



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับการตรวจสอบสารสเตียรอยด์ที่ปนเปื้อนในเครื่องสำอางด้วย
เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง
(Analytical method development for determination of steroid adulterants in
cosmetics using high performance liquid chromatography with solid phase
extraction)

โดย

1. นสภ.ปริยากร อนันต์นาวิสูตรณ์ รหัสสนិត 60210207
2. นสภ.วนศักดิ์ ชื่นตา รหัสสนិត 60210215
3. นสภ.ศรีสุกิจ สาระอาภรณ์ รหัสสนិត 60210223

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับการตรวจสอบสารสเตียรอยด์ที่ปนเปื้อนในเครื่องสำอางด้วย
เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง
(Analytical method development for determination of steroid adulterants in
cosmetics using high performance liquid chromatography with solid phase
extraction)

โดย

1. นสภ.ปริยากร อนันต์นาวิสูตรณ์ รหัสนิสิต 60210207
2. นสภ.วนศักดิ์ ชื่นตา รหัสนิสิต 60210215
3. นสภ.ศรีสุกิจ สาระอาภรณ์ รหัสนิสิต 60210223

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

ในปัจจุบันเครื่องสำอางเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความนิยมมากขึ้น มีหลากหลายรูปแบบ และจำหน่ายในราคาย่อมเยา อีกทั้งพบว่าการอดอ้างสรรพคุณเกินจริง จึงเสี่ยงต่อการที่เครื่องสำอางเหล่านี้จะมีการใส่สารปนเปื้อน โดยเฉพาะสารสเตียรอยด์ซึ่งพบการปนเปื้อนมากในประเทศไทยในเครื่องสำอางรูปแบบครีมและอาจมีการใส่สารสเตียรอยด์มากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งหากใช้ไปในระยะเวลานานจะก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์และเกิดอันตรายแก่ผู้ใช้ได้ตั้งแต่ระดับเล็กน้อยจนถึงมาก

ในเครื่องสำอางที่มีการปนเปื้อนสารสเตียรอยด์ ผู้บริโภคไม่สามารถทราบได้ว่าผลิตภัณฑ์นั้นมีสารสเตียรอยด์ชนิดใดบ้าง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงความสำคัญในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจสอบระบุชนิดและหาปริมาณของสารสเตียรอยด์ในการวิเคราะห์โดยใช้สภาวะการวิเคราะห์เดียวได้

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาหาสภาวะในการวิเคราะห์ที่สามารถตรวจสอบหาสารสเตียรอยด์และแยกชนิดของสารสเตียรอยด์ทั้ง 3 ชนิดออกจากกัน ซึ่งใช้การสกัดสารสเตียรอยด์จากเครื่องสำอางโดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง

คณะผู้วิจัย

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2564

เรื่อง การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับการตรวจสอบสารสเตียรอยด์ที่ปนเปื้อนในเครื่องสำอางด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | |
|----------------------------------|---------------------|
| 1. นสภ.พิริยากร อนันต์นาวิสูตรณ์ | รหัสสนิสิต 60210207 |
| 2. นสภ.วนศักดิ์ ชื่นตา | รหัสสนิสิต 60210215 |
| 3. นสภ.ศรีสุกิจ สาระอาภรณ์ | รหัสสนิสิต 60210223 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ญญ.ผศ.ดร.สมาวดี เปลี่ยนวงษ์
2. ญญ.ดร.นภัสสร ฉันทอรัณศิริ

บทคัดย่อ

คอร์ติโคสเตียรอยด์ จัดเป็นวัตถุห้ามใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุข การตรวจสอบหาคอร์ติโคสเตียรอยด์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางด้วยวิธี HPLC จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้ทั้งชนิดและปริมาณของสาร แต่เนื่องจากในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมีสารอื่น ๆ รวมอยู่ด้วยการสกัดแยกคอร์ติโคสเตียรอยด์ออกจากองค์ประกอบอื่นในเครื่องสำอาง จึงมีความสำคัญเพื่อลดการรบกวนจากสารอื่น งานวิจัยนี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับการตรวจสอบสารสเตียรอยด์ 3 ชนิด ได้แก่ ไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไมด์, เบตาเมธาโซน วาเลอเรท และคลอเบทาซอล โพรพิโอเนต ที่ปนเปื้อนในเครื่องสำอางด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง โดยใช้สภาวะการวิเคราะห์เดียวในการแยกสารคอร์ติโคสเตียรอยด์ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งสภาวะการวิเคราะห์ที่เหมาะสมคือ คอลัมน์ C18 เฟสเคลื่อนเป็นระบบ gradient ที่มีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้โซเดียมไทรโพลฟอสเฟตและน้ำ เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ 55 นาที ตรวจวัดสารโดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออโรเมตริก ที่ความยาวคลื่น 240 และ 254 นาโนเมตร ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ โดยทำการสกัดสารคอร์ติโคสเตียรอยด์ใน spiked sample ด้วยวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม พบว่าพีคของไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไมด์, เบตาเมธาโซน วาเลอเรท และคลอเบทาซอล โพรพิโอเนต แยกออกจากกันได้ชัดเจนและไม่ถูกรบกวนจากสารอื่น โดยมีค่าเวลาชะ (retention time) เท่ากับ 9, 28 และ

32 นาที ตามลำดับ มีความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารกับพื้นที่ใต้กราฟตลอดช่วงความเข้มข้น 2.5-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) ของสเตียรอยด์ทั้ง 3 ชนิด เท่ากับ 0.9999 ซีดจำกัดของการตรวจพบเท่ากับ 1.11, 3.62 และ 0.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ 3.35, 10.98 และ 2.61 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีความถูกต้องแม่นยำแสดงด้วยร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) ในช่วง 98.72-110.33 ความเที่ยงตรงในการวิเคราะห์วันเดียวกันแสดงด้วย %RSD มีค่า 0.35-2.15 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ความเที่ยงของการวิเคราะห์ต่างวันแสดงด้วย %RSD มีค่า 1.24-6.41 อย่างไรก็ตามสำหรับงานวิจัยนี้พบว่ายังไม่สามารถสกัดสารคอร์ติโคสเตียรอยด์ที่ต้องการด้วยตัวดูดซับของแข็งได้ เนื่องจากขั้นตอนการปรับสถานะของตัวดูดซับของแข็งยังไม่เหมาะสมทำให้สารไม่สามารถเกาะติดกับตัวดูดซับของแข็ง เมื่อนำวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยการสกัดแบบดั้งเดิมมาประยุกต์ใช้กับตัวอย่างเครื่องสำอางจริงที่ขายในท้องตลาด มีการพบสารสเตียรอยด์ปนเปื้อนอยู่ 2 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 3 ตัวอย่าง และสามารถคาดการณ์ชนิดและทราบปริมาณของสเตียรอยด์ที่พบได้ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้สามารถแยกสารสเตียรอยด์ในเครื่องสำอางชนิดครีมได้พร้อมกันหลายชนิด เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการเฝ้าระวังการปลอมปนสารสเตียรอยด์ในเครื่องสำอาง

