

การพัฒนาอุปกรณ์วิเคราะห์ฐานกระดาษสำหรับหาปริมาณสารเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซนที่
ปลอมปนในผลิตภัณฑ์สมุนไพรด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

DEVELOPMENT OF PAPER-BASED ANALYTICAL DEVICE FOR DETERMINATION OF
PREDNISOLONE AND DEXAMETHASONE ADULTERATED IN HERBAL PRODUCTS USING
ELECTROCHEMICAL METHOD



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2018

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาอุปกรณ์วิเคราะห์ฐานกระดาษสำหรับหาปริมาณสารเพอร์คลอโรไซโลนและเดกซาเมทาโซนที่ปลอมปนในผลิตภัณฑ์สมุนไพรด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า
โดย	นายวิศรุต พริ้มพราย
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล)	
.....	กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ศิริพร แสงสุธรรม)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.วีณา เสียงเพราะ)	

5976671937 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORD: Electrochemical paper-based analytical device, paper chromatography, herbal medicine, dexamethasone, prednisolone

Vitsarut Primpray : DEVELOPMENT OF PAPER-BASED ANALYTICAL DEVICE FOR DETERMINATION OF PREDNISOLONE AND DEXAMETHASONE ADULTERATED IN HERBAL PRODUCTS USING ELECTROCHEMICAL METHOD. Advisor: Asst. Prof. Wanida Laiwattanapaisal, Ph.D.

The adulteration of herbal medicines by dexamethasone or prednisolone has been regarded as a serious health problem in many countries worldwide, especially in developing countries. In this study, a novel platform for separation and quantification of both target steroids adulterated in herbal medicines was successfully developed. The method was based on an electrochemical paper-based analytical device (ePAD). The ePAD was composed of Whatman SG81 chromatography paper, 3D-printed devices and a commercial screen printed electrode. Whatman SG81 paper was used for separation of dexamethasone and prednisolone by using 60% ethyl acetate in cyclohexane as a mobile phase. The results showed that dexamethasone and prednisolone were completely separated from other substances in the extracted herbal medicine within 7 min. The separated steroids on the paper were then quantified by electrochemical detection using differential pulse voltammetry, in which the 3D-printed devices facilitated the measurement by containing the electrolysis solution on the hydrophilic paper throughout the measurement. Analytical ranges of 10–500 µg/mL were obtained for both dexamethasone and prednisolone ($r^2 = 0.988$ and 0.994 , respectively). The limits of detection for dexamethasone and prednisolone were 3.59 and 6.00 µg/mL, respectively, whereas the limits of quantification were 11.98 and 20.02 µg/mL, respectively. The amounts of both target steroids derived from real herbal medicine samples determined by the proposed method were comparable with the assays using standard high-performance liquid chromatography method. The ePAD was simple, low-cost, rapid, and very promising for on-site quantitative detection of dexamethasone or prednisolone in suspected adulterated herbal medicine samples.

Field of Study: Clinical Biochemistry and Molecular Medicine Student's Signature

Academic Year: 2018 Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งเป็นผู้ให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทางในการแก้ปัญหา ช่วยแก้ไขข้อผิดพลาดต่างๆ ที่เกิดขึ้นในการทำงานวิจัย และให้ความช่วยเหลือสนับสนุนทั้งด้านวิชาการและกำลังใจในการทำงานวิจัย จนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวั ประธานกรรมการในการสอบป้องกัน วิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ศิริพร แสงสุธรรม กรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.วีณา เสียงเพราะ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ภายนอกมหาวิทยาลัยที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.อรุวรรณ ชัยลภากุล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการสนับสนุน ทุนผู้ช่วยวิจัย นางสาวนันทนา กลิ่นสุนทร และ เกษัชกร รองศาสตราจารย์ ดร. ชีรศักดิ์ โรจนราธา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการจัดหาสิ่งตัวอย่างสมุนไพรและทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณการปลอมปนของ สารสเตียรอยด์ด้วยวิธี HPLC และ Prof. Manabu Tokeshi และ Asst. Prof. Akihiko Ishida ที่ให้ความรู้ ประสบการณ์ในการทำงานวิจัยและการดูแลเป็นอย่างดี ตลอดระยะเวลา 3 เดือนที่คณะวิศวกรรมศาสตร์ ภาควิชา Biotechnology and Macromolecular Chemistry มหาวิทยาลัยฮอกไกโด ประเทศญี่ปุ่น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาเคมีคลินิกที่คอยสั่งสอน ให้ความรู้และให้คำแนะนำในการทำงานวิจัย รวมทั้งบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีบางส่วนในการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนค่าเล่าเรียน จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนผู้ช่วยวิจัย จากทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย (เมธีวิจัยอาวุโส) สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ภายใต้การดูแลของ ศาสตราจารย์ ดร.อรุวรรณ ชัยลภากุล เป็นหัวหน้าโครงการ ทุนสนับสนุนนิสิตระดับปริญญาโทและเอกไปทำวิจัยในต่างประเทศ จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนเสริมรากฐานการวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โครงการความร่วมมือด้านการวิจัยกับสถาบันต่างประเทศของ คณะสหเวชศาสตร์

ขอบคุณ พี่ น้อง สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ที่คอยให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี และคอยให้กำลังใจเมื่อเกิดปัญหาและให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้ทุกสิ่งทุกอย่างกับผู้วิจัย

วิศรุต พรหมพราย

สารบัญ

หน้า

.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตการศึกษา.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 สารสแตียรอยด์.....	5
2.2 สแตียรอยด์ฮอร์โมน	6
2.2.1 ฮอร์โมนเพศ.....	6
2.2.1.1 กลุ่มฮอร์โมนเพศหญิง.....	6
2.2.1.2 กลุ่มฮอร์โมนเพศชาย.....	6
2.2.2 ฮอร์โมนต่อมหมวกไต	7
2.2.2.1 ฮอร์โมนมินเนอร์ราโลคอร์ติคอยด์	7

2.2.2.2 ฮอริโมนกลูโคคอร์ติคอยด์.....	7
2.3 ยาเสพติด.....	8
2.4 ผลข้างเคียงของยาเสพติด.....	9
2.5 สถิติการตรวจพบสารเสพติด.....	10
2.6 วิธีการตรวจการปลอมปนของสารเสพติด.....	12
2.7 อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ (paper-based analytical devices, PADs).....	17
2.8 วิธีการตรวจวิเคราะห์บนกระดาษ.....	24
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	27
3.1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร.....	27
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	27
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	29
3.3.1 ศึกษาการแยกสารเสพติดด้วยกระดาษ Whatman SG81.....	29
3.3.1.1 การออกแบบกระดาษ Whatman SG81.....	29
3.3.1.2 ศึกษาวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม.....	29
3.3.1.3 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ.....	30
3.3.1.4 ศึกษาผลการแยกสารเสพติดด้วยชุดตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ.....	33
3.3.2 ศึกษาสถานะที่เหมาะสมของสารละลาย Britton Robinson buffer สำหรับตรวจวิเคราะห์สารเสพติดด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า.....	33
3.3.2.1 ทดสอบค่า pH ที่เหมาะสม.....	33
3.3.2.2 ทดสอบค่าความแรงของไอออน (ionic strength) ที่เหมาะสม.....	34
3.3.3 ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารเสพติดด้วยเทคนิค Differential Pulse Voltammetry.....	35
3.3.4 ขั้นตอนการวิเคราะห์สารเสพติดด้วยวิธี ePAD.....	35
3.3.4.1 ขั้นตอนการสกัดสารเสพติดจากผลิตภัณฑ์สมุนไพร.....	35

3.3.4.2	ขั้นตอนการแยกสารสเตียรอยด์.....	36
3.3.4.3	ขั้นตอนการวิเคราะห์สารสเตียรอยด์.....	36
3.3.5	การทดสอบหาขีดความสามารถในการตรวจวิเคราะห์.....	37
3.3.6	ทดสอบสารรบกวนปฏิกิริยา (interference).....	38
3.3.7	ทดสอบความถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์ (Accuracy).....	38
3.3.8	ทดสอบความเที่ยงในการตรวจวิเคราะห์ (Precision).....	38
3.3.9	ทดสอบความสามารถในการตรวจวัดกับสิ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร	39
บทที่ 4	ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	40
4.1	ผลการศึกษาการแยกสารสเตียรอยด์ด้วยกระดาษ Whatman SG81	40
4.2	ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสารละลาย Britton Robinson buffer สำหรับตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า	43
4.2.1	ผลการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสม	43
4.2.2	ผลการศึกษาความแรงของไอออน (ionic strength) ที่เหมาะสม	44
4.3	ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสารละลาย Britton Robinson buffer สำหรับตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า	45
4.3.1	ผลการศึกษา accumulation potential ที่เหมาะสม.....	45
4.3.2	ผลการศึกษา accumulation time ที่เหมาะสม.....	46
4.3.3	ผลการศึกษา pulse amplitude ที่เหมาะสม	47
4.4	ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรงและขีดความสามารถในการตรวจวิเคราะห์.....	48
4.5	ผลการทดสอบสารรบกวนปฏิกิริยา (interference).....	51
4.5.1	ผลการทดสอบสารรบกวนที่อาจพบในผลิตภัณฑ์สมุนไพรทั่วไป.....	51
4.5.2	ผลการทดสอบสารรบกวนจากสารสเตียรอยด์ชนิดเตกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน ..	52
4.6	ผลการทดสอบความถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์ (Accuracy).....	53
4.7	ผลการทดสอบความเที่ยงในการตรวจวิเคราะห์ (Precision).....	54

4.8 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจวัดกับสิ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร.....	55
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	60
บรรณานุกรม.....	71
ประวัติผู้เขียน.....	80



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงสถิติการปลอมปนของชนิดสารสเตียรอยด์ในพื้นที่สาธารณสุขที่ 4 และ 5	11
ตารางที่ 2 แสดงสถิติการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ในพื้นที่กรุงเทพมหานคร	11
ตารางที่ 3 แสดงการวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า	16
ตารางที่ 4 แสดงเทคนิคการสร้างขั้วไฟฟ้าด้วยวิธีต่าง	26
ตารางที่ 5 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	27
ตารางที่ 6 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	28
ตารางที่ 7 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	28
ตารางที่ 8 แสดงค่า parameter ที่ใช้ในการวิเคราะห์ pH ของ BR buffer ที่เหมาะสม ด้วยเทคนิค cyclic voltammetry.....	34
ตารางที่ 9 แสดงค่า parameter ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความแรงของไอออนที่เหมาะสม ด้วยเทคนิค Differential Pulse Voltammetry	34
ตารางที่ 10 แสดงการหาค่า parameter ที่เหมาะในการวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ ด้วยเทคนิค Differential Pulse Voltammetry	35
ตารางที่ 11 แสดงค่า parameter ที่ใช้ในการวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ ด้วยเทคนิค Differential Pulse Voltammetry.....	36
ตารางที่ 12 แสดงค่าเฉลี่ย Retardation factor (Rf) ของสารเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโซน ...	42
ตารางที่ 13 แสดง % Recovery ของสารสเตียรอยด์ที่มีการปลอมปนสารแคมเพสเตอรอลและ สติกแมสเตอรอลด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น	51
ตารางที่ 14 แสดง % Recovery ของสารสเตียรอยด์ที่มีการปลอมปนสารสเตียรอยด์ คนละชนิดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น.....	52
ตารางที่ 15 แสดงความถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น	53
ตารางที่ 16 แสดงความถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์สารเพรดนิโซโลนด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น	54
ตารางที่ 17 แสดงความเที่ยงในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น	54

ตารางที่ 18 แสดงความเที่ยงในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น 55

ตารางที่ 19 แสดงการเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์สารเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซน ในสิ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร..... 56

ตารางที่ 20 แสดงการเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์สารเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซน ในสิ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรหลังจากนำสิ่งตัวอย่างไปเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธีระเหยแห้ง 57



สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 (A) แสดงโครงสร้างพื้นฐานของสารสเตียรอยด์และ (B) แสดงโครงสร้างของคอเลสเตอรอล ..	5
รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของฮอร์โมนเอสโตรเจน	6
รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และ เทสโทสเตอโรน.....	7
รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของฮอร์โมนแอลโดสเตอโรน	7
รูปที่ 5 แสดงลักษณะโครงสร้างของฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์	8
รูปที่ 6 แสดงลักษณะโครงสร้างของยาสเตียรอยด์	8
รูปที่ 7 แสดงลักษณะกลุ่มอาการคุซซิง (Cushing syndrome).....	10
รูปที่ 8 แสดงสูตรการคำนวณค่า Retardation factor หรือ Rf	12
รูปที่ 9 แสดงการตรวจเชิงคุณภาพของวิธี TLC.....	14
รูปที่ 10 แสดงการตรวจเชิงปริมาณของวิธี TLC ด้วยเครื่อง densitometer	14
รูปที่ 11 แสดงการตรวจการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ด้วยวิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟี	15
รูปที่ 12 แสดงการสร้างชุดตรวจด้วยเทคนิค Craft punch patterning.....	17
รูปที่ 13 แสดงการสร้างชุดตรวจด้วยเทคนิค LPAD fabrication	18
รูปที่ 14 แสดงการสร้างชุดตรวจด้วยเทคนิค Photolithography.....	19
รูปที่ 15 แสดงการสร้างชุดตรวจด้วยเทคนิค Plotting	19
รูปที่ 16 แสดงการสร้างชุดตรวจด้วยเทคนิค Lacquer spray.....	20
รูปที่ 17 แสดงการสร้างชุดตรวจด้วยเทคนิค Wax screen-printing.....	20
รูปที่ 18 แสดงการสร้างชุดตรวจด้วยเทคนิค Wax dipping	21
รูปที่ 19 แสดงการสร้างชุดตรวจด้วยเทคนิค Vapor phase deposition	22
รูปที่ 20 แสดงการสร้างชุดตรวจด้วยเทคนิค Stamping	23

รูปที่ 21 (A) แสดงกระดาษ Whatman SG81 และ (B) แสดงตลับพลาสติก เพื่อใช้ศึกษาการแยกสารสเตียรอยด์.....	29
รูปที่ 22 แสดงลักษณะของชุดตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ	31
รูปที่ 23 แสดงการออกแบบตลับชุดตรวจ	32
รูปที่ 24 แสดงลักษณะของตลับชุดตรวจ.....	32
รูปที่ 25 (A) แสดงขั้นตอนการสกัดสารสเตียรอยด์จากผลิตภัณฑ์สมุนไพร (B) แสดงขั้นตอนการแยกสารสเตียรอยด์ และ (C) แสดงขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า.....	37
รูปที่ 26 แสดงการแยกสารสเตียรอยด์ด้วยกระดาษ WhatmanSG81.....	42
รูปที่ 27 แสดงการแยกสารสเตียรอยด์ด้วยชุดตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ	43
รูปที่ 28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าและค่า pH ของสารละลาย Britton Robinson buffer โดยแผนภูมิสีดำ (■) แสดงผลการทดสอบของสารเดกซาเมทาโซนและ แผนภูมิสีขาว (□) แสดงผลการทดสอบของสารเพรดนิโซโลน.....	44
รูปที่ 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าและค่าความเข้มข้นของ KCl ในสารละลาย Britton Robinson buffer โดยแผนภูมิสีดำ (■) แสดงผลการทดสอบของสารเดกซาเมทาโซนและ แผนภูมิสีขาว (□) แสดงผลการทดสอบของสารเพรดนิโซโลน	45
รูปที่ 30 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าและค่า Accumulation potential โดยจุดสีดำ (●) แสดงผลการทดสอบของสารเดกซาเมทาโซนและจุดสีขาว (○) แสดงผลการทดสอบของสารเพรดนิโซโลน	46
รูปที่ 31 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าและ ค่า Accumulation time โดยจุดสีดำ (●) แสดงผลการทดสอบของสารเดกซาเมทาโซนและจุดสีขาว (○) แสดงผลการทดสอบของสารเพรดนิโซโลน.....	47
รูปที่ 32 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าและค่า Pulse amplitude โดยจุดสีดำ (●) แสดงผลการทดสอบของสารเดกซาเมทาโซนและจุดสีขาว (○) แสดงผลการทดสอบของสารเพรดนิโซโลน.....	48
รูปที่ 33 แสดง Differential Pulse Voltammogram ของสารเดกซาเมทาโซนที่ ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยวิธี ePAD.....	49

รูปที่ 34 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นของการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนที่ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยวิธี ePAD	49
รูปที่ 35 แสดง Differential Pulse Voltammogram ของสารเพรดนิโซโลนที่ ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยวิธี ePAD	50
รูปที่ 36 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นของการตรวจวิเคราะห์สารเพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยวิธี ePAD	50
รูปที่ 37 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเพรดนิโซโลนที่ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และวิธีที่พัฒนาขึ้นในผลิตภัณฑ์สมุนไพร	56
รูปที่ 38 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเพรดนิโซโลนที่ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และวิธีที่พัฒนาขึ้นในผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ผ่านกระบวนการระเหยแห้ง	58
รูปที่ 39 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเดกซาเมทาโซนที่ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และวิธีที่พัฒนาขึ้นในผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ผ่านกระบวนการระเหยแห้ง	58
รูปที่ 40 แสดงผลการเปรียบเทียบการตรวจวัด (A) ปริมาณสารเพรดนิโซโลน และ (B) ปริมาณสารเดกซาเมทาโซน โดยใช้เครื่องมือทางสถิติ Bland and Altman plot	59

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย

เนื่องจากปัจจุบันการบริโภคผลิตภัณฑ์สมุนไพรกำลังเป็นที่นิยมอย่างมาก จากรายงานขององค์การอนามัยโลกพบว่า 70-80% ของประชากรโลก โดยเฉพาะกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนา มีการใช้สมุนไพรในการดูแลสุขภาพเบื้องต้น [1] ซึ่งสมุนไพรเหล่านี้มักจะถูกนำมาแปรรูปเป็นยาและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มากมายไม่ว่าจะเป็น ยาเม็ด ยาผงบรรจุแคปซูล ยาน้ำ หรือเครื่องสำอางสมุนไพรต่าง ๆ เป็นต้น เพื่อนำมาใช้ในการบำรุงร่างกายและรักษาโรคบางชนิด แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการควบคุมคุณภาพในการผลิตยังไม่ได้รับการควบคุมอย่างเป็นมาตรฐาน ประกอบกับในปัจจุบันมีการใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรในผู้บริโภคอย่างแพร่หลาย ทำให้ผู้ผลิตบางราย มีการนำเอายาแผนปัจจุบันผสมลงไปในการผลิตสมุนไพร เพื่อเพิ่มฤทธิ์ในการรักษาจนเกินความจริง ยกตัวอย่างเช่น สารเพรดนิโซโลน และ เดกซาเมทาโซน เป็นต้น ซึ่งเป็นสารกลุ่มสเตียรอยด์ที่มีความอันตรายอย่างมากและมีสถิติพบการปลอมปนที่สูงมากในหลายพื้นที่ เช่น ในระหว่างปี ค.ศ. 1992 ถึง 1993 ประเทศไต้หวันพบการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ร้อยละ 14.8 จากจำนวน 2,609 ตัวอย่าง [2] ในระหว่างปี ค.ศ. 2000 ถึง 2002 ประเทศมาเลเซียพบการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ร้อยละ 27.5 จากจำนวน 102 ตัวอย่าง [3] และในประเทศไทย ซึ่งพบการปลอมปนของยาสเตียรอยด์ในหลายพื้นที่ เช่น ในระหว่างปี พ.ศ. 2550 ถึง 2551 เขตพื้นที่สมุทรสงครามพบว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ไม่ผ่านมาตรฐานจำนวน 205 ตัวอย่าง โดยมีสาเหตุมาจากการปลอมปนของยาสเตียรอยด์คิดเป็นร้อยละ 13.17 ของตัวอย่างที่ไม่ผ่านเกณฑ์ [4] ในปี พ.ศ. 2554 ถึง 2556 เขตพื้นที่ 9 จังหวัดทางภาคตะวันออกพบว่าการปลอมปนของยาสเตียรอยด์ในผลิตภัณฑ์สมุนไพรคิดเป็นร้อยละ 27.3 จากจำนวน 99 ตัวอย่าง [5] และในปี พ.ศ. 2558 เขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร พบการปลอมปนของยาสเตียรอยด์ในผลิตภัณฑ์สมุนไพรถึงร้อยละ 23 จากจำนวน 100 ตัวอย่าง [6] เป็นต้น จะเห็นได้ว่าปัญหาดังกล่าวเป็นปัญหาที่ควรตระหนักและได้รับการตรวจสอบเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากยากกลุ่มสเตียรอยด์สามารถส่งผลเสียร้ายแรงต่อสุขภาพในระยะยาวหากรับประทานไม่ถูกต้อง

ยาสเตียรอยด์เป็นกลุ่มยาที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาโดยมีฤทธิ์การทำงานที่คล้ายกับฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ในการกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย จึงถูกนำไปใช้ในการรักษาโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันมากมายเช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) โรคภูมิคุ้มกันทำลายตนเอง (autoimmune disease) โรคภูมิแพ้ต่าง ๆ (inflammatory disease) และคนไข้ที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ [7-10] อย่างไรก็ตามหากใช้ยาดังกล่าวเป็นระยะเวลานาน จะส่งผลให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันผิดปกติ ทำให้ร่างกายติดเชื้อ

ต่าง ๆ ได้ง่ายขึ้น มีอาการบวม ท้องลาย เกิดลิ้นขนาดเล็ก ๆ เรียกว่าสิวสตีรอยด์ และมีขนขึ้นตามตัว จะเรียกอาการเหล่านี้ว่า Cushing's syndrome และยิ่งไปกว่านั้นนำไปสู่อาการเกิดภาวะกล้ามเนื้ออ่อนแรงจากระดับโพแทสเซียมในกระแสเลือดที่ต่ำลง เกิดโรคกระดูกพรุน (osteoporosis) จากระดับแคลเซียมในกระแสเลือดต่ำ การเกิดโรคเบาหวานและหลอดเลือดหัวใจจากภาวะน้ำตาลในเลือดสูง เป็นต้น [11-15] แต่เมื่อไรก็ตามที่หยุดยาสตีรอยด์ทันทีหลังจากที่รับประทานมานานจะทำให้เกิดการนอนยา เนื่องมาจากร่างกายยังไม่สามารถสังเคราะห์ฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ได้ตามปกติ จะส่งผลให้เกิดอาการอ่อนเพลีย น้ำหนักลด ความดันโลหิตต่ำ น้ำตาลในกระแสเลือดตก มีอาการเป็นลมหมดสติและนำไปสู่การเสียชีวิตได้ในที่สุด [16]

จะเห็นได้ว่ายาสตีรอยด์หากรับประทาน อย่างไม่เหมาะสมจะทำให้เกิดผลข้างเคียงที่ร้ายแรง ดังนั้นการทดสอบสารสตีรอยด์ที่ปลอมปนในผลิตภัณฑ์สมุนไพรเป็นสิ่งที่ควรตระหนักและให้ความสำคัญเป็นอย่างมาก ในปัจจุบันมีวิธีการตรวจสอบสารสตีรอยด์อยู่ 3 วิธีที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจวัดคือ วิธีรังคเลขฉิวบาง (Thin-Layer Chromatography หรือ TLC) เป็นวิธีที่สามารถแยกชนิดของสารสตีรอยด์ที่ปลอมปนได้ วัดได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ แต่วิธีนี้มีขั้นตอนที่สลับซับซ้อนและไม่นิยมนำมาทดสอบเชิงปริมาณ [17] ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวัดเชิงปริมาณโดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (High performance liquid chromatography หรือ HPLC) ซึ่งวิธีนี้สามารถแยกชนิดของสารสตีรอยด์และตรวจวัดเชิงปริมาณได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธี TLC แต่ต้องอาศัยกระบวนการเตรียมตัวอย่างก่อนการทดสอบหลายขั้นตอน เครื่องมือที่มีราคาแพง ระยะเวลาในการทดสอบนาน ต้องใช้ผู้มีความเชี่ยวชาญใช้เครื่องมือในการตรวจวัด และไม่สามารถนำไปทดสอบนอกสถานที่ได้ [18] และวิธีสุดท้ายซึ่งพัฒนาโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์คือวิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟี (immuno chromatography technique) เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก แต่สามารถวัดได้เฉพาะเชิงคุณภาพเท่านั้น ไม่สามารถแยกชนิดของสารสตีรอยด์และวัดเชิงปริมาณได้ จึงเหมาะสำหรับการตรวจเบื้องต้นเท่านั้น [19]

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการพัฒนาอุปกรณ์สำหรับใช้ในการตรวจวัดปริมาณการปลอมปนของสารสตีรอยด์ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร โดยใช้วิธี electrochemical paper based analytical device หรือ ePAD ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยทั้งหลักการตรวจวิเคราะห์บนกระดาษและเคมีไฟฟ้า โดยในการตรวจวิเคราะห์บนกระดาษทางผู้วิจัยได้เลือกใช้กระดาษโครมาโทกราฟีชนิด Whatman SG81 ซึ่งมีองค์ประกอบของสารซิลิกากระจายตัวอยู่ภายในเนื้อกระดาษ มาใช้ในการแยกสารสตีรอยด์ชนิดเพรดนิโซโลน และ เดกซาเมทาโซนออกจากกัน รวมถึงสิ่งเจือปนอื่น ๆ ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร โดยอาศัยความแตกต่างในการเคลื่อนที่ของสารผ่านเฟสคงที่บนแผ่นเรียบหรือรูพรุนของแผ่นกระดาษที่มีซิลิกาเคลือบอยู่ ด้วยหลักการเดียวกับวิธี TLC เนื่องจากสารสตีรอยด์ทั้งสองชนิดที่ทำการตรวจวิเคราะห์สามารถรบกวนการตรวจวัดกันเองได้ และอาจจะมีสารโมเลกุลอื่น ๆ ที่มีลักษณะโครงสร้าง

และคุณสมบัติทางเคมีที่ใกล้เคียงกันเข้ามารบกวนการตรวจวิเคราะห์ หลังจากทีสารเพรดนิโซโลน และ เดกซาเมทาโซนถูกแยกออกจากกันบนกระดาษรีบบร็อยแล้ว สารสเตียรอยด์แต่ละชนิดจะถูกวัด ปริมาณการปลอมปนด้วยวิธี Differential Pulse Voltammetry (DPV) โดยใช้ขั้วไฟฟ้าชนิด screen printed carbon electrode และอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น มีการนำเทคนิคการพิมพ์สาม มิติมาใช้ในการสร้างตลับพลาสติก โดยตลับที่สร้างขึ้นถูกนำมาใช้ในการเสริมสร้างความแข็งแรงของ กระดาษ Whatman SG81 ในขั้นตอนการแยกสารสเตียรอยด์ และอุปกรณ์ที่สร้างจากการพิมพ์สาม มิติที่เป็นส่วนตัดกระดาษ (cutter) เป็นเสมือนภาชนะบรรจุสารอิเล็กโทรไลต์ ทำให้สามารถกักสาร อิเล็กโทรไลต์ไว้บนกระดาษไม่ไหลซึมแพร่ออกไปบริเวณรอบ ๆ ทำให้สามารถวัดปฏิกิริยาทาง เคมีไฟฟ้าที่เกิดขึ้นได้โดยตรงบนกระดาษและสัญญาณคงที่ตลอดขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ชนิดเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซนที่ปลอมปนในผลิตภัณฑ์สมุนไพรเชิงปริมาณ
2. เพื่อลดระยะเวลาและขั้นตอนในการตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ชนิดเพรดนิโซโลนและ เดกซาเมทาโซนที่ปลอมปนในผลิตภัณฑ์สมุนไพรเชิงปริมาณ
3. เพื่อแก้ปัญหาการรบกวนปฏิกิริยาการตรวจวัด จากสารสเตียรอยด์ที่ความต่างศักย์ทาง เคมีไฟฟ้าใกล้เคียงกัน

1.3 ขอบเขตการศึกษา

ขอบเขตงานวิจัยชิ้นนี้เป็นการพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษสำหรับทดสอบการปลอมปนของสารเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซนในผลิตภัณฑ์สมุนไพร โดยใช้กระดาษ Whatman SG81 ในการแยกสารสเตียรอยด์ดังกล่าวและสารสเตียรอยด์ของพีชออกจากกัน และทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธีการทางเคมีไฟฟ้าชนิด DPV โดยในงานวิจัยชิ้นนี้ได้ศึกษาหาวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการแยกสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิด ศึกษาสารละลายอิเล็กโทรไลต์และสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี DPV ศึกษาขีดความสามารถในการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ ศึกษาการรบกวนจากสารเคมีต่าง ๆ ศึกษาความถูกต้องและความเที่ยงในการตรวจวิเคราะห์ และเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธี HPLC โดยใช้สิ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. การนำกระดาษโครมาโทกราฟีชนิด Whatman SG81 เข้ามาประยุกต์ใช้กับการเตรียมตัวอย่างก่อนทำการตรวจวิเคราะห์สารด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า สามารถช่วยลดระยะเวลาและปัญหาของสารรบกวนต่าง ๆ ภายในสิ่งตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาต่อยอดเพื่อวิเคราะห์สารเคมีต่าง ๆ ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าได้

2. การนำเทคนิคการพิมพ์สามมิติเข้ามาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยดังกล่าว สามารถช่วยแก้ไขปัญหที่เกิดขึ้นจากความไม่คงตัวของกระดาษในขั้นตอนการแยกสารเคมีและความไม่เสถียรของสัญญาณไฟฟ้าในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงสามารถนำรูปแบบชุดตรวจดังกล่าวไปใช้ในการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารเคมีต่าง ๆ ได้

3. ผลงานวิจัยในครั้งนี้ได้รับการตีพิมพ์ลงในวารสารระดับนานาชาติ เนื่องจากการนำกระดาษ Whatman SG81 และชุดตรวจที่สร้างจากเครื่องพิมพ์สามมิติเข้ามาประยุกต์ใช้กับการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าเพ็งมีการรายงานเป็นครั้งแรก โดยงานวิจัยชิ้นนี้ได้ตีพิมพ์ลงในวารสาร “Analytica Chimica Acta” ซึ่งมี impact factor เท่ากับ 5.123 (JCR 2018, ISI database) ในหัวข้อเรื่อง “A paper-based analytical device coupled with electrochemical detection for the determination of dexamethasone and prednisolone in adulterated traditional medicines” และคาดว่าจะถูกนำไปใช้อ้างอิง (citations) ต่อไป

