

การเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคแคชเชอร์สำหรับการหาปริมาณสเตียรอยด์ที่ปลอมปนในยาลูกกลอนสมุนไพร โดย โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

QuEChERS Sample Preparation for Determination of Steroids Adulterated in Herbal Pills by High Performance Liquid Chromatography

นันทนา กลิ่นสุนทร ตวงพร เข็มทอง ปริชญา มาประดิษฐ์
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม

บทคัดย่อ

การปลอมปนสเตียรอยด์ในยาสมุนไพรเพื่อหวังผลในการรักษายังคงเป็นปัญหาสำคัญที่ผู้บริโภคอาจได้รับอันตรายจากผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นได้ ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์สเตียรอยด์จึงมีความจำเป็น และจะต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคแคชเชอร์ (QuEChERS) สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสเตียรอยด์ 2 ชนิด ได้แก่ เพรดนิโซโลน และเดกซาเมทาโซนที่ปลอมปนในยาสมุนไพรชนิดลูกกลอน ด้วยโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวอร์สเฟส (RP–HPLC) โดยเริ่มจากการสกัดตัวอย่างจำนวน 0.5 กรัม ด้วยอะซีโตไนไตรล์ 3 มิลลิลิตร แล้วเติมแอนไฮดรัสแมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม ร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ 0.125 กรัม จากนั้นทำให้สารบริสุทธิ์โดยใช้ primary secondary amine (PSA) เป็นตัวดูดซับร่วมกับแอนไฮดรัสแมกนีเซียมซัลเฟต วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (LOD) เท่ากับ 0.36 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซนตามลำดับ จากการเติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างยาลูกกลอนสมุนไพร ได้ค่าร้อยละการคืนกลับที่ยอมรับได้ในช่วง 82–97% ด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 5% วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ใช้สารเคมีและตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณน้อย มีความเหมาะสม ในการนำไปตรวจวิเคราะห์การปลอมปนเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซนในตัวอย่างยาสมุนไพร เพื่อประโยชน์ในการคุ้มครองผู้บริโภค

คำสำคัญ: สเตียรอยด์ ปลอมปน ยาลูกกลอนสมุนไพร แคชเชอร์ เอชพีแอลซี

FDA 1-2557 - by fon.indd 59 23/5/2557 16:10:15

Abstract

Adulterations with synthetic steroids are common problems of herbal medicines and this can potentially cause serious adverse effects to consumers. It is important to determine the presence of synthetic steroids and effective analytical method is therefore critically important. The objective of this study was to develop the QuEChERS sample preparation for high performance liquid chromatography (HPLC) determination of two steroids, prednisolone and dexamethasone, adulterated in herbal pills. In QuEChERS procedures, a 0.5 g of sample was extracted with acetonitrile (3.0 ml) and then anhydrous magnesium sulfate (0.5 g) and sodium chloride (0.125 g). Then simple cleanup was performed by dispersive–solid phase extraction using PSA sorbents as well as magnesium sulfate for the removal of residual water. Using HPLC separation, the QuEChERS extraction gave the limits of detection of 0.36 and 0.6 mg/kg, respectively. Blank sample of herbal pills were spiked with prednisolone and dexamethasone at two levels of 10 and 50 mg/kg, acceptable recoveries of 82–97% were obtained with relative standard deviation less than 5%. The technique was simple, convenient, rapid, and consumed less chemical and organic solvent. It was suitable to analyse prednisolone and dexamethasone adulterated in herbal medicines for the benefit of consumer protection.

