
การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในยาจากสมุนไพร โดยวิธี Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry

สุภาณี ดวงธีรปรีชา จิราณูช แจ่มทวีกุล ประภาพรรณ สุขพรรณ และปรัชญาพร อินทองแก้ว
สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การวิเคราะห์ปริมาณสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในยาจากสมุนไพร โดยวิธี Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry (GFAAS) ได้ถูกพัฒนาขึ้นและตรวจสอบความถูกต้อง เพื่อใช้ตรวจการปนเปื้อนของโลหะหนักดังกล่าวในยาจากสมุนไพร เพื่อประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ เตรียมตัวอย่างโดยวิธีย่อยสลายด้วยกรด แล้วตรวจหาปริมาณโดยวิธี GFAAS ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตามแนวทางของ ICH-Q2(R1) พบว่าสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 5-80, 10-80 และ 0.25-4.0 นาโนกรัมต่อมิลลิตรตามลำดับ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.999 ขีดจำกัดของการตรวจพบ เท่ากับ 2.5, 2.5 และ 0.16 นาโนกรัมต่อมิลลิตร โดยที่ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ เท่ากับ 1, 2 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม สำหรับสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ตามลำดับ การทดสอบความแม่นยำของวิธี ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับเท่ากับ 105.6, 98.8 และ 101.0 สำหรับสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียมตามลำดับ วิธีวิเคราะห์มีความเที่ยง ได้ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ น้อยกว่า 2.9, 2.0 และ 4.7 สำหรับสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียมตามลำดับ ทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ เมื่อนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปตรวจหาการปนเปื้อนของสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในยาจากสมุนไพร 86 ตัวอย่างที่มีจำหน่ายในประเทศไทย พบว่าการปนเปื้อนของโลหะหนักทั้งสามชนิดไม่เกินมาตรฐานที่กำหนดไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย

Accepted for publication, 17 June 2015

บทนำ

ปัจจุบันกระแสของการแพทย์ทางเลือก ไม่ว่าจะเป็นการแพทย์แผนไทย การแพทย์แผนจีน การแพทย์แบบองค์รวมหรือการแพทย์ทางเลือกอื่นๆ กลับมาได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง ประกอบกับการแพทย์แผนตะวันตกไม่สามารถตอบสนองต่อความต้องการของผู้ป่วยโรคเรื้อรังได้ จึงทำให้ประชาชนให้ความสนใจการแพทย์ทางเลือกมากขึ้น โดยใช้สมุนไพรและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรเพื่อรักษาและดูแลสุขภาพ โดยมีความเชื่อว่าผลิตภัณฑ์จากธรรมชาตินั้นจะมีความปลอดภัยหรือเกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์น้อยกว่ายาแผนปัจจุบัน และจากการที่ประเทศไทยมีนโยบายส่งเสริมการใช้ยาสมุนไพรมาอย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการบำบัดรักษา ดูแลสุขภาพของประชาชนและทดแทนการนำเข้ายาจากต่างประเทศ ตลอดจนเพื่อส่งเสริมองค์ความรู้ดั้งเดิมของหลักการแพทย์และเภสัชกรรมแผนไทย ทำให้มีการตื่นตัวในการใช้สมุนไพรและการแพทย์แผนไทยเพิ่มมากขึ้น ปัจจุบันมีการบรรจุยาแผนโบราณจำนวน 50 รายการ และยาพัฒนาจากสมุนไพร 21 รายการ ไว้ในบัญชียาหลักแห่งชาติฉบับที่ 4⁽¹⁾ และกระทรวงสาธารณสุขได้ให้การสนับสนุนโดยมีนโยบายส่งเสริมให้สถานพยาบาลในสังกัดทั่วประเทศใช้ยาจากสมุนไพรบำบัดรักษาควบคู่กับยาแผนปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการใช้ยาสมุนไพรยังมีสัดส่วนที่น้อยอยู่เมื่อเทียบกับเงินงบประมาณสาธารณสุขของประเทศ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากบุคลากรทางสาธารณสุขตลอดจนผู้บริโภคยังขาดความเชื่อมั่นในคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เหล่านี้

จากการขยายตัวของภาคอุตสาหกรรม ทำให้มีการนำโลหะหนักมาใช้ในกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมต่างๆ มากขึ้น ภาคการเกษตรมีการใช้ปุ๋ยและยาฆ่าแมลงมากขึ้น ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีโลหะหนักเป็นส่วนผสม ทำให้มีสารเคมีและโลหะหนักตกค้างสะสมในดินและน้ำ ส่งผลให้พืชสมุนไพรต่างๆ ที่ปลูกในสิ่งแวดล้อมเหล่านั้นดูดซึมและสะสมโลหะหนักมากขึ้น เมื่อผู้บริโภคได้รับสมุนไพรที่ปนเปื้อนดังกล่าวจะสามารถก่อให้เกิดพิษต่อผู้บริโภคได้ ทั้งพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรัง พิษจากโลหะหนักที่มีรายงานการพบมากในประเทศไทยคือ พิษสารหนู พิษตะกั่ว พิษแคดเมียม⁽²⁾ เป็นต้น พิษเนื่องจากสารหนูส่วนใหญ่เป็นพิษแบบเรื้อรัง จะทำให้ผิวหนังมีลักษณะกระดากระต่าง เกิดตุ่มแข็ง มีอาการชาปลายนิ้วมือ นิ้วเท้า กล้ามเนื้ออ่อนแรง โลหิตจาง เกิดมะเร็งผิวหนังหรืออวัยวะภายในได้ อันตรายโดยทั่วไปจากตะกั่ว จะทำให้เม็ดเลือดแดงอายุสั้นลง เกิดเป็นโรคโลหิตจาง และเป็นอันตรายต่อระบบประสาท ไต ทางเดินอาหาร ตับ และหัวใจ สำหรับแคดเมียมเมื่อเข้าสู่ร่างกาย จะแพร่กระจายไปที่ตับ ม้าม และลำไส้ และเมื่อสะสมมากขึ้นจะทำให้เกิดมะเร็ง ไตทำงานผิดปกติ ทำให้เกิดโรคความดันโลหิตสูง ปวดกระดูกสันหลัง ปวดแขนขา ซึ่งจะทำให้ไตพิการได้^(2, 3, 4)

ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการควบคุมคุณภาพยาจากสมุนไพร เพื่อให้ประชาชนได้รับความปลอดภัยในการบริโภคยา และได้รับยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาอาการเจ็บป่วย สำหรับด้านความปลอดภัยจะคำนึงถึงการปนเปื้อนของโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์เป็นหลัก โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้ประกาศเรื่องหลักเกณฑ์การพิจารณาการขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนโบราณ เกี่ยวกับมาตรฐานการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และโลหะหนัก⁽⁵⁾ ซึ่งจะต้องไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์และโลหะหนักเกินเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด เพื่อแสดงความปลอดภัยของยา ประกอบการขอขึ้นทะเบียนยาแผนโบราณหรือยาสมุนไพร โดยใช้ค่ามาตรฐานตามที่กำหนดในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia 2009) โดยเกณฑ์การปนเปื้อนของโลหะหนักในยาจากสมุนไพรต้องมีปริมาณสารหนูไม่เกิน 4 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ตะกั่วไม่เกิน 10 ส่วนในล้านส่วน (ppm) และแคดเมียมไม่เกิน 0.3 ส่วนในล้านส่วน (ppm)⁽⁶⁾

เนื่องจากไม่มีวิธีวิเคราะห์โลหะหนักแต่ละชนิดกำหนดไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยดังกล่าว ผู้วิจัยจึงพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก 3 ชนิดนี้คือ สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม เพื่อให้ได้วิธีที่สามารถตรวจปริมาณโลหะหนักแต่ละชนิดที่ระดับค่ามาตรฐานได้ โดยเลือกวิธีการเตรียมตัวอย่างแบบ wet digestion ย่อยสลายด้วยกรดไนตริก ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ ทาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างยาจากสมุนไพร จากนั้นจึงตรวจหาปริมาณโลหะหนักแต่ละชนิดโดยวิธี Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry

metry (GFAAS) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไว สามารถตรวจวิเคราะห์ที่ปริมาณต่ำๆ ได้ดี หาสถานะของเครื่องที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์แต่ละธาตุ โดยใช้สภาวะการทดสอบของบริษัทผู้ผลิตเครื่องมือเป็นแนวทาง แล้วทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ได้ตามแนวทางของ ICH-Q2(R1)⁽⁷⁾ เพื่อนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปใช้ในการตรวจปริมาณสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในยาจากสมุนไพร เพื่อประกันความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ โดยใช้เกณฑ์ตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย เป็นการสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภค และยังเป็นการส่งเสริมนโยบายการใช้ยาจากสมุนไพรของประเทศด้วย

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่อง Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry (GFAAS), บริษัท PerkinElmer รุ่น Analyst 800
- Analytical balance ความละเอียด 0.0001 กรัม บริษัท Mettler รุ่น AT200
- หลอดกำเนิดแสงสำหรับวิเคราะห์ธาตุสารหนู (Arsenic lamp)
- หลอดกำเนิดแสงสำหรับวิเคราะห์ธาตุตะกั่ว (Lead lamp)
- หลอดกำเนิดแสงสำหรับวิเคราะห์ธาตุแคดเมียม (Cadmium lamp)
- หลอดกราฟไฟต์ (Graphite tubes)
- Water bath บริษัท Neslab รุ่น GP-400
- เครื่องแก้ว class A
- ขวดพลาสติกสำหรับบรรจุสารละลายตัวอย่าง ชนิด high density polyethylene (HDPE)
(เครื่องแก้วและขวดพลาสติก ต้องแช่ในสารละลายกรดไนตริก 10% v/v ทั้งค้างคืน แล้วล้างกรดออกด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง ผึ่งให้แห้งก่อนนำมาใช้งาน)
- กระดาษกรอง Whatman No.1
- ก๊าซอาร์กอนความบริสุทธิ์ 99.995%

สารมาตรฐานและสารเคมี

- สารละลายมาตรฐานผสม (Mixed standard solution: As 100 ppm, Pb 100 ppm, Cd 5 ppm), AA grade บริษัท PerkinElmer
- สารละลายมาตรฐานสารหนู (As 1000 ppm), สารละลายมาตรฐานตะกั่ว (Pb 1000 ppm), สารละลายมาตรฐานแคดเมียม (Cd 1000 ppm), AA grade บริษัท PerkinElmer
- สารละลาย Palladium nitrate (Pd 10,000 ppm), AA grade บริษัท PerkinElmer
- สารละลาย Magnesium nitrate (Mg (NO₃)₂ 10,000 ppm), AA grade บริษัท PerkinElmer
- กรดไนตริกเข้มข้น (65%), AR grade บริษัท Merck
- น้ำความบริสุทธิ์สูง ความต้านทานไฟฟ้าไม่น้อยกว่า 18.2 เมกะโอห์ม จากเครื่อง Elix 20 บริษัท Millipore

ตัวอย่าง

1. ใช้ยาจากสมุนไพรชนิดผง ที่มีสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ปนเปื้อนปริมาณน้อย เป็นตัวแทนของ matrix

2. เมื่อได้วิธีที่เหมาะสมที่ตรวจสอบความถูกต้องแล้ว จึงนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในตัวอย่างสมุนไพรชนิดอื่น ๆ จำนวน 86 ตัวอย่าง แบ่งเป็นวัตถุดิบสมุนไพร 26 ตัวอย่าง เป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรเดี่ยว 41 ตัวอย่าง และเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรตำรับซึ่งประกอบด้วยสมุนไพรหลายชนิด 19 ตัวอย่าง

การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับกราฟมาตรฐาน

เตรียม Standard stock solution ให้มีความเข้มข้นของสารหนู (As) และตะกั่ว (Pb) 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ppb) และแคดเมียม 5 ppb

โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานผสม (As 100 ppm, Pb 100 ppm, Cd 5 ppm) 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ แล้วปิเปตสารละลายมาตรฐานที่ได้ 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ จากนั้นเจือจางสารละลายมาตรฐาน โดยตั้งระบบการทำงานของเครื่อง GFAAS ให้เจือจางอัตโนมัติ (automix) ให้ได้สารหนูที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 80 ppb ตะกั่วที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 80 ppb และแคดเมียมที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 และ 4.0 ppb

การเตรียมตัวอย่าง

ซึ่งตัวอย่างสมุนไพรที่บดเป็นเนื้อเดียวกัน ประมาณ 0.25 กรัม โดยทราบน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมกรดไนตริก 50% v/v จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระจกนาฬิกา ทำการย่อยสลายบนอ่างอังไอน้ำนาน 15 นาที ยกลง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง แล้วเติมกรดไนตริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ปิดบีกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา ทำการย่อยสลายบนอ่างอังไอน้ำต่ออีก 1 ชั่วโมง หรือจนผงสมุนไพรถูกย่อยสลายหมด ยกลงตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และถ่ายสารละลายตัวอย่างใส่ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ นำตัวอย่างมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 และถ่ายลงหลอดพลาสติก จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณ สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ด้วยเครื่อง GFAAS

การเตรียมสารละลาย Blank

วิธีเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่าง แต่ไม่มีส่วนผสมของตัวอย่าง

สภาวะการทดสอบ

Element	As	Pb	Cd
Wavelength (nm)	193.7	283.3	228.8
Slit (nm)	0.7	0.7	0.7
Mode	AA-BG	AA-BG	AA-BG
Lamp	EDL	EDL	EDL
Current (mA)	380	440	230
Sample volume (μl)	20	20	20
Standards (ppb)	5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80	10, 20, 30, 40, 50, 60, 80	0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0
Matrix modifier	Palladium 1:10, 5 μl	Magnesium 1:100, 2 μl Palladium 1: 50, 1 μl	Magnesium 1:10, 1 μl Palladium 1:10, 1 μl
Pyrolysis temp (°C)	1200	500	600
Atomization temp (°C)	2150	1500	1450

วัดค่า absorbance โดยใช้ค่า peak area

การทดสอบความเหมาะสมของเครื่อง AAS

ก่อนทำการวิเคราะห์จะต้องปรับเครื่องมือ โดยการทำ sensitivity check ให้ได้สัญญาณพีคที่สมมาตร มีพื้นที่ใต้พีคสูงสุดและได้ค่า absorbance อยู่ในช่วง $\pm 20\%$ ของค่าที่ผู้ผลิตเครื่องมือกำหนดไว้ เครื่องจึงเหมาะสมที่จะใช้ทำการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)⁽⁷⁾

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

ฉีดสารละลายมาตรฐานสารหนูความเข้มข้น 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 ppb สารละลายมาตรฐานตะกั่ว ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 ppb และสารละลายมาตรฐานแคดเมียมความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 ppb ตามสภาวะการทดสอบที่กำหนดไว้ของแต่ละธาตุ โดยฉีดซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำค่าเฉลี่ย absorbance ของแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐานของแต่ละธาตุ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่า absorbance คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เพื่อศึกษาความเป็นเส้นตรง ซึ่งควรมีค่าไม่ต่ำกว่า 0.995

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยเติมสารละลายมาตรฐาน ลงในตัวอย่าง (standard addition method) ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 3 ระดับ คือสารหนู ที่ความเข้มข้น 10, 30 และ 50 ppb ตะกั่วที่ความเข้มข้น 10, 30 และ 60 ppb และแคดเมียมที่ความเข้มข้นที่ 1.0, 1.5 และ 2.5 ppb ระดับละ 3 ซ้ำ วิเคราะห์หาปริมาณ คำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) ของแต่ละระดับความเข้มข้น หาค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ (% mean recovery) และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน สัมพัทธ์ (% Relative Standard Deviation, %RSD) โดยที่ % mean recovery ควรอยู่ในช่วง 80–110 และ ค่า %RSD ของสารหนูและตะกั่ว ไม่มากกว่า 7 และ %RSD ของแคดเมียม ไม่มากกว่า 11⁽⁸⁾

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

ความทวนซ้ำได้ (Repeatability)

เติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่าง (standard addition method) ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่าง ตามขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย คือสารหนูที่ความเข้มข้น 20 ppb ตะกั่วที่ความเข้มข้น 50 ppb และแคดเมียมที่ความเข้มข้น 1.5 ppb เตรียมความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ วิเคราะห์หาปริมาณ คำนวณค่าเฉลี่ย และ %RSD โดย %RSD สำหรับสารหนูและตะกั่ว ไม่มากกว่า 7 และสำหรับแคดเมียม ไม่มากกว่า 11⁽⁸⁾

Intermediate precision

เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการทดสอบ Repeatability โดยนักวิเคราะห์ 2 คน ทดสอบต่างวัน ด้วยเครื่องมือเดิม ทำคนละ 6 ซ้ำ รวมเป็น 12 ซ้ำ คำนวณ %RSD และใช้เกณฑ์พิจารณาเช่นเดียวกับของการทดสอบ Repeatability

การทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ประมาณค่า LOD โดยคำนวณจากสูตร $LOD = 3.3\sigma/S$ โดย σ คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ และ S คือ slope ของกราฟมาตรฐาน