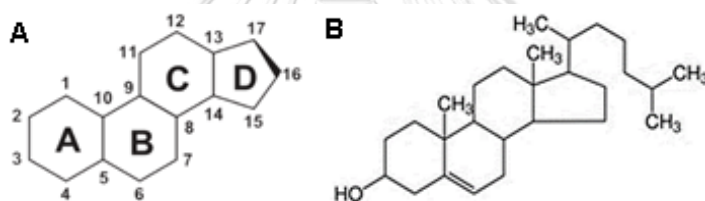
4. ผลงานวิจัยในครั้งนี้ได้เข้าร่วมการนำเสนอผลงานวิจัยระดับนานาชาติ ในงานประชุม 6th International Conference on Bio-Sensing Technology ณ ประเทศมาเลเซีย ระหว่างวันที่ 16-19 มิถุนายน พ.ศ.2562 ในหัวข้อเรื่อง “Paper chromatography coupled with electrochemical detection for quantification of adulterated dexamethasone and prednisolone in traditional medicines” ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อนักวิจัยที่สนใจต่อไป โดยเฉพาะในกลุ่มที่ทำงานวิจัยด้าน paper-based analytical device

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารสเตียรอยด์

สารสเตียรอยด์ เป็นสารกลุ่มอินทรีย์ (organic compound) ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างพื้นฐานประกอบไปด้วยธาตุคาร์บอน (carbon) จำนวน 17 อะตอม โดยมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นวงคาร์บอนหกเหลี่ยม (cyclohexane ring) จำนวน 3 วงและวงคาร์บอนห้าเหลี่ยม (cyclopentane ring) จำนวน 1 วง ดังรูปที่ 1 [20, 21] ซึ่งโครงสร้างนี้จะประกอบไปด้วยหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ มากมายไม่ว่าจะเป็น หมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) หมู่เมทิล (methyl group) และโครงสร้างของสายคาร์บอน (carbon side chains) จึงส่งผลให้สารสเตียรอยด์นั้นมีอยู่หลากหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น คอเลสเตอรอล (cholesterol) จะมีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 มีหมู่เมทิล 2 หมู่อยู่ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 10,13 และมีสายคาร์บอนจำนวน 8 อะตอม ต่อกับตำแหน่งคาร์บอนที่ 17 ดังรูปที่ 1 [20, 21]



ที่มา Ref. [20, 21]

รูปที่ 1 (A) แสดงโครงสร้างพื้นฐานของสารสเตียรอยด์และ (B) แสดงโครงสร้างของคอเลสเตอรอล

อย่างไรก็ตามในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะสารสเตียรอยด์ที่มีความเกี่ยวเนื่องและสำคัญกับสิ่งมีชีวิตจำพวกสัตว์คือ คอเลสเตอรอล (cholesterol) โดยคอเลสเตอรอลนั้นมีความสำคัญอย่างมากเนื่องจากเป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์ และใช้ในการสังเคราะห์น้ำดี (bile acid) วิตามิน D และ สเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) [22] ซึ่งสเตียรอยด์ฮอร์โมนนั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทด้วยกันคือ ฮอร์โมนเพศ (sex steroid hormone) และฮอร์โมนต่อมหมวกไต (adrenal steroid hormone) ซึ่งจะกล่าวรายละเอียดดังต่อไปนี้

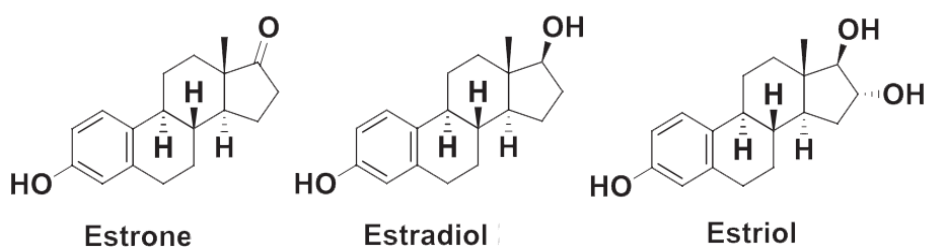
2.2 สเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone)

สเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) เป็นฮอร์โมนที่ใช้คอเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์จากอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) และต่อมหมวกไต (adrenal gland) จึงทำให้ฮอร์โมนกลุ่มนี้สามารถถูกส่งเข้าสู่กระแสเลือดแล้วผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) ของเซลล์เป้าหมายได้โดยตรง เพื่อเข้าไปควบคุมกระบวนการทำงานของเซลล์โดยผ่านการแสดงออกของยีน (gene expression) [23] ซึ่งสามารถจำแนกชนิดของสเตียรอยด์ฮอร์โมนออกได้เป็น 2 ประเภทดังนี้

2.2.1 ฮอร์โมนเพศ (sex steroid hormone) เป็นฮอร์โมนที่ส่วนใหญ่ถูกสังเคราะห์มาจากอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ เช่น อัณฑะของระบบสืบพันธุ์เพศชาย และรังไข่ของระบบสืบพันธุ์เพศหญิง เป็นต้น ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงลักษณะและพฤติกรรมทางเพศ ยกตัวอย่างเช่น

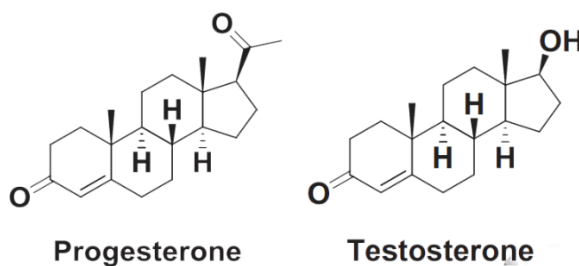
2.2.1.1 กลุ่มฮอร์โมนเพศหญิง จะมีอยู่ด้วยกัน 2 ฮอร์โมนที่สำคัญคือ ฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) เป็นฮอร์โมนที่ทำหน้าที่ในการควบคุมรอบประจำเดือนของเพศหญิง (menstruation cycle) และลักษณะทางกายภาพที่บ่งบอกถึงเพศหญิง อาทิเช่น สะโพกผาย การเจริญเติบโตของเต้านม การสะสมของไขมันที่ส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย เป็นต้น [24] โปรเจสเตอโรน (progesterone) เป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับภาวะการตั้งครรภ์ของเพศหญิง โดยจะทำหน้าที่ให้ผนังมดลูกหนาตัวขึ้นเพื่อให้เหมาะสมต่อการรองรับตัวอ่อน และเมื่อตัวอ่อนเข้ามาฝังตัวระดับฮอร์โมนดังกล่าวจะคงที่เพื่อรักษาภาวะแวดล้อมและป้องกันการตกไข่ในรอบเดือนต่อไป [25]

2.2.1.2 กลุ่มฮอร์โมนเพศชาย (androgen) จะมีฮอร์โมนที่สำคัญคือ ฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone) เป็นฮอร์โมนที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานของระบบสืบพันธุ์เพศชาย เช่นกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์หรือสเปิร์ม (sperm) และยังทำหน้าที่ในการควบคุมลักษณะทางกายภาพของเพศชายด้วย เช่น กระบวนการสร้างมัดกล้ามเนื้อ น้ำเสียงที่ทุ้มลึก เป็นต้น [26]



ที่มา Ref. [27]

รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของฮอร์โมนเอสโตรเจน

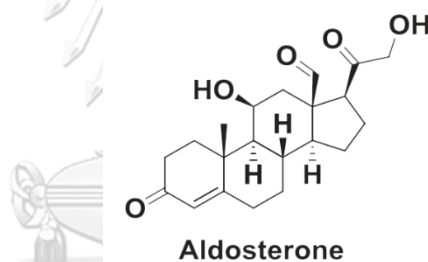


ที่มา Ref. [27]

รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และ เทสโทสเตอโรน

2.2.2 ฮอร์โมนต่อมหมวกไต (adrenal steroid hormone) เป็นกลุ่มฮอร์โมนที่ผลิตจากต่อมหมวกไต ซึ่งมีบทบาทอย่างมากในการควบคุมสมดุลของร่างกาย เช่น น้ำ น้ำตาล แร่ธาตุต่าง ๆ เป็นต้น ซึ่งจะสามารถจำแนกออกได้เป็น 2 กลุ่มที่มีความสำคัญตามหน้าที่การทำงานดังนี้

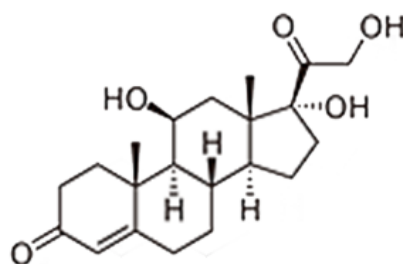
2.2.2.1 ฮอร์โมนมินเนอรัลคอร์ตिकอยด์ (mineralocorticoids) หรือฮอร์โมนแอลโดสเตอโรน (aldosterone) เป็นฮอร์โมนที่ถูกผลิตจากต่อมหมวกไตชั้นนอก (adrenal cortex) โดยเป็นฮอร์โมนที่มีความสำคัญที่สุด มีบทบาทในการควบคุมสมดุลเกลือแร่และน้ำภายในร่างกาย [28]



ที่มา Ref. [27]

รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของฮอร์โมนแอลโดสเตอโรน

2.2.2.2 ฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ (glucocorticoids) เป็นฮอร์โมนที่ถูกผลิตจากต่อมหมวกไตชั้นนอก (adrenal cortex) เช่นเดียวกัน แต่มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อสภาวะเครียด ช่วยในการควบคุมกระบวนการทางสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ (metabolism) โดยเฉพาะการควบคุมระดับกลูโคส โปรตีน และยังทำหน้าที่ในการกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Immune system) เพื่อลดอาการการอักเสบ เป็นต้น [29]



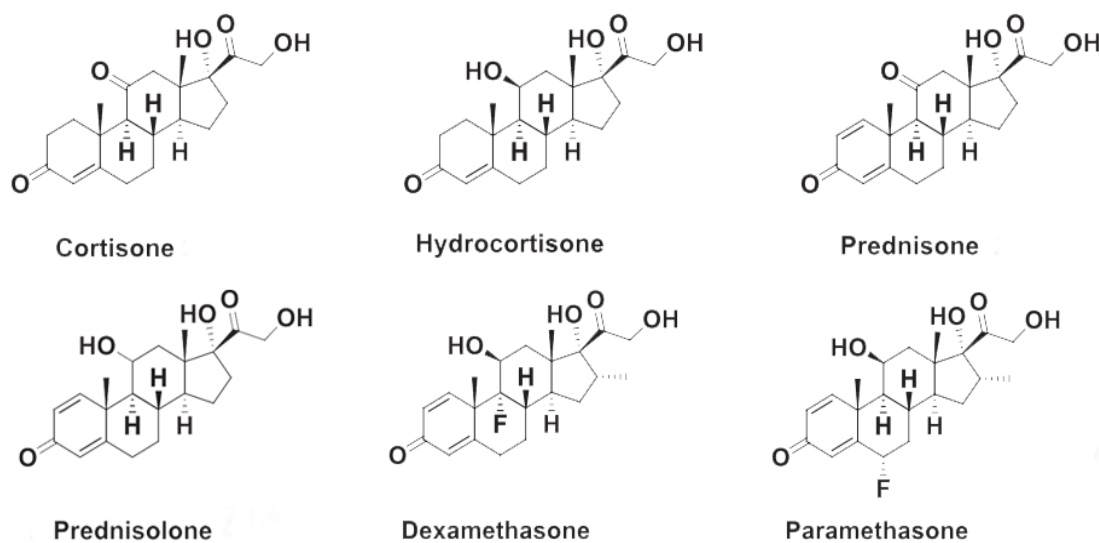
ที่มา Ref. [27]

รูปที่ 5 แสดงลักษณะโครงสร้างของฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์

จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้วงการแพทย์แผนปัจจุบันมีการสังเคราะห์สารสเตียรอยด์ขึ้นมา เพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคที่มีความผิดปกติทางด้านระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) โรคภูมิคุ้มกันทำลายตนเอง (autoimmune disease) โรคภูมิแพ้ต่าง ๆ (inflammatory disease) และคนไข้ที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ [7-10] เป็นต้น

2.3 ยาสเตียรอยด์

ยาสเตียรอยด์เป็นยาที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมา เพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันมากมาย ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลากหลายชนิดดังนี้ คอร์ติโซน (cortisone) ไฮโดรคอร์ติโซน (hydrocortisone) เพรดนิโซน (prednisone) เพรดนิโซโลน (prednisolone) เดกซามิทาโซน (dexamethasone) พาราเมทาโดน (paramethasone) เป็นต้น ดังรูปที่ 6 [27]



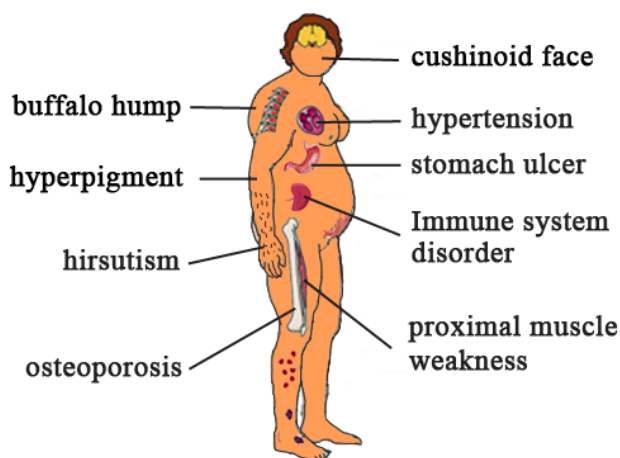
ที่มา Ref. [27]

รูปที่ 6 แสดงลักษณะโครงสร้างของยาสเตียรอยด์

แม้ว่ายาในกลุ่มสเตียรอยด์ดังกล่าวจะมีสรรพคุณในการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่การใช้งานที่ผิดประเภทหรือใช้โดยไม่ได้รับการปรึกษาจากแพทย์เป็นระยะเวลานานมากกว่า 2-3 เดือนอย่างต่อเนื่อง จะก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่าง ๆ มากมายดังนี้

2.4 ผลข้างเคียงของยาสเตียรอยด์

กลุ่มอาการคุชซิง (cushing syndrome) เป็นภาวะที่เกิดจากการที่ร่างกายมีระดับฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ (glucocorticoids hormone) มากเกินกว่าปกติ ซึ่งมีอยู่หลายสาเหตุดังนี้ สาเหตุแรกคือฮอร์โมนแอดรีโนคอร์ติโคทรอปิก (adrenocorticotrophic hormone) ที่สูงกว่าปกติจากการเจริญเติบโตของเนื้องอกบริเวณต่อมใต้สมอง ซึ่งฮอร์โมนดังกล่าวทำหน้าที่ในการกระตุ้นการสร้างฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ที่ต่อมหมวกไต สาเหตุที่สองคือ ฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ที่สูงกว่าปกติจากการที่มีเนื้องอกที่บริเวณต่อมหมวกไตเอง และสาเหตุที่สามคือ สาเหตุจากการได้รับสารที่มีฤทธิ์คล้ายกับฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ จากภายนอกร่างกายเช่น ยาในกลุ่มสเตียรอยด์บางชนิด ซึ่งจะส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่าง ๆ มากมายดังนี้ ใบหน้าลักษณะกลมคล้ายพระจันทร์หรือหน้าจันทร์แรม (cushinoid face) บริเวณลำคอบริเวณค้ำยอกขึ้นมา (buffalo hump) ท้องป่อง มีลำตัวใหญ่กว่าแขนขา เนื่องจากการสะสมของไขมันที่บริเวณเนื้อเยื่อ ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติ (hyperglycemia) บริเวณผิวหนังมีรอยลักษณะเป็นเส้นสีม่วง แดงตามแขนขา หรือลำตัว (striae) มีสีขึ้นตามลำตัวและใบหน้า มีสีผิวที่คล้ำขึ้นกว่าปกติ (hyperpigment) มีขนขึ้นที่ตามบริเวณหน้า หวด เครา และทั่วร่างกาย (hirsutism) อาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง โดยเฉพาะบริเวณต้นแขนและต้นขา (proximal muscle weakness) โรคกระดูกพรุน (osteoporosis) ความผิดปกติทางระบบหัวใจ และหลอดเลือดเนื่องจากความดันโลหิตสูง (hypertension) ความผิดปกติทางระบบทางเดินอาหาร เช่น แผลในกระเพาะอาหาร (stomach ulcer) และลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenal ulcer) ความผิดปกติทางระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) เนื่องจากฮอร์โมนดังกล่าวไปกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน จึงทำให้โอกาสการติดเชื้อโรคต่าง ๆ ได้ง่ายขึ้น และส่งผลต่อความผิดปกติทางสมองโดยประสิทธิภาพในการจดจำจะลดลง เกิดอาการสับสน ไม่มีสมาธิและมีความผิดปกติทางสภาพอารมณ์และจิตใจ เป็นต้น ดังรูปที่ 7 [11-15]



ที่มา ปรับปรุงมาจาก Ref. [30]

รูปที่ 7 แสดงลักษณะกลุ่มอาการคุชชิง (Cushing syndrome)

ยิ่งไปกว่านั้นหากมีการใช้ยาสเตียรอยด์เป็นระยะเวลานานแล้วทำการหยุดยากระทันหัน จะทำให้ร่างกายเกิดภาวะขาดสเตียรอยด์ เนื่องจากการรับประทานยาสเตียรอยด์เป็นระยะเวลานาน จะไปกีดการทำงานของต่อมหมวกไต ร่างกายจึงไม่สามารถสังเคราะห์ฮอร์โมนได้ตามปกติ จะส่งผลให้ ความดันโลหิตต่ำ น้ำตาลในกระแสเลือดตก มีอาการเป็นลมหมดสติและนำไปสู่การเสียชีวิตได้ในที่สุด

2.5 สถิติการตรวจพบสารสเตียรอยด์

จากการศึกษาจะเห็นได้ว่ายาสเตียรอยด์นั้นมีโทษที่ร้ายแรงมากหากนำมาใช้ไม่ถูกต้อง ซึ่งสาเหตุหลักของการใช้ยาไม่ถูกต้องนั้นเกิดจากการที่ผู้บริโภคซื้อยาด้วยตนเอง โดยไม่ได้ปรึกษา แพทย์ หรือเภสัชกร โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มยาชุดแก้ปวดที่หาซื้อได้ตามร้านค้าทั่วไป ผลิตภัณฑ์ สมุนไพร และอาหารเสริมที่ไม่ได้ลงทะเบียนตามกฎหมายในรูปแบบต่าง ๆ อาทิเช่น ยาเม็ด ยาน้ำ และยาแคปซูล เป็นต้น ซึ่งพบว่ามี การปลอมปนของสารสเตียรอยด์ในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเป็นจำนวนมาก อาทิเช่น ในระหว่างปี ค.ศ. 1992 ถึง 1993 ประเทศได้หวั่นพบการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ ร้อยละ 14.8 จากจำนวน 2,609 ตัวอย่าง [2] ในระหว่างปี ค.ศ. 2000 ถึง 2002 ประเทศมาเลเซียพบ การปลอมปนของสารสเตียรอยด์ร้อยละ 27.5 จากจำนวน 102 ตัวอย่าง [3] และ ในระหว่างปี พ.ศ. 2550 ถึง 2551 มีการศึกษาการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ในพื้นที่เขตสาธารณสุขที่ 4 และ 5 ของ ประเทศไทย จำนวน 205 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างที่ไม่ผ่านมาตรฐานจำนวน 37 ตัวอย่าง โดยมีสาเหตุ มาจากการปลอมปนของสารสเตียรอยด์จำนวน 27 ตัวอย่าง โดยคิดเป็นร้อยละ 73.0 ของตัวอย่างที่ ไม่ผ่านเกณฑ์ และยังพบว่าส่วนใหญ่แล้วจะมีการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ชนิดเพรดนิโซโลน และ เดกซาเมทาโซน มากที่สุด ดังตารางที่ 1 [4]

ตารางที่ 1 แสดงสถิติการปลอมปนของชนิดสารสเตียรอยด์ในพื้นที่สาธารณสุขที่ 4 และ 5

การปลอมปนยาแผนปัจจุบัน	ตัวอย่าง
Dexamethasone	6
Prednisolone	2
Cyproheptadine	1
Paracetamol	1
Dexamethasone และ Prednisolone	7
Dexamethasone และ Paracetamol	2
Dexamethasone และ Diclofenac	2
Dexamethasone และ Indomethacin	1
Dexamethasone และ Chlorpheniramine	3
Dexamethasone, Prednisolone และ Diazepam	1
Dexamethasone, Prednisolone และ Chlorpheniramine	1

ในปี พ.ศ. 2554 ถึง 2556 เขตพื้นที่ 9 จังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่าการปลอมปนของยาสเตียรอยด์ในผลิตภัณฑ์สมุนไพรคิดเป็นร้อยละ 27.3 จากจำนวน 99 ตัวอย่าง [5] และ ในปี พ.ศ. 2558 เขตพื้นที่กรุงเทพมหานครจำนวน 6 ชุมชน พบว่าการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ในผลิตภัณฑ์สมุนไพรถึง 23 ตัวอย่าง จากจำนวน 100 ตัวอย่าง โดยคิดเป็นร้อยละ 23 ดังตารางที่ 2 โดยส่วนใหญ่จะพบมาในรูปแบบของยาเม็ด [6]

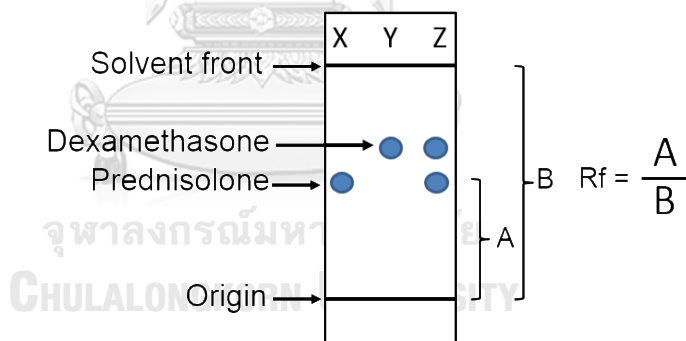
ตารางที่ 2 แสดงสถิติการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ในพื้นที่กรุงเทพมหานคร

ชุมชน	จำนวนตัวอย่างที่คาดว่าจะมีการปลอมปนสารสเตียรอยด์	
	ร้อยละของตัวอย่างทั้งหมด (n=100)	ร้อยละของตัวอย่างที่คาดว่าจะมีสเตียรอยด์ (n=23)
ชุมชนนครหลวง	2	8.7
ชุมชนริมคลองลาดพร้าว	3	13.0
ชุมชนวังหิน	4	17.4
ชุมชนซอยพหลโยธิน 32	2	8.7
ชุมชนวัดบางบัว	10	43.5
ชุมชนชายคลองเสนา	2	8.7

ดังนั้นการทดสอบสารสเตียรอยด์ที่ปลอมปนในผลิตภัณฑ์สมุนไพรต่าง ๆ เป็นสิ่งที่ควรตระหนักและให้ความสำคัญเป็นอย่างมาก ซึ่งในปัจจุบันมีวิธีการตรวจสอบสารสเตียรอยด์อยู่หลายวิธีด้วยกันหลากหลายวิธี โดยแต่ละวิธีจะมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน

2.6 วิธีการตรวจการปลอมปนของสารสเตียรอยด์

2.6.1 วิธีเรียงเลขผิบบาง (Thin-Layer Chromatography หรือ TLC) อาศัยหลักการโครมาโทกราฟีในการแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากสิ่งเจือปนอื่น ๆ ซึ่งมีส่วนประกอบสำคัญ 2 ส่วนคือ วัฏภาคคงที่ (stationary phase) เป็นส่วนที่มีลักษณะเป็นของแข็งและมีคุณสมบัติในการดูดซับสารได้ดี โดยจะถูกเคลือบลงบนแผ่นอะลูมิเนียม แก้ว หรือพลาสติก ซึ่งสารที่นิยมนำมาใช้ในการเคลือบ คือ ซิลิกาเจล (silica gel) เป็นสารที่มีสภาพขั้วสูง และส่วนต่อมาเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ ของเหลวที่ทำหน้าที่ในการทำลายองค์ประกอบต่าง ๆ ของสารในสิ่งตัวอย่างแล้วแยกออกจากกันบนวัฏภาคคงที่ตามคุณสมบัติการละลาย ซึ่งสารที่ละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ดีจะสามารถเคลื่อนที่ไปบนวัฏภาคคงที่ได้มาก ส่วนสารที่ละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ได้น้อยจะเคลื่อนที่ไปบนวัฏภาคคงที่ได้น้อย ซึ่งระยะทางการเคลื่อนที่จะถูกคำนวณเป็น ค่า Retardation factor หรือ Rf โดยใช้สูตรดังรูปที่ 8 [31]



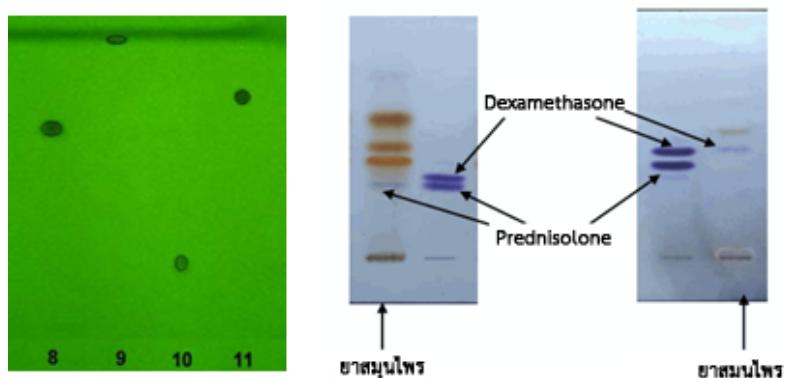
รูปที่ 8 แสดงสูตรการคำนวณค่า Retardation factor หรือ Rf

วิธีดังกล่าวเป็นวิธีหนึ่งที่ยิยมใช้ในการตรวจหาการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ โดยนำสิ่งตัวอย่างมาสกัดด้วยกรรมวิธีที่เหมาะสม แล้วนำไปจุดลงบนแผ่นวัฏภาคคงที่ จากนั้นจุดสารละลายมาตรฐานเพรดนิโซโลน และ เดกซาเมทาโซนไปบนแผ่นวัฏภาคคงที่ในตำแหน่งถัดไป เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ หลังจากนั้นนำวัฏภาคคงที่ที่ได้หยดสิ่งตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานก่อนหน้านี้อลงไปตั้งในภาชนะ และทิ้งไว้จนวัฏภาคเคลื่อนที่เคลื่อนที่ไปยังขีดที่กำหนดไว้ จึงนำไปตรวจวิเคราะห์ต่อด้วยวิธีต่าง ๆ ดังนี้ [17]

2.6.1.1 UV detection เป็นการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยดูการดูดกลืนแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 nm ซึ่งวิธีการนี้ต้องอาศัยวัสดุภาควงที่มีสารตัวชี้วัด (indicator) เช่น ซิงค์ซิลิเกต (zinc silicate) ซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่นดังกล่าว แล้วเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 523 nm หรือแสงสีเขียว ซึ่งถ้าหากในสิ่งตัวอย่างมีสารสเตียรอยด์ปลอมปนชนิดใดจะพบตำแหน่งที่บ่งแสงเป็นตำแหน่งเดียวกับสารมาตรฐานดังรูปที่ 9 อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่ามีสารสเตียรอยด์บางชนิดที่พืชสามารถสร้างขึ้นได้เอง ยกตัวอย่างเช่น เบต้าซิโตสเตอรอล (beta-sitosterol) สติกแมสเตอร์อล (stigmasterol) และ แคมเพสเตอร์อล (campesterol) เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 254 nm ได้เช่นเดียวกัน แต่จะมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ที่สูงกว่าสารสเตียรอยด์เพรตนิโซโลน และ เดกซาเมทาโซน [17, 32] ซึ่งวิธีนี้มีขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพอยู่ที่ประมาณ 400 µg/mL

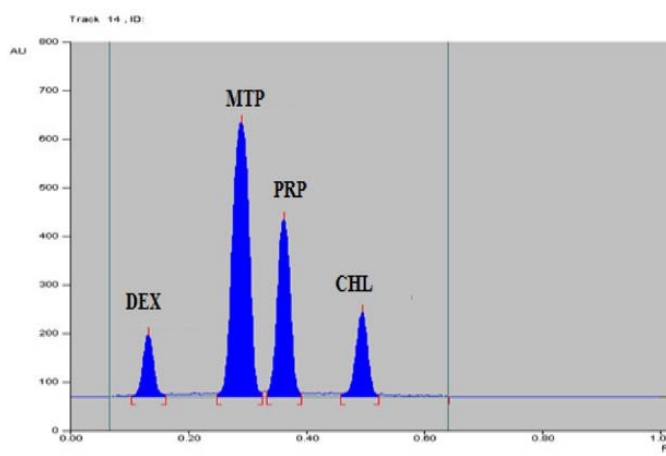
2.6.1.2 Colorimetric detection เป็นการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพ โดยการสเปรย์แผ่น TLC ด้วยสารละลาย Tetrazolium blue จะเกิดแถบสีม่วงปรากฏขึ้นมาบนแผ่นวัสดุภาควงที่จากการถูกรีดิวซ์ด้วยสารสเตียรอยด์ ซึ่งถ้าในสิ่งตัวอย่างมีแถบสีม่วงขึ้นตำแหน่งเดียวกับสารมาตรฐานชนิดใด แสดงว่ามีการปนเปื้อนของสารสเตียรอยด์ชนิดนั้นดังรูปที่ 9 และวิธีนี้ไม่เกิดปฏิกิริยากับสารสเตียรอยด์เบต้าซิโตสเตอรอล สติกแมสเตอร์อล และแคมเพสเตอร์อล แต่สามารถเกิดปฏิกิริยากับน้ำตาลที่มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ได้ อย่างไรก็ตามตำแหน่งของน้ำตาลจะอยู่บริเวณใกล้จุดเริ่มต้นจึงไม่รบกวนการทดสอบ ซึ่งวิธีนี้มีขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพอยู่ที่ประมาณ 500 µg/mL [17, 32] และเคยมีการนำเอาเทคนิคการวิเคราะห์เชิงภาพหรือ Image processing โดยใช้โปรแกรม Adobe photoshop เพื่อแปลขนาดและความเข้มของวงสีที่เกิดจากการพ่นสารละลาย Tetrazolium blue เป็นหน่วยพิกเซล แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ค่อนข้างต่ำประมาณ 500 µg/mL สำหรับเพรตนิโซโลน และ เดกซาเมทาโซน [33]

2.6.1.3 Densitometer เป็นการตรวจวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยวัดจากการดูดกลืนแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 nm โดยใช้เครื่อง densitometer เช่นเดียวกับวิธี 2.6.1.1 ซึ่งเครื่องมือดังกล่าวจะวัดความเข้มที่เกิดจากจุดที่บ่งแสงของตำแหน่งที่มีสารสเตียรอยด์ดังรูปที่ 10 จากการศึกษาพบว่าเคยมีการใช้วิธีดังกล่าวในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนเท่านั้น โดยมีขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพเท่ากับ 3 µg/mL และมีขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณเท่ากับ 9 µg/mL แต่อย่างไรก็ตามเครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง มีขนาดใหญ่ไม่สามารถเคลื่อนย้ายได้ และใช้ตัวอย่างในปริมาณมาก [34]



ที่มา Ref. [17]

รูปที่ 9 แสดงการตรวจเชิงคุณภาพของวิธี TLC



ที่มา Ref. [34]

