในประเด็นใด ขัดแย้งประเด็นใดซึ่งต้องหาสาเหตุหรือเหตุผลมาอธิบาย ทำไม จึงเป็นเช่นนั้น ซึ่งหลักการเขียนที่สำคัญมี 4-5 ประการคือ (1) ศึกษาอะไร เพื่อบอกวัตถุประสงค์หรือสมมติฐานให้ทราบ (2) ผลที่ได้รับเป็นอย่างไร เพื่อบอกข้อค้นพบว่าเจออะไรบ้าง (3) เป็นเพราะอะไร เพื่อให้เหตุผลว่าเกิดขึ้นได้อย่างไร ทำไมจึง เป็นเช่นนั้น (4) สอดคล้องกับใคร เพื่อบอกว่าข้อค้นพบนี้มีใคร ที่ทำวิจัยแล้วพบในลักษณะเดียวกันบ้างหรือขัดแย้งกับใครบ้าง (5) มีข้อจำกัดหรือไม่ (ถ้ามี) เพื่อให้ผู้อ่านตัดสินใจเรื่องความเที่ยงตรง (validity) ของผลวิจัยและข้อจำกัดที่จะนำไปสู่การให้ข้อเสนอแนะ เพื่อการวิจัยครั้งต่อไปและการนำผลวิจัยไปใช้

Tips: การเขียนให้น่าอ่าน ควรเขียนเป็นลำดับขั้นตอน เพื่อให้ผู้อ่านเข้าใจง่าย ดังนี้

1. ไม่ควรอภิปรายผลจากการวิจัยทั้งหมด แต่ควรเลือกเฉพาะ ประเด็นสำคัญหรือสิ่งที่เราสนใจในแต่ละประเด็น เพื่ออภิปรายผลเชิงลึกในแต่ละด้าน

2. ควรเริ่มต้นอภิปรายด้วยผลการวิจัยเชิงปริมาณ ตามด้วย เชิงคุณภาพ

3. ควรให้เหตุผลร้อยเรียงกันไปและอ้างอิงงานวิจัยของ คนอื่นอย่างน้อย 3 คน ในแต่ละประเด็น

7. สรุปผล

การสรุปผลวิจัยต้องได้องค์ความรู้ใหม่ โดยที่ผู้เขียนต้องสรุป เนื้อหาประเด็นและสาระสำคัญหรือข้อค้นของงานวิจัยสั้น ๆ ด้วย ภาษาที่ชัดเจนและรัดกุม ว่าตอบโจทย์วัตถุประสงค์ หรือที่มาของ ปัญหา หรือสมมติฐาน หรือคำถามการวิจัยหรือไม่อย่างไร

8. ข้อเสนอแนะ

ความยาวประมาณครึ่งหน้า เป็นการเขียนเพื่อให้ข้อมูล คำแนะนำ แนวทาง หรือวิธีการใด ๆ แก่ผู้เกี่ยวข้อง เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ ในด้านต่าง ๆ อาทิ การพัฒนา การปรับปรุง การเปลี่ยนแปลง หรือ เพิ่มประสิทธิภาพการดำเนินการ ซึ่งมีหลักการเขียน 2 ประการคือ (1) ข้อเสนอแนะจากผลการวิจัย โดยอาจเสนอแนะในเชิงนโยบาย หรือในเชิงปฏิบัติการก็ได้ (2) ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยครั้งต่อไป เพื่อให้ผู้อื่นที่สนใจในหัวข้อใกล้เคียงกันสามารถนำไปศึกษาวิจัย เพิ่มเติมในอนาคต เช่น ขยายขอบเขตการวิจัย เพิ่มตัวแปร หรือศึกษา ประชากรในกลุ่มอื่น หรือการศึกษาเปรียบเทียบ เป็นต้น

9. เอกสารอ้างอิงแบบ Vancouver

การอ้างอิงไม่ควรเกิน 20 อ้างอิง ผู้พิมพ์ต้องมีการค้นคว้า รวบรวมสารสนเทศจากแหล่งต่าง ๆ โดยเฉพาะวารสาร เอกสาร ที่มีความสำคัญจริง ๆ เป็นการนำรายการอ้างอิงจากท้ายบทความ ใส่เชิงอรรถอ้างอิงทั้งหมดตามที่ปรากฏในเนื้อเรื่อง มารวบรวม เขียนไว้ที่ท้ายบทความโดยเรียงลำดับและต้องสอดคล้องกับลำดับที่ ในรายการอ้างอิงท้ายบทความ