แล้วทำการทดสอบยืนยันโดยเตรียมสารละลายตัวอย่าง จาก blank ที่เติมสารมาตรฐานชนิดเดียวให้มีความเข้มข้นที่ระดับ LOD จำนวน 7 ซ้ำ วิเคราะห์ด้วย GFAAS ทุกตัวอย่างต้องอ่านสัญญาณได้มากกว่า blank

การทดสอบหาขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ประมาณค่า LOQ (estimated LOQ) โดยคำนวณจากสูตร $LOQ = 10\sigma/S$ โดย σ คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ และ S คือ slope ของกราฟมาตรฐาน

แล้วทำการทดสอบยืนยันโดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี standard addition โดยเติมสารมาตรฐานชนิดเดียวลงในตัวอย่างที่ระดับ estimated LOQ จำนวน 7 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณ คำนวณ % recovery และ %RSD เพื่อหาค่า LOQ ที่มีความแม่นยำและความเที่ยงที่ยอมรับได้

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)⁽⁹⁾

เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานของ ISO/IEC 17025:2005 ที่กำหนดให้มีการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม โดยคำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนทุกแหล่ง เมื่อรวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมดแล้ว คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย โดยใช้ k เท่ากับ 2 ในการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด ปริมาณสารที่พบ คำนวณได้จาก

$$\text{ปริมาณสารที่พบ} \quad (\mu\text{g/g, ppm}) = \frac{\text{ความเข้มข้นที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (ng/ml)} \times \text{ปริมาตรที่ปรับ (ml)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)} \times 1000}$$

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารหนู (As) ตะกั่ว (Pb) และแคดเมียม (Cd) ในยาจากสมุนไพรโดยวิธี Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry (GFAAS)

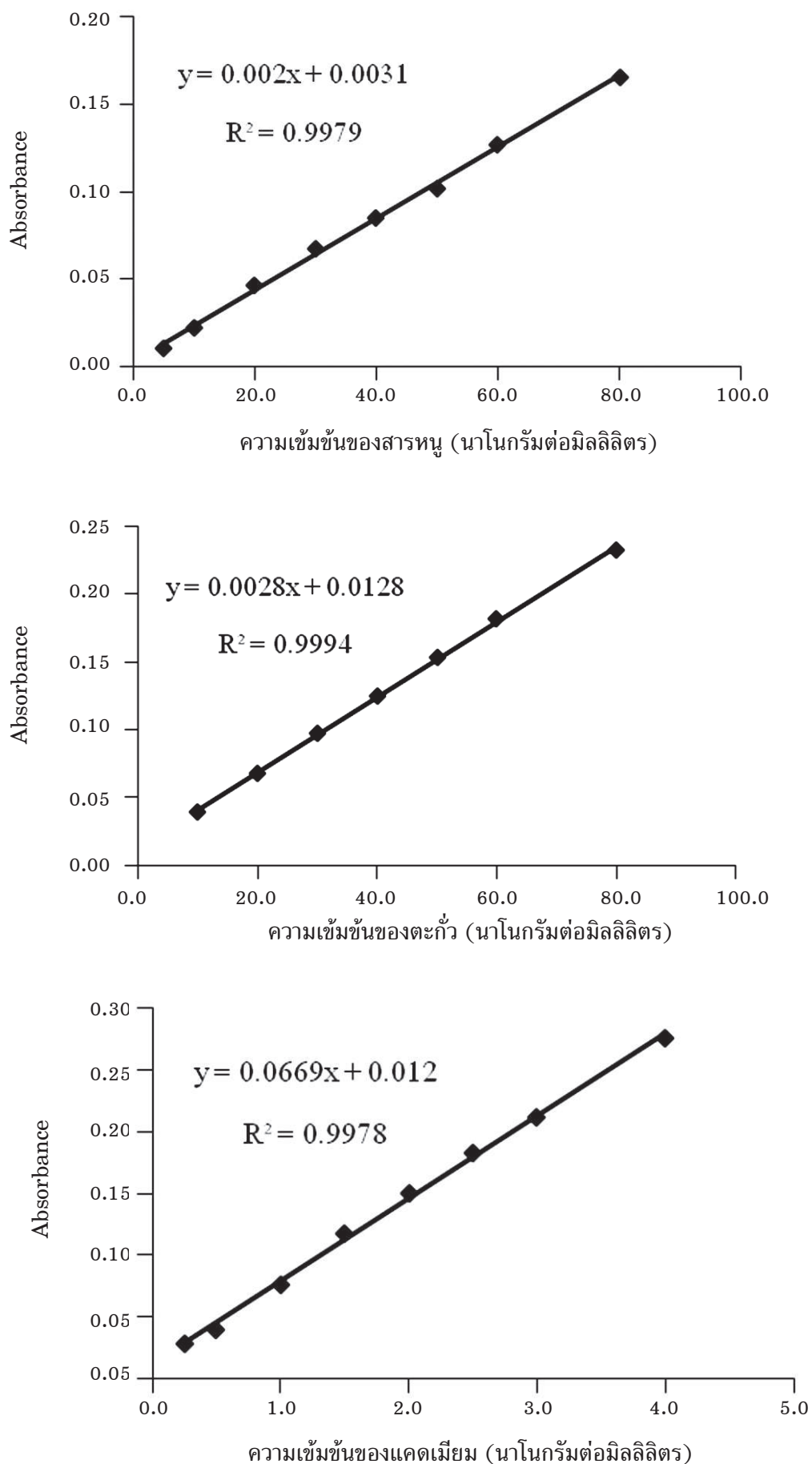
วิเคราะห์ปริมาณสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในตัวอย่างยาจากสมุนไพร โดยใช้วิธี GFAAS ที่ตรวจสอบความถูกต้องแล้ว จำนวน 86 ตัวอย่าง แบ่งเป็นวัตถุดิบสมุนไพร 26 ตัวอย่าง เป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรเดี่ยว 41 ตัวอย่าง และเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรตำรับซึ่งประกอบด้วยสมุนไพรหลายชนิด 19 ตัวอย่าง ใช้เกณฑ์การประเมินสารหนูและโลหะหนักที่ยอมให้ตกค้างในผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพร ที่กำหนดในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia 2009) คือ สารหนูไม่เกิน 4 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ตะกั่วไม่เกิน 10 ppm และแคดเมียมไม่เกิน 0.3 ppm