รูปที่ 10 แสดงการตรวจเชิงปริมาณของวิธี TLC ด้วยเครื่อง densitometer

2.6.2 วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid chromatography หรือ HPLC) เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจหาการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ได้โดยใช้หลักการโครมาโทกราฟีเช่นเดียวกัน แต่จะมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดได้ดีกว่าวิธีแรงเฉื่อยบาง โดยสารที่ต้องการทดสอบจะไหลผ่านเข้าไปในคอลัมน์ที่เป็นวัฏภาคคงที่มีขนาดเล็ก ซึ่งสารสเตียรอยด์จะถูกดูดซับเอาไว้แล้วถูกชะออกมาจากคอลัมน์ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ จากนั้นสารสเตียรอยด์จะถูกตรวจวัดความเข้มข้นด้วยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 nm ซึ่งวิธีนี้มีขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพประมาณ 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และมีขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณประมาณ 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สำหรับสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิด แม้ว่าวิธีนี้สามารถตรวจวัดเชิงปริมาณได้อย่างมีประสิทธิภาพมาก แต่ต้องอาศัยกระบวนการเตรียมสิ่งตัวอย่างก่อนการทดสอบหลายขั้นตอน เครื่องมืออุปกรณ์มีราคาแพง และต้องอาศัยบุคลากรที่มีความสามารถในการใช้เครื่องมือ เป็นต้น [18]

2.6.3 วิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟี (Immunochromatography technique) เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจหาการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ได้โดยใช้หลักการโครมาโทกราฟีเช่นเดียวกัน แต่จะมีการติดฉลากสารแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับสารเดกซาเมทาโซน ลงบนอนุภาคทองคำนาโน ซึ่งเป็นตัวชี้วัดในการทดสอบ มีการตรึงสารเดกซาเมทาโซนที่จับกับโอวัลบูมิน (ovalbumin) ลงบนตำแหน่ง Test line และมีการตรึงสาร anti-rabbit ชนิด IgG ที่ตำแหน่ง Control line เมื่อใดก็ตามถ้าตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีสารสเตียรอยด์ปลอมปนอยู่ สารดังกล่าวจะเข้าไปจับกับแอนติบอดีบนอนุภาคทองคำนาโนจนหมด จึงทำให้มีแถบสีแดงปรากฏขึ้นเพียงแถบเดียวที่ตำแหน่ง Control line จะไม่ปรากฏแถบสีแดงบน Test line แต่ถ้าหากในสิ่งตัวอย่างไม่มีสารสเตียรอยด์ปลอมปน แถบสีแดงจะปรากฏขึ้นมา 2 ขีดคือตำแหน่ง Test line และ Control line ดังรูปที่ 11 ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีคือสามารถทดสอบได้อย่างรวดเร็วประมาณ 10-15 นาที มีราคาไม่แพง และมีขีดความสามารถในการทดสอบอยู่ที่ประมาณ 50 µg/mL สำหรับเพรดนิโซโลนและ 1 µg/mL สำหรับเดกซาเมทาโซน จึงทำให้วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้น อย่างไรก็ตามวิธีการนี้มีข้อจำกัดคือ การอ่านผลการทดสอบเป็นแบบตรงกันข้ามกับชุดตรวจที่คุ้นเคย เช่น ชุดตรวจการตั้งครรภ์คือ ผลเป็นบวกจะขึ้นแถบสีแดง 2 แถบ ผลลบจะขึ้นเพียงแถบเดียว ซึ่งอาจทำให้การอ่านผลการทดสอบผิดพลาดได้ ยิ่งไปกว่านั้นการทดสอบนี้สามารถตรวจวัดได้เพียงเชิงคุณภาพเท่านั้นไม่สามารถระบุเชิงปริมาณได้และไม่สามารถแยกชนิดของสารสเตียรอยด์ได้ [35]



ที่มา Ref. [17]

รูปที่ 11 แสดงการตรวจการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ด้วยวิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟี

2.6.4 วิธีทางเคมีไฟฟ้า (electrochemistry analysis) เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่อาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงทางเคมีไฟฟ้าของสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ อาทิเช่น กระบวนการออกซิเดชัน-รีดักชัน (oxidation-reduction reaction) หรือเรียกว่า ปฏิกริยารีดอกซ์ (redox reaction) มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารที่ต้องการ โดยตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงค่าทางไฟฟ้าต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นความต่างศักย์ ความต้านทานไฟฟ้า หรือกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีก็คือสามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว มีความไวในการตรวจวิเคราะห์สูง โดยสามารถวัดสารได้แม้มีปริมาณสารต่ำ ๆ และมีความจำเพาะสูง ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงการวิเคราะห์สารตกค้างในนาโนสโตนด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า

สารสเตียรอยด์	ขั้วไฟฟ้า	ช่วงการวิเคราะห์ (M)	ขีดจำกัดการวิเคราะห์ (M)	สิ่งตัวอย่าง	วิธีการวิเคราะห์	แหล่งอ้างอิง
เดกซาเมทาโซน (Dexamethasone)	HMDE	2.5×10^{-5} - 1.2×10^{-4}	7.6×10^{-6}	ยา	DPV	[36]
	B-Cyclodextrin/CPE	4.1×10^{-7} - 2×10^{-5}	3.6×10^{-7}	เลือด, ปัสสาวะ	DPV	[37]
	MWCNT/PE	1.5×10^{-7} - 1×10^{-4}	9×10^{-8}	ปัสสาวะ	SWV	[38]
	C60/EPPGE	5×10^{-8} - 1×10^{-4}	5×10^{-8}	เลือด	SWV	[39]
	HMDE	4.9×10^{-8} - 6.1×10^{-7}	2.5×10^{-9}	-	SWV	[40]
เพรดนิโซโลน (Prednisolone)	Fe ₃ O ₄ /PANI-Cull microspheres	5×10^{-8} - 3×10^{-5}	3×10^{-9}	เลือด, ปัสสาวะ	DPV	[41]
	B-Cyclodextrin/CPE	5.6×10^{-7} - 2×10^{-5}	4.8×10^{-7}	เลือด, ปัสสาวะ	DPV	[37]
	C60/Au	1.0×10^{-6} - 1×10^{-4}	2.6×10^{-8}	เลือด, ปัสสาวะ	DPV	[42]
	NanoAu/ITO	1.0×10^{-6} - 1×10^{-4}	9×10^{-8}	เลือด, ปัสสาวะ	DPV	[42]
เพรดนิโซโลน (Prednisolone)	MIP-MWCNT paste	8.0×10^{-8} - 16×10^{-7}	5×10^{-8}	เลือด	DPV	[43]
	SWCNT/EPPGE	1.0×10^{-8} - 1×10^{-4}	9.0×10^{-9}	ปัสสาวะ	SWV	[44]

2.7 อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ (paper-based analytical devices, PADs)

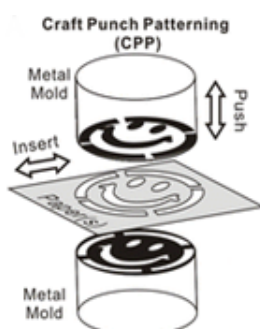
Whitesides และคณะเป็นผู้พัฒนาแนวคิดการตรวจวิเคราะห์สารบนกระดาษเป็นครั้งแรกในปี 2007 [45] โดยวิธีการดังกล่าวอาศัยคุณสมบัติที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ของกระดาษและแรงดึงตามรูขนาดเล็ก (capillary force) ภายในเนื้อเยื่อกระดาษที่เกิดจากรูพรุนของเซลลูโลส เพื่อใช้ในการดึงสารเคมีต่าง ๆ ให้ไหลไปตามทิศทางของแรงดังกล่าว โดยปราศจากการใช้แรงดึงภายนอกจากเครื่องมือต่าง ๆ เข้าช่วย แต่อย่างไรก็ตามเพื่อควบคุมทิศทางการไหลของสารจึงมีการสร้างขอบเขตของกระดาษเพื่อควบคุมการไหล โดยมีหลากหลายวิธีด้วยกันดังนี้

2.7.1 การสร้างขอบเขตโดยใช้วิธีการทางกายภาพ (patterning physical boundaries) เป็นวิธีที่ไม่ต้องอาศัยสารที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ในการสร้างขอบเขต ดังนี้

2.7.1.1 Plotter cutting เป็นเทคนิคที่ใช้เครื่องตัดกระดาษชนิดใบมีดในการสร้างลวดลายเพื่อกำหนดขอบเขตพื้นที่การไหลของสารไปตามรูปแบบที่กำหนด ซึ่งวิธีดังกล่าวสามารถสร้างชุดตรวจได้หลายชุดในระยะเวลาอันสั้น มีความแม่นยำในการตัดสูง และเครื่องมือราคาไม่แพง แต่อย่างไรก็ตามกระดาษบางชนิดมีความหนาและเหนียว ซึ่งจะไม่สามารถใช้วิธีนี้ในการตัดได้ [46]

2.7.1.2 Laser cutting เป็นเทคนิคที่ใช้เครื่องตัดกระดาษชนิดเลเซอร์ในการกำหนดขอบเขตพื้นที่การไหลของสารไปตามรูปแบบที่กำหนดเช่นเดียวกับการตัดด้วยเครื่องตัดกระดาษทั่วไป แต่เครื่องตัดชนิดเลเซอร์จะมีประสิทธิภาพมากกว่า โดยสามารถตัดกระดาษที่มีความหนาและเหนียวได้ดี มีความเร็วและแม่นยำในการตัดสูงกว่า แต่อย่างไรก็ตามเครื่องมือชนิดนี้มีราคาแพง [47]

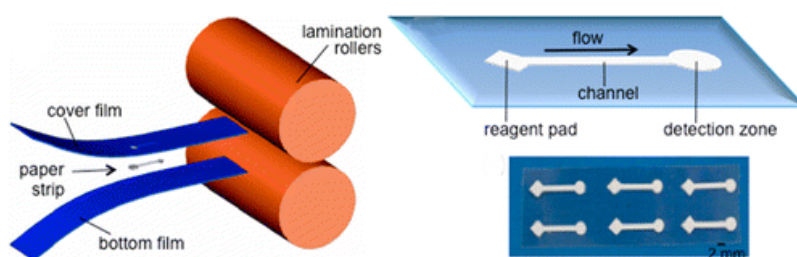
2.7.1.3 Craft punch patterning เป็นเทคนิคที่ใช้แม่แบบโลหะที่ถูกออกแบบให้มีลักษณะตามต้องการ แล้วนำแผ่นแม่แบบโลหะดังกล่าวไปกดลงบนแผ่นกระดาษหรือวัสดุที่ต้องการตัดตั้งรูปที่ 12 ซึ่งวิธีนี้สามารถทำได้ง่ายโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง แต่อย่างไรก็ตามตัวแม่แบบมีลักษณะที่จำเพาะและมีต้นทุนในการสร้างตัวแม่แบบ [48]



ที่มา ปรับปรุงมาจาก Ref. [48]

รูปที่ 12 แสดงการสร้างชุดตรวจด้วยเทคนิค Craft punch patterning

2.7.1.4 laminated paper-based analytical devices หรือ LPAD เป็นเทคนิคที่ใช้เครื่องเคลือบนามบัตรมาใช้ในการกำหนดขอบเขตและทิศทางการไหลของสาร โดยการเคลือบแผ่นพลาสติกลงไปบนแผ่นกระดาษทั้งสองด้าน โดยมีด้านหนึ่งที่แผ่นพลาสติกถูกตัดให้มีขนาดเล็กกว่ากระดาษตามความเหมาะสมในการใช้งานดังรูปที่ 13 ซึ่งวิธีนี้ช่วยให้กระดาษมีความคงทนมากยิ่งขึ้น เนื่องจากกระดาษเมื่อสัมผัสกับของเหลวจะทำให้อ่อนตัวลงจึงเป็นอุปสรรคในการทดสอบ [49] แต่มีข้อจำกัดในการสร้างลวดลายที่มีความละเอียดสูงและต้องใช้ความร้อนในการเคลือบแผ่นกระดาษ



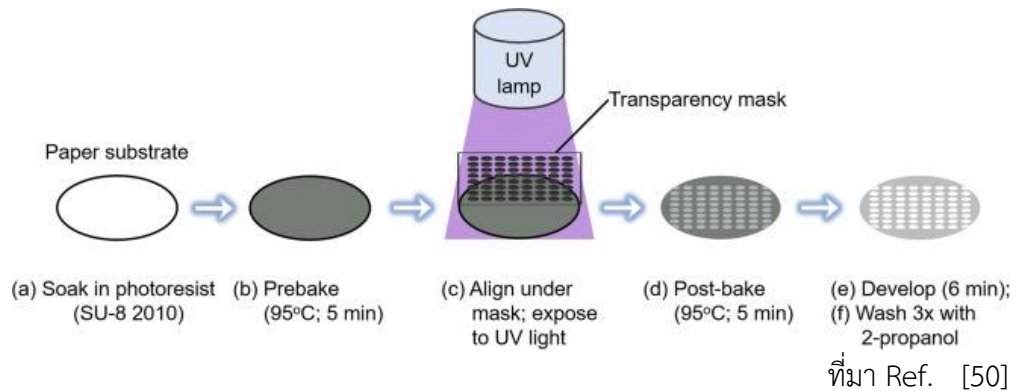
ที่มา Ref. [49]

รูปที่ 13 แสดงการสร้างชุดตรวจด้วยเทคนิค LPAD fabrication

2.7.2 การสร้างขอบเขตโดยใช้สารเคมี (patterning hydrophobic boundaries) เป็นวิธีที่ใช้สารที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ในการสร้างขอบเขต ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ดังนี้

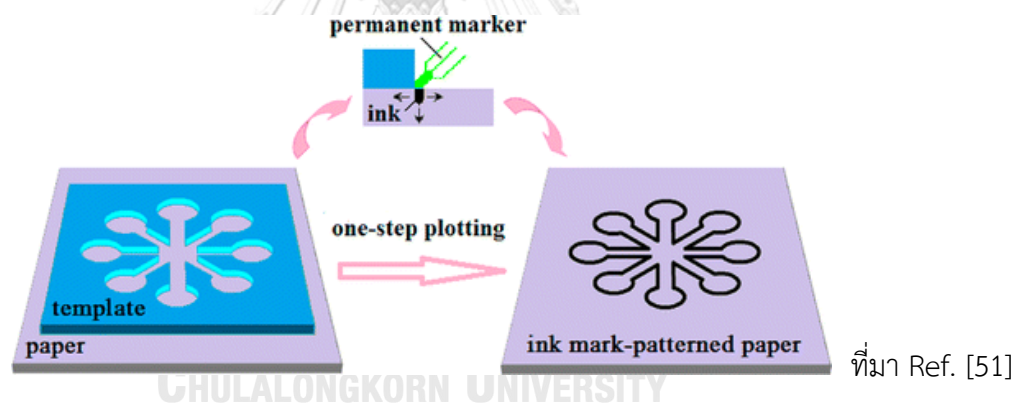
2.7.2.1 Mask-guided patterning methods เป็นเทคนิคที่ต้องใช้แม่แบบเป็นตัวกำหนดขอบเขตพื้นที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำบนกระดาษ โดยมีหลากหลายวิธีดังนี้

2.7.2.1.1 Photolithography เป็นเทคนิคแรกที่ถูกนำมาใช้ในการสร้างลวดลายบนแผ่นกระดาษ โดยการเคลือบสารไวแสง (photoresist) ลงบนแผ่นกระดาษ จากนั้นวางแผ่นฟิล์มที่บดแสงที่ทำหน้าที่เป็นแม่แบบในการกำหนดลักษณะลวดลายบนแผ่นกระดาษ แล้วฉายรังสี UV ลงไปจะทำให้บริเวณที่โดนรังสี UV เกิดกระบวนการเชื่อมโยงกันของโมเลกุลหรือ crosslink เป็นพื้นที่ที่ไม่ชอบน้ำขึ้นมา หลังจากนั้นนำสารไวแสงที่ไม่เกิดปฏิกิริยาออกไป ซึ่งจะได้ลวดลายบนแผ่นกระดาษตามลักษณะแม่แบบดังรูปที่ 14 [45, 50] ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีคือสามารถสร้างลวดลายที่มีความละเอียดสูงได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่เครื่องมือ สารเคมี และอุปกรณ์ที่ใช้ในการสร้างลวดลายบนกระดาษนั้นมีราคาแพงและต้องปฏิบัติงานในห้องพิเศษที่มีการควบคุมแสงจากภายนอกและควบคุมฝุ่นละออง



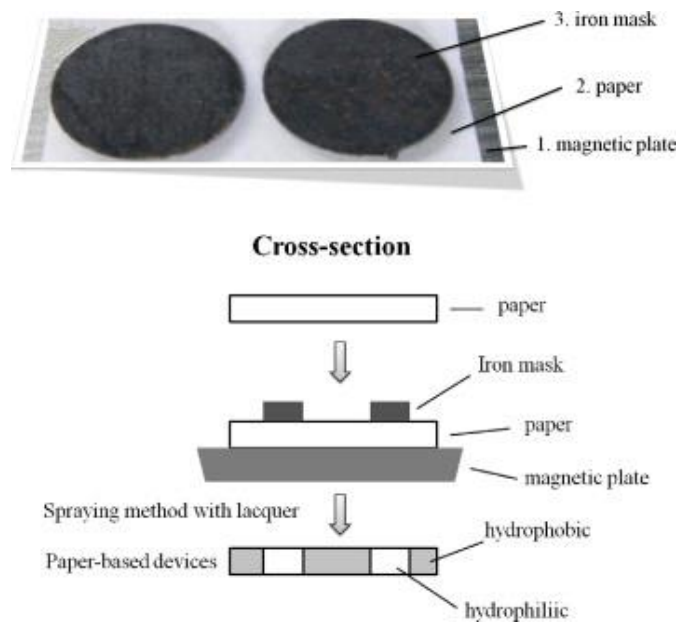
รูปที่ 14 แสดงการสร้างชุดตรวจด้วยเทคนิค Photolithography

2.7.2.1.2 Plotting เป็นเทคนิคการสร้างลวดลายบนกระดาษโดยใช้หมึกชนิดเรซิน ซึ่งมีคุณสมบัติในการทนน้ำมาเขียนลงบนแผ่นกระดาษตามลักษณะของแม่แบบโลหะที่สร้างขึ้น ซึ่งบริเวณที่ถูกวาดโดยหมึกดังกล่าวจะมีคุณสมบัติเป็นพื้นที่ไม่ชอบน้ำและบริเวณอื่น ๆ จะเป็นพื้นที่ชอบน้ำดังรูปที่ 15 [51] ซึ่งวิธีนี้สามารถทำได้ง่ายไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่สลับซับซ้อนและราคาแพง แต่มีข้อจำกัดในการสร้างลวดลายที่มีความละเอียดสูง



รูปที่ 15 แสดงการสร้างชุดตรวจด้วยเทคนิค Plotting

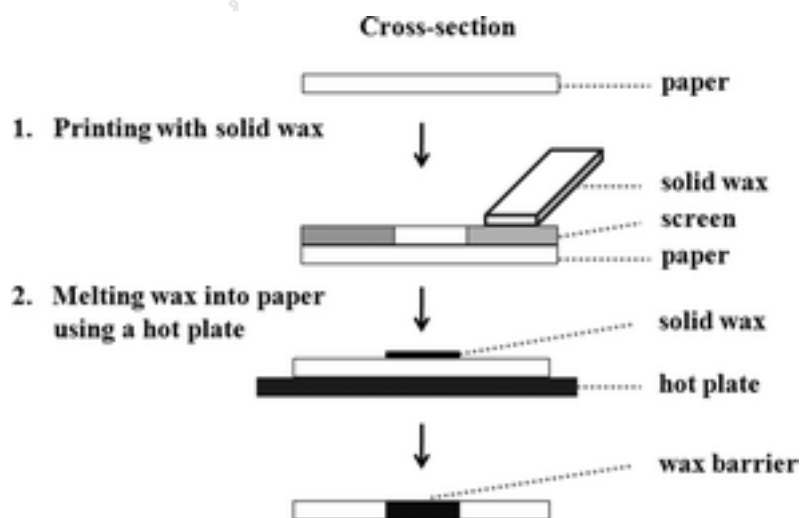
2.7.2.1.3 Lacquer spray เป็นเทคนิคที่สร้างลวดลายบนกระดาษโดยใช้แลคเกอร์ ซึ่งมีองค์ประกอบของสารเรซิน มาพ่นลงไปบนแผ่นโลหะที่ถูกยึดไว้กับกระดาษด้วยแผ่นแม่เหล็ก บริเวณที่ถูกสเปรย์ด้วยแลคเกอร์จะมีคุณสมบัติเป็นพื้นที่ไม่ชอบน้ำและบริเวณที่ถูกบดบังด้วยแผ่นแม่เหล็กจะเป็นพื้นที่ชอบน้ำดังรูปที่ 16 [52] วิธีนี้สามารถทำได้ง่ายไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่สลับซับซ้อนและราคาแพง แต่มีข้อจำกัดในการสร้างลวดลายที่มีความละเอียดสูง



ที่มา ปรับปรุงมาจาก Ref. [52]

รูปที่ 16 แสดงการสร้างชุดตรวจด้วยเทคนิค Lacquer spray

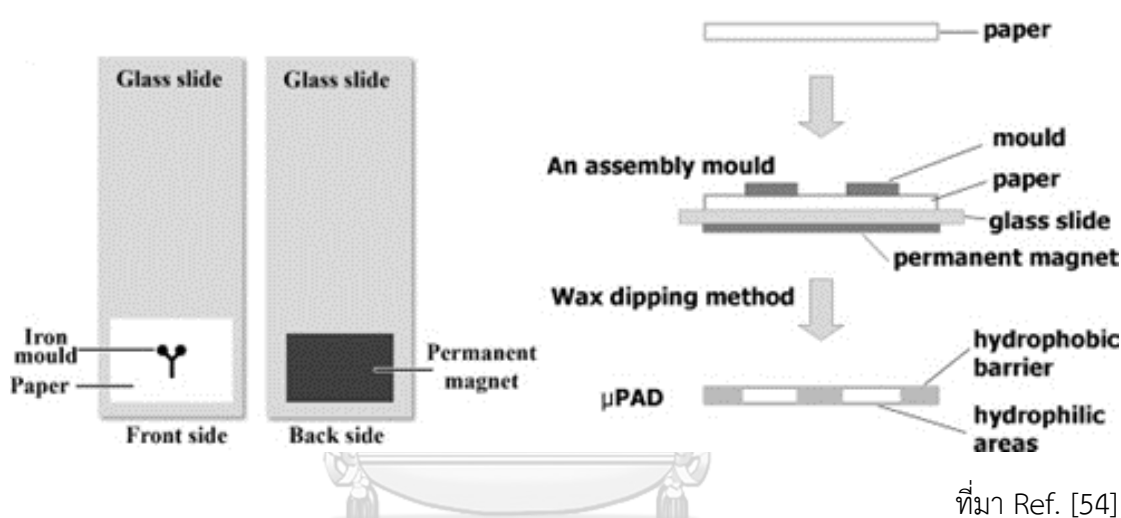
2.7.2.1.4 Wax screen-printing เป็นเทคนิคที่สร้างลวดลายบนกระดาษโดยการนำแผ่นสกรีนที่มีการสลักลวดลายวางไว้บนแผ่นกระดาษเพื่อใช้การกำหนดขอบเขต จากนั้นใช้แท่ง wax สกรีนขีดลงไปบนกระดาษ แล้วนำกระดาษที่ได้ไปวางไว้บนเตาให้ความร้อน จะทำให้ wax ที่เกาะบนแผ่นกระดาษซึมผ่านเข้าไปในเนื้อกระดาษเกิดเป็นพื้นที่ไม่ชอบน้ำขึ้นมา และบริเวณที่ถูกบดบังด้วยแผ่นสกรีนจะเป็นพื้นที่ชอบน้ำดังรูปที่ 17 วิธีนี้สามารถทำได้ง่ายไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่สลับซับซ้อนและราคาแพง แต่มีข้อจำกัดในการสร้างลวดลายที่มีความละเอียดสูง



ที่มา Ref. [53]

รูปที่ 17 แสดงการสร้างชุดตรวจด้วยเทคนิค Wax screen-printing

2.7.2.1.5 Wax dipping เป็นเทคนิคที่สร้างลวดลายบนแผ่นกระดาษ โดยใช้แผ่นเหล็กที่ถูกออกแบบให้เหมาะสมกับการใช้งานวางไว้บนแผ่นกระดาษเพื่อใช้ในการกำหนดขอบเขต จากนั้นนำแผ่นกระดาษและแผ่นเหล็กดังกล่าวมาวางไว้บนแผ่นสไลด์ แล้ววางแผ่นแม่เหล็กในด้านตรงข้ามเพื่อให้แรงดึงจากแม่เหล็กยึดแผ่นเหล็กให้แนบชิดกับกระดาษ จากนั้นนำไปจุ่มลงใน wax ที่ถูกทำให้หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 120-130 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วินาที หลังจากนั้นนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำแผ่นเหล็กออกและลอก wax ส่วนเกินออกไป ซึ่งบริเวณที่สัมผัสกับ wax จะเป็นพื้นที่ไม่ชอบน้ำและบริเวณที่ถูกบดบังด้วยแผ่นเหล็กจะเป็นพื้นที่ชอบน้ำดังรูปที่ 18 วิธีนี้สามารถทำได้ง่ายไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่สลับซับซ้อนและต้นทุนต่ำ แต่มีข้อจำกัดในการสร้างลวดลายที่มีความละเอียดสูงและต้องใช้ความร้อนในการในการละลาย wax

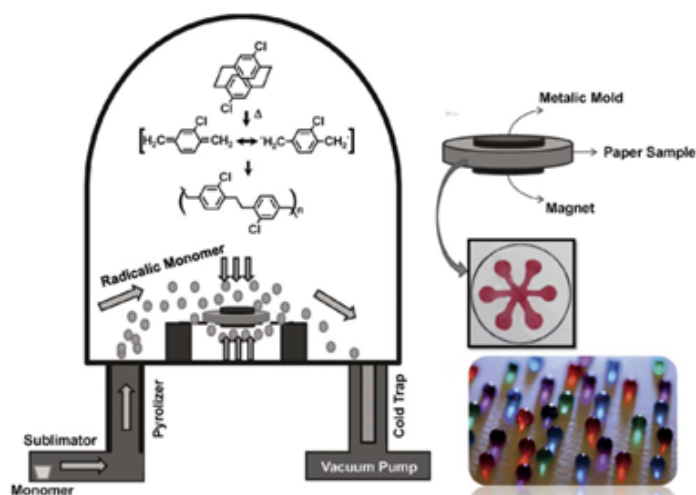


ที่มา Ref. [54]

รูปที่ 18 แสดงการสร้างชุดตรวจด้วยเทคนิค Wax dipping

2.7.2.1.6 Etching เป็นเทคนิคที่สร้างลวดลายโดยนำกระดาษไปจุ่มลงในสารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic อาทิเช่น Alkyl ketene dimer (AKD) [55], octadecyltrichlorosilane [56] และ titanium oxide [57] เป็นต้น จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 45 นาที ซึ่งจะเป็นการสร้างพื้นที่ไม่ชอบน้ำลงบนกระดาษ จากนั้นนำเอาแผ่นแม่แบบโลหะมาวางไว้บนกระดาษข้างต้นแล้วใช้เครื่อง plasma cleaner ในการกำจัดสาร AKD ออกจากบริเวณที่ต้องการสร้างพื้นที่ชอบน้ำ วิธีนี้สามารถสร้างลวดลายที่มีความละเอียดสูงและสารเคมีที่ใช้ราคาไม่แพง โดยเฉพาะ AKD แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ต้องอาศัยเครื่อง plasma cleaner และพื้นที่ hydrophilic มีการสัมผัสกับสารเคมีโดยตรง ซึ่งอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนในการตรวจวิเคราะห์ได้

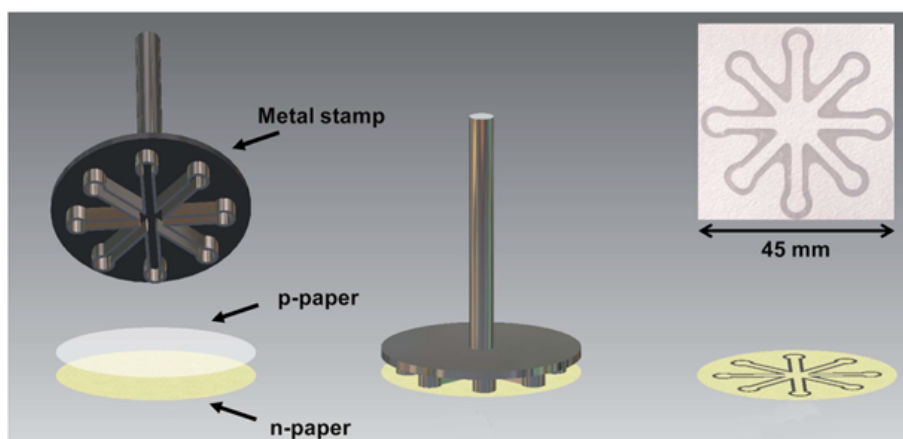
2.7.2.1.7 Vapor phase deposition เป็นเทคนิคที่สร้างลวดลายบนแผ่นกระดาษโดยใช้สาร Hydrophobic dichloro-[2,2]-paracyclophane ซึ่งเป็นสารโมโนเมอร์ชนิดหนึ่งในการเคลือบพื้นผิวแผ่นกระดาษด้วยวิธีเคลือบผิวด้วยไอสารเคมี (CVD หรือ Chemical Vapor Deposition) โดยกำหนดลวดลายโดยใช้แผ่นแม่แบบโลหะ บริเวณที่ถูกสารเคมีดังกล่าวจะเป็นพื้นที่ไม่ชอบน้ำ ส่วนบริเวณที่ไม่ถูกสารเคมีจะเป็นพื้นที่ชอบน้ำดังรูปที่ 19 [58] วิธีนี้สามารถสร้างขอบเขตที่ทนต่อสารจำพวก organic compound ได้ดีแต่ต้องอาศัยเครื่องมือในการระเหยสารเคมี



ที่มา Ref. [58]

รูปที่ 19 แสดงการสร้างชุดตรวจด้วยเทคนิค Vapor phase deposition

2.7.2.1.8 Stamping เป็นเทคนิคที่สร้างลวดลายบนแผ่นกระดาษโดยนำกระดาษไปจุ่มในพาราฟินเหลวที่อุณหภูมิประมาณ 90 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแผ่นกระดาษดังกล่าวมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องให้พาราฟินแข็งตัวเป็นเนื้อเดียวกับเนื้อกระดาษ แล้วนำไปวางไว้บนกระดาษอีกแผ่นหนึ่ง นำแผ่นแม่แบบโลหะที่มีอุณหภูมิประมาณ 150 องศาเซลเซียสมาวางไว้บนแผ่นกระดาษที่มีพาราฟิน ความร้อนจากแผ่นแม่แบบโลหะจะส่งผลให้พาราฟินละลายและซึมลงไปในเนื้อกระดาษอีกแผ่นหนึ่ง เกิดเป็นพื้นที่ไม่ชอบน้ำเกิดขึ้นดังรูปที่ 20 [59] วิธีนี้สามารถทำได้ง่าย โดยไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่สลับซับซ้อนและราคาแพง แต่ต้องใช้ความร้อนในการในการละลายพาราฟินบนผิวกระดาษ