การเขียนบทความวิชาการ

เป็นข้อเขียนเชิงสารที่ผู้เขียนตั้งใจหยิบยกประเด็นใดประเด็นหนึ่ง หรือปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นในแวดวงวิชาการ วิชาชีพ เพื่อวิเคราะห์ หรือวิพากษ์หรือมีทัศนะหรือให้แนวคิดใหม่ ให้ผู้อ่านทราบหรือ ปรับเปลี่ยนแนวคิด ความเชื่อมาสู่แนวคิดของผู้เขียน โดยเน้นการให้ ข้อมูลความรู้เป็นสำคัญ และต้องมีข้อมูลทางวิชาการ เอกสารอ้างอิง และเหตุผลที่พิสูจน์ได้ เพื่อสร้างความน่าเชื่อถือให้แก่ผู้อ่าน ประกอบด้วย

1. บทนำ

เป็นส่วนที่ดึงดูดใจผู้อ่านให้เกิดความสนใจ อาจกล่าวถึงวัตถุประสงค์ ของการเขียน หรือบอกที่มาของการเขียน และระบุขอบเขตของ บทความนั้น ๆ เพื่อให้ผู้อ่านไม่คาดหว้งเกินขอบเขตที่กำหนดไว้ ซึ่งจะช่วยในการปูพื้นฐานหรือกรอบแนวคิดให้ผู้อ่านเข้าใจเนื้อหาสาระ ของบทความที่จะนำเสนอ (ไม่ต้องเขียน “บทนำ”)

2. เนื้อเรื่อง

เป็นการนำเสนอข้อมูลเนื้อหาสาระที่เข้าใจง่ายและรวดเร็ว การนำเสนอเนื้อเรื่องอาจแบ่งเป็นประเด็น หรือหัวข้อย่อย หรือลำดับ เหตุการณ์ตามความเหมาะสมของบทความนั้น ๆ อาจมีการวิเคราะห์ วิพากษ์ วิจัยด้วยข้อมูลอ้างอิงที่น่าเชื่อถือ

3. บทสรุป

ให้เขียนหัวข้อ “บทสรุป” โดยเป็นการสรุปประเด็นสำคัญ ของบทความอย่างสั้น ๆ ท้ายบท ซึ่งอาจบอกถึงผลลัพธ์ว่า สิ่งที่กำลังกล่าว มา มีความสำคัญอย่างไร จะนำไปใช้อะไรได้บ้าง จะทำให้เกิดอะไรต่อไป หรืออาจตั้งประเด็นคำถามหรือประเด็นทิ้งท้ายเพื่อกระตุ้นให้ผู้อ่าน ได้แสวงหาความรู้ หรือคิดค้นพัฒนาเรื่องนั้นต่อไป

4. การเขียนเอกสารอ้างอิงแบบ Vancouver

คำแนะนำการเขียนเอกสารอ้างอิงแบบ Vancouver

การเขียนอ้างอิงเอกสาร เป็นสิ่งที่แสดงถึงหลักฐานความน่าเชื่อถือของผลงาน และแหล่งความรู้ที่สามารถสืบค้นเพื่อตรวจสอบความถูกต้องและค้นคว้าเพิ่มเติม เพื่อเพิ่มพูนความรู้ความเข้าใจ และการศึกษาต่อยอดในเรื่องที่อ้างอิงนั้น ๆ ซึ่งบทความในวารสารอาหารและยา เป็นวารสารทางการแพทย์และวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงกำหนดให้ใช้การอ้างอิงแบบ Vancouver เนื่องจากเป็นที่ยอมรับจากคณะกรรมการบรรณาธิการวารสารทางการแพทย์นานาชาติ (International Committee of Medical Journal Editors: ICMJE) โดยมีรูปแบบการเขียนเอกสารอ้างอิง 2 ส่วน คือ การอ้างอิงในเนื้อหาหรือเชิงบรรณ และการอ้างอิงท้ายเล่ม