Keywords: steroids, adulterated, herbal pills, QuEChERS, HPLC

บทนำ

ยาสมุนไพรมีบทบาทสำคัญในการรักษาโรค และมีแนวโน้มการใช้ยาในกลุ่มนี้เพิ่มขึ้นในปัจจุบัน เนื่องจากผู้บริโภคเชื่อว่าไม่เป็นอันตราย รักษาแล้วได้ผลดี[1] แต่ปัญหาที่พบ คือ มีการนำตัวยาแผนปัจจุบัน เช่น ยากลุ่มสเตียรอยด์ (steroids) ผสมลงไปในยาสมุนไพร เพื่อให้เกิดผลในการรักษาที่รวดเร็ว ดึงดูดใจผู้บริโภค แต่การได้รับสเตียรอยด์ที่ปราศจากการควบคุมปริมาณเป็นเวลานาน และไม่มีข้อบ่งชี้ทางการแพทย์ อาจเกิดผลข้างเคียงได้[2,3] เช่น การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพที่เรียกว่า Cushing's Syndrome โดยมีอาการบวมตามร่างกาย ความดันโลหิตสูง ระดับโปแตสเซียมในเลือดต่ำ กล้ามเนื้ออ่อนแรง ผิวหนังบาง เกิดภาวะแคลเซียมในเลือดต่ำ ภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) กดการทำงานของต่อมหมวกไต ทำให้ต่อมหมวกไตฝ่อ เกิดแผลในกระเพาะอาหาร ทำให้กระเพาะอาหารทะลุได้ ฯลฯ จึงมีกฎหมายกำหนดให้สเตียรอยด์เป็นยาควบคุมพิเศษตามพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 ต้องสั่งจ่ายโดยแพทย์เท่านั้น และห้ามนำมาผสมในการผลิตยาแผนโบราณ[4,5] ดังนั้น การวิเคราะห์หาปริมาณสเตียรอยด์ ในยาสมุนไพรจึงมีความจำเป็น เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นให้ผู้บริโภคระวังการใช้ยาสมุนไพรซึ่งอาจมีการปลอมปนสเตียรอยด์ โดยภาครัฐนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ในการประเมินความเสี่ยงหรืออาการข้างเคียงจากการได้รับยาสเตียรอยด์ ซึ่งจะต้องมีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากสมุนไพร มีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด และมีสารรบกวนการตรวจวิเคราะห์อยู่เป็นจำนวนมาก ทำให้

FDA 1-2557 - by fon.indd 60 23/5/2557 16:10:15

ผลการตรวจวัดที่ได้ผิดพลาด จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีรายงานเกี่ยวกับการวิเคราะห์สารกลุ่มสเตียรอยด์ในตัวอย่างประเภทต่างๆ เช่น ยาจีนแผนโบราณ อาหารสัตว์ เครื่องสำอาง และปัสสาวะ ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้เครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิดอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล และแมสสเปกโทรมิเตอร์[6, 7, 8, 9, 10] ซึ่งเทคนิคการเตรียมตัวอย่างส่วนใหญ่ใช้วิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction: SPE) สำหรับตัวอย่างยาแผนโบราณได้มีรายงานเกี่ยวกับการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์หาปริมาณสเตียรอยด์โดยการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มโดยใช้คลื่นความถี่สูง (sonication) ตามด้วยการสกัดด้วย SPE แบบ cartridge[6] ซึ่งข้อด้อยของวิธีดังกล่าว คือ ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณมากและหลายชนิด การทำ SPE มีหลายขั้นตอน และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย อีกทั้งเกิดอิมัลชันในขั้นตอนการสกัดของตัวอย่างบางชนิด และที่สำคัญ การใช้ตัวทำละลาย เช่น คลอโรฟอร์ม อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้วิเคราะห์ และมีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมได้