ที่มา Ref. [59]

รูปที่ 20 แสดงการสร้างชุดตรวจด้วยเทคนิค Stamping

2.7.2.2 Non Mask-guided patterning methods เป็นเทคนิคที่สามารถสร้างขอบเขตพื้นที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ โดยไม่ต้องใช้อุปกรณ์ลอกแบบ

2.7.2.2.1 Plotter printing เป็นเทคนิคที่สร้างลวดลายบนแผ่นกระดาษโดยใช้เครื่องพล็อตเตอร์ในการสร้างลวดลายลงบนกระดาษ ซึ่งเครื่องดังกล่าวจะบรรจุสารที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) อาทิเช่น PDMS หรือหมึกพิมพ์ที่มีคุณสมบัติในการต้านทานน้ำ เป็นต้น โดยบริเวณที่ถูกเขียนด้วยสารดังกล่าวจะมีคุณสมบัติเป็นพื้นที่ไม่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่โดนเขียนจะเป็นพื้นที่ชอบน้ำ [60] วิธีนี้สามารถทำได้ง่ายและสารเคมีไม่สัมผัสกับบริเวณ hydrophilic แต่ต้องอาศัยเครื่องพล็อตเตอร์ในการเขียนลวดลายบนกระดาษ

2.7.2.2.2 Printing เป็นเทคนิคที่สร้างลวดลายบนแผ่นกระดาษโดยใช้เครื่องพิมพ์สารเคมีลงไป อาทิเช่น Octadecyl acrylate, 1,10-Decanediol diacrylate [61], polystyrene [62], alkyl ketene dimer ในสารละลาย heptane [63] เป็นต้น ซึ่งสารเคมีดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นสารไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) หรือการใช้วัสดุที่มีคุณสมบัติในการต้านทานน้ำเช่น หมึก wax เป็นต้น [64] โดยบริเวณที่ถูกพิมพ์ด้วยสารดังกล่าวจะมีคุณสมบัติเป็นพื้นที่ไม่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่โดนพิมพ์จะเป็นพื้นที่ชอบน้ำเช่นเดียวกัน วิธีนี้สามารถทำได้ง่ายและใช้ระยะเวลาในการสร้างน้อย แต่ต้องใช้เครื่องพิมพ์ชนิดพิเศษที่มีราคาแพงและต้องใช้ความร้อนในการให้สาร hydrophobic ซึมผ่านเข้าไปในกระดาษ

2.8 วิธีการตรวจวิเคราะห์บนกระดาษ

อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลฐานกระดาษสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยในปัจจุบันมีหลากหลายเทคนิคดังนี้

2.8.1 Colorimetric detection เป็นการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาทางเคมีบนกระดาษ ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยการสังเกตด้วยตาเปล่าจากการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นหรือใช้อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ อาทิเช่น การใช้กล้องถ่ายภาพ โทรศัพท์มือถือ เครื่องสแกนเอกสาร หรืออาศัยเครื่องมือตรวจวัดการดูดกลืนแสง [65] เป็นต้น จึงทำให้วิธีดังกล่าวเป็นที่นิยมในการนำไปประยุกต์ใช้ตรวจสอบสารเคมีต่าง ๆ เช่น การตรวจวัดปริมาณกลูโคสโดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะทำปฏิกิริยาทางเคมีกับกลูโคสเกิดเป็นสาร hydrogen peroxide (H_2O_2) จากนั้น H_2O_2 จะทำปฏิกิริยา Iodide โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) ทำให้เกิดสาร Iodine ซึ่งเป็นสารสีน้ำตาลจึงสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า เป็นต้น [66] ถึงแม้ว่าวิธีดังกล่าวสามารถทดสอบได้ง่ายและไม่สลับซับซ้อน แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัดก็คือการเปลี่ยนแปลงของสีกระดาษจากการเก็บไม่เหมาะสมหรือชุดตรวจที่ถูกเก็บเอาไว้ยาวนานอาจจะส่งผลต่อการตรวจวัดได้

2.8.2 Chemiluminescence and fluorescence sensor เป็นการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของแสงหรือการเรืองแสงของสารที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาทางเคมี ยกตัวอย่างเช่น การทดสอบสาร Uric acid อาศัยการทำปฏิกิริยาของ Urate oxidase (UOx) ทำให้เกิดสาร H_2O_2 จากนั้นสาร H_2O_2 จะไปทำปฏิกิริยากับ Rhodamine derivative เกิดการเปล่งแสงขึ้นมาแล้ววัดความเข้มแสงที่เกิดขึ้นด้วย luminescence analyzer โดยความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของ Uric acid เป็นต้น [67] ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีคือสามารถทดสอบสารได้ในปริมาณต่ำ ๆ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ต้องใช้เอนไซม์ที่ความเข้มข้นสูงจึงอาจไปขัดขวางรูพรุนของกระดาษทำให้ส่งผลต่อการทดสอบได้

2.8.3 Electrochemical sensor เป็นการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีไฟฟ้าของสารไม่ว่าจะเป็นความต่างศักย์ ความต้านทานไฟฟ้า หรือกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น ซึ่งวิธีนี้สามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วเพียงไม่กี่วินาที มีความไวในการตรวจวิเคราะห์สูง สามารถวัดสารได้แม้ปริมาณสารต่ำ ๆ และมีความจำเพาะสูง จึงมีการนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารต่าง ๆ มากมาย ยกตัวอย่างเช่น การวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคส (glucose) ในตัวอย่างเลือดครบส่วน โดยใช้กระดาษแยกเลือดชนิด VF2 membrane ในการแยกพลาสมาออกมาจากเม็ดเลือดแดง แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) แล้วตรวจวัดปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide หรือ H_2O_2) ที่เกิดขึ้นจากสารดังกล่าวด้วยขั้วไฟฟ้าชนิด Prussian blue modified screen printed electrode (PB-SPEs) และวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของ

กระแสไฟฟ้าด้วยวิธีโครโนแอมเพอโรเมทรี (chronoamperometry) [68] และยังคงเคยมีการนำเอากระดาษ whatman NO1 มาสร้างขอบเขตพื้นที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำด้วยไซ เพื่อกำหนดทิศทางการไหลของสิ่งตัวอย่างไปยังขั้วไฟฟ้าที่ถูกตรึงด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับสารเอสตราไดอล (estradiol) ซึ่งเป็นสารสเตียรอยด์ชนิดหนึ่งในกลุ่มฮอร์โมนเอสโตรเจน ลงบนขั้วไฟฟ้าชนิด Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs)/thionine (THI)/gold nano-particles (AuNPs) screen printed electrode และวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าด้วย DPV [69]

แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้จะมุ่งเน้นไปที่การวิเคราะห์ปริมาณสารสเตียรอยด์ชนิดเพรดนิโซโลน และ เดกซาเมทาโซนด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ซึ่งแต่ละวิธีจะมีวิธีการวิเคราะห์แตกต่างกันมากมาย ดังตารางที่ 3 จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าวิธีในการตรวจวัดสารสเตียรอยด์ยังคงใช้เซลล์ไฟฟ้าเคมี (electrochemical cell) ในการตรวจวัด โดยจุ่มขั้วไฟฟ้าลงในตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งต้องใช้ตัวอย่างและสารละลายอิเล็กโทรไลต์ (electrolyte) ในปริมาณมากและมีโอกาสสูงที่การตรวจวัดจะถูกรบกวนจากสารอื่น ๆ ที่พบได้ในสิ่งตัวอย่าง จึงได้มีการพัฒนาวิธีการสร้างขั้วไฟฟ้าแทนที่การใช้เซลล์ไฟฟ้าเคมี ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันดังตารางที่ 5 โดยในงานวิจัยครั้งนี้ได้เลือกใช้ขั้วไฟฟ้าชนิด Screen printed electrode เนื่องจากเป็นขั้วที่ได้รับความนิยม ราคาถูก และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการเทคนิคการวิเคราะห์อื่น ๆ ได้ง่าย ยกตัวอย่างเช่น เทคนิคระบบการไหลบนฐานกระดาษ เนื่องจากกระดาษเป็นวัสดุที่มีราคาถูก พกพาได้ง่าย ใช้สารในการทดสอบน้อย และสามารถนำมาใช้ในเตรียมตัวอย่างก่อนการทดสอบได้ตามคุณสมบัติของกระดาษที่เลือกใช้

ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้นำเทคนิคการตรวจวิเคราะห์บนกระดาษและวิธีทางเคมีไฟฟ้ามาใช้ในการวัดปริมาณสารสเตียรอยด์ที่ปลอมปนมาในผลิตภัณฑ์สมุนไพร โดยการใช้กระดาษโครมาโทกราฟีชนิด Whatman SG81 ซึ่งมีสารซิลิกาเจลกระจายตัวอยู่ในเนื้อกระดาษ จึงมีคุณสมบัติในการแยกสารเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซนออกจากกัน รวมถึงสิ่งเจือปนอื่น ๆ ด้วยหลักการเดียวกับวิธี TLC เพื่อใช้ในการเตรียมตัวอย่างก่อนการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจากสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดที่ตรวจวิเคราะห์สามารถรบกวนการตรวจวัดกันเองได้ และในผลิตภัณฑ์สมุนไพรแต่ละชนิดที่นำมาทดสอบมีองค์ประกอบที่แตกต่างกันมาก จึงต้องกำจัดสิ่งเจือปนอื่น ๆ ที่อาจเข้ามารบกวนการตรวจวัด หลังจากแยกสารสเตียรอยด์ดังกล่าวเรียบร้อยแล้ว จึงตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Differential Pulse Voltammetry หรือ DPV ซึ่งเป็นเทคนิคหนึ่งของวิธีเคมีไฟฟ้า โดยใช้ขั้วไฟฟ้าชนิด Screen printed carbon electrode หรือ SPCE

ตารางที่ 4 แสดงเทคนิคการสร้างขั้วไฟฟ้าด้วยวิธีต่าง

ขั้วไฟฟ้า	วิธีการสร้างขั้วไฟฟ้า	หลักการ	ข้อดี	ข้อจำกัด	แหล่งอ้างอิง
	Screen-printed	- ใช้แผ่นฟิล์มพลาสติกที่ถูกสลักลายตามแบบที่ต้องการแล้วติดลงไปในแผ่นพลาสติกที่ลักษณะเป็นโครงร่างตาข่าย แล้วสกรีนหมึกนำไฟฟ้าให้ลงไปติดกับวัสดุที่ต้องการสร้างขั้ว	- ต้นทุนต่ำ - ใช้อุปกรณ์น้อย - สามารถสร้างขั้วได้ในปริมาณมาก	- ไม่สามารถใช้กับขั้วที่ต้องการความละเอียดสูงได้	[70-72]
คาร์บอน (Carbon)	Stencil-printing	- ใช้แผ่นเทปหรือพลาสติกที่ถูกสลักลายตามแบบที่ต้องการเพียงอย่างเดียว แล้วสกรีนหมึกนำไฟฟ้าลงไปที่ขั้วโดยตรง	- ต้นทุนต่ำ - ใช้อุปกรณ์น้อย	- การทำขั้วในแต่ละครั้งมีความแตกต่างกันสูง	[71, 73]
	Pencil drawing	- ใช้ดินสอที่ทำจากวัสดุนำไฟฟ้าเช่น คาร์บอน ตะกั่วซินนิม ในกระบวนการสร้างขั้วไฟฟ้า	- การทำขั้วแต่ละครั้งมีความแม่นยำสูง	- ต้องใช้เครื่องมือชนิดพิเศษในการสร้างขั้ว	[71, 74]
	Painting carbon ink	- ใช้หมึกที่นำไฟฟ้าในการสร้างขั้วลงไปในกระดาษหรือวัสดุต่าง ๆ โดยไม่ต้องอาศัยแผ่นสกรีน	- สามารถสร้างขั้วขนาดเล็กได้ดี	- ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพงในการสร้างขั้ว	[71, 75, 76]
โลหะ (Metal)	Thin film	- ใช้การพ่นโลหะลงบนวัสดุพื้นผิวที่ต้องการสร้างขั้วผ่านแผ่นแม่แบบเพื่อกำหนดขอบเขตการสร้างขั้ว	- มีความต้านทานต่ำ	- มีขนาดเล็กและเสียหายได้ง่าย - ราคาแพง	[71, 77]
	Wires	- นำลวดนำไฟฟ้ามาใช้ในการสร้างขั้วไฟฟ้า			

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรทั้งหมด 10 ตัวอย่างได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เขตที่ 5 จังหวัดสมุทรสงครามและคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มด้วยกันคือ ผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ไม่มีการปลอมปนของสารสเตียรอยด์จำนวน 3 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีการปลอมปนสารเดกซาเมทาโซนเพียงอย่างเดียวจำนวน 3 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีการปลอมปนสารสเตียรอยด์ชนิดเพรดนิโซโลนเพียงอย่างเดียวจำนวน 1 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีการปลอมปนทั้งสารเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนจำนวน 3 ตัวอย่าง เป็นต้น

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 5 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับที่	เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
1.	Balance รุ่น AG245	METTLER TOLEDO, Switzerland
2.	Centrifuge รุ่น MIKRO200	HETTICH, Germany
3.	3D printing รุ่น i3Dbot-X250 model	i3Dbot, Thailand
4.	Electrochemical analyzer รุ่น Autolab PGSTAT101	Metrohm Autolab, Netherlands
5.	Evaporation รุ่น DNA110	Thermo Scientific, USA
6.	HPLC รุ่น Agilent Technology 1260	Agilent, USA
7.	Laser cutter รุ่น CNMANLASER MAN-6069	Shandong Man Machinery Equipment Co., Ltd.China
8.	MilliQ	Millipore, USA
9.	pH meter รุ่น ORION 2 STAR	Thermo Scientific, USA
10.	Sonicator รุ่น Branson2510	BransonUltrasonic, USA
11.	Vortex รุ่น Genie2	FINEPCR, Korea

ตารางที่ 6 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับที่	วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
1.	Auto pipette	Gilson, Inc., USA
2.	Glassware ได้แก่ beaker, cylinder, glass plate	PYREX, USA
3.	Microcentrifuge tube	Axygen® Scientific, USA
4.	Pipette tip (10, 200, 1000 μ L)	Gilson, Inc., USA
5.	Polylactic acid (PLA)	Polymaker, China
6.	Screen printed carbon electrode	Dropsens Inc, Spain
7.	Whatman SG81	Whatman International Ltd., England

ตารางที่ 7 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

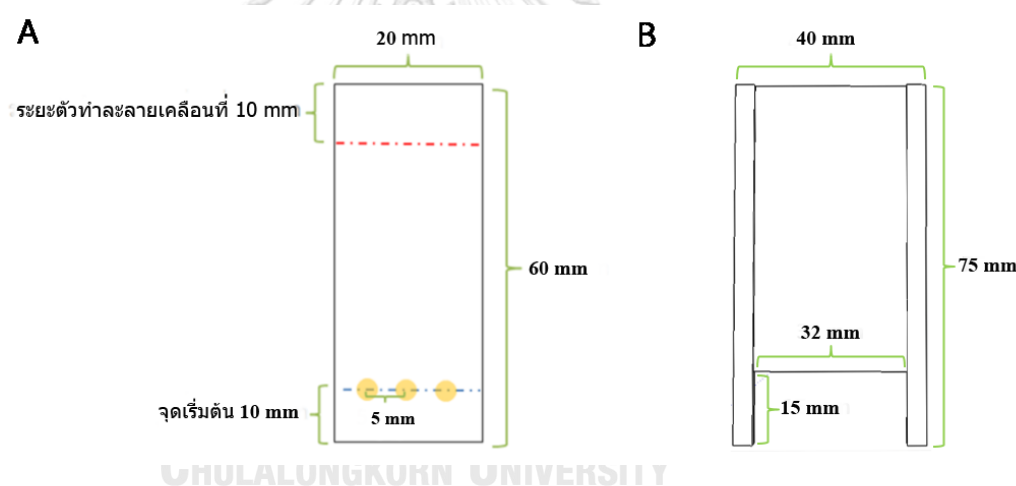
ลำดับที่	วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
1.	Acetic acid (analytical grade, purity \geq 99%)	Merck, Germany
2.	Acetonitrile (HPLC grade, purity \geq 98%)	Sigma-Aldrich, USA
3.	Boric acid (analytical grade, purity \geq 99%)	Merck, Germany
4.	Cyclohexane (analytical grade, purity \geq 98%)	Sigma-Aldrich, USA
5.	Dexamethasone (HPLC grade, purity \geq 98%)	Sigma-Aldrich, USA
6.	Dichloromethane (HPLC grade, purity \geq 98%)	Sigma-Aldrich, USA
7.	Ethyl acetate (analytical grade, purity \geq 99%)	Merck, Germany
8.	Methanol (HPLC grade, purity \geq 98%)	Sigma-Aldrich, USA
9.	Phosphoric acid (analytical grade, purity \geq 99%)	Merck, Germany
10.	Potassium chloride (analytical grade, purity \geq 99%)	Merck, Germany
11.	Prednisolone (HPLC grade, purity \geq 98%)	Sigma-Aldrich, USA
12.	Sodium hydroxide (analytical grade, purity \geq 99%)	Merck, Germany
13.	Tetrasolium blue chloride (analytical grade, purity \geq 99%)	Sigma-Aldrich, USA

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 ศึกษาการแยกสารสเตียรอยด์ด้วยกระดาษ Whatman SG81

3.3.1.1 การออกแบบกระดาษ Whatman SG81

ในการออกแบบกระดาษ Whatman SG81 เพื่อใช้ในการศึกษาการแยกสารสเตียรอยด์ชนิดเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซน โดยตัดกระดาษ Whatman SG81 ให้มีขนาดความกว้าง 20 มิลลิเมตร ความยาว 60 มิลลิเมตร จากนั้นใช้ดินสอกำหนดจุดเริ่มต้นในการหยดสิ่งตัวอย่าง โดยให้ห่างจากฐานของกระดาษ 10 มิลลิเมตร และกำหนดระยะตัวทำละลายเคลื่อนที่โดยให้ห่างจากขอบกระดาษด้านบน 10 มิลลิเมตร และเนื่องจากกระดาษเมื่อสัมผัสกับของเหลวจะเกิดการอ่อนตัว จึงเป็นอุปสรรคในการทดสอบได้ ดังนั้นทางผู้วิจัยได้ออกแบบตลับพลาสติกสำหรับรองรับกระดาษดังกล่าว โดยออกแบบให้มีลักษณะดังรูปที่ 21



รูปที่ 21 (A) แสดงกระดาษ Whatman SG81 และ (B) แสดงตลับพลาสติก
เพื่อใช้ศึกษาการแยกสารสเตียรอยด์

3.3.1.2 ศึกษาวิฤภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

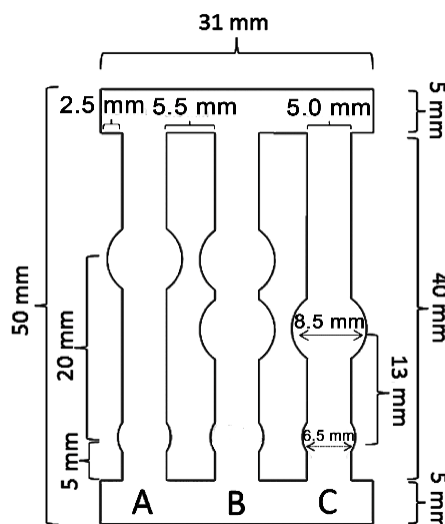
นำกระดาษ Whatman SG81 ข้างต้นมาใช้ในการทดสอบหาวิฤภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม โดยหยดสารละลายมาตรฐานชนิดเดกซาเมทาโซนที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และสารละลายมาตรฐานที่มีทั้งสารเดกซาเมทาโซนที่และเพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ในตัวทำละลาย DCM : Methanol อัตราส่วน 9:1 v/v จำนวน 1 μL ลงในตำแหน่งจุดเริ่มต้น โดยให้แต่ละจุดห่างกัน 5 มิลลิเมตร จากนั้นนำกระดาษ Whatman

SG81 ไปจุ่มลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตรที่มีวัฏภาคเคลื่อนอยู่ 3 มิลลิลิตร โดยวัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย ethyl acetate และ cyclohexane ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันดังนี้คือ 50%, 60% และ 70% ของ ethyl acetate ใน cyclohexane แล้วทิ้งให้สารละลายเคลื่อนที่ไปยังระยะตัวทำละลายเคลื่อนที่ จากนั้นนำกระดาษดังกล่าวออกมาวางไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และพ่นสารละลายที่ประกอบด้วย 0.5% g/ml Tetrazolium blue chloride ในตัวทำละลายเมทานอลและสารละลาย 12% g/ml sodium hydroxide อัตราส่วน 1:1 ซึ่งจะเข้าไปทำปฏิกิริยารีดักชันกับสารสเตียรอยด์ เกิดเป็นสาร Formazan เป็นสารสีม่วง จากนั้นสังเกตลักษณะของแถบสารสเตียรอยด์ที่ปรากฏ และวัดระยะเคลื่อนที่ของสารสเตียรอยด์จากจุดเริ่มต้นเพื่อนำไปคำนวณค่า Retardation factor

3.3.1.3 การสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ

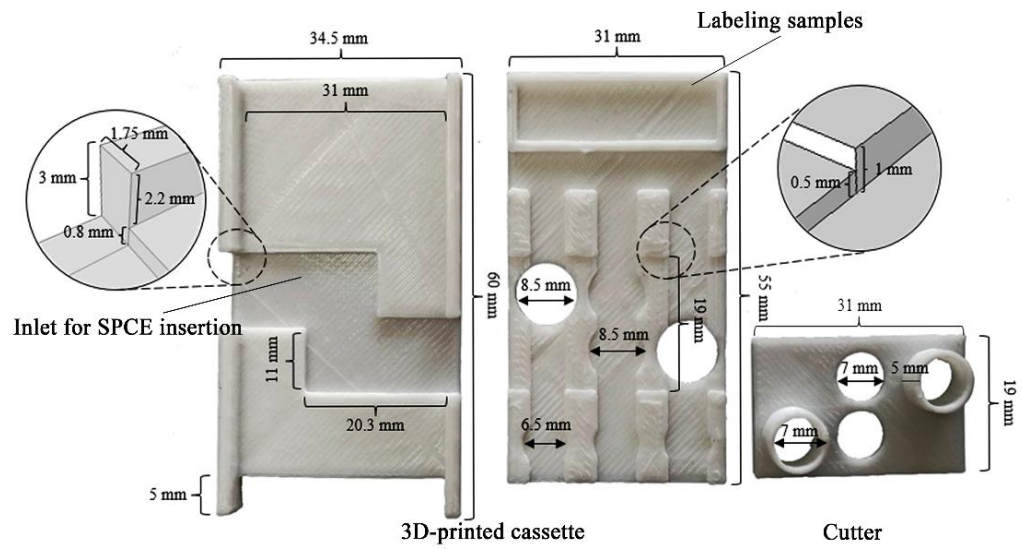
จากการทดสอบการแยกสารสเตียรอยด์ด้วยกระดาษ Whatman SG81 จะทราบค่าตำแหน่งของสารสเตียรอยด์ที่ถูกแยกบนกระดาษ จากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้ในการออกแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ โดยในงานวิจัยครั้งนี้ได้เลือกใช้โปรแกรม Adobe Illustrator CC2017 และใช้เครื่องตัดเลเซอร์ในการตัดกระดาษ โดยตั้งค่าความแรงของแสงเลเซอร์อยู่ที่ 12 W และความเร็วในการตัดเท่ากับ 25 มิลลิเมตรต่อวินาที

โดยชุดตรวจที่สร้างขึ้นได้ถูกแบ่งออกเป็น 3 คอลัมน์คือ คอลัมน์ A , C ใช้ในการวิเคราะห์สารเตกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนตามลำดับ และคอลัมน์ B ใช้ในการควบคุมประสิทธิภาพในการแยกสารสเตียรอยด์ของชุดตรวจดังกล่าว ซึ่งทั้งสามคอลัมน์ได้ถูกออกแบบให้มีพื้นที่วงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5 มิลลิเมตร สำหรับรองรับสิ่งตัวอย่างในคอลัมน์ A และ C และรองรับสารสเตียรอยด์มาตรฐานในคอลัมน์ B และมีพื้นที่วงกลมขนาด 8.5 มิลลิเมตรสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสเตียรอยด์ทั้ง 2 ชนิดในคอลัมน์ A และ C และ สำหรับใช้ในการตรวจสอบประสิทธิภาพในการแยกสารสเตียรอยด์ในคอลัมน์ B ดังรูปที่ 22



รูปที่ 22 แสดงลักษณะของชุดตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ

หลังจากนั้นออกแบบตลับชุดตรวจด้วยโปรแกรม Google SketchUp 2017 และโปรแกรม Cura แล้วใช้เครื่องพิมพ์สามมิติในการสร้างชุดตรวจขึ้นมา โดยตั้งค่าอุณหภูมิที่ใช้ในการหลอมละลายเส้นใยพลาสติกชนิด polylactic acid (PLA) ที่อุณหภูมิเท่ากับ 190 องศาเซลเซียส และความเร็วในการสร้างชุดตรวจเท่ากับ 30 มิลลิเมตรต่อวินาที ซึ่งตลับชุดตรวจที่สร้างขึ้นประกอบด้วยตลับสำหรับบรรจุชุดตรวจเป็นส่วนที่สร้างขึ้นสำหรับรองรับกระดาษ Whatman SG81 เพื่อให้กระดาษสามารถคงตัวอยู่ได้ในขณะที่สัมผัสกับภูมิภาคเคลื่อนที่ในขั้นตอนการแยกสารสเตียรอยด์รวมทั้งใช้ในการยึดขั้วไฟฟ้าให้ตรงกับตำแหน่งวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ และพลาสติกสำหรับตัดกระดาษสร้างขึ้นมาเพื่อใช้ในการแยกกระดาษส่วนที่ใช้ในวิเคราะห์ออกจากพื้นที่อื่น ๆ ดังรูปที่ 23 และ 24



รูปที่ 23 แสดงการออกแบบตลับชุดตรวจ



รูปที่ 24 แสดงลักษณะของตลับชุดตรวจ

3.3.1.4 ศึกษาผลการแยกสารสเตียรอยด์ด้วยชุดตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ

นำชุดตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษที่สร้างขึ้นมาทดสอบประสิทธิภาพในการแยกสารสเตียรอยด์ชนิดเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน โดยหยดสารละลายมาตรฐานชนิดเดกซาเมทาโซนที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/mL}$ เพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/mL}$ และสารละลายมาตรฐานที่มีทั้งสารเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซนที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/mL}$ ในตัวทำละลาย DCM : Methanol อัตราส่วน 9:1 v/v จำนวน 1 μL ลงในตำแหน่งรองรับสิ่งตัวอย่าง จากนั้นนำชุดตรวจไปจุ่มลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตรที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่เหมาะสมอยู่ 3 มิลลิลิตร แล้วทิ้งให้สารละลายเคลื่อนที่ไปจนสุดคอลัมน์ จากนั้นนำกระดาษดังกล่าวออกมาวางไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และพ่นสารละลายที่ประกอบด้วย 0.5% g/mL Tetrazolium blue chloride ในตัวทำละลายเมทานอลและสารละลาย 12% g/mL sodium hydroxide อัตราส่วน 1:1 สังเกตแถบสีม่วงที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของสาร Tetrazolium blue chloride กับสารสเตียรอยด์บนกระดาษ แล้วบันทึกลักษณะของแถบสารสเตียรอยด์ ตำแหน่งของสารสเตียรอยด์แต่ละชนิดที่เคลื่อนที่ไปบนกระดาษ และคำนวณค่า Rf

3.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสารละลาย Britton Robinson buffer สำหรับตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า

3.3.2.1 ทดสอบค่า pH ที่เหมาะสม

เตรียมสารละลาย Britton Robinson buffer (BR buffer) ที่ความแรงของไอออน เท่ากับ 0.05 M ที่ pH แตกต่างกันดังนี้ 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 [78] และเตรียมสารละลายสเตียรอยด์มาตรฐานชนิดเดกซาเมทาโซนที่ความเข้มข้น 10 mg/mL ในสารละลายเมทานอลและเพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 10 mg/mL ในสารละลายเมทานอล จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานดังกล่าวผสมกับสารละลาย BR buffer ที่เตรียมไว้ข้างต้น เพื่อเตรียมสารละลายเดกซาเมทาโซนที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/mL}$ ในสารละลาย BR buffer เพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/mL}$ ในสารละลาย BR buffer และนำสารละลาย BR buffer ที่ไม่มีสารสเตียรอยด์มาใช้เป็น Blank ในการเปรียบเทียบปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้า จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปหยดลงบนขั้วไฟฟ้าชนิด screen printed carbon electrode จำนวน 50 μL แล้ววัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค cyclic voltammetry โดยตั้งค่าโปรแกรมดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงค่า parameter ที่ใช้ในการวิเคราะห์ pH ของ BR buffer ที่เหมาะสม ด้วยเทคนิค cyclic voltammetry

ตัวแปร	ค่า
- Start potential (V)	-0.5
- Upper vertex potential (V)	-0.5
- Lower vertex potential (V)	-1.5
- Stop potential (V)	-1.6
- Scan rate (V/s)	0.01

3.3.2.2 ทดสอบค่าความแรงของไอออน (ionic strength) ที่เหมาะสม

เตรียมสารละลาย Britton Robinson buffer (BR buffer) ที่ความแรงของไอออนแตกต่างกันด้วยเกลือ KCl ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันดังนี้คือ 0.05 M, 0.1 M, 0.5 M และ 1.0 M เป็นต้น [78] และเตรียมสารละลายสเตียรอยด์มาตรฐานชนิดเดกซาเมทาโซนที่ความเข้มข้น 500 µg/mL ในตัวทำละลาย DCM : Methanol อัตราส่วน 9:1 v/v และเพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 500 µg/mL ในตัวทำละลาย DCM : Methanol อัตราส่วน 9:1 v/v จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานดังกล่าวหยดลงบนกระดาษ Whatman SG81 ขนาดยาว 1 เซนติเมตร และกว้าง 8 เซนติเมตร จำนวน 1 µL และนำกระดาษดังกล่าวไปวางบนขั้วไฟฟ้าชนิด หreen printed carbon electrode แล้วหยดสารละลาย BR buffer ที่เตรียมไว้ข้างต้น ลงไปบนกระดาษจำนวน 35 µL จึงวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค DPV โดยตั้งค่าโปรแกรมดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงค่า parameter ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความแรงของไอออนที่เหมาะสม ด้วยเทคนิค Differential Pulse Voltammetry