1. อ้างอิงในเนื้อหาหรือเชิงบรรณ (in-text citation)

เมื่อนำข้อมูลผลงานของบุคคลอื่นมาอ้างอิงในผลงานวิจัยหรือผลงานวิชาการ การเขียนให้ใส่ตัวเลขตามลำดับของการอ้างอิง ยกขึ้น (superscript) หลังข้อความหรือชื่อผู้เขียน และใช้เลขลำดับเดิมเมื่ออ้างอิงซ้ำทุกครั้ง โดยมีวิธีอ้างอิง ได้แก่

1.1 การอ้างอิงเน้นผู้เขียน ให้ใส่หมายเลขลำดับการอ้างอิง หลังชื่อผู้เขียนเจ้าของผลงาน

ตัวอย่าง จากการศึกษาของ Mitsu และ Appavu¹ และ AHSP² กล่าวว่า การขาดความรู้และการฝึกทักษะอาจนำไปสู่การเกิดความคลาดเคลื่อนทางยาได้

1.2 การอ้างอิงเน้นเนื้อหา ให้ใส่หมายเลขลำดับการอ้างอิง หลังข้อความ

1) อ้างอิงรายการเดียว

ตัวอย่าง เชื้อ *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ไม่สร้างสปอร์ และเคลื่อนที่ได้ พบทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ดิน น้ำ อูจจาระ และบนพื้นผิววัสดุอินทรีย์ที่สัมผัส¹

2) อ้างอิงหลายรายการพร้อมกัน กรณีที่เลขลำดับการอ้างอิงเป็นลำดับที่ต่อเนื่องกันให้ใช้เครื่องหมายติดังค์ (-) คั่นระหว่างตัวเลข แต่หากลำดับไม่ต่อเนื่องกันให้ใช้เครื่องหมายจุลภาค (,) คั่นระหว่างตัวเลขโดยไม่ต้องเว้นช่องว่าง

ตัวอย่าง องค์การอนามัยโลกได้เล็งเห็นถึงวิกฤตของปัญหาของคุณภาพยาเพราะพบว่ายาที่มีคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐานพบได้ทั่วโลก แม้ในประเทศที่พัฒนาแล้ว โดยผลสำรวจขององค์การอนามัยโลกพบปัญหาคุณภาพยาทั่วโลกร้อยละ 10 โดยร้อยละ 50 พบในทวีปเอเชียและทวีปแอฟริกา¹⁻²

ตัวอย่าง สาเหตุของการใช้ไนโตรที่พบจากตัวอย่างสถานที่ในการสุ่มเก็บตัวอย่างเนื่องจากเป็นสถานที่ที่มีการจำหน่ายอยู่เป็นประจำ ผู้จำหน่ายผลิตภัณฑ์จะรับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปมาจากพ่อค้าคนกลางอีกที ดังนั้นเพื่อเป็นการลดค่าขนส่งและสามารถเก็บไว้ได้นาน จึงต้องมีการใส่ไนโตรที่ยืดอายุของผลิตภัณฑ์ โดยไนโตรจะเข้าไปชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและยังมีส่วนช่วยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคต่าง ๆ อีกทั้งยังช่วยในการตรึงสีหรือทำให้สีเกิดความเสถียรเพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีความน่ารับประทานอีกด้วย โดยจะเติมลงในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปประเภทกลุ่มเนื้อหมักต่าง ๆ เช่น แฮมและแฮมม เป็นต้น^{2,9}

2. การอ้างอิงท้ายเล่มหรือบรรณานุกรม

เป็นการนำรายการที่อ้างอิงในเนื้อหา มารวบรวมไว้ในส่วนท้ายของบทความภายใต้หัวข้อเอกสารอ้างอิง เรียงตัวเลขเป็นลำดับ 1, 2, 3, จัดขอบซ้าย โดยที่ตัวเลขต้องตรงตามลำดับการอ้างอิงในเนื้อหา ซึ่งการเขียนเอกสารอ้างอิงจะมีความแตกต่างกันตามประเภทของเอกสารที่นำมาอ้างอิง เช่น หนังสือ บทความวารสาร เอกสารจากอินเทอร์เน็ต

หลักการทั่วไปของการเขียนเอกสารอ้างอิง

1. ชื่อผู้เขียน (authors)