ผล

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

ผลจากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานสารหนู ในช่วง 5 ถึง 80 ppb สารละลายมาตรฐานตะกั่ว ในช่วง 10 ถึง 80 ppb และสารละลายมาตรฐานแคดเมียม ในช่วง 0.25 ถึง 4.0 ppb พบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่า absorbance เป็นเส้นตรงตลอดช่วงที่ทดสอบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.9989, 0.9997 และ 0.9989 ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

การทดสอบความแม่นยำ โดยการเติมสารละลายมาตรฐานในตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 3 ระดับ ระดับละ 3 ซ้ำ คือ สารหนูที่ความเข้มข้น 10, 30 และ 50 ppb ได้ค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 100.0 – 110.3 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 105.6 และ %RSD เท่ากับ 2.9 ตะกั่วที่ความเข้มข้นคือ 10, 30 และ 60 ppb ได้ค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 95.3–104.0 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 98.8 และ %RSD เท่ากับ 3.4 แคดเมียมที่ความเข้มข้น 1.0, 1.5 และ 2.5 ppb ได้ค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 97.9–104.8 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 101.0 และ %RSD เท่ากับ 2.3 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในยาจากสมุนไพร

ชนิด โลหะหนัก	ปริมาณสารมาตรฐาน ที่เติม (ppb)	ร้อยละของการคืนกลับ					ค่าเฉลี่ย	%RSD
		1	2	3	ค่าเฉลี่ย	%RSD		
สารหนู	10	103.0	104.5	107.8	105.1	2.3	105.6	2.9
	30	110.3	105.2	107.8	107.8	2.3		
	50	107.3	104.0	100.0	103.8	3.5		
ตะกั่ว	10	95.8	98.5	104.0	99.5	4.2	98.8	3.4
	30	103.0	101.5	99.3	101.3	1.8		
	60	96.7	95.3	95.4	95.8	0.8		
แคดเมียม	1.0	98.8	104.8	100.8	101.5	3.0	101.0	2.3
	1.5	99.9	97.9	101.9	99.9	2.0		
	2.5	99.9	100.3	104.3	101.5	2.4		

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

ผลการศึกษา repeatability ของการวิเคราะห์สารหนูที่ความเข้มข้น 20 ppb ได้ %RSD น้อยกว่า 1.5 การวิเคราะห์ตะกั่วที่ความเข้มข้น 50 ppb ได้ %RSD น้อยกว่า 1.2 และการวิเคราะห์แคดเมียมที่ความเข้มข้น 1.5 ppb ได้ %RSD น้อยกว่า 5.7 (ตารางที่ 2) และผลการศึกษา intermediate precision ได้ %RSD เท่ากับ 2.9, 2.0 และ 4.7 สำหรับสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในยาจากสมุนไพร

ตัวอย่างที่	สารหนู (20 ppb)		ตะกั่ว (50 ppb)		แคดเมียม (1.5 ppb)	
	A	B	A	B	A	B
1	19.42	20.45	48.14	50.98	1.66	1.63
2	18.90	20.77	47.97	49.87	1.49	1.52
3	19.65	20.21	48.45	49.42	1.58	1.56
4	19.27	20.58	48.59	49.71	1.51	1.52
5	19.50	20.23	47.71	49.59	1.53	1.56
6	19.69	20.00	48.00	49.50	1.56	1.37
ค่าเฉลี่ย (6 ค่า)	19.41	20.38	48.14	49.84	1.56	1.53
%RSD*	1.5	1.4	0.7	1.2	3.9	5.7
ค่าเฉลี่ย (12 ค่า)	19.89		48.99		1.54	
%RSD**	2.9		2.0		4.7	

A = วิเคราะห์โดยนักวิเคราะห์คนที่ 1 วันที่ 1 เครื่องมือเดิม

B = วิเคราะห์โดยนักวิเคราะห์คนที่ 2 วันที่ 2 เครื่องมือเดิม

* %RSD ของการทดสอบ Repeatability

** %RSD ของการทดสอบ Intermediate precision

การทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ได้ค่า LOD สำหรับสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม เท่ากับ 2.5, 2.5 และ 0.16 ppb ตามลำดับ

การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

ได้ค่า LOQ ของสารหนู เท่ากับ 5 ppb คิดเป็น 1 ppm ในตัวอย่าง มี % recovery เท่ากับ 89.2 และ %RSD เท่ากับ 6.2 ค่า LOQ ของตะกั่ว เท่ากับ 10 ppb คิดเป็น 2 ppm ในตัวอย่าง มี % recovery เท่ากับ 98.0 และ %RSD เท่ากับ 4.5 และค่า LOQ ของแคดเมียม เท่ากับ 0.5 ppb คิดเป็น 0.1 ppm ในตัวอย่าง มี % recovery เท่ากับ 94.2 และ %RSD เท่ากับ 4.8 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในยาจากสมุนไพร ที่ระดับ LOQ

ตัวอย่างที่	สารหนู (5 ppb)	ตะกั่ว (10 ppb)	แคดเมียม (0.5 ppb)
1	4.22	9.58	0.46
2	4.26	9.85	0.50
3	4.20	10.40	0.49
4	4.53	9.38	0.44
5	4.68	9.38	0.45
6	4.38	9.64	0.50
7	4.94	10.40	0.47
ค่าเฉลี่ย	4.46	9.80	0.47
% recovery	89.2	98.0	94.2
%RSD	6.2	4.5	4.8