ตัวแปร	Dexamethasone	Prednisolone
- Start potential (V)	-0.6	-0.6
- Stop potential (V)	-1.4	-1.4
- Scan rate (V/s)	0.01	0.01
- Accumulation potential (mV)	-600	-600
- Accumulation Time (s)	50	50
- Pulse amplitude (mV)	50	50

3.3.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ด้วยเทคนิค Differential Pulse Voltammetry

เตรียมสารละลายสเตียรอยด์มาตรฐานชนิดเดกซาเมทาโซนที่ความเข้มข้น 500 µg/mL ในตัวทำละลาย DCM : Methanol อัตราส่วน 9:1 v/v และเพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 500 µg/mL ในตัวทำละลาย DCM : Methanol อัตราส่วน 9:1 v/v เช่นเดียวกัน จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานดังกล่าวหยดลงบนกระดาษ Whatman SG81 ขนาดยาว 1 เซนติเมตรและกว้าง 8 เซนติเมตร จำนวน 1 µL และนำกระดาษดังกล่าวไปวางบนขั้วไฟฟ้าชนิด screen printed carbon electrode แล้วหยดสารละลาย BR buffer ที่เหมาะสมลงไปในกระดาษจำนวน 35 µL จากนั้นวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค DPV โดยตั้งค่าโปรแกรมดังตารางที่ 10 เพื่อศึกษาหาค่า accumulation potential, accumulation time และ pulse amplitude ที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์

ตารางที่ 10 แสดงการหาค่า parameter ที่เหมาะในการวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ด้วยเทคนิค Differential Pulse Voltammetry

ตัวแปร	การตั้งค่า
- Start potential (V)	-0.6
- Stop potential (V)	-1.3
- Scan rate (V/s)	0.01
- Accumulation potential (mV)	-300, -400, -500, -600, -700, -800 และ -900
- Accumulation Time (s)	0, 25, 50 และ 100
- Pulse amplitude (mV)	50, 100, 150, 200 และ 250

3.3.4 ขั้นตอนการวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ด้วยวิธี ePAD

3.3.4.1 ขั้นตอนการสกัดสารสเตียรอยด์จากผลิตภัณฑ์สมุนไพร

ซึ่งผลิตภัณฑ์สมุนไพรลงในหลอดไมโครเซนติพิวจำนวน 100 µg จากนั้นเติมตัวทำละลาย DCM : Methanol อัตราส่วน 9:1 v/v ลงไปจำนวน 1 mL แล้วนำไปผสมด้วยเครื่อง vortex เป็นระยะเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำหลอดไมโครเซนติพิวดังกล่าวไปจุ่มลงในเครื่อง Sonicator เป็นระยะเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นระยะเวลา 5 นาที จึงแยกสารละลายส่วนบนออกมาเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

3.3.4.2 ขั้นตอนการแยกสารสเตียรอยด์

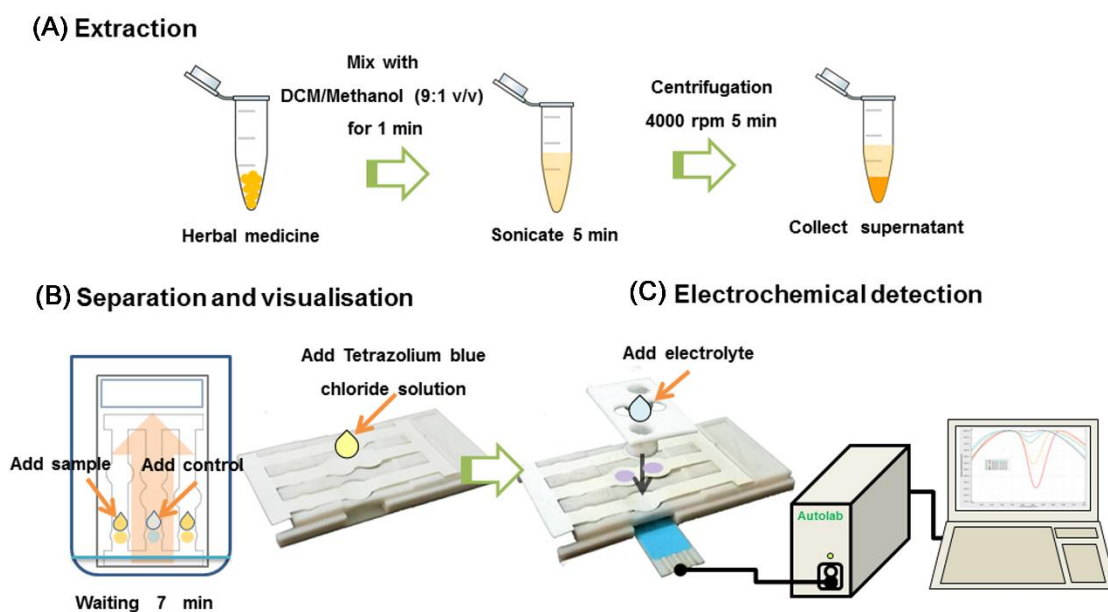
หยดสิ่งตัวอย่างสมุนไพรที่สกัดด้วยวิธีที่ 3.3.4.1 ลงบนชุดตรวจสารสเตียรอยด์ที่ตำแหน่งรองรับสิ่งตัวอย่างจำนวน 1 μL และหยดสารสเตียรอยด์มาตรฐานที่ประกอบด้วยสารเพรดนิโซโลน และเตกซาเมทาโซนที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ในตัวทำละลาย DCM : Methanol อัตราส่วน 9:1 v/v จำนวน 1 μL ลงในตำแหน่งรองรับสารสเตียรอยด์มาตรฐาน (คอลัมน์ C ในรูปที่ 22) จากนั้นนำชุดตรวจดังกล่าวไปจุ่มลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีภูมิภาคเคลื่อนที่เหมาะสมอยู่ 3 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 7 นาที แล้วนำกระดาษดังกล่าวออกมาวางไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นประเมินประสิทธิภาพในการแยกของชุดตรวจโดยการหยดสารละลาย 0.5% g/mL Tetrazolium blue chloride ในตัวทำละลายเมทานอลและสารละลาย 12% g/mL sodium hydroxide อัตราส่วน 1:1 จำนวน 10 μL ลงในช่องควบคุมประสิทธิภาพในการแยก

3.3.4.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์สารสเตียรอยด์

หลังจากนั้นสอดขั้วไฟฟ้าเข้าไปข้างใต้ชุดตรวจในตำแหน่งของสารสเตียรอยด์ที่ต้องการทดสอบ แล้วใช้พลาสติกที่ถูกลอกแบบไว้สำหรับตัดกระดาษกดลงไปเพื่อแยกส่วนวงกลมที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ออกจากบริเวณอื่น ๆ ของกระดาษ เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ และยังช่วยให้กระดาษส่วนดังกล่าวแนบติดกับขั้วไฟฟ้า หลังจากนั้นหยดสารละลาย 1.0 M BR buffer pH 4.0 จำนวน 35 μL ลงไปในตำแหน่งตรวจวิเคราะห์ แล้ววิเคราะห์ปริมาณของสารสเตียรอยด์แต่ละชนิดด้วยเทคนิค DPV โดยตั้งค่าโปรแกรมดังตารางที่ 11 และรูปที่ 25

ตารางที่ 11 แสดงค่า parameter ที่ใช้ในการวิเคราะห์สารสเตียรอยด์
ด้วยเทคนิค Differential Pulse Voltammetry

ตัวแปร	ค่าที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์	
	Dexamethasone	Prednisolone
- Start potential (V)	-0.6	-0.6
- Stop potential (V)	-1.3	-1.3
- Scan rate (V/s)	0.01	0.01
- Accumulation potential (mV)	-500	-700
- Accumulation Time (s)	50	25
- Pulse amplitude (mV)	150	150



รูปที่ 25 (A) แสดงขั้นตอนการสกัดสารสเตียรอยด์จากผลิตภัณฑ์สมุนไพร (B) แสดงขั้นตอนการแยกสารสเตียรอยด์ และ (C) แสดงขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า

3.3.5 การทดสอบหาขีดความสามารถในการตรวจวิเคราะห์

เตรียมสารสเตียรอยด์มาตรฐานเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ ในตัวทำละลาย DCM : Methanol อัตราส่วน 9:1 v/v และสกัดผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ไม่มีการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ด้วยวิธี 3.3.4.1 เพื่อนำมาใช้เป็น Blank ในการทดสอบ จากนั้นนำสารละลายข้างต้นไปวัดค่ากระแสไฟฟ้าด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

นำค่ากระแสไฟฟ้าที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นมาเขียนกราฟแล้ววัดค่าความเป็นเส้นตรงจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, R^2) และหาค่าขีดจำกัดในการวัดเชิงคุณภาพ (limit of qualification) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification) จากสมการ 3σ Blank/S หรือ 10σ Blank/S ตามลำดับ โดยค่า σ คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณที่ได้จากการวัดจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ไม่มีการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ และค่า S คือ ความชันของกราฟมาตรฐาน

3.3.6 ทดสอบสารรบกวนปฏิกิริยา (interference)

เตรียมสารรบกวนที่อาจพบในผลิตภัณฑ์สมุนไพรทั่วไปคือ สารแคมเฟสเตอร์อลและสติกแมสเตอร์อลลงในสารละลายมาตรฐานให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายมาตรฐานเท่ากับ 100 µg/mL และความเข้มข้นของสุดท้ายของสารแคมเฟสเตอร์อลและสติกแมสเตอร์อลที่ความเข้มข้น 200 µg/mL และ 50 µg/mL ตามลำดับ และในการทดสอบครั้งนี้ได้ทดสอบการรบกวนจากสารสเตียรอยด์ชนิดเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนด้วยตัวเอง เนื่องจากตัวอย่างบางชนิดมีการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ทั้ง 2 ชนิด โดยเตรียมสารละลายให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสเตียรอยด์ที่วิเคราะห์มีค่าเท่ากับ 100 µg/mL และความเข้มข้นสุดท้ายของสารสเตียรอยด์ที่เป็นตัวรบกวนลงไปเท่ากับ 50, 100, 500 และ 1000 µg/mL จากนั้นตรวจวัด สารสเตียรอยด์ดังกล่าวตามวิธีในข้อที่ 3.3.4.2 และนำค่าที่ได้มาคำนวณร้อยละการคืนกลับ (% Recovery) ซึ่งค่าดังกล่าวควรอยู่ในช่วง 80-115% ตามมาตรฐานของ AOAC [79]

3.3.7 ทดสอบความถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์ (Accuracy)

ทดสอบความถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์ โดยเติมสารเดกซาเมทาโซนหรือเพรดนิโซโลนลงในตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร ให้ความเข้มข้นขั้นสุดท้ายที่ระดับความเข้มข้นต่ำเท่ากับ 12 µg/mL และ 20 µg/mL ตามลำดับ และที่ระดับกลางและสูงเท่ากับ 100 µg/mL และ 500 µg/mL ของสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิด แล้วนำมาตรวจวัดโดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นจำนวน 6 ครั้ง จากนั้นคำนวณร้อยละการคืนกลับ (% Recovery) ซึ่งค่าดังกล่าวควรอยู่ในช่วง 80-115% ตามมาตรฐานของ AOAC [79]

3.3.8 ทดสอบความเที่ยงในการตรวจวิเคราะห์ (Precision)

ทดสอบความเที่ยงในการตรวจวิเคราะห์ โดยเติมสารเดกซาเมทาโซนหรือเพรดนิโซโลนลงในตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร ให้ความเข้มข้นขั้นสุดท้ายที่ระดับความเข้มข้นต่ำเท่ากับ 12 µg/mL และ 20 µg/mL ตามลำดับ และที่ระดับกลางและสูงเท่ากับ 100 µg/mL และ 500 µg/mL ของสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิด แล้วนำมาตรวจวัดโดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นจำนวน 6 ครั้ง จากนั้นคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ของความผันแปร (coefficient of variation หรือ CV) ซึ่งค่าดังกล่าวควรน้อยกว่าร้อยละ 6, 4 และ 4 สำหรับความเข้มข้น 10 µg/ml, 100 µg/ml และ 500 µg/ml ตามลำดับ ตามมาตรฐานของ AOAC [79]

3.3.9 ทดสอบความสามารถในการตรวจวัดกับสิ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร

ใช้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ จำนวน 7 ตัวอย่างมาเปรียบเทียบความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธี HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่ยอมรับและใช้ในห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐาน โดยในขั้นตอนการตรวจวัดด้วยวิธี HPLC ได้รับความร่วมมือจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนการตรวจวัดด้วยวิธี HPLC

- ขั้นตอนการสกัดสารสเตียรอยด์จากผลิตภัณฑ์สมุนไพร

ชั่งผลิตภัณฑ์สมุนไพรลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจำนวน 100 mg เติมตัวทำละลายเมทานอลลงไปจำนวน 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมด้วยเครื่อง vortex เป็นระยะเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำหลอดไมโครเซนติฟิวดังกล่าวไปจุ่มลงในเครื่อง Sonicator เป็นระยะเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นแยกสารละลายส่วนบนออกมาเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

- ขั้นตอนการวิเคราะห์

ตั้งค่าเครื่องมือ HPLC โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็นคอลัมน์ชนิดคาร์บอน 18 อะตอม (C18) ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน ความยาว 250 มิลลิเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลาย 60% (v/v) Acetonitrile ในน้ำกลั่นชนิด Milli-Q ตั้งค่าอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิในการตรวจวิเคราะห์เท่ากับ 40 °C ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และปริมาตรของสิ่งตัวอย่างเท่ากับ 20 ไมโครลิตร

ในขั้นตอนการทดสอบจะวัดสารละลายมาตรฐานก่อนเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน จากนั้นวัดสิ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร สุดท้ายวัดสิ่งตัวอย่างที่มีการเติมสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดลงไป และวัดสารสเตียรอยด์มาตรฐานอีกครั้ง เพื่อใช้ในการตรวจสอบตำแหน่งของ retention time ของสารสเตียรอยด์ที่ทำกรวิเคราะห์ทั้งก่อนและหลังการทดสอบ จากนั้นนำผลการทดสอบมาวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์และใช้เครื่องมือทางสถิติ Bland-Atman ในการเปรียบเทียบความแตกต่างกับวิธีที่พัฒนาขึ้น

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ผลการศึกษาการแยกสารสเตียรอยด์ด้วยกระดาษ Whatman SG81

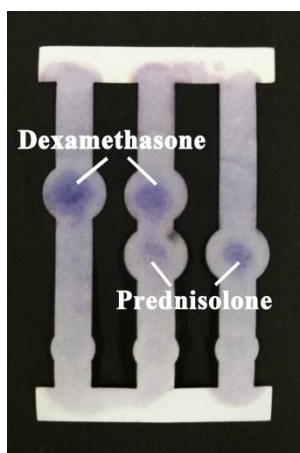
เนื่องจากในผลิตภัณฑ์สมุนไพรมีสิ่งเจือปนต่าง ๆ มากมาย ประกอบกับสารสเตียรอยด์ชนิดเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซนที่วิเคราะห์ในครั้งนี้มีโครงสร้างโมเลกุลที่คล้ายกันและมีสภาพขั้วที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย จึงทำให้คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีมีความใกล้เคียงกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน จากปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าของสารทั้งสองชนิดเกิดที่ความต่างศักย์ -1.07 และ -1.05 ตามลำดับ [37] ซึ่งมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังนั้นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือ ความสามารถในการแยกสารสเตียรอยด์ดังกล่าวออกจากกันให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด

โดยทางคณะผู้วิจัยได้เลือกใช้กระดาษชนิด Whatman SG81 มาใช้ในการแยกสารสเตียรอยด์ชนิดเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซน เนื่องจากกระดาษ Whatman SG81 มีองค์ประกอบของอนุภาคซิลิกายึดจับอยู่กับโครงสร้างของเซลลูโลสภายในเนื้อเยื่อกระดาษ จึงทำให้กระดาษชนิดนี้มีคุณสมบัติในการแยกสารเคมีตามความสามารถในการละลายของสารได้คล้ายคลึงกับหลักการของ TLC และเนื่องจากกระดาษ Whatman SG81 ไม่มี Backing รองรับ จึงทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์กับวิธีต่าง ๆ ได้ง่ายกว่าแผ่น TLC และกระดาษ Whatman SG81 มีราคาที่ถูกกว่า สามารถย่อยสลายได้โดยไม่เกิดปัญหามลพิษแก่สิ่งแวดล้อม

แต่อย่างไรก็ตามกระดาษ Whatman SG81 ยังไม่เคยถูกนำมาใช้ในการศึกษาการแยกสารสเตียรอยด์ชนิดเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซนมาก่อน ทางผู้วิจัยจึงได้ศึกษาหาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมที่สุดในการแยกสารสเตียรอยด์ดังกล่าวตามหลักการของ TLC โดยมุ่งเน้นไปที่การศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมโดยการปรับอัตราส่วนของสาร Ethyl acetate และ Cyclohexane ที่แตกต่างกันดังนี้คือ 50%, 60% และ 70% (v/v) ซึ่งสารทั้งสองชนิดเคยถูกนำมาใช้ในการแยกสารสเตียรอยด์ด้วยวิธี TLC มาก่อน ประกอบกับสารดังกล่าวมีความเป็นพิษต่ำเมื่อเทียบกับสารเคมีอื่น ๆ ที่เคยถูกนำมาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

จากการวิเคราะห์หาวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมโดยการเปรียบเทียบค่า Retardation factor (Rf) และสังเกตลักษณะของแถบสารสเตียรอยด์ที่ถูกแยกออกมา จากการศึกษาพบว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ความเข้มข้น 50% (v/v) Ethyl acetate ใน Cyclohexane นั้นมีค่า Retardation factor (Rf) ของสารเดกซาเมทาโซนอยู่ที่ 0.35 ± 0.01 และของเพรดนิโซโลนอยู่ที่ 0.18 ± 0.01 ซึ่งมีความแตกต่างกันเท่ากับ 0.17 ± 0.01 และจากการสังเกตลักษณะของแถบสารสเตียรอยด์ พบว่าอยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกันจนไม่สามารถแยกสารสเตียรอยด์ดังกล่าวออกจากกันได้ วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ความเข้มข้น 60% (v/v) Ethyl acetate ใน Cyclohexane พบว่าค่า Retardation factor (Rf) ของสารเดกซาเมทาโซนอยู่ที่ 0.55 ± 0.01 และของเพรดนิโซโลนอยู่ที่ 0.37 ± 0.00 ซึ่งมีความแตกต่างกัน 0.18 ± 0.01 และจากการสังเกตลักษณะของแถบสารสเตียรอยด์ พบว่าสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดแยกออกจากกันอย่างชัดเจนและลักษณะของแถบมีขนาดเล็ก วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ความเข้มข้น 70% (v/v) Ethyl acetate ใน Cyclohexane พบว่าค่า Retardation factor (Rf) ของสารเดกซาเมทาโซนอยู่ที่ 0.67 ± 0.01 และของเพรดนิโซโลนอยู่ที่ 0.49 ± 0.01 ซึ่งมีความแตกต่างกัน 0.18 ± 0.01 และจากการสังเกตลักษณะของแถบสารสเตียรอยด์พบว่า แถบสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดแยกออกจากกันอย่างชัดเจน แต่ลักษณะของแถบสารเพรดนิโซโลนมีขนาดใหญ่กว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ความเข้มข้น 60% Ethyl acetate ใน Cyclohexane และมีส่วนที่เรียกว่า Tailing เกิดขึ้น ดังรูปที่ 26 และตารางที่ 12

ดังนั้นวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด 60% (v/v) Ethyl acetate ใน Cyclohexane จึงถูกนำมาใช้ในการแยกสารสเตียรอยด์บนกระดาษ Whatman SG81 และตำแหน่งของสารสเตียรอยด์ชนิดเดกซาเมทาโซนห่างจากตำแหน่งเริ่มต้นเท่ากับ 20 มิลลิเมตร และพบว่าตำแหน่งของแถบสารสเตียรอยด์ชนิดเพรดนิโซโลนห่างจากตำแหน่งจุดเริ่มต้นเท่ากับ 13 มิลลิเมตร จากข้อมูลดังกล่าวจึงถูกนำไปใช้ในการออกแบบชุดตรวจ

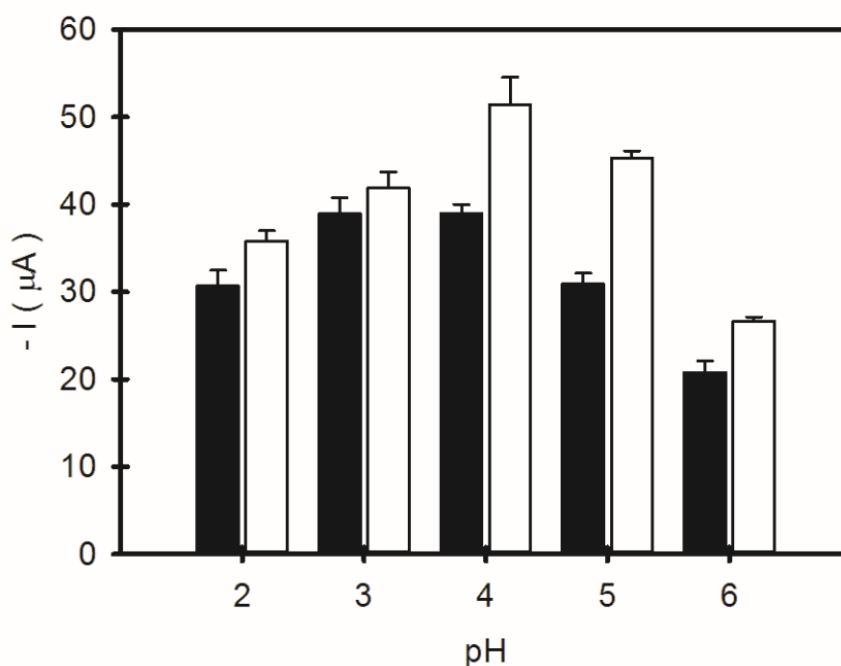


รูปที่ 27 แสดงการแยกสารสเตียรอยด์ด้วยชุดตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ

4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสารละลาย Britton Robinson buffer สำหรับตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า

4.2.1 ผลการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสม

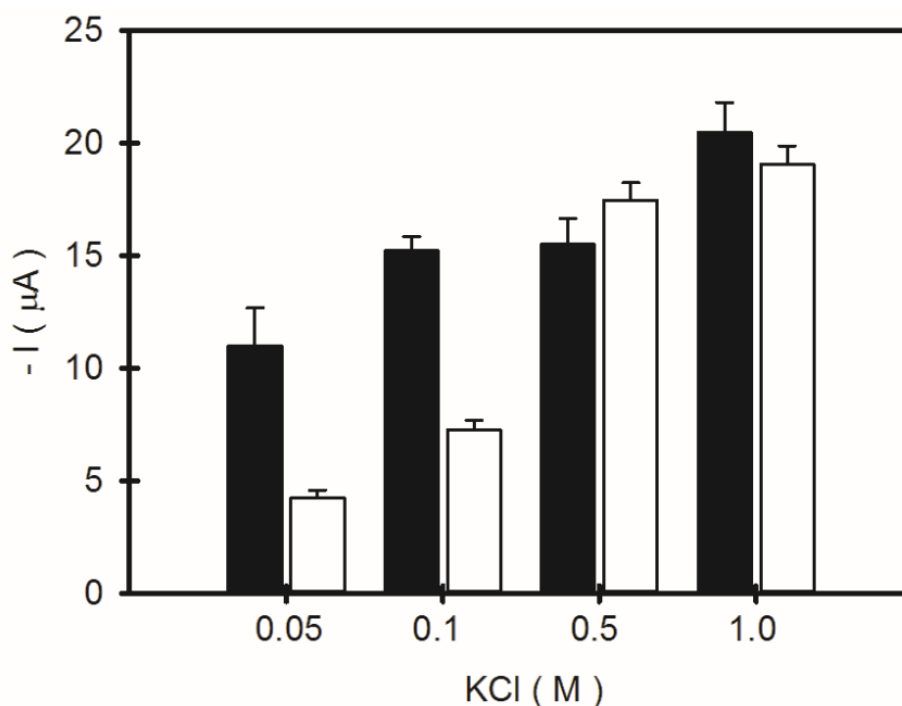
เนื่องจากกระบวนการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าของสารเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนเกิดจากกระบวนการรีดักชันของหมู่คีโตนเป็นหมู่ไฮดรอกซิล [40] โดย pH จะช่วยในการรักษาสภาพของโมเลกุลไม่ให้เกิดเปลี่ยนแปลงก่อนการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ศึกษาค่า pH ของสารละลาย Britton Robinson buffer ซึ่งเป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ โดยตรวจวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นด้วยวิธี cyclic voltammetry (CV) ซึ่งที่สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมจะให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงสุด จากการศึกษาพบว่าในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนที่ pH เท่ากับ 3.0 และ 4.0 ให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงสุดเท่ากับ 3.9×10^{-6} A และในการตรวจวิเคราะห์สารเพรดนิโซโลนที่ pH เท่ากับ 4.0 ให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงสุดเท่ากับ 5.14×10^{-6} A ดังรูปที่ 28 อย่างไรก็ตามทางผู้วิจัยได้เลือกสารละลาย Britton Robinson buffer ที่ pH เท่ากับ 4.0 เนื่องจากที่ค่า pH ดังกล่าวเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดพร้อมกัน ทำให้ไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนบัฟเฟอร์ขณะวิเคราะห์



รูปที่ 28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าและค่า pH ของสารละลาย Britton Robinson buffer โดยแผนภูมิสีดำ (■) แสดงผลการทดสอบของสารเดกซามิทาโซนและแผนภูมิสีขาว (□) แสดงผลการทดสอบของสารเพรดนิโซโลน

4.2.2 ผลการศึกษาความแรงของไอออน (ionic strength) ที่เหมาะสม

ความแรงของไอออนในสารละลายอิเล็กโทรไลต์มีความสำคัญอย่างมากในการลดกระบวนการเคลื่อนที่ของสารสเตรอยด์จากแผ่นกระดาษไปยังขั้วไฟฟ้าแบบไมเกรชัน (migration) แต่ช่วยในการส่งเสริมการเคลื่อนที่แบบการแพร่ (diffusion) แทน ซึ่งจะมีประสิทธิภาพมากกว่าทางผู้วิจัยจึงได้ปรับความแรงของไอออน (ionic strength) ของสารละลาย Britton Robinson buffer ด้วยเกลือ KCl ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันดังนี้คือ 0.05 M, 0.1 M, 0.5 M และ 1.0 M เป็นต้น แล้วตรวจวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นด้วยวิธี DPV ซึ่งที่สภาวะแวดล้อมที่มีความแรงของไอออนเหมาะสมจะให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงที่สุด จากการศึกษาพบว่าในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซามิทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ใช้สารละลาย Britton Robinson buffer เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีความเข้มข้น KCl เท่ากับ 1.0 M ให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 2.05×10^{-5} และ 1.91×10^{-5} A ตามลำดับดังรูปที่ 29

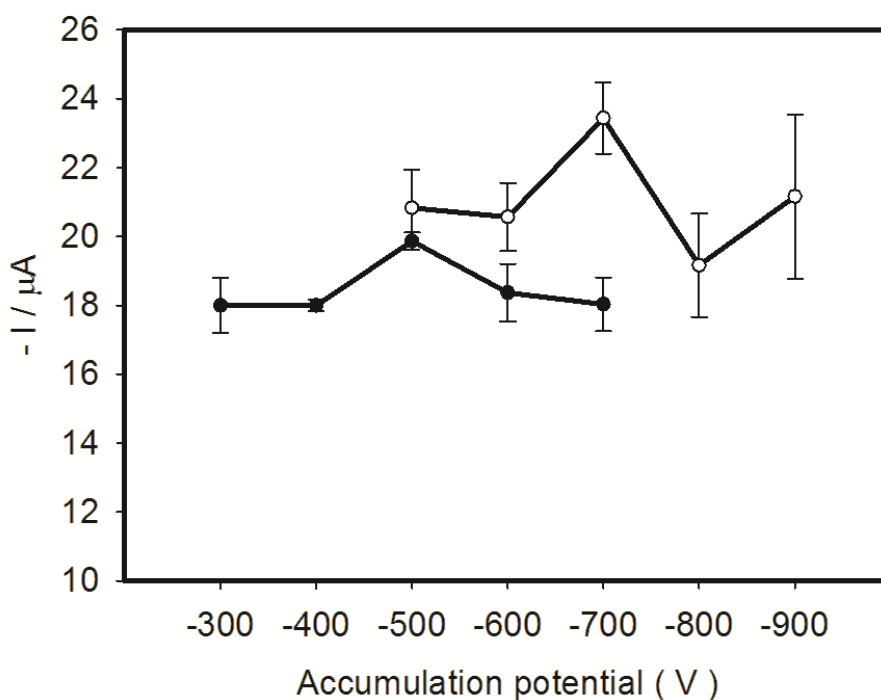


รูปที่ 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าและค่าความเข้มข้นของ KCl ในสารละลาย Britton Robinson buffer โดยแผนภูมิสีดำ (■) แสดงผลการทดสอบของสารเดกซาเมทาโซนและแผนภูมิสีขาว (□) แสดงผลการทดสอบของสารเพรดนิโซโลน

4.3 ผลการศึกษาสถานะที่เหมาะสมของสารละลาย Britton Robinson buffer สำหรับตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า

4.3.1 ผลการศึกษา accumulation potential ที่เหมาะสม

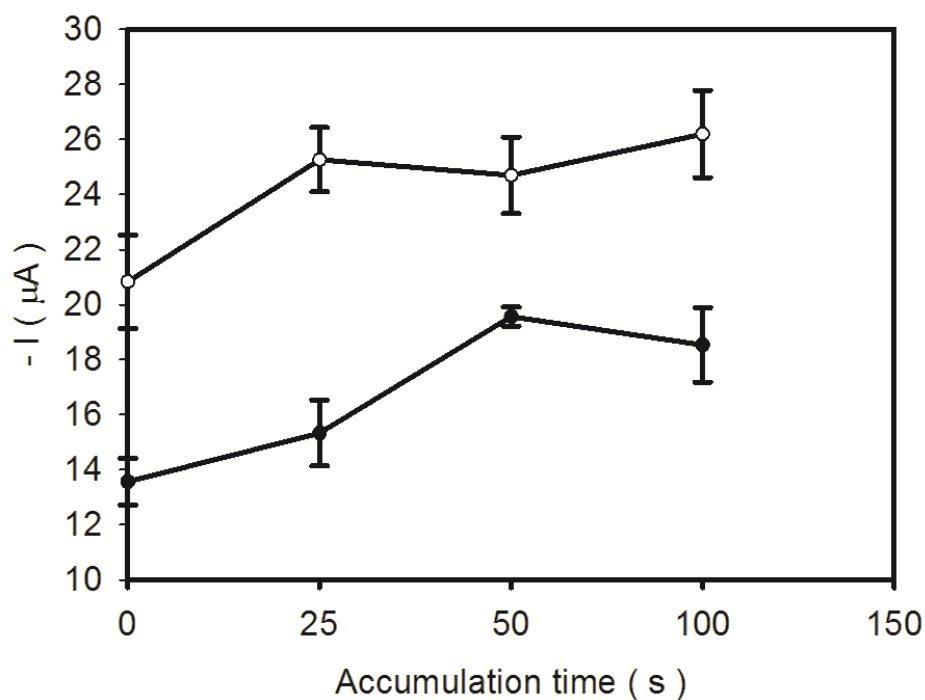
Accumulation potential คือค่าความต่างศักย์ที่ให้แก่อิเล็กโทรด เพื่อให้โมเลกุลของสารที่กระจายตัวอยู่ในเนื้อกระดาศเข้ามารวมตัวกันที่พื้นผิวของอิเล็กโทรดก่อนตรวจวิเคราะห์ ซึ่งในการทดสอบครั้งนี้ได้ตั้งค่า accumulation time ที่แตกต่างกันดังนี้คือ -400, -500, -600, -700, -800 สำหรับสารเดกซาเมทาโซนและ -300, -400, -500, -600 และ -700 สำหรับสารเพรดนิโซโลน แล้วตรวจวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นด้วยวิธี DPV ซึ่งที่สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมจะให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงที่สุด จากการศึกษาพบว่าในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนที่ค่า accumulation potential เท่ากับ -500 mV ให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงที่สุด และสารเพรดนิโซโลนที่ค่า accumulation potential เท่ากับ -700 mV ให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงที่สุด ดังรูปที่ 30