ชื่อผู้เขียนคนไทย ให้ใช้ชื่อตามด้วยนามสกุล ส่วนภาษาอังกฤษ ให้ใช้นามสกุลขึ้นต้น (family name) ตามด้วยอักษรย่อชื่อต้นตัวแรก (first name) และอักษรย่อชื่อกลาง (ถ้ามี) กรณีผู้เขียนเป็นนิติบุคคล เช่น หน่วยงาน องค์กร สถาบัน ให้ใส่ชื่อหน่วยงาน ตามด้วยหน่วยงานรองตามลำดับ (ถ้ามี) โดยมีเครื่องหมายมหภาคภาคคั่น (.) เช่น สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. กองยา.

2. ชื่อเรื่อง (title)

2.1 ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษ อักษรตัวแรกให้ใช้ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ นอกนั้นใช้ตัวพิมพ์เล็ก ยกเว้นเป็นชื่อเฉพาะ เช่น ชื่อคน ชื่อประเทศ ชื่อเมือง ชื่อสารเคมี

2.2 กรณีมีชื่อเรื่องย่อย ให้ใช้เครื่องหมายวิภาค (;) หลังชื่อหลัก และเว้น 1 ตัวอักษร

3. ครั้งที่พิมพ์ (edition) ของหนังสือ

ใส่เฉพาะการจัดพิมพ์ตั้งแต่ครั้งที่ 2 เป็นต้นไป โดยใส่ต่อจากชื่อเรื่อง ตามด้วยเครื่องหมายมหภาค (.) และเว้น 1 ตัวอักษร ตัวอย่าง พิมพ์ครั้งที่ 2. หรือ 2nd ed.

4. สถานที่พิมพ์ หรือสำนักพิมพ์ของหนังสือ (place or publisher)

4.1 มีรูปแบบคือ ชื่อจังหวัดหรือชื่อเมือง: สถานที่พิมพ์; ปีที่พิมพ์ ตัวอย่าง กรุงเทพฯ: บอร์น ทู ปี; 2563. ทั้งนี้ กรณีหนังสือภาษาอังกฤษที่มีชื่อเมืองไม่เป็นที่รู้จักแพร่หลายให้ระบุชื่อรัฐกำกับไว้ในวงเล็บด้วย เช่น St Louis (MO) Mosby; 2020.

4.2 ให้ตัดคำประกอบอื่นในชื่อสำนักพิมพ์ออก เช่น ห้างหุ้นส่วน จำกัด บริษัท จำกัด Publisher, Limited (Ltd.), Co., Incorporated (Inc.), and company, and sons

4.3 กรณีเป็นหน่วยงานหรือสถาบันเป็นผู้จัดพิมพ์ ให้ใช้ชื่อหน่วยงานรอง ตามด้วยหน่วยงานใหญ่ โดยเว้น 1 ตัวอักษร เช่น นนทบุรี: กองยุทธศาสตร์และแผนงาน สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา; 2563.

4.4 หากไม่ปรากฏสถานที่พิมพ์ ให้ใช้ [place unknown หรือไม่ปรากฏสถานที่พิมพ์]

5. ปีที่พิมพ์ (year)

ให้ใส่ตัวเลขวปี พ.ศ. หรือปี ค.ศ. ตามด้วยเครื่องหมายมหภาค (.)

6. เลขหน้า (page)

เลขหน้าของบทความวารสาร บทใดบทหนึ่งในหนังสือ หรือเอกสารประกอบการประชุม ให้ใส่ตัวเลขหน้าแรก-หน้าสุดท้าย โดยใช้ตัวเต็มสำหรับหน้าแรก และตัดตัวเลขข้อต่อสำหรับหน้าสุดท้าย เช่น หน้า 2536-49

รูปแบบการอ้างอิงแต่ละประเภทของแหล่งข้อมูล

1. หนังสือ

1.1 หนังสือและตำรา

ชื่อผู้แต่ง. ชื่อหนังสือ. ครั้งที่พิมพ์ หรือ ed. สถานที่พิมพ์: สำนักพิมพ์; ปีพิมพ์.

ตัวอย่าง

1. รุ่งรัตน์ เหลืองนทีเทพ. พืชเครื่องเทศ และสมุนไพร. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์; 2540.
2. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik, M. Immunobiology. 5th ed. New York: Garland Publishing; 2001.