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก..... *Amth P.*

Senior Project Academic Year 2021

: Analytical method development for determination of steroid adulterants in cosmetics using high performance liquid chromatography with solid phase extraction

By

1. Miss Piriya Korn Anannaweenusorn ID 60210207
2. Mr Wanasak Chuenta ID 60210215
3. Miss Srisukit Saraarporn ID 60210223

Advisor:

1. Assist. Prof. Dr. Samarwadee Plianwong
2. Dr. Naphatson Chanthathamrongsiri

ABSTRACT

Corticosteroids are forbidden to be used in cosmetics on the lists of restricted and prohibited cosmetic ingredients by The Ministry of Public Health. In order to examine the corticosteroids as the contaminants in cosmetics, the HPLC method has been the popular technique because of its efficacy for identification and quantity. To reduce the interferences in the analysis, the separation and purification of the corticosteroids are important due to the various components of the cosmetic formulation. The aim of this study was to develop a simultaneous analytical method for determination of three steroid adulterants in cosmetics, triamcinolone acetonide, betamethasone valerate and clobetasol propionate, using high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction. The suitable analytical condition is performed using the C18 column and the mobile phase consisted of water and acetonitrile in gradient elution. The flow rate was fixed at 1 mL/min and the total analysis time was 55 minutes. The corticosteroids were detected by photo diode array detector at 240 nm and 254 nm. The method validation was performed with spiked sample by conventional extraction technique showed completely separated peaks of 3 types of corticosteroids without interference of excipients peak. The retention times

of triamcinolone acetonide, betamethasone valerate and clobetasol propionate were at 9, 28, and 32 minutes, respectively. The correlation coefficient were 0.9999 in all corticosteroids. The limits of detection were 1.11, 3.62, and 0.86 $\mu\text{g/mL}$, and the limits of quantitation were 3.35, 10.98, and 2.61 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The accuracy was analyzed and the percent recovery was in the range of 98.72-110.33. The precision of the method was demonstrated by percent relative standard deviation (%RSD) in acceptable range of 0.35-2.15 and intermediate precision was shown by %RSD in acceptable range of 1.24-6.41. However, the extraction of corticosteroids using SPE was not optimized as required due to the corticosteroids in the spiked sample were not retained in the SPE. The developed method with conventional extraction were applied for determination of corticosteroids in three cosmetic products. Two of the three samples were contaminated with corticosteroids, and could be predicted as the type and quantity of corticosteroids. Therefore, this method could be useful for separation and determination of corticosteroid adulterants in cosmetic products.

Major Advisor.....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงไปได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างสูงจากอาจารย์ที่ปรึกษา ญญ.ผศ.ดร.สมวดี เปลี่ยนวงศ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณ ญญ.ดร.นภัสสร ฉันทธำรงค์ศิริ ที่ช่วยแนะนำในส่วนขอเทคนิคการใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์ต่าง ๆ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพาที่สนับสนุนเงินทุนในการศึกษาครั้งนี้และให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography)

คณะผู้วิจัย

12 เมษายน 2565

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ง
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูปภาพ	ฅ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	21
บทที่ 4 ผลการวิจัย	28
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	70
เอกสารอ้างอิง	75

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดง Solvent elution gradients (acetonitrile : water)	11
ตารางที่ 2 แสดง Solvent elution gradients (0.1% Phosphoric acid in water: Acetonitrile)	12
ตารางที่ 3 แสดง Solvent elution gradients (Main solvent gradient and Complementary solvent gradient)	12
ตารางที่ 4 แสดง Solvent elution gradients (Solution A and Solution B)	13
ตารางที่ 5 แสดงเกณฑ์การยอมรับของร้อยละการกลับคืนตามมาตรฐานทางอาหารและยา (AOAC 20 th edition, 2016)	15
ตารางที่ 6 แสดงผลของร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ย (% mean recovery)	16
ตารางที่ 7 แสดงคำแนะนำสำหรับการยอมรับความเที่ยงของสารที่สนใจที่ระดับความเข้มข้น ต่างๆ (AOAC 20 th edition, 2016)	17
ตารางที่ 8 แสดงอัตราส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่	22
ตารางที่ 9 แสดง Retention time ของสารมาตรฐานสเตียรอยด์	29
ตารางที่ 10 แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetone ที่ 8 ความเข้มข้น	30
ตารางที่ 11 แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของสารมาตรฐาน Betamethasone valerate ที่ 8 ความเข้มข้น	31
ตารางที่ 12 แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของสารมาตรฐาน Clobetasol propionate ที่ 8 ความเข้มข้น	32
ตารางที่ 13 แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของ Triamcinolone acetone (spiked) ที่ 5 ความเข้มข้น	34
ตารางที่ 14 แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของ Betamethasone valerate (spiked) ที่ 5 ความเข้มข้น	35
ตารางที่ 15 แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของ Clobetasol propionate (spiked) ที่ 5 ความเข้มข้น	36