เมื่อเร็วๆ นี้ การเตรียมตัวอย่างแบบ QuEChERS ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวางในการวิเคราะห์สารปราบศัตรูพืชตกค้างในตัวอย่างผักและผลไม้[11, 12] การเตรียมตัวอย่างโดยพื้นฐานประกอบด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เข้ากับน้ำได้ จากนั้นเติมเกลือจำนวนมากลงไปเพื่อดูดน้ำและทำให้เกิด salting–out effect ตามด้วยการกำจัดเมทริกซ์ในส่วนสกัดโดยใช้ dispersive SPE นับว่าเป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่ง่าย รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ และปลอดภัย เนื่องจากใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณน้อย ซึ่งจะเห็นได้ว่าข้อดีของ QuEChERS เทียบกับวิธีการเดิม คือ ขั้นตอนการสกัดง่ายและเร็ว และหลักการต่างจาก SPE คือ SPE ใช้หลักการรวมเฟสของแข็งโดยสารที่ต้องการจะถูกดูดซับไว้ใน Solid–phase cartridge จากนั้นชะสารที่ต้องการออกด้วยสารละลายที่เหมาะสม[13, 14] ส่วน dispersive SPE ใช้หลักการกระจายเฟสของแข็งซึ่งสามารถกำจัดสารรบกวนได้โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านการปรับสภาพ (conditioning) ของ SPE[11, 12] เทคนิค QuEChERS ได้รับการยอมรับอย่างเป็นทางการจาก Association of Official Analytical Chemists หรือ AOAC International เมื่อปี 2007[15] ให้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์สารปราบศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้ ต่อมาได้มีการศึกษาเพื่อขยายผลของเทคนิคนี้ออกไปอย่างกว้างขวางเพื่อให้ครอบคลุมกลุ่มของสารและเมทริกซ์ที่หลากหลายมากขึ้น เมื่อเร็วๆ นี้ ได้มีการนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์หาปริมาณสเตียรอยด์ในตัวอย่างยาน้ำสมุนไพร[16] ซึ่งพบว่ายังไม่ครอบคลุมทุกเมทริกซ์ของยาสมุนไพร เนื่องจากยาสมุนไพรยังมีรูปแบบอื่นๆ เช่น ลูกกลอน ดังนั้น เพื่อให้การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างยาสมุนไพรครอบคลุมมากขึ้น งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาต่อยอดโดยนำมาประยุกต์ใช้ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อหาปริมาณสเตียรอยด์ชนิดเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซน ที่ปลอมปนในยาสมุนไพรชนิดลูกกลอน

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคแคชเชอร์ (QuEChERS) สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสเตียรอยด์ 2 ชนิด ได้แก่ เพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซน ที่ปลอมปนในยาสมุนไพรชนิดลูกกลอนด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

วิธีการทดลอง

1. สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐานเพรดนิโซโลน DMSc Reference Standard: purity 99.65% และสารมาตรฐานเดกซาเมทาโซน DMSc Reference Standard: purity 99.5%, อะซีโตไนไตรล์ (Merck; Germany), โซเดียมคลอไรด์ (Merck; Germany), แอนไฮดรัสแมกนีเซียมซัลเฟต (Merck; Germany), primary secondary amine (PSA) (Varian; USA), ผลิตภัณฑ์ยาลูกกลอนที่ทราบแน่นอนว่าไม่มีสเตียรอยด์ผสมอยู่เป็นตัวควบคุม (blank sample) ซึ่งได้จากกลุ่มผู้ผลิตยาสมุนไพรชุมชนปฐมอโศก จังหวัดนครปฐม

FDA 1-2557 - by fon.indd 61 23/5/2557 16:10:16

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) รุ่น 1200 Series ผลิตภัณฑ์ของ Agilent Technologies; USA ซึ่งประกอบด้วย degasser, quaternary pump, autosampler, column และ detector ชนิด photodiode array

2.2 เครื่องชั่งละเอียด 5 ตำแหน่ง รุ่น BP 210 D ของ Sartorius AG

2.3 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น LA 230 S ของ Sartorius AG

2.4 คอลัมน์ C18 Hypersil BDS (ขนาด 4.6 x 300 มิลลิเมตร x 0.45 ไมโครเมตร) ผลิตภัณฑ์ของ Thermo Scientific