รูปที่ 30 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าและค่า Accumulation potential โดยจุดสีดำ (●) แสดงผลการทดสอบของสารเดกซาเมทาโซนและจุดสีขาว (○) แสดงผลการทดสอบของสารเพรดนิโซโลน

4.3.2 ผลการศึกษา accumulation time ที่เหมาะสม

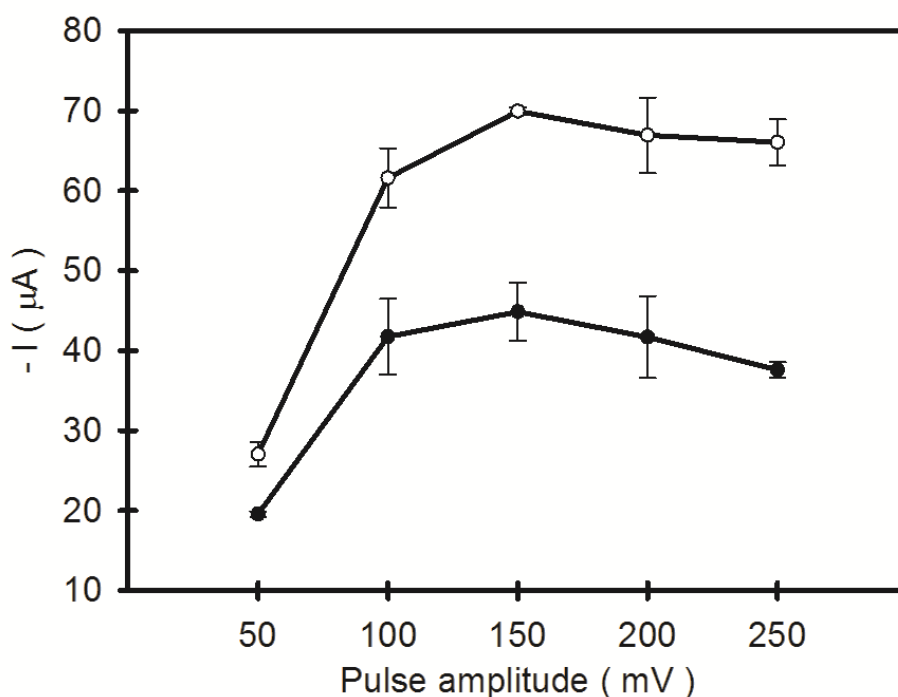
Accumulation time คือระยะเวลาที่ให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ขั้วไฟฟ้าเพื่อให้โมเลกุลของสารที่กระจายตัวอยู่ในเนื้อกระดาษเข้ามารวมตัวกันที่พื้นผิวของขั้วไฟฟ้าก่อนตรวจวิเคราะห์ ซึ่งในการทดสอบครั้งนี้ได้ตั้งค่า accumulation time ที่แตกต่างกันดังนี้คือ 0, 25, 50 และ 100 วินาที สำหรับสารเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน จากการศึกษาพบว่าในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนที่ค่า accumulation time เท่ากับ 50 และ 100 วินาที ค่ากระแสไฟฟ้าที่ตรวจวัดได้ไม่มีความแตกต่างกัน และสารเพรดนิโซโลนที่ค่า accumulation time เท่ากับ 25, 50, และ 100 วินาที ค่ากระแสไฟฟ้าที่ตรวจวัดได้ไม่มีความแตกต่างกัน ดังรูปที่ 31 จึงเลือก accumulation time ที่ใช้ระยะเวลาสั้นที่สุดในการตรวจวิเคราะห์ก็คือ 50 วินาทีสำหรับสารเดกซาเมทาโซนและ 25 วินาทีสำหรับสารเพรดนิโซโลน



รูปที่ 31 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าและ ค่า Accumulation time โดยจุดสีดำ (●) แสดงผลการทดสอบของสารเดกซาเมทาโซนและจุดสีขาว (○) แสดงผลการทดสอบของสารเพรดนิโซโลน

4.3.3 ผลการศึกษา pulse amplitude ที่เหมาะสม

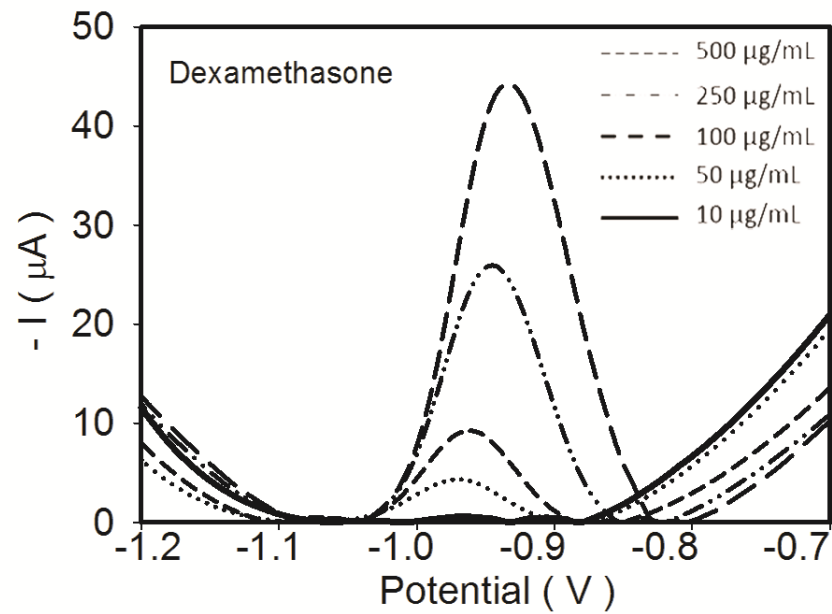
Pulse amplitude คือ ค่าของศักย์ไฟฟ้าที่ส่งไปยังขั้วไฟฟ้าจากนั้นวัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้าของสารสแตเดียรอยด์ทั้งสองชนิด ซึ่งในการทดสอบครั้งนี้ได้ตั้งค่า pulse amplitude ที่แตกต่างกันดังนี้คือ 50, 100, 150, 200 และ 250 mV เป็นต้น แล้วตรวจวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นด้วยวิธี DPV จากการศึกษาพบว่าในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนที่ค่า pulse amplitude เท่ากับ 150 ทั้งเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน จากนั้นค่ากระแสไฟฟ้าจะค่อย ๆ ลดลงเล็กน้อยที่ pulse amplitude เท่ากับ 200 และ 250 mV ดังรูปที่ 32



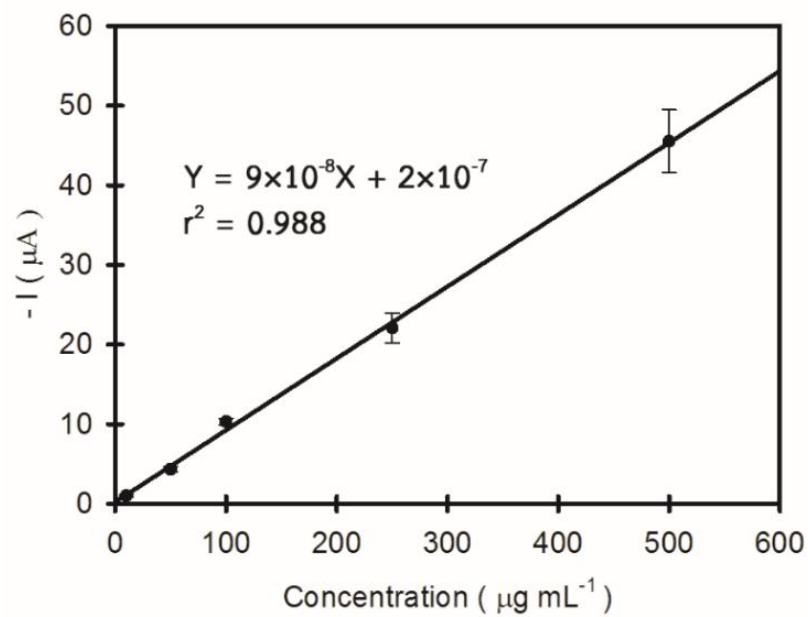
รูปที่ 32 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าและค่า Pulse amplitude โดยจุดสีดำ (●) แสดงผลการทดสอบของสารเดกซาเมทาโซนและจุดสีขาว (○) แสดงผลการทดสอบของสารเพรดนิโซโลน

4.4 ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรงและขีดความสามารถในการตรวจวิเคราะห์

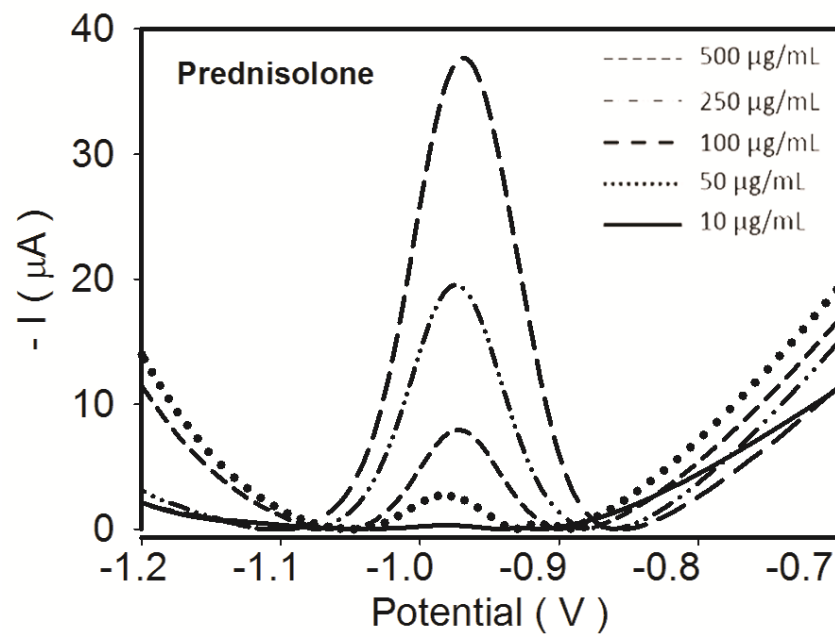
การศึกษาความเป็นเส้นตรง คือการศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของตัวแปรในการทดสอบระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้าของสารสเตียรอยด์และความเข้มข้นของสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิด เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, R^2) และขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ โดยทางผู้วิจัยได้ตรวจวัดสารสเตียรอยด์มาตรฐานเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ในตัวทำละลาย DCM : Methanol อัตราส่วน 9:1 v/v ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น เพื่อนำมาใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานและสมการเชิงเส้น ผลการศึกษาพบว่าสมการเชิงเส้นของสารเดกซาเมทาโซนคือ $Y = 9 \times 10^{-8}X + 2 \times 10^{-7}$ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.988 ดังรูปที่ 33, 34 และสมการเชิงเส้นของสารเพรดนิโซโลนคือ $Y = 8 \times 10^{-8}X - 6 \times 10^{-7}$ และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.994 ดังรูปที่ 35, 36



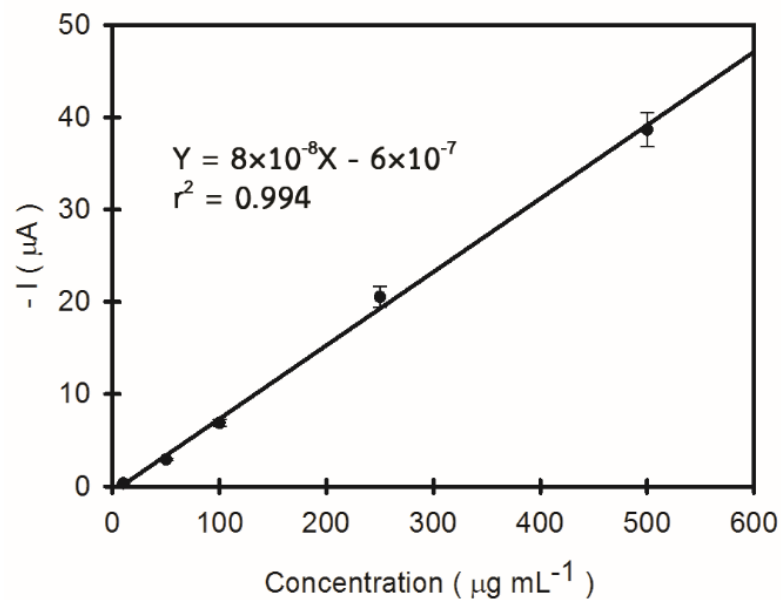
รูปที่ 33 แสดง Differential Pulse Voltammogram ของสารเดกซาเมทาโซนที่
ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยวิธี ePAD



รูปที่ 34 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นของการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนที่ความเข้มข้น
แตกต่างกันด้วยวิธี ePAD



รูปที่ 35 แสดง Differential Pulse Voltammogram ของสารเพรดนิโซโลนที่
ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยวิธี ePAD



รูปที่ 36 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นของการตรวจวิเคราะห์สารเพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้น
แตกต่างกันด้วยวิธี ePAD

หลังจากนั้นคำนวณขีดความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ของสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดจากการคำนวณพบว่าวิธี ePAD มีขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพของสารเดกซาเมทาโซนเท่ากับ 3.59 µg/mL และของสารเพรดนิโซโลนเท่ากับ 6.00 µg/mL ส่วนขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารเดกซาเมทาโซนเท่ากับ 11.98 µg/mL และของสารเพรดนิโซโลนเท่ากับ 20.02 µg/mL

4.5 ผลการทดสอบสารรบกวนปฏิกิริยา (interference)

ในการทดสอบสารรบกวนต่อวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยชิ้นนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือการทดสอบสารรบกวนที่อาจพบในผลิตภัณฑ์สมุนไพรทั่วไปคือ สารแคมเพสเตอร์อลและสติกแมสเตอร์อล ซึ่งเป็นสารสเตียรอยด์ของพืชที่มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับสารสเตียรอยด์ที่วิเคราะห์ และการทดสอบสารรบกวนจากสารสเตียรอยด์ชนิดเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่อาจจะรบกวนการตรวจวิเคราะห์กันเอง เนื่องจากสารสเตียรอยด์ทั้ง 2 ชนิด เกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ใกล้เคียงกันมาก จากนั้นจึงประเมินการรบกวนด้วยร้อยละการคืนกลับ (% Recovery) ซึ่งค่าดังกล่าวควรอยู่ในช่วง 80-115% ตามมาตรฐานของ AOAC

4.5.1 ผลการทดสอบสารรบกวนที่อาจพบในผลิตภัณฑ์สมุนไพรทั่วไป

จากการศึกษาได้ตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่มีการปลอมปนของสารแคมเพสเตอร์อลและสติกแมสเตอร์อลที่ความเข้มข้น 200 µg/mL และ 50 µg/mL เนื่องจากความเข้มข้นดังกล่าวเป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่เคยมีการงานการตรวจพบในพืชและสมุนไพรทั่วไป ผลการศึกษาพบว่าค่า % Recovery ของวิธีที่พัฒนาขึ้นอยู่ในช่วง 80-115% ตามมาตรฐานของ AOAC ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดง % Recovery ของสารสเตียรอยด์ที่มีการปลอมปนสารแคมเพสเตอร์อลและสติกแมสเตอร์อลด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

Plante Steroid	%Recovery	
	Dexamethasone detection	Prednisolone detection
Campesterol 200 µg/mL	106 ± 2	92 ± 14
Stigmasterol 50 µg/mL	92 ± 10	96 ± 8

4.5.2 ผลการทดสอบสารรบกวนจากสารสเตียรอยด์ชนิดเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน

จากการศึกษาได้ตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์เดกซาเมทาโซนที่มีการปลอมปนสารเพรดนิโซโลนลงไปที่มีความเข้มข้น 50, 100, 500 และ 1000 $\mu\text{g/mL}$ พบว่าที่ความเข้มข้นของเพรดนิโซโลนที่ 500 $\mu\text{g/mL}$ ค่า % Recovery ในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนยังคงอยู่ในช่วง 80-115% แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเพรดนิโซโลนจนถึง 1000 $\mu\text{g/mL}$ ค่า % Recovery ไม่อยู่ในช่วง 80-115% และในการตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์เพรดนิโซโลนที่มีการปลอมปนสารเดกซาเมทาโซนลงไปที่มีความเข้มข้น 50, 100, 500 และ 1000 $\mu\text{g/mL}$ พบว่าที่ความเข้มข้นของสารเดกซาเมทาโซนที่ 500 $\mu\text{g/mL}$ ค่า % Recovery ในการตรวจวิเคราะห์สารเพรดนิโซโลนอยู่ในช่วง 80-115% แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเดกซาเมทาโซนจนถึง 1000 $\mu\text{g/mL}$ ค่า % Recovery ไม่อยู่ในช่วง 80-115% ตามมาตรฐานของ AOAC เช่นเดียวกันดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดง % Recovery ของสารสเตียรอยด์ที่มีการปลอมปนสารสเตียรอยด์คนละชนิดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

Dexamethasone detection		Prednisolone detection	
Prednisolone added ($\mu\text{g/mL}$)	%Recovery	Dexamethasone added ($\mu\text{g/mL}$)	%Recovery
0	100 \pm 2	0	100 \pm 4
50	104 \pm 8	50	97 \pm 6
100	99 \pm 7	100	99 \pm 2
500	106 \pm 12	500	104 \pm 10
1000	122 \pm 6	1000	175 \pm 29

4.6 ผลการทดสอบความถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์ (Accuracy)

การทดสอบถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์คือ การประเมินวิธีการตรวจวิเคราะห์ว่ามีความใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากน้อยเพียงใด โดยการคำนวณจากค่า % Recovery ในการทดสอบได้ ตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนที่ความเข้มข้น 12, 100 และ 500 µg/mL ซึ่งเป็นความเข้มข้นระดับต่ำ กลางและสูง ผลการทดสอบพบว่า % Recovery ของสารเดกซาเมทาโซนที่ความเข้มข้น 12, 100 และ 500 µg/mL อยู่ในช่วงตามมาตรฐานของ AOAC ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 แสดงความถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

Dexamethasone (µg/mL)	Measured by ePAD (µg/mL ± SD)	%Recovery	AOAC Guide
0	0.0 ± 0.0	-	-
12	9.9 ± 0.8	83 ± 7	80% - 115%
100	108.4 ± 15.4	108 ± 15	80% - 115%
500	495.3 ± 27.9	99 ± 6	80% - 115%

และการตรวจวิเคราะห์สารเพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 20, 100 และ 500 µg/mL ซึ่งเป็นความเข้มข้นระดับต่ำ กลางและสูงตามลำดับ ผลการทดสอบพบว่า % Recovery ของสารเพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 20 µg/mL ไม่อยู่ในช่วงค่ามาตรฐานของ AOAC แต่ค่า % Recovery ของสารเพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 100 และ 500 µg/mL อยู่ในช่วงตามมาตรฐานของ AOAC ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 แสดงความถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์สารเพรดนิโซโลนด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

Prednisolone ($\mu\text{g/mL}$)	Measured by ePAD ($\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$)	%Recovery	AOAC Guide
0	0.0 \pm 0.0	-	-
20	26.9 \pm 2.2	134 \pm 11	80% - 115%
100	87.5 \pm 6.4	88 \pm 6	80% - 115%
500	487.1 \pm 21.1	97 \pm 4	80% - 115%

4.7 ผลการทดสอบความเที่ยงในการตรวจวิเคราะห์ (Precision)

การทดสอบความเที่ยงในการตรวจวิเคราะห์ (Precision) คือ การประเมินความเที่ยงตรงในการตรวจวิเคราะห์จากการทดสอบซ้ำ ๆ หลายครั้ง โดยการคำนวณจากค่า CVs ในการทดสอบได้ตรวจวิเคราะห์สารเดกซามะทาโซนที่ความเข้มข้น 12, 100 และ 500 $\mu\text{g/mL}$ และสารเพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 20, 100 และ 500 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นระดับต่ำ กลางและสูงตามลำดับ โดยค่ามาตรฐานจาก AOAC กำหนดไว้ว่าที่ความเข้มข้น 10-20 $\mu\text{g/mL}$ ค่า CVs \leq 6 และที่ความเข้มข้น 100 และ 500 μg ค่า CVs \leq 4 ผลการทดสอบพบว่า CVs ของสารเดกซามะทาโซนและเพรดนิโซโลนมีค่ามากกว่ามาตรฐานของ AOAC ดังตารางที่ 17 และ 18 ตามลำดับ

ตารางที่ 17 แสดงความเที่ยงในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซามะทาโซนด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

Dexamethasone ($\mu\text{g/mL}$)	Measured by ePAD ($\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$)	CVs	AOAC Guide
0	0.0 \pm 0.0	-	-
12	9.9 \pm 0.8	10.1%	\leq 6
100	108.4 \pm 15.4	5.7%	\leq 4
500	495.3 \pm 27.9	5.6%	\leq 4

ตารางที่ 18 แสดงความเที่ยงในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

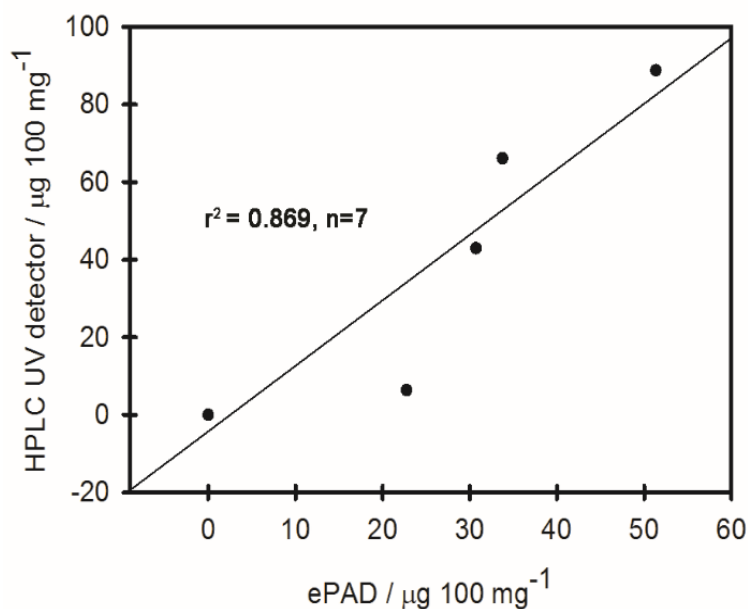
Prednisolone ($\mu\text{g/mL}$)	Measured by ePAD ($\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$)	CVs	AOAC Guide
0	0.0 ± 0.0	-	-
20	26.9 ± 2.2	13.8%	≤ 6
100	87.5 ± 6.4	8.2%	≤ 4
500	487.1 ± 21.1	4.4%	≤ 4

4.8 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจวัดกับสิ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร

จากการนำสิ่งตัวอย่างจำนวน 7 ตัวอย่างมาทดสอบด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นและวิธี HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับและใช้ในห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐาน โดยใช้กราฟแสดงความสัมพันธ์และใช้เครื่องมือทางสถิติ Bland and Altman plot ในการประเมินความสัมพันธ์ของวิธีทั้งสอง ผลการทดสอบการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ของสารเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซนแสดงดังตารางที่ 19 และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Sigma plot มาหาความสัมพันธ์ของทั้ง 2 วิธี พบว่าค่าการตรวจวิเคราะห์สารเพรดนิโซโลนสามารถคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ได้เท่ากับ 0.869 ($n=7$) ดังรูปที่ 37 ส่วนการวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนไม่สามารถนำมาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ได้ เนื่องจากสิ่งตัวอย่างส่วนใหญ่มีการปลอมปนในปริมาณที่น้อยกว่าขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของวิธีที่พัฒนาขึ้น จึงไม่สามารถระบุเป็นเชิงปริมาณได้

ตารางที่ 19 แสดงการเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์สารเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซน
ในสิ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร

Sample	Prednisolone		Dexamethasone	
	No	HPLC	No	HPLC
	pre-concentration ePAD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		pre-concentration ePAD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
1	Not found	Not found	19.02±2.84	13.09
2	30.71±1.54	42.94	Found	17.79
3	22.73±3.40	6.38	Not found	Not found
4	51.33±9.18	88.81	Not found	8.90
5	Not found	Not found	Not found	5.72
6	Not found	Not found	Found	7.56
7	33.76±5.13	66.10	Not found	6.03

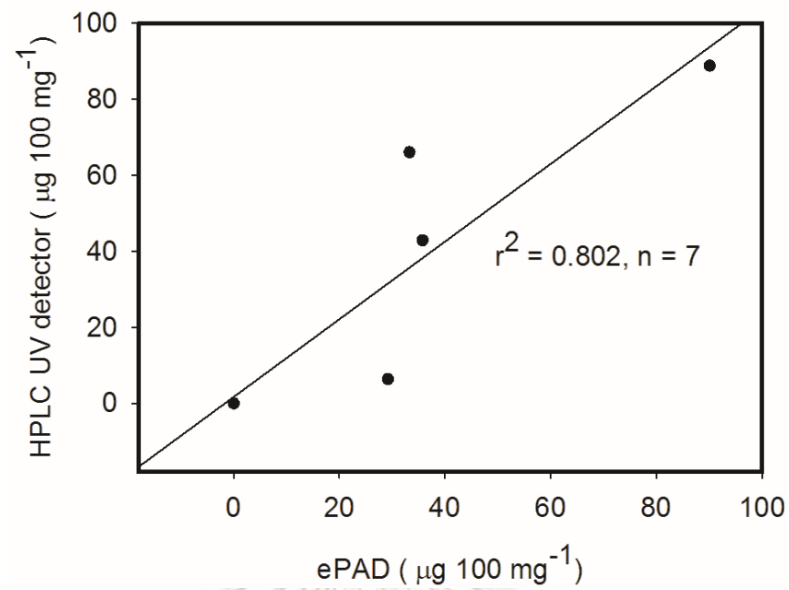


รูปที่ 37 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเพรดนิโซโลนที่ถูวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC
และวิธีที่พัฒนาขึ้นในผลิตภัณฑ์สมุนไพร

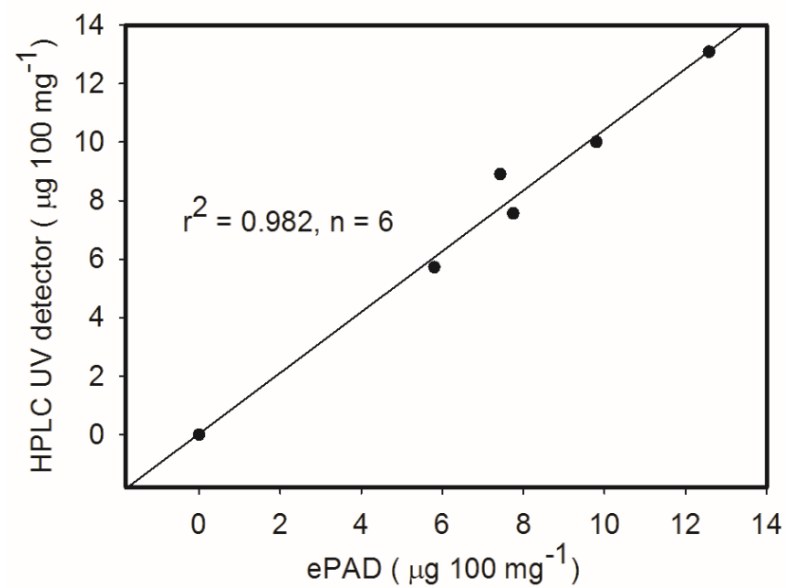
จากผลการทดสอบก่อนหน้านี้นี้พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นยังมีปัญหาในการตรวจวิเคราะห์การปลอมปนของสารเดกซาเมทาโซนในผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีปริมาณต่ำ ๆ ทางผู้วิจัยจึงได้เพิ่มขั้นตอนการเตรียมสิ่งตัวอย่างดังนี้ หลังจากสกัดสารสเตียรอยด์เสร็จเรียบร้อยแล้ว ทำการแบ่งสารสกัดดังกล่าวลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจำนวน 500 μL แล้วนำไประเหยแห้ง นาน 10 นาทีแล้วใส่ตัวทำละลายลงไป 100 μL จะทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น 4 เท่า หลังจากนั้นจึงนำไปทดสอบด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นอีกครั้ง ผลการทดสอบการเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์ของสารเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซนหลังเพิ่มขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 20 และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Sigma plot มาหาความสัมพันธ์ของทั้ง 2 วิธีอีกครั้ง พบว่าค่าการตรวจวิเคราะห์สารเพรดนิโซโลนสามารถคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ได้เท่ากับ 0.802 (n=7) ดังรูปที่ 38 และการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนจะวิเคราะห์เพียงแค่ 6 ตัวอย่าง เนื่องจากพบว่ามียาหนึ่งตัวอย่างถูกรบกวนจากอนุภาคที่เป็นสารแขวนลอยกระจายตัวอยู่ในเนื้อสารละลาย ซึ่งสามารถคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.982 (n=6) ดังรูปที่ 39

ตารางที่ 20 แสดงการเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์สารเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซนในสิ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรหลังจากนำสิ่งตัวอย่างไปเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธีระเหยแห้ง

Sample	Prednisolone		Dexamethasone	
	Pre-concentration ePAD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	HPLC	Pre-concentration ePAD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	HPLC
1	Not found	Not found	12.58 \pm 3.03	13.09
2	35.75 \pm 3.77	42.94	6.82 \pm 2.52	17.79
3	29.17 \pm 4.04	6.38	Not found	Not found
4	90.08 \pm 3.12	88.81	7.43 \pm 0.49	8.90
5	Not found	Not found	5.80 \pm 1.65	5.72
6	Not found	Not found	7.75 \pm 2.13	7.56
7	33.25 \pm 2.94	66.10	9.8 \pm 5.32	6.03