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 16 แสดง % recovery ของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide	37
ที่ 3 ความเข้มข้น	
ตารางที่ 17 แสดง % recovery ของสารมาตรฐาน Betamethasone valerate	38
ที่ 3 ความเข้มข้น	
ตารางที่ 18 แสดง % recovery ของสารมาตรฐาน Clobetasol propionate	38
ที่ 3 ความเข้มข้น	
ตารางที่ 19 แสดง % recovery ของ Triamcinolone acetonide (spiked)	39
ที่ 3 ความเข้มข้น	
ตารางที่ 20 แสดง % recovery ของ Betamethasone valerate (spiked)	40
ที่ 3 ความเข้มข้น	
ตารางที่ 21 แสดง % recovery ของ Clobetasol propionate (spiked)	40
ที่ 3 ความเข้มข้น	
ตารางที่ 22 แสดง %RSD ของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide	41
ที่ 3 ความเข้มข้น	
ตารางที่ 23 แสดง %RSD ของสารมาตรฐาน Betamethasone valerate	42
ที่ 3 ความเข้มข้น	
ตารางที่ 24 แสดง %RSD ของสารมาตรฐาน Clobetasol propionate	42
ที่ 3 ความเข้มข้น	
ตารางที่ 25 แสดง %RSD ของ Triamcinolone acetonide (spiked)	43
ที่ 3 ความเข้มข้น	
ตารางที่ 26 แสดง %RSD ของ Betamethasone valerate (spiked)	44
ที่ 3 ความเข้มข้น	
ตารางที่ 27 แสดง %RSD ของ Clobetasol propionate (spiked)	44
ที่ 3 ความเข้มข้น	
ตารางที่ 28 แสดง %RSD ของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide	45
ที่ 3 ความเข้มข้น ทำซ้ำ 3 วัน	

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 29 แสดง %RSD ของสารมาตรฐาน Betamethasone valerate ที่ 3 ความเข้มข้น ทำซ้ำ 3 วัน	46
ตารางที่ 30 แสดง %RSD ของสารมาตรฐาน Clobetasol propionate ที่ 3 ความเข้มข้น ทำซ้ำ 3 วัน	48
ตารางที่ 31 แสดง %RSD ของ Triamcinolone acetonide (spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น ทำซ้ำ 3 วัน	49
ตารางที่ 32 แสดง %RSD ของ Betamethasone valerate (spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น ทำซ้ำ 3 วัน	50
ตารางที่ 33 แสดง %RSD ของ Clobetasol propionate (spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น ทำซ้ำ 3 วัน	52
ตารางที่ 34 แสดง LOD ของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide	53
ตารางที่ 35 แสดง LOD ของสารมาตรฐาน Betamethasone valerate	53
ตารางที่ 36 แสดง LOD ของสารมาตรฐาน Clobetasol propionate	54
ตารางที่ 37 แสดง LOD ของ Triamcinolone acetonide (spiked)	54
ตารางที่ 38 แสดง LOD ของ Betamethasone valerate (spiked)	55
ตารางที่ 39 แสดง LOD ของ Clobetasol propionate (spiked)	55
ตารางที่ 40 แสดง LOQ ของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide	56
ตารางที่ 41 แสดง LOQ ของสารมาตรฐาน Betamethasone valerate	56
ตารางที่ 42 แสดง LOQ ของสารมาตรฐาน Clobetasol propionate	57
ตารางที่ 43 แสดง LOQ ของ Triamcinolone acetonide (spiked)	57
ตารางที่ 44 แสดง LOQ ของ Betamethasone valerate (spiked)	57
ตารางที่ 45 แสดง LOQ ของ Clobetasol propionate (spiked)	58
ตารางที่ 46 แสดง % recovery ของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide ที่ 5 ความเข้มข้น	61
ตารางที่ 47 แสดง % recovery ของสารมาตรฐาน Betamethasone valerate ที่ 5 ความเข้มข้น	61

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 48 แสดง % recovery ของสารมาตรฐาน Clobetasol propionate	61
ที่ 5 ความเข้มข้น	
ตารางที่ 49 แสดง % recovery ของสารมาตรฐานโดยใช้ SPE cartridge	62
ยี่ห้อ Welchrom®	
ตารางที่ 50 แสดง % recovery ของสารมาตรฐานโดยใช้ SPE cartridge	62
ยี่ห้อ Strata®	
ตารางที่ 51 แสดง % recovery ของสารละลาย spiked sample โดยใช้ SPE cartridge	63
ยี่ห้อ Welchrom®	
ตารางที่ 52 แสดง % recovery ของสารละลาย spiked sample โดยใช้ SPE cartridge	63
ยี่ห้อ Strata®	
ตารางที่ 53 แสดง % recovery ของสารมาตรฐานโดยใช้ SPE cartridge ยี่ห้อ Welchrom®	64
ในสภาวะที่ใช้ methanol และ water	
ตารางที่ 54 แสดง % recovery ของสารมาตรฐานโดยใช้ SPE cartridge ยี่ห้อ Welchrom®	64
ในสภาวะที่ใช้ methanol เพียงอย่างเดียว	
ตารางที่ 55 แสดง % recovery ของสารมาตรฐานโดยใช้ SPE ที่ปรับสภาวะโดยใช้สารละลาย	65
methanol: dichloromethane 1:9 (v/v)	
ตารางที่ 56 แสดง % recovery ของสารละลาย spiked sample โดยใช้ SPE ที่ปรับสภาวะ	65
โดยใช้สารละลาย methanol: dichloromethane 1:9 (v/v)	
ตารางที่ 57 แสดง % recovery ของตัวอย่างยาหาสเดียรอยด์ชนิดครีมในท้องตลาด	66
ตารางที่ 58 แสดงปริมาณสารสเตียรอยด์ที่คาดว่าจะพบในตัวอย่างเครื่องสำอาง 1	68
ตารางที่ 59 แสดงปริมาณสารสเตียรอยด์ที่คาดว่าจะพบในตัวอย่างเครื่องสำอาง 2	69
ตารางที่ 60 แสดงปริมาณสารสเตียรอยด์ที่คาดว่าจะพบในตัวอย่างเครื่องสำอาง 3	69

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดง chromatogram ของ Triamcinolone acetonide ที่ 240 และ 254 nm	29
รูปที่ 2 แสดง chromatogram ของ Betamethasone valerate ที่ 240 และ 254 nm	29
รูปที่ 3 แสดง chromatogram ของ Clobetasol propionate ที่ 240 และ 254 nm	29
รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide กับพื้นที่ใต้กราฟ	31
รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Betamethasone valerate กับพื้นที่ใต้กราฟ	32
รูปที่ 6 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Clobetasol propionate กับพื้นที่ใต้กราฟ	33
รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide (spiked) กับพื้นที่ใต้กราฟ	34
รูปที่ 8 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Betamethasone valerate (spiked) กับพื้นที่ใต้กราฟ	35
รูปที่ 9 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Clobetasol propionate (spiked) กับพื้นที่ใต้กราฟ	36
รูปที่ 10 แสดง chromatogram ของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate ตามลำดับ	58
รูปที่ 11 แสดง chromatogram ของสารละลาย spiked sample Triamcinolone acetonide, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate ตามลำดับ	59
รูปที่ 12 แสดง chromatogram ของ cream base 1	59
รูปที่ 13 แสดง chromatogram ของ cream base 2	59
รูปที่ 14 แสดง chromatogram ของ cream base 3	60
รูปที่ 15 แสดงตัวอย่างยาทาสเตียรอยด์ชนิดครีมในท้องตลาด	66
รูปที่ 16 แสดงตัวอย่างเครื่องสำอางในท้องตลาด 1, 2 และ 3 (ซ้ายไปขวา)	66
รูปที่ 17 แสดงการตรวจสอบสารสเตียรอยด์เบื้องต้นโดยใช้ชุดทดสอบสเตียรอยด์ ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ (ซ้าย) และ หลังหยดน้ำยาทดสอบ 15 นาที (ขวา)	67