2.5 เครื่อง vortex mixer รุ่น KMSI, IKA–works อุตสาหกรรมจำกัด

2.6 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (centrifuge; low speed), Hettich

2.7 หัวกรองชนิดไนลอน ขนาด 13 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 0.45 ไมโครเมตร บริษัท Vertical Chromatography จำกัด

2.8 หลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 15 มิลลิลิตร ของ บริษัท Hycon จำกัด

2.9 เข็มฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร ของบริษัท Nipro (ประเทศไทย) จำกัด

2.10 vial HPLC สีชาขนาด 2 มิลลิลิตร พร้อมฝาเกลียวชนิด PTFE ของบริษัท Agilent Technologies; USA



3. สภาวะของเครื่อง HPLC

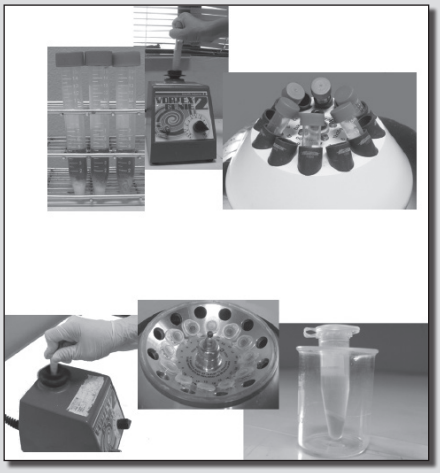
เครื่องตรวจวัดชนิด photodiode array detector (Agilent Technologies; USA) ที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร อุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 35 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย อะซีโตไนไตรล์และน้ำ อัตราส่วน 40:60 อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีด 10 ไมโครลิตร

4. วิธีเตรียมสารมาตรฐาน

เตรียมสารมาตรฐานเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซน ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานแต่ละชนิด จำนวน 25 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอล ปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตร ด้วยอะซีโตไนไตรล์ เก็บไว้ใช้เป็นสารมาตรฐานตั้งต้น (stock solution)

5. วิธีเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคของ QuEChERS

ชั่งตัวอย่างยาลูกกลอนสมุนไพรจำนวน 0.5 กรัม ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 15 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามด้วยอะซีโตไนไตรล์ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมแอนไฮดรัสแมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม และ โซเดียมคลอไรด์ จำนวน 0.125 กรัม เขย่าให้ผสมกันเพื่อให้เกิด การแยกชั้นของน้ำและอะซีโตไนไตรล์ นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 5,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที



ภาพที่ 1 วิธีการเตรียมตัวอย่างยาลูกกลอนสมุนไพร ด้วยเทคนิคของ QuEChERS

FDA 1-2557 - by fon.indd 62 23/5/2557 16:10:16

นำสารละลายชั้นบน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ ที่ประกอบด้วย PSA และแอนไฮดรัสแมกนีเซียมซัลเฟต อย่างละ 100 มิลลิกรัม เขย่าให้เข้ากัน นำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ 5,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายชั้นบน กรองผ่านหัวกรองชนิดไนลอน 0.45 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (ดังภาพที่ 1)

6. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการเตรียมตัวอย่าง

6.1 ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection: LOD)

เติมสารมาตรฐานเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซน ใน blank sample ที่ระดับความเข้มข้นที่ให้ขนาดสัญญาณเป็น 3 เท่า ของสัญญาณรบกวน (signal to noise) คำนวณค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซน

6.2 ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation: LOQ)

เติมสารมาตรฐานเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซน ใน blank sample ที่ระดับความเข้มข้นที่ให้ขนาดสัญญาณเป็น 10 เท่า ของสัญญาณรบกวน (signal to noise) คำนวณค่าความเข้มข้นของสารเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซน ทำการตรวจวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นนี้ซ้ำ 10 ครั้ง แล้วคำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับ (% Recovery) และร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (% RSD)

6.3 ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and range)