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดของวิธีวิเคราะห์ ได้แหล่งที่มาของความไม่แน่นอนจากการเตรียมสารละลายมาตรฐาน เครื่องแก้ววัดปริมาตรที่ใช้ การชั่งน้ำหนักของตัวอย่าง ความแม่นยำ (% recovery) และความเที่ยง (Repeatability) เมื่อประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์สารหนูที่ระดับ 4 ppm ตะกั่วที่ระดับ 10 ppm และแคดเมียมที่ระดับ 0.3 ppm ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานที่กำหนดของการปนเปื้อนของสารแต่ละตัวในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายของการตรวจสารหนูได้เท่ากับ 0.34 ppm (ตารางที่ 4) ของการตรวจตะกั่วได้เท่ากับ 0.29 ppm (ตารางที่ 5) และของการตรวจแคดเมียมได้เท่ากับ 0.02 ppm (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 4 แสดงการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สารหนูในยาจากสมุนไพร

Components	Value, xi	Unit	Standard uncertainty, u (xi)	Relative standard uncertainty, u (xi)/xi
1. Standard				
Purity	99.3	µg/ml	0.35000	0.0035247
Pipet (P_{x1})	2	ml	0.00354	0.0017698
Volumetric flask (V_{x1})	200	ml	0.11310	0.0005655
Pipet (P_{x2})	10	ml	0.02707	0.0027070
Volumetric flask (V_{x2})	100	ml	0.06824	0.0006824
2. Sample				
Weight (m_s)	0.25	g	0.00006	0.0002366
Volumetric flask (V_s)	50	ml	0.03912	0.0007825
3. C_0	19.41	ng/ml	0.81410	0.0419423
4. Recovery	105.56	%	0.97653	0.0092510
5. Precision	100	%	0.61237	0.0061237
Sumsquare relative standard uncertainty				0.0019066
Combined standard uncertainty				0.0436643
Standard uncertainty (U_c): 0.0436643×3.88 ppm				0.1694176
Expanded uncertainty (U): $k = 2, 2 \times 0.1694176$				0.3388352
Report value: 3.88 ± 0.34 ppm				

ตารางที่ 5 แสดงการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตะกั่วในยาจากสมุนไพร

Components	Value, xi	Unit	Standard uncertainty, u (xi)	Relative standard uncertainty, u (xi)/xi
1. Standard				
Purity	99.7	µg/ml	0.15000	0.0015045
Pipet (P_{x1})	2	ml	0.00354	0.0017698
Volumetric flask (V_{x1})	200	ml	0.11310	0.0005655
Pipet (P_{x2})	10	ml	0.02707	0.0027070
Volumetric flask (V_{x2})	100	ml	0.06824	0.0006824
2. Sample				
Weight (m_s)	0.25	g	0.00006	0.0002366
Volumetric flask (V_s)	50	ml	0.03912	0.0007825
3. C_0	48.14	ng/ml	0.3631	0.0075426
4. Recovery	98.85	%	1.12947	0.0114261
5. Precision	100	%	0.47357	0.0047357
Sumsquare relative standard uncertainty				0.0002240
Combined standard uncertainty				0.0149683
Standard uncertainty (U_c): 0.0149683×9.63 ppm				0.1441444
Expanded uncertainty (U): $k = 2, 2 \times 0.1441444$				0.2882889
Report value: 9.63 ± 0.29 ppm				

ตารางที่ 6 แสดงการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์แคดเมียมในยาจากสมุนไพร

Components	Value, xi	Unit	Standard uncertainty, u (xi)	Relative standard uncertainty, u (xi)/xi
1. Standard				
Purity	5.00	µg/ml	0.00500	0.0010000
Pipet (P _{x1})	2	ml	0.00354	0.0017698
Volumetric flask (V _{x1})	200	ml	0.11310	0.0005655
Pipet (P _{x2})	10	ml	0.02707	0.0027070
Volumetric flask (V _{x2})	100	ml	0.06824	0.0006824
2. Sample				
Weight (m _s)	0.25	g	0.00006	0.0002366
Volumetric flask (V _s)	50	ml	0.03912	0.0007825
3. C₀	1.56	ng/ml	0.03230	0.0207051
4. Recovery	100.97	%	0.77227	0.0076485
5. Precision	100	%	2.31476	0.0231476
Sumsquare relative standard uncertainty				0.0010359
Combined standard uncertainty				0.0321858
Standard uncertainty (Uc): 0.0321858 × 0.31 ppm				0.0099776
Expanded uncertainty (U): k = 2, 2 × 0.0099776				0.0199552
Report value: 0.31 ± 0.02 ppm				

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารหนู (As) ตะกั่ว (Pb) และแคดเมียม (Cd) ในยาจากสมุนไพรโดยวิธี GFAAS

วิเคราะห์ปริมาณสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในตัวอย่างยาจากสมุนไพร โดยวิธีวิเคราะห์ที่ตรวจสอบความถูกต้องแล้ว จำนวน 86 ตัวอย่าง เป็นวัตถุดิบสมุนไพร 26 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์สมุนไพรเดี่ยว 41 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์สมุนไพรตำรับ 19 ตัวอย่าง ตรวจพบสารหนู 13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 15) ตะกั่ว 56 ตัวอย่าง (ร้อยละ 65) และแคดเมียม 70 ตัวอย่าง (ร้อยละ 81) แต่ปริมาณที่ตรวจพบไม่เกินมาตรฐานที่กำหนดในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในยาจากสมุนไพร

ประเภทตัวอย่าง	ตัวอย่าง (จำนวน)	สารหนู (≤ 4 ppm)*		ตะกั่ว (≤ 10 ppm)*		แคดเมียม (≤ 0.3 ppm)*	
		ตรวจพบ (จำนวน)	ปริมาณที่พบ (ppm)	ตรวจพบ (จำนวน)	ปริมาณที่พบ (ppm)	ตรวจพบ (จำนวน)	ปริมาณที่พบ (ppm)
วัตถุดิบสมุนไพร	26	4	< 1	14	< 2 – 4.01	25	< 0.1 – 0.15
ผลิตภัณฑ์สมุนไพรเดี่ยว	41	8	< 1	32	< 2 – 3.10	32	< 0.1 – 0.18
ผลิตภัณฑ์สมุนไพรตำรับ	19	1	1.61	10	< 2 – 2.19	13	< 0.1 – 0.26
รวม	86	13	< 1 – 1.61	56	< 2 – 4.01	70	< 0.1 – 0.26

* เกณฑ์มาตรฐานตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia 2009)

วิจารณ์

จากการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์นี้ พบว่าเป็นเส้นตรงตลอดช่วงของการวิเคราะห์ ที่ความเข้มข้นของสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม คือ 5-80, 10-80 และ 0.25-4.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ppb) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9989, 0.9997 และ 0.9989 ตามลำดับ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ มากกว่า 0.995

การทดสอบความแม่นยำของวิธี สำหรับสารหนูที่ความเข้มข้น 10 ppb, 30 ppb และ 50 ppb ซึ่งครอบคลุมค่ามาตรฐานที่กำหนดของสารหนูที่ 4 ppm ($\mu\text{g/g}$) ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายตัวอย่างจะเท่ากับ 20 ppb พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ (mean percent recovery) ของสารหนู 3 ระดับ อยู่ในช่วง 103.8-107.8 มีค่าเฉลี่ยรวมเท่ากับ 105.6 และ %RSD เท่ากับ 2.9 สำหรับตะกั่วที่ความเข้มข้น 10 ppb, 30 ppb และ 60 ppb ซึ่งครอบคลุมค่ามาตรฐานที่กำหนดของตะกั่วที่ 10 ppm ($\mu\text{g/g}$) ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายตัวอย่างจะเท่ากับ 50 ppb ได้ค่าเฉลี่ย % recovery ของตะกั่ว 3 ระดับอยู่ในช่วง 95.8-101.3 มีค่าเฉลี่ยรวมเท่ากับ 98.8 และ %RSD เท่ากับ 3.4 และสำหรับแคดเมียม ที่ความเข้มข้น 1.0 ppb, 1.5 ppb และ 2.5 ppb ซึ่งครอบคลุมค่ามาตรฐานที่กำหนดของแคดเมียมที่ 0.3 ppm ($\mu\text{g/g}$) ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายตัวอย่างจะเท่ากับ 1.5 ppb ได้ค่าเฉลี่ย % recovery ของแคดเมียม 3 ระดับ อยู่ในช่วง 99.9-101.5 มีค่าเฉลี่ยรวมเท่ากับ 101.0 และ %RSD เท่ากับ 2.3 ผลทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ คือ ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 80-110 และ %RSD ของสารหนู และตะกั่ว ไม่มากกว่า 7 และของแคดเมียมไม่มากกว่า 11⁽⁶⁾

การทดสอบความเที่ยงของวิธี ได้ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นที่ค่ามาตรฐานที่กำหนดของแต่ละธาตุ คือ สารหนูที่ 20 ppb ตะกั่วที่ 50 ppb และแคดเมียมที่ 1.5 ppb ผลการทดสอบความทวนซ้ำได้ของสารหนู ตะกั่วและแคดเมียม ได้ค่า %RSD น้อยกว่า 1.5, น้อยกว่า 1.2 และน้อยกว่า 5.7 ตามลำดับ และเมื่อเปลี่ยนนักวิเคราะห์และเปลี่ยนวันวิเคราะห์ (intermediate precision) ได้ %RSD รวมของผลวิเคราะห์ของสารหนู เท่ากับ 2.9 ของตะกั่ว เท่ากับ 2.0 และของแคดเมียม เท่ากับ 4.7 ซึ่งทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ คือ %RSD ของสารหนูและของตะกั่ว ไม่มากกว่า 7 และ %RSD ของแคดเมียม ไม่มากกว่า 11⁽⁶⁾

จากการทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ เมื่อได้ค่า estimated LOQ แล้วทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับความเข้มข้นนี้ 7 ขั้ว คือ สารหนูที่ 1 ppm ตะกั่วที่ 2 ppm และแคดเมียมที่ 0.1 ppm ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ เท่ากับ 89.2, 98.0 และ 94.2 ตามลำดับ ซึ่งทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ คือร้อยละ 80-110 สำหรับ %RSD ที่ระดับ LOQ ของสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียมเท่ากับ 6.2, 4.5 และ 4.8 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ คือ %RSD ของสารหนูไม่มากกว่า 11 ของตะกั่วไม่มากกว่า 7 และของแคดเมียมไม่มากกว่า 15⁽⁶⁾ ค่า LOQ ของทั้งโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด ต่ำกว่าค่ามาตรฐานของการปนเปื้อนที่มีกำหนดไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้จึงใช้ตรวจปริมาณการปนเปื้อนของโลหะหนักเหล่านี้ในยาจากสมุนไพรได้อย่างถูกต้อง