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 18 แสดง chromatogram ของตัวอย่างเครื่องสำอาง 1	68
รูปที่ 19 แสดง chromatogram ของตัวอย่างเครื่องสำอาง 2	68
รูปที่ 20 แสดง chromatogram ของตัวอย่างเครื่องสำอาง 3	69

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

คอร์ติโคสเตียรอยด์ (Corticosteroids) เป็นสารที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ นิยมนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ยาใช้ภายนอกในการรักษาภาวะผิวหนังที่มีการอักเสบและโรคที่เกิดความผิดปกติของผิวหนังภาวะที่ผิวหนังมีการแบ่งตัวมากเกินไปหรือภาวะที่ผิวหนังผิดปกติจากความบกพร่องของภูมิคุ้มกันร่างกายการใช้สารในกลุ่มนี้อาจไม่ถูกต้องหรือเกินความจำเป็นอาจส่งผลให้เกิดผลข้างเคียงทั้งภายนอกและภายในร่างกายได้ เช่น รอยแตกลาย (striae), ภาวะการขยายของเส้นเลือดฝอยบนใบหน้า (telangiectasia), stellate pseudoscars, ผิวบาง (fragile skin), แผลเปื่อย, รอยจ้ำ (purpura), แผลหายช้า (impaired wound healing), มีขนเพิ่มที่ใบหน้า (facial hypertrichosis) และมีผลข้างเคียงที่ทำให้ผิวขาวขึ้น⁽¹⁾ จากกลไกที่สเตียรอยด์มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสารเคมีสื่อกลาง (mediators) เช่น โพรสตาแกรนดิน (prostaglandin) และลิวโคไตรอิน (leukotriene) ที่ใช้ในการสร้างเม็ดสี (melanin) ทำให้ปริมาณเม็ดสีลดลงส่งผลให้ผิวขาวขึ้น⁽²⁾ จึงมีผู้ขายบางรายนำมาผสมในเครื่องสำอาง เช่น ครีมหน้าขาว แต่ไม่คำนึงถึงผลข้างเคียงอื่น ๆ ที่จะตามมาจากการใช้ เนื่องจากเครื่องสำอางมักเป็นสิ่งที่ใช้เป็นประจำทุก ๆ วันหากผู้บริโภคใช้เครื่องสำอางที่มีสารต้องห้ามติดต่อกันเป็นระยะเวลานานย่อมทำให้เกิดอันตรายและผลข้างเคียงตามที่กล่าวมาข้างต้นได้ ดังนั้นคอร์ติโคสเตียรอยด์จึงจัดเป็นวัตถุห้ามใช้ลำดับที่ 300 ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุข⁽³⁾

ในปัจจุบันผู้คนหันมาให้ความสนใจในผลิตภัณฑ์เสริมความงามมากขึ้น ทำให้มีการปรับปรุงพัฒนาส่วนประกอบและทำออกมาจำหน่ายกันทั่วไปตามท้องตลาด ทั้งผลิตภัณฑ์ที่ขึ้นทะเบียนถูกต้องตามกฎหมายและจำหน่ายโดยไม่มีการขึ้นทะเบียนและรับรองโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ซึ่งผู้บริโภคไม่สามารถรู้ได้เลยว่าในเครื่องสำอางมีสารสเตียรอยด์ปนเปื้อนหรือไม่ เนื่องจากไม่มีการบอกส่วนผสมที่ชัดเจนและมีการอวดอ้างสรรพคุณเกินจริง อีกทั้งราคาที่ไม่สูงมากเมื่อเทียบกับ

แบนด์ชั้นนำ ซึ่งจากการศึกษาสารห้ามใช้ที่ปลอมปนในเครื่องสำอางชนิดครีมทาผิวในปี 2556 พบว่า สารทำให้ผิวขาวที่ห้ามใช้ที่พบมากที่สุด คือ สเตียรอยด์ชนิดโคลเบตาซอลโพรพิโอเนต (Clobetasol propionate) รองลงมาคือ ไฮโดรควิโนน (Hydroquinone) เทรทีโนอิน (Tretinoin) เบตามาธาโซน ไดโพรพิโอเนต (Betamethasone dipropionate) เดกซาเมทาโซน (Dexamethasone) ไฮโดรคอร์ติโซนอะซิเตท (Hydrocortisone acetate) และฟลูโอซิโนโลนอะเซโทไนด์ (Fluocinolone acetonide) ตามลำดับ⁽⁴⁾ และจากประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยวัตถุที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง พ.ศ. 2559 ได้มีการกล่าวถึงสเตียรอยด์ที่มีการใช้ในเครื่องสำอางที่ทำให้หน้าขาวที่ผิดกฎหมาย ได้แก่ โคลเบตาซอล (Clobetasol) ไตรแอมซิโนโลน (Triamcinolone) และเบต้าเมธาโซน (Betamethasone) ซึ่งจัดเป็นสารในกลุ่มกลูโคคอร์ติคอยด์ (Glucocorticoids) ซึ่งเป็นสารห้ามใช้ในเครื่องสำอางลำดับที่ 300 เช่นกัน⁽⁵⁾

จากการสำรวจชุดทดสอบสเตียรอยด์ในเครื่องสำอางเบื้องต้นที่มีจำหน่ายในประเทศไทย คือ การใช้ชุดทดสอบสเตียรอยด์ในเครื่องสำอาง (STR Kit) ซึ่งสามารถหาซื้อได้ทั่วไป สามารถทำให้ทราบได้ว่ามีสเตียรอยด์ปนเปื้อนหรือไม่ แต่ไม่สามารถทราบชนิดและปริมาณของสารสเตียรอยด์นั้น ๆ โดยหลักการของชุดทดสอบนี้ คือ น้ำยาที่ใช้ในการทดสอบจะทำปฏิกิริยากับสารสเตียรอยด์ แล้วทำให้สีของเครื่องสำอางเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ได้แก่ สีม่วงคราม สีเขียวขี้ม้า และสีเทาเข้ม ซึ่งสีของเครื่องสำอางที่เปลี่ยนแปลงไปจะขึ้นอยู่กับสีเครื่องสำอางเดิม