เตรียมสารมาตรฐาน working standard ของเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซน โดยเริ่ม จาก LOQ จนถึง 10 มิลลิกรัม/ลิตร (ppm) และทำการทดสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีการเตรียมตัวอย่างแบบ QuEChERS โดยการเติมสารมาตรฐานเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซน ใน blank sample ให้มีความเข้มข้นระดับเดียวกับสารมาตรฐาน หาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (R^2) เพื่อศึกษาความเป็นเส้นตรง ซึ่งควรมีค่าใกล้เคียง 1[17, 18]

6.4 ความแม่น (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

เติมสารมาตรฐานเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซน ใน blank sample ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ ระดับ LOQ, 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่ละความเข้มข้นทดสอบ 10 ซ้ำ คำนวณ % Recovery, % RSD และ HorRat (Horwitz ratio) ประเมินผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีตามเกณฑ์กำหนดดังนี้[17, 18]

ความแม่น (Accuracy) กำหนดเกณฑ์การยอมรับโดยค่าเฉลี่ย % Recovery ในช่วงร้อยละ 80–120

ความเที่ยง (Precision) กำหนดเกณฑ์การยอมรับโดย HorRat (Horwitz ratio) คำนวณจากอัตราส่วนระหว่าง % RSD ที่คำนวณได้จากการทดลองกับ % RSD ที่คำนวณได้จากสมการ Horwitz

$$\text{HorRat} = \frac{\text{Experimental RSD}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}; \text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)}$$

เกณฑ์การยอมรับ ต้องมีค่าน้อยกว่า 2

7. การประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริง

เตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคของ QuEChERS สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างยาสมุนไพรชนิดลูกกลอน จำนวน 17 ตัวอย่าง นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

8. ผลการทดลอง

จากการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค QuEChERS สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณสเตียรอยด์ชนิดเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซนที่ปลอมปนในยาสมุนไพรชนิดลูกกลอน และการทดสอบความใช้ได้ของวิธี ขีดจำกัดในการตรวจพบ (LOD) มีค่าเท่ากับ 0.36 และ 0.60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ขีดจำกัดในการเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.8 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์เริ่มจาก LOQ จนถึง 10 มิลลิกรัม/ลิตร พบค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9994 และ 0.9993 สำหรับสารเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซนตามลำดับ ดังตารางที่ 1

FDA 1-2557 - by fon.indd 63 23/5/2557 16:10:16

ตารางที่ 1 ค่า LOD, LOQ, Linearity และ R^2

ชนิดของสาร	LOD (มิลลิกรัม)	LOQ (มิลลิกรัม)	Linearity (มิลลิกรัม)	R^2
เพรดนิโซโลน (ขีดจำกัด)	0.06 (0.36)	0.13 (0.8)	0.13–10.00 (0.8–60.00)	0.9994
เดกซาเมทาโซน (ขีดจำกัด)	0.10 (0.60)	0.20 (1.2)	0.20–10.00 (1.2–60)	0.9993

จากการทดสอบความแม่น และความเที่ยง โดยเติมสารมาตรฐานใน blank sample ที่ระดับ LOQ, 10 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบร้อยละการคืนกลับของเพรดนิโซโลน และเดกซาเมทาโซนอยู่ในช่วง 82–97% อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (80–120%) มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานน้อยกว่า 5% และค่า HorRat ในช่วง 0.1–0.2 อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (น้อยกว่า 2) ดังตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 2 ความแม่น (% Recoveries, % RSD) และความเที่ยง (HorRat) ของเพรดนิโซโลน ที่ความเข้มข้น 0.8, 10, และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ppm)

ชนิดของสาร	% Recoveries % RSD			HorRat		
	0.8 ppm	10 ppm	50 ppm	0.8 ppm	10 ppm	50 ppm
เพรดนิโซโลน	93.1 (3.1)	95.1 (1.2)	82.5 (0.6)	0.2	0.2	0.1