1.2 หนังสือที่มีผู้เขียนเฉพาะบท และมีบรรณาธิการ

ชื่อผู้แต่ง. ชื่อบท. ใน/In: ชื่อบรรณาธิการ, บรรณาธิการ. ชื่อหนังสือ. ครั้งที่พิมพ์. เมืองที่พิมพ์: สำนักพิมพ์; ปีพิมพ์. หน้า/p. หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.

ตัวอย่าง

1. เกียรติศักดิ์ จีระแพทย์. การให้สารน้ำและเกลือแร่. ใน: มนตรี ตูจันดา, วินัย สุวดี, อรุณ วงษ์จิราขุณ, ประอร ขวลิตธำรง, พิภพ จิรภิญโญ, บรรณาธิการ. กุมารเวชศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: เรือนแก้วการพิมพ์; 2540. หน้า 424-78.
2. Hamera J. Performance ethnography. In: Lincoln YS, Denzin NK, editors. Strategies of qualitative inquiry. Thousand Oaks (CA): Sage; 2013. P. 205-31.

2. การอ้างอิงบทความในวารสารทางวิชาการ

ชื่อผู้แต่ง. ชื่อบทความ. ชื่อวารสาร ปีพิมพ์;ปีที่(เล่มที่):หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.

ทั้งนี้ ชื่อวารสารให้ใช้ชื่อย่อตามมาตรฐานสากลที่กำหนดไว้ใน Index Medicus โดยตรวจสอบได้จาก เว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> และคลิกที่ Journals in NCBI Databases

ตัวอย่าง

1. อรุณรัตน์ อรุณเมือง. การพัฒนาคุณภาพการให้บริการงานควบคุม กำกับผลิตภัณฑ์และบริการสุขภาพก่อนออกสู่ตลาด สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดชัยนาท. วารสารอาหารและยา 2561;25(1): 53-63.
2. Kane RA, Kane RL. Effect of genetic testing for risk of Alzheimer's disease. N Engl J Med 2009;361:298-9.

3. เอกสาร

3.1 เอกสารการประชุม/รายงานการประชุม

ชื่อบรรณาธิการ, บรรณาธิการ. ชื่อเรื่อง. ชื่อการประชุม; ปี เดือน วันที่ที่ประชุม; สถานที่จัดประชุม. เมืองที่พิมพ์: สำนักพิมพ์; ปีพิมพ์. p. หรือหน้าแรก-หน้าสุดท้าย.

ตัวอย่าง

1. สุขเกษม โฆษิตเศรษฐ, รัตนา เติงทิพย์. การหาโปรตีนในปัสสาวะ ที่บ่งชี้โรคไตด้วยวิธีโปรตีนโนมิคส์. ใน: ขจร ลักษณ์ขยปกรณ์, บรรณาธิการ. ประชุมวิชาการคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย

ธรรมศาสตร์ ประจำปี 2552 Changes: new trends in medicine; วันที่ 14-17 กรกฎาคม 2552; ณ ห้องประชุมแพทย์โดม 2. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2552. หน้า 23-40.

2. Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress in Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland, Amsterdam: North-Holland; 1992. P. 1561-5.

3.2 บทความที่นำเสนอในการประชุม

ชื่อผู้แต่ง. ชื่อบทความ. ใน/In: ชื่อบรรณาธิการ, บรรณาธิการ. ชื่อเรื่อง. ชื่อการประชุม;ครั้งที่ประชุม. วันเดือนปีที่ประชุม; สถานที่ประชุม: เมืองที่พิมพ์: สำนักพิมพ์; ปีที่พิมพ์. หน้า.

ตัวอย่าง

1. ชีระ ฤๅษะตระกูล. Coagulopathy in liver diseases. ใน: ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์, ทวีศักดิ์ แทนวันดี, อรุณจิต จุฑาพุทธิ, บรรณาธิการ. Vascular of the liver. การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 4 Vascular diseases of the liver; 12-14 มี.ค.2552; เพชรบุรี. [กรุงเทพฯ]: สมาคมโรคตับ (ประเทศไทย); 2552. หน้า 1-13.
2. Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG, editors. Genetic programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3-5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer; 2002. p. 182-91.