จากการค้นหาค้นหาการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบหาสารสเตียรอยด์ที่ปนเปื้อนในเครื่องสำอาง พบว่ามีการศึกษาวิธีที่สามารถตรวจสอบวิเคราะห์หาปริมาณสเตียรอยด์ที่นิยมใช้ ได้แก่ เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถตรวจได้ทั้งชนิดและปริมาณของสาร โดยในการศึกษาที่ผ่านมาสามารถหาสารสเตียรอยด์ได้หลายตัวหรือเพียงชนิดเดียว^(6,7) อีกทั้งวิธีการสกัดสารจากเครื่องสำอางตัวอย่างยังคงใช้วิธีแบบดั้งเดิม (Conventional) ซึ่งเป็นวิธีที่อาจกำจัดการที่เป็นส่วนประกอบอื่น ๆ ในตำรับได้น้อย ส่งผลทำให้รบกวนผลการวิเคราะห์ของสารสเตียรอยด์⁽⁸⁾ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงความสำคัญในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ในการตรวจสอบหาปริมาณสเตียรอยด์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่พบบ่อยในประเทศไทย ได้แก่ Triamcinolone acetonide, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate โดยใช้วิธีการสกัดสารจากผลิตภัณฑ์ตัวอย่างเป็นวิธีการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid-phase extraction) พร้อมทั้งการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) ที่พัฒนาขึ้น

2. วัตถุประสงค์

- 2.2 เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับการตรวจสอบสารสเตียรอยด์ที่ปนเปื้อนในเครื่องสำอาง
- 2.3 เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์
- 2.3 เพื่อหาวิธีการสกัดสารสเตียรอยด์จากเครื่องสำอางได้อย่างเหมาะสม
- 2.4 เพื่อนำมาใช้ตรวจสอบกับเครื่องสำอางที่อาจมีการปนเปื้อนสารสเตียรอยด์ในท้องตลาดได้

3. กรอบแนวคิด

3.1 ตัวแปรต้น

- 3.1.1 เครื่องสำอางที่วางจำหน่ายในท้องตลาด
- 3.1.2 ชนิดและอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase)
- 3.1.3 อัตราการไหล (Flow rate) ของ mobile phase
- 3.1.4 ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

3.2 ตัวแปรตาม

- 3.2.1 ชนิดและปริมาณสารสเตียรอยด์ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง
- 3.2.2 ความถูกต้อง และความแม่นยำของผลการวิเคราะห์
- 3.2.3 Retention time
- 3.2.4 Peak area
- 3.2.5 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.3 ตัวแปรควบคุม

- 3.3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์
- 3.3.2 คุณภาพของสารมาตรฐานที่ใช้

4. สมมติฐาน

- 4.1 วิธีการสกัดสารสเตียรอยด์จากเครื่องสำอางโดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid phase extraction) จะได้สารสเตียรอยด์ที่มีสารปนเปื้อนชนิดอื่นน้อยกว่าวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม
- 4.2 สภาวะในการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกชนิดของสารสเตียรอยด์ทั้ง 3 ชนิดและแยกออกจากสารอื่นในตำรับได้
- 4.3 วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้งานจริงสำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนสารสเตียรอยด์ในเครื่องสำอางตัวอย่าง

5. นิยามศัพท์

5.1 เครื่องสำอาง

เครื่องสำอางที่นำมาใช้ในการศึกษา เป็นรูปแบบผลิตภัณฑ์ชนิดครีม ซึ่งมีวางจำหน่ายทั่วไปตามตลาดหรือช่องทางออนไลน์

5.2 สารสเตียรอยด์

สเตียรอยด์ เป็นกลุ่มฮอร์โมนชนิดหนึ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นได้เองในปริมาณเพียงเล็กน้อย เพื่อทำหน้าที่ในกระบวนการต่าง ๆ ของร่างกายให้เป็นปกติ ตัวอย่างเช่น ด้านการอักเสบ ลดอาการปวด ทำให้ภูมิคุ้มกันของร่างกายทำงานเป็นปกติ เป็นต้น เนื่องด้วยคุณสมบัติของสารสเตียรอยด์ที่จำเป็นต่อร่างกาย จึงทำให้มีการผลิตสเตียรอยด์สังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้ทางการแพทย์ มีหลายชนิด และหลายรูปแบบทั้งยาฉีด ยาเม็ด และยาครีม⁽⁹⁾

5.3 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC)

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบที่สนใจที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่างวัฏภาค 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคคงที่กับวัฏภาคเคลื่อนที่ สารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้นขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับวัฏภาคเคลื่อนที่หรือวัฏภาคคงที่ โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณ แสดงผลในลักษณะเป็นพีค ซึ่งเรียกว่า โครมาโทแกรม ระยะเวลาที่สารแต่ละชนิดถูกหน่วงเหนี่ยวไว้กับ

วัฏภาคคงที่ (retention time) หรือ ตำแหน่งของพีคที่ปรากฏบนโครมาโทแกรมสามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และพื้นที่ใต้พีค หรือความสูงของพีคใช้ประโยชน์ด้านการวิเคราะห์เชิงปริมาณ⁽¹⁰⁾

5.4 การสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid-phase extraction, SPE)

การสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งเป็นเทคนิคการแยกที่เกิดระหว่างของแข็ง คือ absorbent ที่อยู่ใน cartridge กับของเหลวหรือ solvent เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสำหรับการแยกและการเพิ่มความเข้มข้นให้กับสารตัวอย่าง ถ้าสารตัวอย่างมีขี้ก็ยังสามารถ load สารตัวอย่างผ่านลงใน small tube ที่ภายในบรรจุด้วย porous

solid particles หรืออาจใช้ membrane disk ที่บรรจุด้วย sorbent ที่เหมาะสม
เทคนิคนี้ใช้ตัวทำละลายน้อย เวลาไม่นาน ประสิทธิภาพการสกัดสูง⁽¹¹⁾