ตารางที่ 3 ความแม่น (% Recoveries, % RSD) และความเที่ยง (HorRat) ของเดกซาเมทาโซน ที่ความเข้มข้น 1.2, 10, และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ppm)

ชนิดของสาร	% Recoveries % RSD			HorRat		
	1.2 ppm	10 ppm	50 ppm	1.2 ppm	10 ppm	50 ppm
เดกซาเมทาโซน	97.6 (3.3)	90.7 (1.6)	82.3 (0.8)	0.2	0.2	0.1

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างจริงที่เป็นยาสมุนไพรชนิดลูกกลอนจำนวน 17 ตัวอย่าง พบปริมาณเพรดนิโซโลนในช่วงความเข้มข้น 113.20–7,054.27 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเดกซาเมทาโซนในช่วงความเข้มข้น 142.03–657.83 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซนที่ตรวจพบในตัวอย่างยาสมุนไพรชนิดลูกกลอน

ตัวอย่างที่	ลักษณะตัวอย่าง	เพรดนิโซโลน (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	เดกซาเมทาโซน (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)
1	ยาเม็ดกลมสีดำ	1,340.90	193.70
2	ยาเม็ดกลมสีน้ำตาลแดง	7,054.27	ไม่พบ
3	ยาเม็ดกลมสีน้ำตาล	113.20	310.41
4	ยาเม็ดกลมสีน้ำตาล	380.10	280.97
5	ยาเม็ดกลมสีน้ำตาล	1,244.64	228.82
6	ยาเม็ดกลมสีดำอมน้ำตาล	347.28	280.21
7	ยาเม็ดกลมสีดำ	1,968.0	ไม่พบ
8	ยาเม็ดกลมสีน้ำตาล	1,078.03	249.91
9	ยาเม็ดกลมสีดำ	1,337.33	ไม่พบ
10	ยาเม็ดกลมสีน้ำตาล	702.08	324.66
11	ยาเม็ดกลมสีน้ำตาลดำ	545.51	204.33
12	ยาเม็ดทรงกระบอกสีน้ำตาลแดง	ไม่พบ	657.83
13	ยาเม็ดทรงกระบอกสีเหลือง	ไม่พบ	704.07
14	ยาเม็ดกลมสีน้ำตาลดำ	637.04	142.03
15	ยาเม็ดกลมสีน้ำตาล	700.33	ไม่พบ
16	ยาเม็ดกลมสีดำ	262.42	337.15
17	ยาเม็ดกลมสีน้ำตาล	1,926.52	213.96

FDA 1-2557 - by fon.indd 64 23/5/2557 16:10:16

9. สรุปและวิจารณ์

เทคนิค QuEChERS สามารถใช้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์การปลอมปนสเตียรอยด์ชนิดเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซนในยาลูกกลอนสมุนไพรได้ ซึ่งนับเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ใช้สารเคมีและตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณน้อย เมื่อเทียบกับเทคนิคการเตรียมตัวอย่างแบบ SPE

จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค QuEChERS โดยการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ที่เริ่มจาก LOQ จนถึง 10 มิลลิกรัม/ลิตร (หรือ 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) ของเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซนตามลำดับ พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (R^2) ใกล้เคียง 1 แสดงถึงวิธีการทดสอบมีความเป็นเส้นตรง ช่วงความเข้มข้นเหมาะสมในการวิเคราะห์ตัวอย่าง จากการทดสอบความแม่น และความเที่ยงที่ระดับ LOQ, 10 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบร้อยละการคืนกลับของเพรดนิโซโลนและเดกซาเมทาโซนระหว่าง 82–97% ซึ่งจะเห็นว่าความแม่นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือในช่วง 80–120%[17,18] และจากการประเมินความเที่ยงด้วย HorRat พบว่าอยู่ระหว่าง 0.1–0.2 ซึ่งเกณฑ์ที่ยอมรับต้องน้อยกว่า 2[17,18] แสดงถึงวิธีการวิเคราะห์มีความถูกต้อง แม่นยำ สามารถนำไปใช้กับการวิเคราะห์ตัวอย่างจริงจากห้องปฏิบัติการได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางสาวจารุวรรณ ลิ้มสัจจะสกุล ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม และรศ.ดร.ธรรมนูญ หนูจักร ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำและสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