จากการสำรวจการปนเปื้อนของโลหะหนักในยาจากสมุนไพรที่มีจำหน่ายในประเทศไทย โดยใช้วิธีวิเคราะห์ดังกล่าวที่ตรวจสอบความถูกต้องแล้ว จำนวน 86 ตัวอย่าง ส่วนประกอบของสมุนไพรในตัวอย่างเหล่านี้ มีทั้งที่เป็นส่วนจากใบ จากต้น จากลำต้นใต้ดิน ซึ่งการปนเปื้อนโลหะหนักจะแตกต่างกันไป โดยส่วนที่อยู่ใต้ดินจะมีโอกาสพบการปนเปื้อนมากกว่า เกณฑ์การปนเปื้อนสารหนูและโลหะหนักในผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพร ที่กำหนดในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย คือ สารหนูไม่เกิน 4 ppm ตะกั่วไม่เกิน 10 ppm และแคดเมียมไม่เกิน 0.3 ppm จากตัวอย่างดังกล่าวพบสารหนูปนเปื้อน 13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 15) พบตะกั่ว 56 ตัวอย่าง (ร้อยละ 65) และพบแคดเมียม 70 ตัวอย่าง (ร้อยละ 81) แต่ปริมาณที่ตรวจพบต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดทั้งหมด แสดงว่าผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีความปลอดภัยจากการปนเปื้อนของโลหะหนัก ซึ่งเป็นข้อกำหนดหนึ่งที่ต้องทดสอบเพื่อแสดงความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพร การตรวจปริมาณโลหะหนักนี้ควรตรวจตั้งแต่ขั้นตอนวัตถุดิบ เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าใช้วัตถุดิบที่ปลอดภัยและในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปด้วย เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าใช้หลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตยาจากสมุนไพร ซึ่งจะ

ไม่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของโลหะหนักในขั้นตอนการผลิต แต่อย่างไรก็ตามนอกจากเรื่องการปนเปื้อนของโลหะหนักแล้ว ยังต้องคำนึงถึงความปลอดภัยด้านอื่น ๆ อีกด้วย เช่น การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ การตกค้างของสารเคมีกำจัดแมลง ซึ่งเป็นข้อกำหนดด้านความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรเช่นกัน จึงจะสามารถประกันความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ได้

สรุป

วิธีวิเคราะห์สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในยาจากสมุนไพรโดยวิธี Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry ที่พัฒนาขึ้นนี้ มีความจำเพาะเจาะจงต่อโลหะหนักแต่ละชนิด มีความเป็นเส้นตรง ในช่วง 5-80, 10-80 และ 0.25-4.0 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ โดยที่ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ เท่ากับ 1, 2 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม สำหรับสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียมตามลำดับ การทดสอบความแม่นยำของวิธี ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับเท่ากับ 105.6, 98.8 และ 101.0 สำหรับสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียมตามลำดับ วิธีวิเคราะห์ที่มีความเที่ยง ได้ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ น้อยกว่า 2.9, 2.0 และ 4.7 สำหรับสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ตามลำดับ สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ปริมาณสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ได้อย่างถูกต้อง และนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจการปนเปื้อนของโลหะหนักทั้งสามชนิดในยาจากสมุนไพรตามข้อกำหนดในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย เพื่อประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ และจากการตรวจตัวอย่างยาจากสมุนไพรที่จำหน่ายในประเทศ จำนวน 86 ตัวอย่าง ไม่พบการปนเปื้อนโลหะหนักเกินเกณฑ์มาตรฐานกำหนด

เอกสารอ้างอิง

1. ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ ฉบับที่ 4 (พ.ศ. 2554). ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 128, ตอนพิเศษ 72 ง. (ลงวันที่ 28 มิถุนายน 2554).
2. ทรงพล ไชยาริ. โลหะหนักที่มีพิษต่อสุขภาพ. สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ. [ออนไลน์]. พฤศิกายน 2555; [สืบค้น 10 เมษายน 2558]; [8 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: [http://eic.wu.ac.th/Data_Download/Research/Metals toxic.pdf](http://eic.wu.ac.th/Data_Download/Research/Metals%20toxic.pdf)
3. ชนิษฐ พานชูวงศ์. ปรอต ตะกั่ว สารหนู โลหะหนักภัยใกล้ตัว. [ออนไลน์]. กุมภาพันธ์ 2550; [สืบค้น 10 เมษายน 2558]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://www.doctor.or.th/article/detail/4102>
4. มลพิษจากโลหะหนัก. [ออนไลน์]. [สืบค้น 10 เมษายน 2558]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/ecology/chapter2/chapter2_airpollution11.htm
5. พระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์การพิจารณาขึ้นทะเบียนตำรับยา แผนโบราณเกี่ยวกับมาตรฐานการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และโลหะหนัก. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 121, ตอนพิเศษ 43 ง. (ลงวันที่ 21 มิถุนายน 2547).
6. Department of Medical Sciences. Thai herbal pharmacopoeia Vol. III. Nonthaburi: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; 2009.
7. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Geneva: ICH Steering Committee; 2005.
8. AOAC Peer Verified Methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, VA, Nov 1993.
9. สุวรรณ จารุณช และคณะ. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550.

Method Development and Validation for Determination of Arsenic, Lead and Cadmium in Herbal Medicines by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry

Supanee Duangteraprecha Jiranuch Jamtaweekul Prapapan Sukphan
and Prachyaporn Inthongkaew

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

ABSTRACT Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry (GFAAS) method was developed and validated for the determination of arsenic (As), lead (Pb) and cadmium (Cd) in herbal medicines. Samples were prepared by wet digestion. Validation was performed according to the International Committee on Harmonization (ICH) Guidelines. The proposed method permitted the determination of As, Pb and Cd in the ranges of 5–80 ng/ml, 10–80 ng/ml and 0.25–4.0 ng/ml, respectively, with correlation coefficients greater than 0.999. Limit of detection (LOD) were found to be 2.5 ng/ml, 2.5 ng/ml and 0.16 ng/ml for As, Pb and Cd, respectively, while limit of quantitation (LOQ) were found to be 1 µg/g, 2 µg/g and 0.1 µg/g for As, Pb and Cd, respectively. Mean percentage recoveries were in the range of 98.8–105.6 while intra- and inter-day precisions were less than 4.7% for all three heavy metals. The method was successfully applied to the study of heavy metal contamination in herbal medicines available in Thailand. A total of 86 samples were investigated and the results showed that all test samples contained As, Pb and Cd lower than the limit specified in the Thai Herbal Pharmacopoeia.

Key words: arsenic, lead, cadmium, herbal medicines, GFAAS, method validation