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 6.1 วิธีการวิเคราะห์สามารถตรวจสอบสารสเตียรอยด์ในเครื่องสำอางทั้ง 3 ชนิดได้ โดยใช้
สภาวะการวิเคราะห์เดียว ซึ่งมีความถูกต้องและแม่นยำ
- 6.2 นำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้ในทางปฏิบัติ สามารถทราบชนิดและปริมาณสารส
เตียรอยด์ที่ปนเปื้อนอยู่ในเครื่องสำอางตัวอย่างได้

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. การสกัดสารตัวอย่าง
 - 1.1 การสกัดด้วยวิธีดั้งเดิม (Conventional)
 - 1.2 การสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง
2. โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
 - 2.1 ส่วนประกอบ
 - 2.2 พารามิเตอร์และสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์
 - 2.3 การวิเคราะห์สารสเตียรอยด์
3. คุณลักษณะเฉพาะที่แสดงคุณสมบัติของวิธีวิเคราะห์
 - 3.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and range)
 - 3.2 การทดสอบความถูกต้องแม่นยำ (Accuracy)
 - 3.3 ความเที่ยงตรง (Precision)
 - 3.4 การทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD)
 - 3.5 การทดสอบหาขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)
 - 3.6 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

1. การสกัดสารตัวอย่าง

เป็นการสกัดแยกสารตัวอย่าง ซึ่งเป็นสารที่สนใจ 3 ตัว ได้แก่ Triamcinolone acetonide, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate ที่ผสมอยู่ในเนื้อของผลิตภัณฑ์โดยการสกัด 2 วิธี ได้แก่

1.1 การสกัดด้วยวิธีดั้งเดิม (Conventional)

การสกัดด้วยวิธีดั้งเดิมเป็นการสกัดแยกสารที่ผสมอยู่ในเนื้อของผลิตภัณฑ์ โดยการใส่สารละลาย Methanol ซึ่งเป็นสารที่นิยมในการสกัดเพื่อแยกสารสเตียรอยด์

จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยหัวข้อ Development of a tandem thin-layer chromatography-high-performance liquid chromatography method for the identification and determination of corticosteroids in cosmetic products⁽⁷⁾ ได้ทำการสกัดสารสเตียรอยด์ คือ Betamethasone esters ออกจากผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีวิธีการสกัดแยกเพื่อคัดกรองหาสารสเตียรอยด์ โดยการนำผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางรูปแบบครีม 50 กรัม มาสกัดโดยใช้ methanol 200 mL ผสมให้เข้ากันจนได้เป็นสารละลายแขวนตะกอน เพื่อนำไป centrifuge จากนั้นแยกสารละลายส่วนใส (supernatant) ออกมากรองและวิเคราะห์เพื่อหาสารโดยใช้ TLC (silica gel plate) – UV detection แล้วเทียบกับสารมาตรฐาน

จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยหัวข้อ Development and Validation of a Stability-Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Assay of Betamethasone Dipropionate, Chlorocresol, and for the Estimation of Betamethasone Dipropionate Related Compounds in a Pharmaceutical Cream and Ointment⁽¹²⁾ ได้ทำการสกัดสารสเตียรอยด์ คือ Betamethasone dipropionate ออกจากผลิตภัณฑ์ที่เป็นครีมและ ointment ที่มีวิธีการสกัดแยกโดยนำตัวอย่างครีม 4 กรัม มาสกัดโดยใช้ 0.1% glacial acetic acid in methanol 20 mL จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 10 นาที ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer และนำไปแช่น้ำแข็งก่อนนำไป centrifuge แยกสารละลายส่วนใสออกมาเพื่อกรองและวิเคราะห์สารโดยใช้ HPLC

จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยหัวข้อ วิธีวิเคราะห์ปริมาณโคลเบทาซอลโพรพิโอเนตในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ได้ทำการสกัด Clobetasol propionate จากผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง⁽⁸⁾ ซึ่งมีวิธีการสกัดเพื่อเตรียมเป็น

สารละลายตัวอย่างโดย ชั่งตัวอย่าง 2.5 กรัม ใส่ลงหลอดทดลองแล้วเติม methanol 10 mL คนให้เข้ากันแล้วนำไป sonicate ใน ultrasonic bath 10 นาที และ centrifuge ที่ความเร็ว 4000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มากรองด้วย nylon syringe filter 0.45 ไมโครเมตร หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

1.2 การสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid-phase extraction, SPE)

การสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งเป็นเทคนิคการแยกที่เกิดระหว่างของแข็ง คือ absorbent ที่อยู่ใน cartridge กับของเหลวหรือ solvent เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสำหรับการแยกและการเพิ่มความเข้มข้นให้กับสารตัวอย่าง ถ้าสารตัวอย่างมีขี้สามารถ load สารตัวอย่างผ่านลงใน small tube ที่ภายในบรรจุด้วย porous solid particles หรืออาจใช้ membrane disk ที่บรรจุด้วย sorbent ที่เหมาะสม เทคนิคนี้ใช้ตัวทำละลายน้อย ใช้เวลาไม่นาน และมีประสิทธิภาพการสกัดสูง

จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยหัวข้อ Development of a tandem thin-layer chromatography-high-performance liquid chromatography method for the identification and determination of corticosteroids in cosmetic products⁽¹³⁾ เป็นการทดลองเพื่อหาเทคนิคและพัฒนาวิธีวิเคราะห์ของการหา Corticosteroid ที่ผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในท้องตลาด โดยการใช้ TLC เพื่อคัดกรองและใช้ HPLC คู่กับการสกัดแยกสารด้วยวิธี SPE โดยมีวิธีการเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC คู่กับวิธีการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (SPE) จากการชั่งผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง 1 กรัม สกัดด้วย methanol หรือ methanol-dichloromethane 1:9 (v/v) นำสารแขวนตะกอนที่ได้ไป sonicate ใน ultrasonic bath ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไป centrifuge แยกส่วนใสด้านบนมาสกัดแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วย SPE โดยมีขั้นตอนดังนี้ การปรับสถานะของ SPE (SPE conditioning) ปรับโดยการเติม methanol 3 mL จากนั้นตามด้วยน้ำ 3 mL ใช้ระบบ vacuum ในการชะสารละลายผ่าน cartridge, ขั้นตอนการบรรจุสาร (load) นำส่วนใสด้านบน (supernatants) 5 mL แล้วใช้ระบบ vacuum ในการชะสารละลายผ่าน cartridge, ขั้นตอนการล้าง (wash) ล้างโดยใช้สารละลายผสม acetone-water (1:4, v/v) 4 mL และ 1 mL ของ hexane, ในขั้นตอนการชะสาร (elute) ทำได้โดยใช้ ethyl ether 4 mL ชะสารที่ต้องการ นำสารละลายที่ได้จากวิธี SPE ไประเหยให้แห้งและนำ

residue มาละลายใหม่โดยใช้ methanol 5 mL หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้มารองและนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

2. โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC)

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบที่สนใจที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่างวัฏภาค 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคคงที่ (Stationary phase) กับ วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) สารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารกับวัฏภาคเคลื่อนที่หรือวัฏภาคคงที่ โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้จะถูกตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณ แสดงผลในลักษณะเป็นพีค เรียกว่า โครมาโทแกรม ระยะเวลาที่สารแต่ละชนิดถูกหน่วงเหนี่ยวไว้กับวัฏภาคคงที่ (retention time) หรือ ตำแหน่งของพีคที่ปรากฏบนโครมาโทแกรมสามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และพื้นที่ใต้พีคหรือความสูงของพีคใช้ประโยชน์ด้านการวิเคราะห์เชิงปริมาณ⁽¹⁰⁾

2.1 ส่วนประกอบ

- 2.1.1 Mobile phase / Solvent: หรือตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่าง เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่คอลัมน์
- 2.1.2 Stationary phase: เพื่อให้เกิดกระบวนการแยกภายในคอลัมน์ (column)
- 2.1.3 Degaser: ทำหน้าที่กำจัดฟองอากาศ อากาศที่มีอยู่ใน Mobile phase เพื่อไม่ให้ฟองอากาศเข้าสู่ column และ detector
- 2.1.4 Pump: ทำหน้าที่ดึงตัวทำละลาย (Mobile phase) เข้าสู่ระบบ HPLC เนื่องจากในการแยกสารผสมในเทคนิค HPLC จะอาศัยหลักการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคคงที่ที่มีขนาดอนุภาคเล็กมาก จึงทำให้เกิดความต้านทานการไหล ระบบปั๊มจึงมีความสำคัญมากในการที่จะทำให้เกิดความดันสูงเพื่อที่จะเอาชนะแรงต้านทาน
- 2.1.5 Injector / Autosampler: ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบ HPLC

- 2.1.6 Column: หรือจะเรียกว่า Stationary phase มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล เป็นวัฏภาคคงที่ ทำหน้าที่ให้เกิดกระบวนการแยกของสารที่สนใจ โดยกระบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่าง Mobile phase กับ Stationary phase
- 2.1.7 Detector: คือ ตัวตรวจวัดสัญญาณ ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก มีหลายชนิดด้วยกัน การเลือกใช้ขึ้นอยู่กับตัวอย่างที่สนใจว่าสามารถตอบสนองกับ Detector ชนิดไหนได้ดี

2.2 พารามิเตอร์และสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

โดยผู้วิจัยได้ทำการทบทวนจากวรรณกรรม ดังต่อไปนี้

- 2.2.1 Monitoring of clobetasol propionate and betamethasone dipropionate as undeclared steroids in cosmetic products manufactured in Korea⁽¹⁴⁾
- 2.2.2 วิธีวิเคราะห์ปริมาณโคลเบทาซอลโพรพิโอเนตในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ได้ทำการสกัด Clobetasol propionate จากผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง⁽⁸⁾
- 2.2.3 HPLC-UV Method for the Identification and Screening of Hydroquinone, Ethers of Hydroquinone and Corticosteroids Possibly Used as Skin-Whitening Agents in Illicit Cosmetic Products⁽⁷⁾
- 2.2.4 Development of a tandem thin-layer chromatography–high-performance liquid chromatography method for the identification and determination of corticosteroids in cosmetic products⁽¹³⁾

ได้สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ ดังนี้

- HPLC column
จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าทุกงานวิจัย^(7,8,13,14) ใช้ reverse phase column C18 ในการแยกสารสเตียรอยด์
- Injection volume
10 μ L

■ Detector

เครื่องตรวจวัดสารในระบบ HPLC ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยเครื่องตรวจวัดที่ใช้ในสภาวะการวิเคราะห์ใช้เป็น Photodiode array detector (PDA) ซึ่งจะเป็นการตรวจวัดสารที่สามารถดูดกลืนแสง UV-Vis ได้ และสามารถตรวจวัดหลายความยาวคลื่นในเวลาเดียวกันเก็บข้อมูล โดยจากงานวิจัยได้ใช้ความยาวคลื่นอยู่ที่ 240 nm และ 254 nm

■ Mobile phase

จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยหัวข้อวิธีวิเคราะห์ปริมาณโคลเบทาซอลโพรพิโอเนตในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี⁽⁸⁾ ได้มีการใช้ Mobile phase คือ Water : Acetonitrile แบบ gradient system ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์สแตียรอยด์เพียงตัวเดียว

ตารางที่ 1 แสดง Solvent elution gradients (acetonitrile : water)

เวลา (นาที)	acetonitrile : water (โดยปริมาตร)
0	33 : 67
10	33 : 67
20	50 : 50
35	50 : 50
35.1	33 : 67
45	33 : 67

จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยหัวข้อ Development of a tandem thin-layer chromatography–high-performance liquid chromatography method for the identification and determination of corticosteroids in cosmetic products⁽¹³⁾ ได้มีการใช้ Mobile phase คือ Water : Acetonitrile

จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยหัวข้อ Monitoring of clobetasol propionate and betamethasone dipropionate as undeclared steroids in

cosmetic products manufactured in Korea⁽¹⁴⁾ ได้มีการใช้ Mobile phase คือ 0.1% Phosphoric acid in water : Acetonitrile แบบ gradient system

ตารางที่ 2 แสดง Solvent elution gradients (0.1% Phosphoric acid in water : Acetonitrile)

เวลา (นาที)	A (0.1% Phosphoric acid in water)	B (Acetonitrile)
0	80%	20%
10	50%	50%
20	0%	100%
25	80%	20%

จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยหัวข้อ HPLC-UV Method for the Identification and Screening of Hydroquinone, Ethers of Hydroquinone and Corticosteroids Possibly Used as Skin-Whitening Agents in Illicit Cosmetic Products⁽⁷⁾ ได้มีการใช้ Mobile phase คือ 0.1% HCOOH in water : Acetonitrile

ตารางที่ 3 แสดง Solvent elution gradients (Main solvent gradient and Complementary solvent gradient)