3.3 เอกสารวิทยานิพนธ์

ชื่อผู้แต่ง. ชื่อเรื่อง [ประเภท/ระดับปริญญา]. เมืองที่พิมพ์: มหาวิทยาลัย; ปีที่ได้ปริญญา.

ตัวอย่าง

1. พงษ์พัฒน์ เวชสิทธิ์. การศึกษาโปรตีนจากพิษงูแมวเซาที่มีผลต่อการทำงานของไตในหนูขาว [ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ; 2542.
2. Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [Dissertation]. St. Louis, (MO): Washington University; 1995.

3.4 เอกสารกฎหมาย

ชื่อหน่วยงานเจ้าของกฎหมาย. ชื่อกฎหมาย และปี. หนังสือที่เผยแพร่ เล่มที่, ตอนที่ (ลงวันที่).

ตัวอย่าง

1. พระราชกฤษฎีกาเงินสวัสดิการเกี่ยวกับการรักษาพยาบาล พ.ศ. 2521. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 95, ตอนที่ 30 ก ฉบับพิเศษ (ลงวันที่ 16 มีนาคม 2521).
2. กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 281) พ.ศ. 2547 เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร. ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่มที่ 121, ตอนที่พิเศษ 97 ง (ลงวันที่ 6 กันยายน 2547).

4. เอกสารอิเล็กทรอนิกส์

4.1 หนังสืออิเล็กทรอนิกส์

ชื่อผู้แต่ง. ชื่อหนังสือ [อินเทอร์เน็ต/Internet]. ครั้งที่พิมพ์. เมืองที่พิมพ์: สำนักพิมพ์; ปีที่พิมพ์ [เข้าถึงเมื่อ วันเดือนปีหรือ cited year month date]. เข้าถึงได้จากหรือ Available from: <http://> (ไม่มีจุด full stop)

ตัวอย่าง

1. ศุภศิลป์ สุทธรา. ผลของวิตามินดีต่อการเกิด การป้องกันและการรักษาโรคกระดูกพรุน [อินเทอร์เน็ต]. ขอนแก่น: กลุ่มศึกษาวิจัยโรคกระดูกพรุน คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2557 [เข้าถึงเมื่อ 8 ก.ย. 2557]. เข้าถึงได้จาก: http://www.osteokku.com/osteokku_o/ebook/vitamins.html
2. Foley KM, Improving palliative care for cancer [Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: http://www.nap.edu/catalog/10149/improving_palliative_care_for_cancer

4.2 บทความวารสารอิเล็กทรอนิกส์

ชื่อผู้แต่ง. ชื่อบทความ. ชื่อวารสาร [อินเทอร์เน็ต/Internet]. ปีพิมพ์ [เข้าถึงเมื่อ วันเดือนปี หรือ cited year month date]; ปีที่(ฉบับที่):หน้าแรก- สุดท้าย. เข้าถึงได้จาก หรือ Available from: <http://> (ไม่มีจุด full stop)

ตัวอย่าง

1. มรกต จรูญวรรณะ. สถานการณ์และปัญหาการเข้าถึงยากกลุ่มโอปิออยด์ กรณีศึกษา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. วารสารอาหารและยา [อินเทอร์เน็ต]. 2563 [เข้าถึงเมื่อ 30 มิ.ย. 2563]; 27(1):13-27. เข้าถึงได้จาก: <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/article/view/243292/165179>
2. Annas GJ. Resurrection of a stem-cell funding barrier-Dickey-Wicker in court. N Engl J Med [Internet]. 2010 [cited 2011 Jun 15];363:1687-9. Available from: <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMp1010466>

4.3 วารสารอิเล็กทรอนิกส์ที่มีหมายเลข Digital Object Identifier (DOI)

ชื่อผู้แต่ง. ชื่อบทความ. ชื่อวารสาร ปี;ปีที่:เลขหน้า (ที่มี e กำกับ). doi: xxxxxxxxxx.หมายเลขประจำเอกสารในฐานข้อมูล PubMed (PubMed PMID): xxxxxxxx.