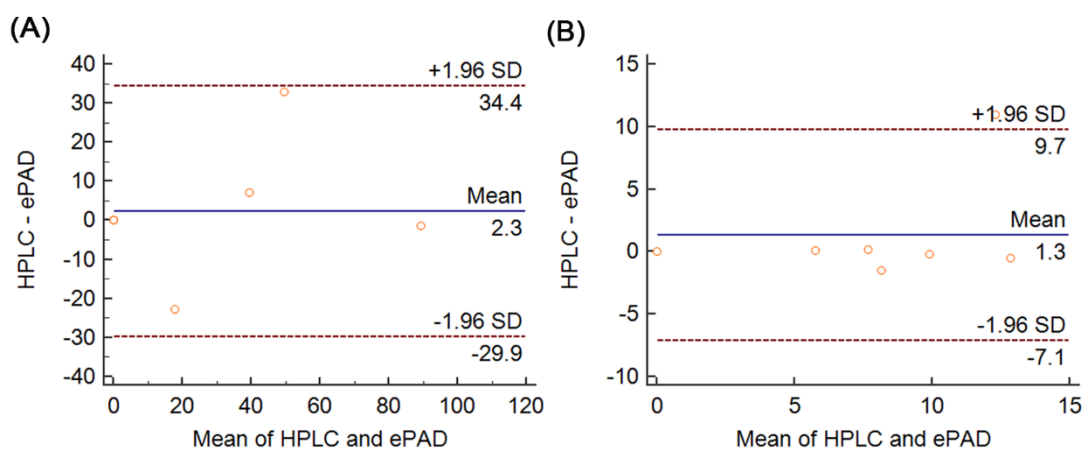


รูปที่ 38 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเพอร์เมทรินโซโลนที่ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และวิธีที่พัฒนาขึ้นในผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ผ่านกระบวนการระเหยแห้ง



รูปที่ 39 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเดลตาเมทาโซนที่ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และวิธีที่พัฒนาขึ้นในผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ผ่านกระบวนการระเหยแห้ง

และเมื่อนำผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดด้วยวิธี HPLC และวิธีที่พัฒนาขึ้นมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือทางสถิติ Bland and Altman test ผลการศึกษาพบว่าในการวิเคราะห์สารเพรดนิโซโลนตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรทั้งหมดอยู่ในช่วง ± 1.96 และการวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนมีตัวอย่างสมุนไพรจำนวน 6 ตัวอย่างอยู่ในช่วง ± 1.96 ของการตรวจวิเคราะห์แสดงดังภาพที่ 40



รูปที่ 40 แสดงผลการเปรียบเทียบการตรวจวัด (A) ปริมาณสารเพรดนิโซโลน และ (B) ปริมาณสารเดกซาเมทาโซน โดยใช้เครื่องมือทางสถิติ Bland and Altman plot

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาอุปกรณ์วิเคราะห์ฐานกระดาษสำหรับตรวจวัดปริมาณการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ชนิดเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซนในผลิตภัณฑ์สมุนไพร โดยอุปกรณ์ดังกล่าวใช้กระดาษโครมาโทกราฟีชนิด Whatman SG81 ในการแยกสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดออกจากกัน เนื่องจากกระดาษชนิดนี้มีองค์ประกอบของอนุภาคซิลิกายึดจับอยู่กับโครงสร้างของเซลลูโลสภายในเนื้อเยื่อกระดาษ จึงทำให้กระดาษชนิดนี้มีคุณสมบัติในการแยกสารเคมีตามความสามารถในการละลายของสารได้คล้ายคลึงกับหลักการของ TLC แต่อย่างไรก็ตามกระดาษ Whatman SG81 ยังไม่เคยมีการรายงานในการใช้แยกสารสเตียรอยด์ทั้งชนิดเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน ทางผู้วิจัยจึงได้ศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการแยกสารสเตียรอยด์ดังกล่าว พบว่าในการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิด 60% Ethyl acetate ใน Cyclohexane สามารถแยกสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดได้ดีที่สุด โดยมีค่า Retardation factor (Rf) เท่ากับ 0.55 ± 0.01 และ 0.37 ± 0.00 สำหรับเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอยู่ 0.18 ± 0.01 และพบว่าลักษณะของแถบสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดถูกแยกออกจากกันอย่างชัดเจนและลักษณะของแถบมีขนาดเล็ก โดยตำแหน่งของสารสเตียรอยด์ชนิดเพรดนิโซโลนอยู่ห่างจากตำแหน่งจุดเริ่มต้น 13 มิลลิเมตร และตำแหน่งของสารสเตียรอยด์ชนิดเดกซาเมทาโซนอยู่ห่างจากตำแหน่งจุดเริ่มต้น 20 มิลลิเมตร จากนั้นข้อมูลดังกล่าวถูกนำไปใช้ในการออกแบบชุดตรวจให้มีลักษณะดังที่แสดงในรูป 28 และวิเคราะห์ความสามารถในการแยกสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดอีกครั้งด้วยชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น พบว่าสารสเตียรอยด์ถูกแยกไปในตำแหน่งสำหรับตรวจวิเคราะห์ตามชนิดของสารสเตียรอยด์ได้ภายใน 7 นาที

การศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ด้วยหลักการทางเคมีไฟฟ้า โดยในเบื้องต้นได้ศึกษาค่า pH และความแรงไอออนของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ชนิด BR buffer พบว่าที่ pH เท่ากับ 4.0 และความเข้มข้นของเกลือ KCl เท่ากับ 1.0 M เป็นค่าที่เหมาะสมมากที่สุด เนื่องจากที่สภาวะดังกล่าวให้สัญญาณกระแสไฟฟ้าสูงที่สุด จากนั้นจึงศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี differential pulse voltammetry โดยได้ศึกษาหาค่า accumulation potential, accumulation time และ pulse amplitude ที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิด พบว่าสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนคือ accumulation potential เท่ากับ -500 mV, accumulation time เท่ากับ 50 วินาที และ pulse amplitude เท่ากับ 150 mV และสำหรับเพรดนิโซโลนคือ accumulation potential เท่ากับ -700

mV, accumulation time เท่ากับ 25 วินาที และ pulse amplitude เท่ากับ 150 mV หลังจากทราบสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์แล้ว จึงได้ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงและขีดความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ พบว่าในการตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดระหว่างความเข้มข้น 10 – 500 $\mu\text{g/mL}$ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.988 สำหรับสารเดกซาเมทาโซนและมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.994 สำหรับสารเพรดนิโซโลน ซึ่งบ่งบอกได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงเชิงเส้นตรงในการตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดในช่วงเข้มข้นดังกล่าว และพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น มีขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพของสารเดกซาเมทาโซนเท่ากับ 3.59 $\mu\text{g/mL}$ และของสารเพรดนิโซโลนเท่ากับ 6.00 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารเดกซาเมทาโซนเท่ากับ 11.98 $\mu\text{g/mL}$ และของสารเพรดนิโซโลนเท่ากับ 20.02 $\mu\text{g/mL}$

ผลการทดสอบสารรบกวนปฏิกิริยาต่อวิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่าในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนที่มีการปลอมปนของสารแคมเฟสเตอร์อลและสติกแมสเตอร์อลที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/mL}$ และ 50 $\mu\text{g/mL}$ คำนวณได้ค่า % Recovery เท่ากับ 106 % และ 92 % ตามลำดับ ซึ่งค่าดังกล่าวอยู่ในช่วง 80-115 % และในการตรวจวิเคราะห์สารเพรดนิโซโลนที่มีการปลอมปนของสารแคมเฟสเตอร์อลและสติกแมสเตอร์อลที่ความเข้มข้นเดียวกัน คำนวณได้ค่า % Recovery เท่ากับ 92 % และ 96 % ตามลำดับ ซึ่งค่าดังกล่าวอยู่ในช่วง 80-115 % จึงสรุปได้ว่าสารแคมเฟสเตอร์อลและสติกแมสเตอร์อลไม่รบกวนการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น และในการทดสอบการรบกวนจากสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดด้วยกันเอง พบว่าที่ความเข้มข้นของเดกซาเมทาโซนเท่ากับ 1000 $\mu\text{g/mL}$ รบกวนการตรวจวิเคราะห์สารเพรดนิโซโลน มีค่า % Recovery เท่ากับ 175 % และความเข้มข้นของสารเพรดนิโซโลนเท่ากับ 1000 $\mu\text{g/mL}$ รบกวนการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนเช่นกัน มีค่า % Recovery เท่ากับ 122 % ซึ่งเกินช่วงที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์ของ AOAC ที่ % Recovery ควรอยู่ในช่วง 80-115 % จึงสรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดในการแยกสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดออกจากกันที่ความเข้มข้นไม่เกิน 1000 $\mu\text{g/mL}$

การทดสอบความถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสเตียรอยด์แต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลางและสูง พบว่าในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนค่า % Recovery ของความเข้มข้นทั้งสามระดับอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามมาตรฐานของ AOAC แต่ในการตรวจวิเคราะห์สารเพรดนิโซโลนค่า % Recovery ที่ความเข้มข้นต่ำเท่านั้น มีค่า % Recovery เกินช่วงที่ยอมรับ ผลการทดสอบความเที่ยงในการตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์แต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลางและสูง พบว่าการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนทั้งสามระดับความเข้มข้นมีค่า CVs

มากกว่ามาตรฐานของ AOAC จึงสรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงต่ำในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิด

การตรวจวิเคราะห์สิ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรจำนวน 7 ตัวอย่างด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นและวิธี HPLC พบว่าในการทดสอบเบื้องต้นวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์สารเพรดนิโซโลนได้ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ได้เท่ากับ 0.869 ($n=7$) แต่สามารถวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนได้เพียงตัวอย่างเดียวจึงไม่สามารถหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ได้ เนื่องจากในสิ่งตัวอย่างส่วนใหญ่มีปริมาณการปลอมปนที่ต่ำกว่าขีดจำกัดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของวิธีที่พัฒนาขึ้น จากนั้นทางผู้วิจัยจึงได้เพิ่มขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง โดยการเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่างสมุนไพรก่อนการตรวจวัดประมาณ 4 เท่าด้วยวิธีการระเหยแห้ง พบว่าสามารถวิเคราะห์สารเพรดนิโซโลนได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ได้เท่ากับ 0.802 ($n=7$) และสามารถวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ได้เท่ากับ 0.982 ($n=6$) เนื่องจากมีหนึ่งตัวอย่างที่ให้ผลการทดลองที่ไม่สอดคล้อง จึงไม่ทราบค่าการตรวจวัดที่แท้จริงได้ จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือทางสถิติ Bland and Altman test พบว่าในการวิเคราะห์สารเพรดนิโซโลนตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรทั้งหมด 7 ตัวอย่างอยู่ในช่วง ± 1.96 และการวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนมีตัวอย่างสมุนไพรจำนวน 6 ตัวอย่างอยู่ในช่วง ± 1.96

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสเตียรอยด์ชนิดเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ปลอมปนในผลิตภัณฑ์สมุนไพร เพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิคตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษและเคมีไฟฟ้ามาประยุกต์ใช้กับงานวิจัยครั้งนี้ เนื่องจากกระดาษเป็นวัสดุที่มีต้นทุนต่ำ น้ำหนักเบา ย่อยสลายได้ง่ายไม่เป็นมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมและสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับเทคนิคตรวจวิเคราะห์อื่น ๆ ได้หลากหลาย โดยวิธีตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าเป็นวิธีที่มีความไว ความจำเพาะสูง และสามารถนำเครื่องมืออุปกรณ์ตรวจวัดดังกล่าว ออกไปตรวจวิเคราะห์ภายนอกห้องปฏิบัติการได้ เนื่องจากตัวเครื่องมือมีขนาดเล็ก พกพาได้ง่าย เครื่องมือจำหน่ายทางการค้าในปัจจุบัน มีตัวเลือกให้สามารถทำงานในระดับภาคสนามได้อย่างมีประสิทธิภาพ

แม้ว่าในปัจจุบันมีงานวิจัยที่รายงาน การตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิด ด้วยหลักการทางเคมีไฟฟ้ามาแล้ว แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาพบว่าการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าของสารสเตียรอยด์เดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน มีความต่างศักย์ที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย จึงทำให้ตรวจแยกชนิดของสารสเตียรอยด์ได้ไม่แม่นยำ โดยเฉพาะในกรณีที่สิ่งตัวอย่างมีการปลอมปนของสารสเตียรอยด์มากกว่าหนึ่งชนิด และจำเป็นต้องทราบระดับของสารที่ปลอมปนแต่ละชนิด

จากปัญหาดังกล่าวจึงนำไปสู่การใช้กระดาษในการแยกสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดออกจากกันก่อน การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า โดยทางผู้วิจัยได้เลือกใช้กระดาษ Whatman SG81 เนื่องจากกระดาษดังกล่าวมีองค์ประกอบของสารซิลิกากระจายตัวอยู่ภายในเนื้อกระดาษคล้ายคลึงกับแผ่น TLC จึงนำไปสู่การตั้งสมมติฐานว่ากระดาษชนิดนี้สามารถใช้ในการแยกสารสเตียรอยด์ได้ใกล้เคียงกับหลักการของวิธี TLC ซึ่งนิยมนำมาใช้ในการแยกสารสเตียรอยด์ และตรวจวิเคราะห์ด้วยแสง UV หรือสังเกตสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างสาร Tetrazolium blue chloride กับสารสเตียรอยด์ แต่อย่างไรก็ตามการตรวจวัดด้วยวิธี TLC แบบตั้ง มีขีดจำกัดในเรื่องความไวของการตรวจวิเคราะห์ที่ต่ำมาก และไม่สามารถตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจคัดกรองเบื้องต้นเท่านั้น ผู้วิจัยจึงใช้ความสามารถของกระดาษในการแยกสารสองชนิดออกจากกัน และใช้เทคนิคที่ความไวสูงกว่าเช่นเคมีไฟฟ้ามาประยุกต์ใช้ตรวจวัดบนกระดาษโดยตรง

ในผลการทดลองเบื้องต้นทางผู้วิจัยได้ศึกษาการแยกสารสเตียรอยด์ดังกล่าวด้วยกระดาษ Whatman SG81 โดยกระดาษชนิดนี้ทำหน้าที่เป็นวัฏภาคคงที่ ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่นั้นใช้สารละลาย Ethyl acetate ใน cyclohexane ที่ความเข้มข้น 60% (v/v) เนื่องจากที่ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถแยกสารสเตียรอยด์สองชนิดได้ดีที่สุด โดยมีค่า Retardation factor (Rf) ต่างกันถึง 0.18 และเมื่อใช้สาร Tetrazolium blue chloride ทำปฏิกิริยา ลักษณะของแถบสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดถูกแยกออกจากกันอย่างชัดเจน และมีขนาดเล็กกว่าการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ความเข้มข้นอื่น ๆ เนื่องจากสารสเตียรอยด์ทั้งเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนเป็นสารที่มีสภาพขั้วต่ำจึงทำให้ละลายได้ดีในสารละลาย Ethyl acetate ที่มีสภาพขั้วใกล้เคียงกัน ดังนั้นเมื่อความเข้มข้นของ Ethyl acetate ต่ำเกินไป การเคลื่อนที่ของสารสเตียรอยด์จะไปได้ไม่ไกลและลักษณะของแถบสารสเตียรอยด์จะอยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกันมากจนไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ดังนั้นที่ความเข้มข้นดังกล่าวจึงไม่เหมาะสมในการใช้แยกสารสเตียรอยด์ แต่เมื่อความเข้มข้นของ Ethyl acetate สูงจนเกินไป ทำให้สารสเตียรอยด์เคลื่อนที่ไปได้ไกล และลักษณะของแถบสารสเตียรอยด์มีลักษณะที่ยาวมี tailing เกิดขึ้น จึงอาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการวิเคราะห์เชิงปริมาณต่อไปได้ เนื่องจากมีโอกาสสูงที่สารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดจะมีที่ไม่แยกออกจากกันอย่างชัดเจน มีการซ้อนทับกันในบริเวณหัวและท้ายของแถบ ข้อดีอีกอย่างหนึ่งของการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยสาร ethyl acetate และ cyclohexane เพราะสารดังกล่าวมีความเป็นพิษต่ำกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดอื่น ๆ อาทิเช่น สาร Chloroform ซึ่งเป็นสารที่มีอันตรายร้ายแรง เป็นต้น [17]

อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ถูกออกแบบให้สอดคล้องกับตำแหน่งของสารสเตียรอยด์ที่แยกด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมจากข้อมูลข้างต้น โดยใช้เทคนิคการตัดด้วยแสงเลเซอร์ ในการตัดกระดาษ Whatman SG81 เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวมีความแม่นยำในการตัดที่สูง และสามารถตัดวัสดุที่มีความเหนียวและหนาได้ดี แต่อย่างไรก็ตามเครื่องตัดเลเซอร์เป็นเครื่องมือที่มี

ราคาแพง สาเหตุที่ทางผู้วิจัยได้เลือกใช้เทคนิคดังกล่าว เนื่องจากเทคนิคอื่น ๆ ที่ใช้ในการสร้างขอบเขตบนแผ่นกระดาษ อาทิเช่น wax-printing, wax dipping และ photolithography นั้น ได้มีรายงานมาก่อนว่าไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ เนื่องจากขอบเขตพื้นที่ hydrophobic ที่สร้างจากวิธี wax printing และ wax dipping นั้นถูกทำลายโดยวัสดุเคลือบที่ ส่วนวิธี photolithography ไม่เหมาะสม เนื่องจากกระดาษที่สร้างขึ้นด้วยวิธีดังกล่าวมีความเหนียวไม่สามารถตัดแยกพื้นที่การตรวจวิเคราะห์ที่ให้ออกจากบริเวณอื่น ๆ ได้ จึงส่งผลให้เมื่อหยดสารละลายอิเล็กโทรไลต์ในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ สารละลายอิเล็กโทรไลต์จะแพร่กระจายออกจากพื้นที่ที่ต้องการตรวจวัดไปยังพื้นที่อื่น ๆ ซึ่งส่งผลให้ค่าสัญญาณกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นมีความไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นเทคนิคการตัดด้วยแสงเลเซอร์จึงเหมาะสมที่สุดในงานวิจัยครั้งนี้ เพราะกระดาษโดนตัดออกโดยตรงไม่มีการสร้างขอบเขตบริเวณขอบน้ำและไม่ชอบน้ำบนผิวกระดาษ

เทคนิคการพิมพ์สามมิติ เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการสร้างโมเดลเสมือนจริงหรือขึ้นรูปชิ้นงานตามการออกแบบ จึงทำให้มีความยืดหยุ่นในการนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างหลากหลาย ยกตัวอย่างเช่นการนำไปใช้ในการสร้างอุปกรณ์อำนวยความสะดวกต่าง ๆ ทางอุตสาหกรรม [80] การสร้างชุดตรวจวิเคราะห์ต่าง ๆ [81] หรือสร้างอวัยวะเทียมของมนุษย์ [82, 83] เป็นต้น โดยในงานวิจัยครั้งนี้ได้นำเอาเทคนิคการพิมพ์สามมิติเข้ามาประยุกต์ใช้ในการสร้างชุดตรวจวิเคราะห์ โดยมีวัตถุประสงค์ต่าง ๆ ดังนี้ ในขั้นตอนการแยกสารสเตียรอยด์ กระดาษจะสัมผัสกับวัสดุเคลือบที่โดยตรง จึงทำให้กระดาษเกิดการอ่อนตัวและเสียสภาพ ซึ่งเป็นอุปสรรคอย่างมากในการทดสอบ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงออกแบบดัดแปลงสำหรับบรรจุชุดตรวจโดยใช้เครื่องพิมพ์สามมิติ เพื่อให้กระดาษสามารถคงตัวอยู่ได้ และในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์จะมีการสอดขั้วไฟฟ้าลงไปข้างใต้ส่วนของกระดาษที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ หรือ detection zone ดังนั้นขั้วไฟฟ้าจะต้องถูกตรึงอยู่บริเวณดังกล่าวตลอดการตรวจวิเคราะห์ ทางผู้วิจัยจึงได้ออกแบบดัดแปลงชุดตรวจให้มีช่องพอดีกับขนาดของขั้วไฟฟ้าที่จะเสียบเข้าไปได้ และให้ตำแหน่งที่สอดขั้วไฟฟ้าตรงกับตำแหน่งของกระดาษที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งส่งผลให้สะดวกต่อผู้ปฏิบัติงานเป็นอย่างมาก และในขั้นตอนการหยดสารละลายอิเล็กโทรไลต์ลงบนกระดาษส่วนที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า แต่เนื่องจากกระดาษเป็นวัสดุที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ จึงทำให้เมื่อหยดสารละลายอิเล็กโทรไลต์ลงไป สารละลายอิเล็กโทรไลต์จะแพร่กระจายออกไปบริเวณรอบข้าง จึงทำให้บริเวณที่ตรวจวิเคราะห์ไม่มีสารละลายอิเล็กโทรไลต์คงเหลืออยู่ จึงไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าได้ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงได้สร้างชิ้นงานด้วยเครื่องพิมพ์สามมิติให้เป็นทรงกระบอกขอบมีความคม สำหรับทำหน้าที่ตัดกระดาษ (cutter) เพื่อแยกส่วนของกระดาษที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ให้ออกจากบริเวณอื่น ๆ ก่อนหยดสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่หยดลงบนไปยังคงอยู่บริเวณดังกล่าว และลักษณะของสัญญาณไฟฟ้ามีความเสถียรมากขึ้น ดังนั้นการนำเอาเทคนิคการพิมพ์สามมิติเข้ามาใช้ในการ

ตรวจวิเคราะห์ในครั้งนี้ ช่วยให้สามารถแยกสารสเตียรอยด์และทำการตรวจวิเคราะห์ได้ภายในชุดตรวจเดียว และเมื่อนำชุดตรวจที่สร้างขึ้นมาทดสอบการแยกสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดด้วยวิธีการเคลื่อนที่ที่เหมาะสมอีกครั้ง พบว่าสามารถแยกสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดไปยังพื้นที่ตรวจวิเคราะห์ได้ภายในระยะเวลา 7 นาที ซึ่งสามารถแยกได้เร็วกว่าการแยกสารบนกระดาษเป็นรูปสีเหลี่ยมผืนผ้าที่ไม่ได้สร้างรูปทรงเป็นท่อ โดยแยกได้เร็วขึ้นประมาณ 30 วินาที และเร็วกว่าวิธี TLC มาตรฐานซึ่งปกติแล้วใช้เวลาประมาณ 10 นาทีในการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจากกระดาษเป็นวัสดุที่มีความชอบน้ำสูงและการเคลื่อนที่ของสารละลายภายในช่องแคบจะมีแรง capillary ที่สูงกว่า จึงทำให้สามารถแยกสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดออกจากกันได้อย่างรวดเร็ว

ในการศึกษาหาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ชนิดเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนด้วยวิธีทางเคมีไฟฟ้า ซึ่งเบื้องต้นทางผู้วิจัยได้ศึกษา pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่เหมาะสม เนื่องจากกระบวนการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าของสารเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนเกิดจากกระบวนการรีดักชัน ของหมู่คีโตน เป็นหมู่ไฮดรอกซิล โดยสารเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนมีค่า pKa เท่ากับ 12.42 และ 12.59 ตามลำดับ ซึ่งบ่งบอกได้ว่าสารดังกล่าวสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโมเลกุลในสภาวะที่ pH สูง ๆ ได้ โดยทางผู้วิจัยจึงได้ทดสอบโดยการเตรียมสารละลายสเตียรอยด์มาตรฐานทั้งสองชนิดใน BR buffer ที่ค่า pH แตกต่างกันดังนี้คือ 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 เป็นต้น จากนั้นหยุดสารละลายดังกล่าวลงบนขั้วไฟฟ้าโดยตรงแล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค cyclic voltammetry เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวเป็นเทคนิคเบื้องต้นที่นิยมใช้ในการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้า พบว่าในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ pH 4.0 เหมาะสมที่สุด เนื่องจากสามารถให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงที่สุดในการตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิด การศึกษาความแรงไอออนที่เหมาะสมในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ โดยทำการหยุดสารละลายสเตียรอยด์มาตรฐานแต่ละชนิดลงบนแผ่นกระดาษ Whatman SG81 แล้วหยุดสารละลายอิเล็กโทรไลต์ชนิด BR buffer ที่ใช้ KCl ในการปรับความแรงของไอออนดังนี้ 0.05 M, 0.10 M, 0.5 M และ 1.0 M เป็นต้น จากนั้นจึงวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DPV เนื่องจากทางผู้วิจัยต้องการจำลองกระบวนการตรวจวิเคราะห์บนแผ่นกระดาษ โดยการปรับค่าความแรงของไอออนจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเคลื่อนที่ของสารสเตียรอยด์จากแผ่นกระดาษสู่ขั้วไฟฟ้า เนื่องจากความแรงของไอออนที่เหมาะสมจะช่วยให้การเคลื่อนที่ของสารสู่ขั้วไฟฟ้าเป็นแบบการแพร่ (diffusion) แทนที่การเคลื่อนที่แบบไมเกรชัน (migration) ซึ่งมีประสิทธิภาพและเหมาะสมกับงานวิจัยนี้มากกว่า จากการศึกษาพบว่าที่ความแรงของไอออนเท่ากับ 1.0 M ให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงที่สุดในการตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิด ซึ่งบ่งบอกได้ว่าความแรงของไอออนดังกล่าวสามารถช่วยส่งเสริมเคลื่อนที่ของสารสู่ขั้วไฟฟ้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ การศึกษาสภาวะของการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DPV ซึ่งประกอบไปด้วย 3 ปัจจัยที่สำคัญคือ accumulation time,

accumulation potential และ pulse amplitude เป็นต้น ซึ่งในการศึกษา accumulation potential เป็นการศึกษาหาค่าความต่างศักย์ที่ให้แก่ขั้วไฟฟ้า เพื่อให้โมเลกุลของสารที่กระจายตัวอยู่ในเนื้อกระดาศเข้ามารวมตัวกันที่พื้นผิวของขั้วไฟฟ้าก่อนการตรวจวิเคราะห์ พบว่าในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนที่ค่าความต่างศักย์เท่ากับ -500 mV และสารเพรดนิโซโลนที่ค่าความต่างศักย์เท่ากับ -700 mV เป็นค่าที่เหมาะสม เนื่องจากค่าดังกล่าวเมื่อวิเคราะห์แล้วให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงที่สุด ซึ่งค่ากระแสไฟฟ้าที่เพิ่มสูงขึ้นบ่งบอกได้ว่าที่ความต่างศักย์ดังกล่าวส่งผลให้โมเลกุลของสารสลายตัวเข้ามารวมตัวกันที่ขั้วไฟฟ้าได้ดี แต่อย่างไรก็ตามค่าความต่างศักย์ที่นำมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้มีค่าใกล้เคียงค่าศักย์ไฟฟ้าที่เกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารสลายตัวทั้งสองชนิด จึงอาจส่งผลให้มีสารสลายตัวบางส่วนเกิดปฏิกิริยาไปก่อนการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งจะส่งผลต่อขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ได้ ดังนั้นควรตั้งค่าช่วงศักย์ไฟฟ้าที่ตรวจวิเคราะห์ให้ต่ำกว่าค่า accumulation potential ที่ศึกษา การศึกษา accumulation time เป็นการศึกษาหาระยะเวลาที่ให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ขั้วไฟฟ้า เพื่อให้โมเลกุลของสารที่กระจายตัวอยู่ในเนื้อกระดาศเข้ามารวมตัวกันที่พื้นผิวของขั้วไฟฟ้าก่อนการตรวจวิเคราะห์ พบว่าในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนที่ค่า accumulation time เท่ากับ 50 และ 100 วินาที ค่ากระแสไฟฟ้าที่ตรวจวัดได้ไม่มีความแตกต่างกัน และสารเพรดนิโซโลนที่ค่า accumulation time เท่ากับ 25, 50, และ 100 วินาที ค่ากระแสไฟฟ้าที่ตรวจวัดได้ไม่มีความแตกต่างกัน จึงเลือก accumulation time ที่ใช้ระยะเวลาสั้นที่สุดในการตรวจวิเคราะห์คือ 50 วินาที สำหรับสารเดกซาเมทาโซนและ 25 วินาที สำหรับสารเพรดนิโซโลน ซึ่งค่า accumulation time ในการศึกษาครั้งนี้มีค่าต่ำกว่าวิธีวิเคราะห์ด้วยเซลล์ไฟฟ้ามาตรฐานประมาณ 3 เท่า และ 6 เท่า สำหรับสารเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนตามลำดับ [37] เนื่องจากในการวิเคราะห์ด้วยเซลล์ไฟฟ้ามาตรฐานสารสลายตัวจะกระจายตัวอยู่ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์จึงทำให้ต้องใช้เวลาในการให้ศักย์ไฟฟ้าเพื่อให้สารสลายตัวเข้ามารวมกันที่ขั้วไฟฟ้าก่อนการตรวจวิเคราะห์ แต่วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ สารสลายตัวแต่ละชนิดจะถูกแยกรวมกันอยู่บนแผ่นกระดาศก่อนการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ดังนั้นสารสลายตัวจะเข้ามาจับที่ขั้วไฟฟ้าได้รวดเร็วกว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วยเซลล์ไฟฟ้ามาตรฐาน และการศึกษา pulse amplitude พบว่าในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ค่า pulse amplitude เท่ากับ 150 mV เป็นค่าที่เหมาะสม เนื่องจากค่าดังกล่าวเมื่อทำการวิเคราะห์แล้วให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงที่สุด และเมื่อเพิ่มค่า pulse amplitude เท่ากับ 200 และ 250 mV ค่ากระแสไฟฟ้าจะค่อย ๆ คงที่และลดลงเล็กน้อย

การทดสอบหาช่วงความเป็นเส้นตรงระหว่างความเข้มข้น 10 ถึง 500 $\mu\text{g/mL}$ พบว่าในการตรวจวิเคราะห์สารสลายตัวชนิดเดกซาเมทาโซน สามารถคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ได้เท่ากับ 0.988 และสารเพรดนิโซโลนคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ได้เท่ากับ 0.994 ซึ่งบ่งบอกได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงเชิงเส้นตรงในการตรวจวิเคราะห์สารสลายตัวทั้งสองชนิดที่