บรรณานุกรม

1. Somporn P, Duangporn W. Screening for undeclared synthetic drugs in traditional Thai medicine for healthy life style. Department of Pharmaceutical Science, Facutly of Pharmacy. Chiang Mai University; 2003.
2. Sweetman SC. Martindale: The complete drug reference. 35th ed. London: Pharmaceutical press; 2007. p. 1342–4.
3. นงลักษณ์ สุขวาณิชย์ศิลป์. เภสัชวิทยาเล่ม 3. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2537.
4. วิสูตร ธนชัยวิวัฒน์. พระราชบัญญัติยา 2510. สำนักพิมพ์สูตรไพศาล. กรุงเทพฯ.
5 สุบุญญา หุตังคบดี. หลักเกณฑ์สำคัญสำหรับตำรับยาแผนโบราณ. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กรุงเทพฯ; 2547.
6 Ku Y.R., Wen K.C., Ho L.K., Chang Y.S. Solid–phase extraction and high–performance liquid chromatographic determination of steroids adulterated in traditional Chinese medicines. J. Food and Drug Anal. 1999; 7:123–130.
7. Lumbrears R.G., Valencia R.M., Montes A.S. Hornillos R.I. Liquid chromatographic method development for steroids determination (corticoids and anabolics) application to animal feed samples. J.Chromatography. A 2007; 1156:321–330. .
8. Huetos O., Ramos M., de Pozuelo M.M., Andres M.S., Reuvers T.B.A. Determination of dexamethasone in feed by thin–layer chromatography and high–performance liquid chromatography. Analyst 1999; 124:1583–1587.
9. Gagliardi L., Orsi D.D., Rosaria Giudice M., et al. Development of a tandem thin–layer chromatography high–performance liquid chromatography method for the identification and determination of corticosteroids in cosmetic product. Anal. Chim. Acta. 2002; 457:187–198.
10. Andersen J.H., Hansen L.G., Pedersen M. Optimization of solid–phase extraction clean up And validation of quantitative determination of corticosteroids in urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Anal. Chim. Acta. 2008; 617:216–224.

FDA 1-2557 - by fon.indd 65 23/5/2557 16:10:16

11. Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenck F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid–phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. J. AOAC Int. 2003; 86:412–431.
12. Majors R.E. QuEChERS–A new technique for multiresidue analysis of pesticides in foods and agricultural samples. LCGC Asia Pacific.2008; 11:1–7.
13. Majors R.E. Advanced topics in solid–phase extraction: chemistries. LCGC N.Am. 2007;25: 1–9.
14. Thurman E.M., Mills M.S. Solid–phase extraction: principle and practice. John Wiley & Sons. New York. 1998.
15. AOAC International (2007), AOAC Official Method of Analysis, AOAC official method 2007.01, Determination of pesticide residues in food by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate; 2007.Chapter10:17–26.
16. Nantana K., Amorn P., Tumnoon N. Determination of steroids adulterated in liquid herbal medicines using QuEChERS sample preparation and high–performance liquid chromatography. J.Pharm. Biomed.Anal. 2011;55:1175–1178.
17. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics, EURACHEM Guide, First internet version, December 1998.
18. Taverniers I., de Loose M., van Bockstaele E. Trends in quality in the analytical laboratory: II analytical method validation and quality assurance. Trends in Analytical Chemistry. 2004; 23:535–552.

FDA 1-2557 - by fon.indd 66 23/5/2557 16:10:16