ตัวอย่าง

1. Zhang M, Holman CD, Price SD, Sanfilippo FM, Preen DB,

Bulsara MK. Comorbidity and repeat admission to hospital for adverse drug reactions in older adults: retrospective cohort study. BMJ 2009;338:a2752. doi: 10.1136/bmj.a2752.

4.4 เอกสารจากอินเทอร์เน็ต (อ้างอิงทั้งเว็บไซต์)

ชื่อผู้จัดทำหรือหน่วยงาน. ชื่อเรื่อง [อินเทอร์เน็ต]. เมือง: ชื่อหน่วยงาน; ปีที่เผยแพร่ [เข้าถึงเมื่อ วัน เดือน ปี หรือ cited year month date]. เข้าถึงได้จาก หรือ Available from: <http://>

ตัวอย่าง

1. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน ขนมหิน (มผช. 500/2547). [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพฯ: สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม; 2547 [เข้าถึงเมื่อ 10 ต.ค. 2562]. เข้าถึงได้จาก: http://tcps.tisi.go.th/pub/tcps500_47.pdf
2. Ranchon F, Salles G, Späth HM, Schwiertz V, Vantard N, Parat S, et al. Chemotherapeutic errors in hospitalised cancer patients: attributable damage and extra costs [Internet]. 2011 [cited 2016 Aug 9]. Available from: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-11-478>

4.5 เอกสารจากส่วนหนึ่งของ homepage หรือ website

ชื่อเว็บไซต์ [อินเทอร์เน็ต/Internet]. เมืองที่พิมพ์: สำนักพิมพ์; ปีพิมพ์. ชื่อเรื่องที่นำมาอ้างอิง; ปีพิมพ์ของเรื่องที่นำมาอ้างอิง [วันที่ปรับปรุง/updated ปี เดือน วัน; เข้าถึงเมื่อ/cited ปี เดือน วัน]; [ประมาณ...น./about screens/p.]. เข้าถึงได้จาก หรือ Available from: <http://>

ตัวอย่าง

1. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา [อินเทอร์เน็ต]. นนทบุรี: สำนักงาน; c2020. แนวทางการปฏิบัติ ด้านการจัดเตรียมสถานที่ การเก็บรักษาและการควบคุมการใช้สำหรับผู้ซื้อใบอนุญาตปลูก ซึ่งยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 เฉพาะกัญชา; [เข้าถึงเมื่อ 6 ม.ค. 2564]; [ประมาณ 1 น.]. เข้าถึงได้จาก: <https://cannabis.fda.moph.go.th/form/form-farm/>
2. AMA: helping doctors help patients [Internet]. Chicago: American Medical Association; c1995-2007. Medical liability crisis map; [update 2006 Dec 20; cited 2007 Mar 20]. [about 2 screens]. Available from: <http://www.ama-assn.org/ama/noindex/category/11871.html>

หลักเกณฑ์การพิจารณาตีพิมพ์บทความ

1. เป็นบทความที่ไม่เคยตีพิมพ์ที่ไหนมาก่อน หรือไม่อยู่ระหว่างเสนอตีพิมพ์ในวารสารอื่น เว้นแต่เป็นการเรียบเรียงหรือเพิ่มองค์ความรู้ใหม่
2. เป็นบทความที่มีคุณค่าทางวิชาการ ส่งเสริมให้เกิดการค้นคว้า ต่อยอดงานวิจัยและงานวิชาการ และใช้อ้างอิงได้
3. กองบรรณาธิการจะประเมินบทความเบื้องต้นโดยพิจารณาความสอดคล้องของขอบเขตของวารสารกับเนื้อหาบทความ และรูปแบบการพิมพ์ตามข้อกำหนด
4. กองบรรณาธิการจะส่งบทความที่พิจารณาเบื้องต้นหรือบทความที่ผู้พิมพ์แก้ไขเบื้องต้นส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิ (peer review) 2-3 คนพิจารณาเป็นแบบ (double blind)
5. บทความที่รับตีพิมพ์ต้องผ่านการพิจารณาจากผู้ทรงคุณวุฒิ
6. เนื้อหาหรือข้อความในบทความในวารสารเป็นความคิดเห็นของผู้พิมพ์ ดังนั้นสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และกองบรรณาธิการวารสารฯ ไม่จำเป็นต้องเห็นพ้องหรือรับผิดชอบ
7. สัดส่วนจำนวนเรื่องในการตีพิมพ์แต่ละฉบับ กำหนดให้สัดส่วนผู้พิมพ์ภายในหน่วยงานต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ ผู้พิมพ์ภายนอก ตามหลักเกณฑ์ TCI
8. การรับตีพิมพ์จะเรียงลำดับจากวันที่ส่งบทความ ยกเว้นมีบทความที่เข้ากับสถานการณ์หรือประเด็นเร่งด่วน
9. การตีพิมพ์แต่ละฉบับ ผู้พิมพ์หลักสามารถลงได้ฉบับละ 1 เรื่อง