ช่วงความเข้มข้นดังกล่าว และในการทดสอบขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพของสารเดกซาเมทาโซนเท่ากับ 3.59 $\mu\text{g/mL}$ และของสารเพรดนิโซโลนเท่ากับ 6.00 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณเท่ากับ 11.98 $\mu\text{g/mL}$ และของสารเพรดนิโซโลนเท่ากับ 20.02 $\mu\text{g/mL}$ อย่างไรก็ตามการศึกษาข้างต้นเป็นการศึกษาในสารละลายมาตรฐานเท่านั้น ซึ่งในสิ่งตัวอย่างสมุนไพรจริงจะมีสิ่งเจือปนต่าง ๆ มากมายทำให้องค์ประกอบส่วนใหญ่แตกต่างจากสารละลายมาตรฐาน และอาจจะส่งต่อกระบวนการตรวจวิเคราะห์ได้ ดังนั้นจึงควรตรวจวิเคราะห์สารสเตียรอยด์มาตรฐานที่เตรียมในสิ่งตัวอย่างสมุนไพรเพิ่มเติม ซึ่งผลการทดสอบในเบื้องต้นพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณที่สูงกว่าวิธี HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ อย่างไรก็ตามวิธี HPLC ต้องอาศัยกระบวนการที่สลับซับซ้อน อาทิเช่น การสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง ซึ่งใช้เวลาในการสกัดนานประมาณ 1 ชั่วโมงต่อหนึ่งตัวอย่าง และมีขั้นตอนกระบวนการเตรียมวัสดุเคลื่อนที่ โดยการผ่านเครื่องกรองสารเคมีเพื่อเปลี่ยนคุณภาพของวัสดุเคลื่อนที่เป็นชนิดที่เหมาะสมกับเครื่อง HPLC ซึ่งกระบวนการต่าง ๆ เหล่านี้ส่งผลให้เพิ่มต้นทุนและระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ เป็นต้น

ในเบื้องต้นทางผู้วิจัยได้ทดสอบสารรบกวนการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งการทดสอบนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ การทดสอบสารรบกวนที่อาจพบในผลิตภัณฑ์สมุนไพรทั่วไปคือ สารแคมเฟสเทอร์รอลและสติกแมสเทอร์รอล ซึ่งเป็นสารสเตียรอยด์ของพืชที่มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับสารสเตียรอยด์ที่วิเคราะห์ โดยตรวจวิเคราะห์สารละลายสเตียรอยด์มาตรฐานที่มีการปลอมปนของสารแคมเฟสเทอร์รอลและสติกแมสเทอร์รอลที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/mL}$ และ 50 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ เนื่องจากความเข้มข้นดังกล่าวเป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่เคยมีการงานการตรวจพบในพืชและสมุนไพรทั่วไป [84, 85] ผลการศึกษาพบว่าค่า % Recovery ของวิธีที่พัฒนาขึ้นอยู่ในช่วง 80-115 % จึงสรุปได้ว่าสารสเตียรอยด์จากพืชทั้งสองชนิดไม่รบกวนกระบวนการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจากสารทั้งสองชนิดนี้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าได้ และการทดสอบสารรบกวนจากสารสเตียรอยด์ชนิดเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่อาจจะรบกวนการตรวจวิเคราะห์กันเอง เนื่องจากสารสเตียรอยด์ทั้ง 2 ชนิด เกิดปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ใกล้เคียงกันมากคือ -0.93 V และ -0.96 V ตามลำดับ ซึ่งผลการทดสอบพบว่าที่ความเข้มข้นสูงถึง 1000 $\mu\text{g/mL}$ สารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดสามารถรบกวนการตรวจวิเคราะห์ได้ เนื่องจากที่ความเข้มข้นสูงเกินไป การแยกบนกระดาษอาจไม่สมบูรณ์ มีแถบของสเตียรอยด์แต่ละชนิดซ้อนเหลื่อมกันในบริเวณหัวท้ายของแถบได้ โดยพิจารณาจากค่า % Recovery ที่เกินช่วง 80-115 % ดังนั้นกรณีที่สิ่งตัวอย่างมีการปลอมปนสารสเตียรอยด์ในปริมาณมากควรเจือจางสิ่งตัวอย่างที่มีการรบกวนก่อนการตรวจวิเคราะห์อีกครั้ง

การทดสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่าค่า % Recovery ของการตรวจวิเคราะห์สารเพอร์นิกโซโลนที่ความเข้มข้น 20 µg/mL เท่านั้นที่ไม่อยู่ในช่วงค่ามาตรฐานของ AOAC จึงทำให้วิธีที่พัฒนาขึ้นมีข้อจำกัดในการตรวจวิเคราะห์สารเพอร์นิกโซโลนในปริมาณต่ำ ๆ แต่อย่างไรก็ตามปัญหาดังกล่าวสามารถแก้ไขได้ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของสิ่งตัวอย่างที่สกัดเสร็จเรียบร้อยแล้วด้วยกระบวนการระเหยแห้งก่อนทำการทดสอบซ้ำ และในการทดสอบความเที่ยงในการตรวจวิเคราะห์พบว่าสารสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นสูง กลางและต่ำ ไม่อยู่ในช่วงค่ามาตรฐานของ AOAC ซึ่งบ่งบอกได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงในการตรวจวิเคราะห์ที่ต่ำกว่ามาตรฐาน ทางผู้วิจัยคาดว่าสาเหตุอันเนื่องมาจากประการแรกก็คือ ปริมาณสิ่งตัวอย่างที่หยดลงในชุดตรวจแต่ละครั้งมีปริมาตรเพียง 1 µL เท่านั้น จึงทำให้อาจเกิดความคลาดเคลื่อนของปริมาตรที่หยดในแต่ละครั้งประการที่สองคือตัวทำละลายที่ใช้เป็นสารละลาย DCM : Methanol อัตราส่วน 9:1 v/v ซึ่งสารละลายดังกล่าวระเหยได้ง่าย ถ้าวางสิ่งตัวอย่างทิ้งไว้นานในการทดสอบแต่ละครั้งจึงอาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้ของความเข้มข้นได้ ประการที่สามคือการกระจายตัวของซิลิกาบนแผ่นกระดาษ whatman SG81 แต่ละแผ่นมีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพในการแยกสารสเตียรอยด์แต่ละครั้งมีความคลาดเคลื่อนได้ โดยความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยที่กล่าวเอาไว้ข้างต้นล้วนสามารถส่งผลกระทบต่อกระบวนการตรวจวิเคราะห์ได้

ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดการปลอมปนของสารสเตียรอยด์ในผลิตภัณฑ์สมุนไพรจำนวน 7 ตัวอย่าง ระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นและวิธี HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ พบว่าการตรวจวิเคราะห์สารเพอร์นิกโซโลนสามารถคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ได้เท่ากับ 0.869 (n=7) และมี 2 ตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบที่แตกต่างจากวิธีมาตรฐานคือตัวอย่างที่ 3 และตัวอย่างที่ 7 และพบว่าการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนไม่สามารถนำมาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ได้ เนื่องจากสิ่งตัวอย่างส่วนใหญ่มีการปลอมปนในปริมาณที่น้อยกว่าขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของวิธีที่พัฒนาขึ้น จากปัญหาดังกล่าวทางผู้วิจัยจึงได้เพิ่มขึ้นตอนกระบวนการระเหยแห้งในขั้นตอนกระบวนการเตรียมตัวอย่างก่อนการตรวจวิเคราะห์ โดยเพิ่มความเข้มข้นขึ้นมาประมาณ 4 เท่า ซึ่งพบว่าการตรวจวิเคราะห์สารเพอร์นิกโซโลนสามารถคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ได้เท่ากับ 0.802 (n=7) และเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือทางสถิติ Bland and Altman test ผลการศึกษาพบว่าในการวิเคราะห์สารเพอร์นิกโซโลนตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรทั้งหมดอยู่ในช่วง ± 1.96 อย่างไรก็ตามค่าความแตกต่างระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธี HPLC มีค่าสูงมากระหว่าง -29.9 จนถึง 34.4 สาเหตุมาจากตัวอย่างที่ 3 และ 7 ค่าที่วิเคราะห์ได้มีความคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง และในการตรวจวิเคราะห์สารเดกซาเมทาโซนพบว่าการเพิ่มกระบวนการระเหยแห้งช่วยให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ในปริมาณต่ำ ๆ ได้ โดยสามารถคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ได้เท่ากับ 0.982 (n=6) แต่พบว่าตัวอย่างที่ 2 มีการรบกวน

จากสารเคมีชนิดอื่น ประกอบกับสิ่งตัวอย่างดังกล่าวเมื่อทำการสกัดแล้ว พบว่ามีสารแขวนลอยกระจายอยู่ในสารละลายหลังปั่นตกตะกอนแล้วเป็นจำนวนมาก จึงส่งผลให้ปริมาณในการดูดสารละลายแต่ละครั้งเกิดการคลาดเคลื่อน ทำให้ค่าที่วิเคราะห์ได้มีค่าต่ำกว่าวิธี HPLC ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือทางสถิติ Bland and Altman test ที่ตัวอย่างดังกล่าวไม่อยู่ในช่วง ± 1.96

จากการวิจัยในครั้งนี้กล่าวโดยสรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมานั้นสามารถช่วยแก้ปัญหาต่าง ๆ มากมาย อาทิเช่น สามารถลดขั้นตอน ระยะเวลา ในการเตรียมตัวอย่างก่อนการตรวจวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการนำกระดาษ Whatman SG81 เข้ามาประยุกต์ใช้ ซึ่งหลักการส่วนนี้สามารถนำไปใช้กับวิธีการตรวจวิเคราะห์สารเคมีอื่น ๆ ได้อย่างมากมาย อีกทั้งยังช่วยในการแก้ไขปัญหาการรบกวนจากสารสเตียรอยด์ด้วยตัวเอง ซึ่งเป็นปัญหาหนึ่งที่เกิดในการตรวจวิเคราะห์ด้วยเซลล์ไฟฟ้ามาตรฐานที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ แต่อย่างไรก็ตามวิธีที่พัฒนาขึ้นมีข้อจำกัดในการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณที่มีค่าต่ำกว่าวิธี HPLC และวิธีทางเคมีไฟฟ้าอื่น ๆ แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาค้นคว้าพบว่าปริมาณของสารสเตียรอยด์ชนิดเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่สามารถส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้คือ ผู้บริโภคต้องได้รับสารเดกซาเมทาโซนประมาณ 0.75 กรัมต่อวัน หรือ สารเพรดนิโซโลนประมาณ 5 กรัมต่อวัน ซึ่งโดยปกติแล้วผู้บริโภคจะมีการรับประทานผลิตภัณฑ์สมุนไพรในกรณีแบบผงประมาณ 1 ซ้อนโต๊ะต่อวันหรือประมาณ 7 g ดังนั้นสมุนไพรแบบผงควรมีการปลอมปนของสารสเตียรอยด์อย่างน้อย 11 μg ต่อสมุนไพร 100 mg สำหรับเดกซาเมทาโซนและ 71 μg ต่อสมุนไพร 100 mg สำหรับเพรดนิโซโลน ในกรณีแบบเม็ดหรือแคปซูลจะต้องรับประทานวันละ 2 ครั้ง ครั้งละหนึ่งเม็ด โดยน้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ดประมาณ 500 mg หรือคิดเป็น 1 g ต่อวัน ดังนั้นสมุนไพรแบบเม็ดควรมีการปลอมปนของสารสเตียรอยด์อย่างน้อย 75 μg ต่อสมุนไพร 100 mg สำหรับเดกซาเมทาโซนและ 500 μg ต่อสมุนไพร 100 mg สำหรับเพรดนิโซโลน [86] ดังนั้นปัญหาในเรื่องของขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ของวิธีที่พัฒนาขึ้นจึงอาจจะไม่ส่งผลต่อการนำเอาชุดตรวจไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์จริง อย่างไรก็ตามทางผู้วิจัยได้เสนอแนวคิดที่จะพัฒนาขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์เพื่อให้เทียบเท่าวิธี HPLC โดยการเปลี่ยนขั้วไฟฟ้า เป็นชนิดที่มีความไวในการตรวจวิเคราะห์ที่สูงกว่า อาทิเช่น การใช้ขั้วไฟฟ้าทองซึ่งมีความสามารถในการนำไฟฟ้าที่ดีกว่าขั้วไฟฟ้าชนิดคาร์บอนหรือใช้ขั้วไฟฟ้าท่อนาโนคาร์บอนที่คุณสมบัติในการเพิ่มพื้นที่รับส่งอิเล็กตรอน ซึ่งขั้วต่าง ๆ เหล่านี้ทางผู้วิจัยคาดว่าสามารถช่วยเพิ่มสัญญาณกระแสไฟฟ้าจากการตรวจวิเคราะห์ได้ แต่อย่างไรก็ตามขั้วดังกล่าวมีราคาแพงอาจจะส่งผลต่อต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บรรณานุกรม

1. Akerele O. Nature's medicinal bounty: Don't throw it away. World Health Forum 1993. p. 390-395.
2. Huang WF, Wen K-C, Hsiao M-L. Adulteration by Synthetic Therapeutic Substances of Traditional Chinese Medicines in Taiwan. The Journal of Clinical Pharmacology. 1997;37(4):344-350.
3. Ismail Z, Mohamed R, Mohd Hassan MH, Wan Su K. Usage of Traditional Medicines Among Elderly and the Prevalence of Prednisolone Contamination. The Malaysian Journal of Medical Sciences : MJMS. 2005;12(2):50-55.
4. นันทนา กลิ่นสุนทร, ชมพูนุท นุตสถาปนา, ปริชญา มาประดิษฐ์. การสำรวจคุณภาพยาสมุนไพรในเขตสาธารณสุขที่ 4 และ 5. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2557;56(1):40-51.
5. จรียา อัครวรินทร์, ศรัณยพร กิจไชยา. โครงการสำรวจการปนเปื้อนสารสเตียรอยด์ ในยาแผนโบราณใน 9 จังหวัด. วารสารอาหารและยา. 2557;23(3):64-72.
6. พิมพร ทองเมือง, สุภาภรณ์ ดอกพวง, สุธาร์ตน์ คุ้มไธสง, อาทิตยา อาธรรมระชะ. พฤติกรรมการจ่ายยา Prednisolone จากร้านขายยาในเขตพระนคร กรุงเทพมหานคร. การประชุมสวนสุนันทาวิชาการระดับชาติด้าน “การวิจัยเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน” ครั้งที่ 4 2559. p. 536-546.
7. Hench PS, Kendall EC, Slocumb CH, Polley HF. Effects of cortisone acetate and pituitary ACTH on rheumatoid arthritis, rheumatic fever and certain other conditions. Archives of Internal Medicine (Chicago, Ill: 1908). 1950;85(4):545-666.
8. Sathasivam S. Steroids and immunosuppressant drugs in myasthenia gravis. Nature Clinical Practice: Neurology. 2008;4(6):317-327.
9. Lazar CA, Culver DA. Treatment of sarcoidosis. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. 2010;31(4):501-518.
10. Garnett C, Apperley JF, Pavlu J. Treatment and management of graft-versus-host disease: improving response and survival. Therapeutic Advances in Hematology. 2013;4(6):366-378.
11. Daniel E, Newell-Price J. Cushing's syndrome. Medicine. 2017;45(8):475-479.
12. Saag KG, Koehnke R, Caldwell JR, Brasington R, Burmeister LF, Zimmerman B, et al. Low dose long-term corticosteroid therapy in rheumatoid arthritis: an analysis of

serious adverse events. American Journal of Medicine. 1994;96(2):115-123.

13. Huscher D, Thiele K, Gromnica-Ihle E, Hein G, Demary W, Dreher R, et al. Dose-related patterns of glucocorticoid-induced side effects. Annals of the Rheumatic Diseases. 2009;68(7):1119-1124.

14. Davis JM, 3rd, Maradit Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, Ballman KV, Thorneau TM, et al. Glucocorticoids and cardiovascular events in rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. Arthritis and Rheumatism. 2007;56(3):820-830.

15. Hafstrom I, Rohani M, Deneberg S, Wornert M, Jogestrand T, Frostegard J. Effects of low-dose prednisolone on endothelial function, atherosclerosis, and traditional risk factors for atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis--a randomized study. Journal of Rheumatology. 2007;34(9):1810-1816.

16. Charles Patrick Davis. Steroid drug withdrawal 1996-2018 [cited 2018 11 February]. Available from: https://www.medicinenet.com/steroid_withdrawal/article.htm#steroid_withdrawal_facts.

17. ลาวัลย์ ศรีพงษ์, ปนัดดา ไยภักดี, สุรีย์ บุญเจริญ. การตรวจหาเดกซาเมทาโซนในยาลูกกลอนกึ่งปริมาณโดยวิธีรังคเลขผิบบาง. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร2545.

18. จิราหนู แจ่มทวีกุล, สุเมธ เทียงธรรม, วลัยลักษณ์ เมธภัทร, และจิตรา ชัยวัฒน์. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2558;57(2):157-173.

19. Pimporn Thongmuang. Drug Combinations with Steroid Dispensing in Drugstores: A Study in the Center Area of Bangkok, Thailand. World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Sciences. 2013;7(7):392-394.

20. MOSS GP. NOMENCLATURE OF STEROIDS. Pure and Applied Chemistry. 1989;61(10):1783-1822.

21. Ball DW, Hill JW, Scott RJ. The Basics of General, Organic, and Biological Chemistry 2011 [cited 2017 30 December]. Available from: https://catalog.flatworldknowledge.com/bookhub/reader/2547?e=gob-ch17_s04.

22. Caballero B, Finglas PM, Toldra F. Cholesterol: Absorption, Function and Metabolism. Encyclopedia of food and health 2016. p. 47-59.

23. Beato M, Chavez S, Truss M. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids*. 1996;61(4):240-251.
24. Chen KL, Madak-Erdogan Z. Estrogens and female liver health. *Steroids*. 2017.
25. Sato T, Miyagawa S, Iguchi T. Subchapter 94A - Progesterone A2 - Takei, Yoshio. *Handbook of Hormones*. San Diego: Academic Press; 2016. p. 507-508.
26. Podlasek CA, Mulhall J, Davies K, Wingard CJ, Hannan JL, Bivalacqua TJ, et al. Translational Perspective on the Role of Testosterone in Sexual Function and Dysfunction. *The Journal of Sexual Medicine*. 2016;13(8):1183-1198.
27. Vardanyan R, Hruby V. Chapter 27 - Steroid Hormones. *Synthesis of Best-Seller Drugs*. Boston: Academic Press; 2016. p. 459-493.
28. Zennaro MC, Boulkroun S, Fernandes RF. Inherited forms of mineralocorticoid hypertension. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2015;29(4):633-645.
29. Balsevich G, Petrie GN, Hill MN. Endocannabinoids: Effectors of glucocorticoid signaling. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2017;47:86-108.
30. Disclaimer. Cushing syndrome [cited 2018 22 April]. Available from: <https://www.physio-pedia.com/index.php?title=Disclaimer&oldid=186815>.
31. Poole CF, Poole SK. CHAPTER 7 - THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY. *Chromatography Today*. Amsterdam: Elsevier; 1991. p. 649-734.
32. รศ.ดร.นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. ตรวจสอบสเตียรอยด์ปนปลอมในผลิตภัณฑ์สมุนไพร...ไม่ยากอย่างที่คิด 2557 [cited 2560 28 December]. Available from: <http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/228>.
33. Limmatvapirat C, Buranaosot J, Laopoonpat P, Phattanwasin P, Rojanarata T, Chaidedgumjorn A, et al. Determination of dexamethasone and prednisolone adulterated in herbal medicines using thin-layer chromatography 2012. 1353-1358 p.
34. Farid NF, Naguib IA, Moatamed RS, El Ghobashy MR. TLC-Densitometric and RP-HPLC Methods for Simultaneous Determination of Dexamethasone and Chlorpheniramine Maleate in the Presence of Methylparaben and Propylparaben. *Journal of AOAC International*. 2017;100(1):51-58.
35. วลัยลักษณ์ เมธากัทร, มาศวลัย ลิขิตชนเศรษฐ์. ชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟีสำหรับเด็กซ์ซาเมธาโซนและเพรีดนิโซโลนในผลิตภัณฑ์สมุนไพร. *วารสารวิชาการสาธารณสุข*. 2553;19(1):59-70.

36. C. Jeyaseelan, A. Joshi. Trace determination of dexamethasone sodium phosphate in pharmaceutical formulations by differential pulse polarography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2002;373:772-776.
37. K. Balaji, G. V. Raghunadha Reddy, T. Madhusudana Reddy, S. Jayarama Reddy. Determination of prednisolone, dexamethasone and hydrocortisone in pharmaceutical formulations and biological fluid samples by voltammetric techniques using β -cyclodextrin modified carbon paste electrode. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2008;2(8):157-166.
38. Rezaei B, Zare SZM, Ensafi AA. Square wave voltammetric determination of Dexamethasone on a multiwalled carbon nanotube modified pencil electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2011;22:897-904.
39. Goyal RN, Gupta VK, Chatterjee S. Fullerene-C60-modified edge plane pyrolytic graphite electrode for the determination of dexamethasone in pharmaceutical formulations and human biological fluids. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009;24(6):1649-1654.
40. Oliveira TMBF, Ribeiro FWP, do Nascimento JM, Soares JES, Freire VN, Becker H, et al. Direct electrochemical analysis of dexamethasone endocrine disruptor in raw natural waters. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2012;23:110-119.
41. Fatahi A, Malakooti R, Shahlaei M. Electrocatalytic oxidation and determination of dexamethasone at an Fe₃O₄ / PANI-Cull microsphere modified carbon ionic liquid electrode. *RSC Advances*. 2017;7(19):11322-11330.
42. Goyal RN, Oyama M, Bachheti N, Singh SP. Fullerene C₆₀ modified gold electrode and nanogold modified indium tin oxide electrode for prednisolone determination. *Bioelectrochemistry*. 2009;74(2):272-277.
43. Behzad R, S. Z. Mirahmadi Z. Nanoscale Manipulation of Prednisolone as Electroactive Configuration Using Molecularly Imprinted-Multiwalled Carbon Nanotube Paste Electrode. *Electroanalysis*. 2011;23(11):2724-2734.
44. Goyal RN, Bishnoi S. Simultaneous voltammetric determination of prednisone and prednisolone in human body fluids. *Talanta*. 2009;79(3):768-774.
45. Martinez AW, Phillips ST, Butte MJ, Whitesides GM. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angewandte Chemie*

(International ed in English). 2007;46(8):1318-1320.

46. Fenton EM, Mascarenas MR, López GP, Sibbett SS. Multiplex Lateral-Flow Test Strips Fabricated by Two-Dimensional Shaping. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2009;1(1):124-129.

47. Fu E, Liang T, Spicar-Mihalic P, Houghtaling J, Ramachandran S, Yager P. Two-dimensional paper network format that enables simple multistep assays for use in low-resource settings in the context of malaria antigen detection. *Analytical Chemistry*. 2012;84(10):4574-4579.

48. Mu X, Zhang L, Chang S, Cui W, Zheng Z. Multiplex Microfluidic Paper-based Immunoassay for the Diagnosis of Hepatitis C Virus Infection. *Analytical Chemistry*. 2014;86(11):5338-5344.

49. Liu W, Cassano CL, Xu X, Fan ZH. Laminated Paper-Based Analytical Devices (LPAD) with Origami-Enabled Chemiluminescence Immunoassay for Cotinine Detection in Mouse Serum. *Analytical Chemistry*. 2013;85(21):10270-10276.

50. Busa LSA, Maeki M, Ishida A, Tani H, Tokeshi M. Simple and sensitive colorimetric assay system for horseradish peroxidase using microfluidic paper-based devices. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2016;236:433-441.

51. Nie J, Zhang Y, Lin L, Zhou C, Li S, Zhang L, et al. Low-Cost Fabrication of Paper-Based Microfluidic Devices by One-Step Plotting. *Analytical Chemistry*. 2012;84(15):6331-6335.

52. Nurak T, Praphairaksit N, Chailapakul O. Fabrication of paper-based devices by lacquer spraying method for the determination of nickel (II) ion in waste water. *Talanta*. 2013;114:291-296.

53. Dungchai W, Chailapakul O, Henry CS. A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing. *Analyst*. 2011;136(1):77-82.

54. Songjaroen T, Dungchai W, Chailapakul O, Laiwattanapaisal W. Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping. *Talanta*. 2011;85(5):2587-2593.

55. Li X, Tian J, Nguyen T, Shen W. Paper-based microfluidic devices by plasma treatment. *Analytical Chemistry*. 2008;80(23):9131-9134.

56. He Q, Ma C, Hu X, Chen H. Method for Fabrication of Paper-Based Microfluidic Devices by Alkylsilane Self-Assembling and UV/O₃ -Patterning. *Analytical Chemistry*. 2013;85(3):1327-1331.
57. Songok J, Tuominen M, Teisala H, Haapanen J, Mäkelä J, Kuusipalo J, et al. Paper-Based Microfluidics: Fabrication Technique and Dynamics of Capillary-Driven Surface Flow. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2014;6(22):20060-20066.
58. Demirel G, Babur E. Vapor-phase deposition of polymers as a simple and versatile technique to generate paper-based microfluidic platforms for bioassay applications. *Analyst*. 2014;139(10):2326-2331.
59. De Tarso Garcia P, Garcia Cardoso TM, Garcia CD, Carrilho E, Tomazelli Coltro WK. A handheld stamping process to fabricate microfluidic paper-based analytical devices with chemically modified surface for clinical assays. *RSC Advances*. 2014;4(71):37637-37644.
60. Bruzewicz DA, Reches M, Whitesides GM. Low-cost printing of poly(dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper. *Analytical Chemistry*. 2008;80(9):3387-3392.
61. Maejima K, Tomikawa S, Suzuki K, Citterio D. Inkjet printing: an integrated and green chemical approach to microfluidic paper-based analytical devices. *RSC Advances*. 2013;3(24):9258-9263.
62. Abe K, Kotera K, Suzuki K, Citterio D. Inkjet-printed paperfluidic immunochemical sensing device. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010;398(2):885-893.
63. Li X, Tian J, Garnier G, Shen W. Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;76(2):564-570.
64. Carrilho E, Martinez AW, Whitesides GM. Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics. *Analytical Chemistry*. 2009;81(16):7091-7095.
65. Ellerbee AK, Phillips ST, Siegel AC, Mirica KA, Martinez AW, Striehl P, et al. Quantifying Colorimetric Assays in Paper-Based Microfluidic Devices by Measuring the Transmission of Light through Paper. *Analytical Chemistry*. 2009;81(20):8447-8452.
66. Martinez AW, Phillips ST, Carrilho E, Thomas SW, Sindi H, Whitesides GM. Simple Telemedicine for Developing Regions: Camera Phones and Paper-Based Microfluidic

Devices for Real-Time, Off-Site Diagnosis. *Analytical Chemistry*. 2008;80(10):3699-3707.

67. Yu J, Wang S, Ge L, Ge S. A novel chemiluminescence paper microfluidic biosensor based on enzymatic reaction for uric acid determination. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011;26(7):3284-3289.

68. Noiphung J, Songjaroen T, Dungchai W, Henry CS, Chailapakul O, Laiwattanapaisal W. Electrochemical detection of glucose from whole blood using paper-based microfluidic devices. *Analytica Chimica Acta*. 2013;788:39-45.

69. Wang Y, Luo J, Liu J, Li X, Kong Z, Jin H, et al. Electrochemical integrated paper-based immunosensor modified with multi-walled carbon nanotubes nanocomposites for point-of-care testing of 17β -estradiol. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018;107:47-53.

70. Dungchai W, Chailapakul O, Henry CS. Electrochemical Detection for Paper-Based Microfluidics. *Analytical Chemistry*. 2009;81(14):5821-5826.

71. Adkins J, Boehle K, Henry C. Electrochemical paper-based microfluidic devices. *Electrophoresis*. 2015;36(16):1811-1824.

72. Nie Z, Nijhuis CA, Gong J, Chen X, Kumachev A, Martinez AW, et al. Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices. *Lab on a Chip*. 2010;10(4):477-483.

73. Santhiago M, Kubota LT. A new approach for paper-based analytical devices with electrochemical detection based on graphite pencil electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2013;177:224-230.

74. Ciniciato G, Lau C, Cochrane A, Sibbett SS, Gonzalez ER, Atanassov P. Development of paper based electrodes: From air-breathing to paintable enzymatic cathodes. *Electrochimica Acta*. 2012;82:208-213.

75. Siegel AC, Phillips ST, Wiley BJ, Whitesides GM. Thin, lightweight, foldable thermochromic displays on paper. *Lab on a Chip*. 2009;9(19):2775-2781.

76. Carvalhal RF, Kfoury MS, Piazzetta MH, Gobbi AL, Kubota LT. Electrochemical detection in a paper-based separation device. *Analytical Chemistry*. 2010;82(3):1162-1165.

77. Fosdick SE, Anderson MJ, Renault C, DeGregory PR, Loussaert JA, Crooks RM. Wire, mesh, and fiber electrodes for paper-based electroanalytical devices. *Analytical Chemistry*. 2014;86(7):3659-3666.

78. Carlos M, Victor C. A Britton-Robinson buffer of known ionic strength. *Annali di Chimica*. 1974;64:409-412.
79. William H. *AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*: AOAC International, Gaithersburg, MD, USA; 2002.
80. Sathish T, Vijayakumar MD, Krishnan Ayyangar A. Design and Fabrication of Industrial Components Using 3D Printing. *Materials Today: Proceedings*. 2018;5(6, Part 2):14489-14498.
81. Songjaroen T, Primpray V, Manosarn T, Khumchanta W, Sakuldamrongpanich T, Kulkeratiyut S, et al. A simple and low-cost portable paper-based ABO blood typing device for point-of-care testing. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2018;39(3):292-307.
82. Galliger Z, Vogt CD, Panoskaltsis-Mortari A. 3D bioprinting for lungs and hollow organs. *Translational Research*. 2019.
83. Hann SY, Cui H, Esworthy T, Miao S, Zhou X, Lee S-j, et al. Recent advances in 3D printing: vascular network for tissue and organ regeneration. *Translational Research*. 2019.
84. Vieno P, Jari T, Riitta PP, Anna ML. Plant sterols in vegetables, fruits and berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2003;88:330-337.
85. Mo S, Dong L, Hurst WJ, van Breemen RB. Quantitative analysis of phytosterols in edible oils using APCI liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Lipids*. 2013;48(9):949-956.
86. American Society of Health System Pharmacists. *Corticosteroids General Statement*. AHFS Drug Information®1999. 2636-2645 p.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	วิศรุต พริ้มพราย
วัน เดือน ปี เกิด	28 พฤษภาคม 2537
สถานที่เกิด	เพชรบุรี
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 14/1 หมู่ 1 ตำบล หนองชุมพล อำเภอ เขาย้อย จังหวัดเพชรบุรี
ผลงานตีพิมพ์	1. Temsiri Songjaroen, Vitsarut Primpray, Thawintra Manosarn, Witsanuwat Khumchanta, Tasanee Sakuldamrongpanich, Suntree Kulkeratiyut, et al. "A simple and low-cost portable paper-based ABO blood typing device for point-of-care testing," <i>Journal of Immunoassay and Immunochemistry</i> 2018;39(3):292-307. 2. Vitsarut Primpray, Orawon Chailapakul, Manabu Tokeshi, Theerasak Rojanarata, Wanida Laiwattanapaisal. "A paper-based analytical device coupled with electrochemical detection for the determination of dexamethasone and prednisolone in adulterated traditional medicines," <i>Analytica Chimica Acta</i> 2019.