จริยธรรมในการตีพิมพ์ผลงานในวารสารอาหารและยา (Publication Ethics)

บทบาทและหน้าที่ของบรรณาธิการวารสาร

1. บรรณาธิการขอพิจารณาบทความ ที่มีรูปแบบครบถ้วนตามข้อกำหนดเท่านั้น หากบทความนั้น ไม่ตรงตามข้อกำหนดกองบรรณาธิการฯ มีสิทธิ์ในการปฏิเสธตีพิมพ์
2. บรรณาธิการต้องไม่มีส่วนได้ส่วนเสียกับผู้พิมพ์
3. บรรณาธิการไม่รับตีพิมพ์บทความที่เคยตีพิมพ์มาก่อนแล้ว
4. บรรณาธิการสามารถออกหนังสือตอบรับการตีพิมพ์ให้ในกรณีที่บทความนั้นส่งผู้ประเมินแล้ว พร้อมจะตีพิมพ์

บทบาทและหน้าที่ของผู้พิมพ์

1. ผู้พิมพ์ต้องส่งบทความมาลงตีพิมพ์ที่ไม่เคยส่งวารสารอื่นมาก่อน และจะไม่นำบทความ ส่งวารสารอื่นระหว่างที่รอพิจารณาตีพิมพ์
2. ผู้พิมพ์ต้องเขียนบทความตามคำแนะนำของผู้พิมพ์ที่วารสารกำหนด
3. ผู้พิมพ์ต้องส่งบทความที่ไม่มีการคัดลอก เลียนแบบ ผลงานของท่านอื่น
4. ผู้พิมพ์ต้องตรวจสอบการเขียนเอกสารอ้างอิงทั้งหมดก่อนส่งมาตีพิมพ์

บทบาทและหน้าที่ของผู้ทรงคุณวุฒิ

1. ผู้ทรงคุณวุฒิต้องไม่มีส่วนได้ส่วนเสียกับผู้พิมพ์
2. ผู้ทรงคุณวุฒิไม่ควรแสดงความคิดเห็นส่วนตัวในการประเมินบทความในการตัดสินใจ
3. ผู้ทรงคุณวุฒิจะต้องคำนึงถึงคุณภาพของบทความ และประเมินด้วยความเข้มข้น
4. ผู้ทรงคุณวุฒิเป็นผู้มีความเชี่ยวชาญ มีความรู้ความเข้าใจในเนื้อหาบทความที่ประเมิน อย่างแท้จริง

รับตีพิมพ์บทความคุณภาพ
ในด้านการคุ้มครองผู้บริโภค
ด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพ
โดยมีกลุ่มเป้าหมายคือ
นักวิชาการ นักศึกษา และ
บุคลากรที่สนใจ
ทั้งในและนอกหน่วยงาน

เชิญชวนส่ง บทความวิจัยและ บทความวิชาการ

หากสนใจโปรดส่งไปยัง <https://www.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal> โดยทำการสมัครสมาชิก หรือ login และทำการส่งต้นฉบับบทความผ่านระบบ Online Submission



รับรองระหว่างปี 2020 - 2024

วารสารอาหารและยา ได้รับการรับรองโดยศูนย์อ้างอิงวารสารไทย (Thai Journal Citation Index Centre - TCI) สาขาวารสารสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ในระดับที่ 2 มีระยะเวลารับรองถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2567



สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
FOOD AND DRUG ADMINISTRATION



สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
กองยุทธศาสตร์และแผนงาน วารสารอาหารและยา

88/24 ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
โทร.02-590-7000 ต่อ 97256
<https://www.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal>
<http://www.fda.moph.go.th>