เวลา (นาที)	Water, HCOOH 0.1%(%v/v)	Acetonitrile, HCOOH 0.1%(%v/v)
Main solvent gradient (A)		
0	95	5
2	95	5
7	60	40
25	60	40
45	30	70
46	95	5
50	95	5
Complementary solvent gradient (B)		
0	90	10
2	90	10
45	70	30
46	90	10
50	90	10

จาก US Pharmacopoeia 2020 USP43-NF 38 ได้มีการใช้ Mobile phase คือ

- Triamcinolone acetonide cream: Water and Acetonitrile (70:30)
- Betamethasone valerate cream: Water (Solution A) and Acetonitrile (Solution B)

ตารางที่ 4 แสดง Solvent elution gradients (Solution A and solution B)

Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0.0	63	37
7.0	63	37
15.0	30	70
19.0	30	70
19.1	10	90
21.0	10	90
21.1	63	37
25.0	63	37

- Clobetasol propionate cream: Acetonitrile, methanol, and Buffer (95:20:85)

งานวิจัยส่วนใหญ่และ pharmacopoeia ได้มีการใช้ Water และ Acetonitrile เป็น mobile phase ในการแยกสารที่เป็นสเตียรอยด์

3. คุณลักษณะที่แสดงความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Typical validation characteristics)^(15,16)

เป็นหลักฐานที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) เพื่อใช้ในการยืนยันถึงผลข้อมูลที่ได้มา ซึ่งแสดงถึงคุณภาพและระดับความน่าเชื่อถือของการทดสอบภายใต้เงื่อนไข โดยจะเป็นการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาของขึ้นเอง ซึ่งมีการตรวจสอบดังนี้

3.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and range)⁽¹⁵⁾

เป็นคุณลักษณะเฉพาะของวิธีทดสอบที่แสดงความสัมพันธ์อย่างเป็นสัดส่วนโดยตรงระหว่างปริมาณที่ทราบค่าแน่นอนกับปริมาณจากการวัด (สัญญาณตอบสนอง) ซึ่งการทดสอบความเป็นเส้นตรงแสดงความสามารถของวิธีที่ให้ค่าสัญญาณของเครื่องมือวัดที่เป็น

สัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่สนใจ โดยการทดสอบความเป็นเส้นตรง จำเป็นต้องมีการตรวจสอบสำหรับวิธีที่มีช่วงการทดสอบหรือช่วงการใช้งานที่กว้าง โดยต้องประเมินช่วงของการวิเคราะห์ (range) ที่ระบุสำหรับการวิเคราะห์ โดยทั่วไปจะทำได้โดยการเตรียมสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่างกันอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น จากนั้นคำนวณหาสมการเส้นตรงของกราฟเทียบมาตรฐาน (calibration equation) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟและหาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient) ใช้สัญลักษณ์ r หรือ R แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของกราฟ โดยกราฟเส้นตรงที่ดีควรมีค่า R ใกล้เคียง 1

จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยหัวข้อ Monitoring of clobetasol propionate and betamethasone dipropionate as undeclared steroids in cosmetic products manufactured in Korea⁽¹⁴⁾ เป็นการติดตามการใส่สารสเตียรอยด์ชนิด clobetasol propionate และ betamethasone dipropionate ในเครื่องสำอางในประเทศเกาหลี โดยการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในหัวข้อ linearity และ range มีช่วงความเข้มข้นสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ 0.5-10 $\mu\text{g/mL}$ (0.5, 2.5 และ 10 $\mu\text{g/mL}$) และค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ที่มากกว่า 0.999

จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยหัวข้อ วิธีวิเคราะห์ปริมาณโคลเบทาซอลโพรพิโอเนตในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี⁽⁸⁾ มีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในหัวข้อ linearity และ range มีช่วงความเข้มข้นสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ 0.8-60 $\mu\text{g/mL}$ (0.8, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 $\mu\text{g/mL}$) และค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ไม่น้อยกว่า 0.995

3.2 การทดสอบความถูกต้องแม่นยำ (Accuracy)⁽¹⁵⁾

เป็นคุณลักษณะที่บ่งชี้ว่าผลการทดสอบมีค่าใกล้เคียงกับค่าจริง (trueness) หรือค่าที่ยอมรับได้ (accepted value) โดยแสดงจากความใกล้เคียงกันระหว่างค่าที่ได้จากการวิเคราะห์กับค่าจริงหรือค่าที่ยอมรับได้ โดยประเมินจาก spiked sample แล้วทำทดสอบตามวิธีวิเคราะห์อย่างน้อย 3 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง จากนั้นคำนวณหาร้อยละ

การคืนกลับ (% recovery) โดยเกณฑ์การยอมรับขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวอย่าง โดยเกณฑ์ยอมรับของร้อยละการคืนกลับคืนตามมาตรฐานทางอาหารและยา แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงเกณฑ์การยอมรับของร้อยละการคืนกลับคืนตามมาตรฐานทางอาหารและยา (AOAC 20th edition, 2016)⁽¹⁷⁾

ความเข้มข้น	ร้อยละการคืนกลับเฉลี่ย (mean recovery, %)
100	98-102
10	
1	97-103
0.1	95-105
0.01	90-107
0.001	80-110
0.0001	
0.00001	
0.000001	60-115
0.0000001	40-120

จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยหัวข้อ Development and Validation Method for Simultaneous Analysis of Retinoic Acid, Hydroquinone and Corticosteroid in Cream Formula by High-Performance Liquid Chromatography⁽¹⁸⁾ การวิเคราะห์ในหัวข้อการทดสอบความถูกต้องแม่นยำทำการวิเคราะห์จาก spiked sample ที่ระดับความเข้มข้นที่ 0.5, 1.0 และ 1.5 เท่า ของค่าความเข้มข้นที่กำหนด จากนั้นคำนวณหาร้อยละของการคืนกลับของการทดสอบแต่ละซ้ำ

จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยหัวข้อ Monitoring of clobetasol propionate and betamethasone dipropionate as undeclared steroids in cosmetic products manufactured in Korea⁽¹⁴⁾ มีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในหัวข้อการทดสอบความถูกต้องแม่นยำ วิเคราะห์จาก spiked sample ได้แก่ clobetasol propionate และ betamethasone dipropionate ที่ระดับความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น คือ 0.5, 2.5 และ 10 µg/mL ซึ่งรายงานผลของร้อยละการคืนกลับเฉลี่ย

(% mean recovery) ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 2.5 และ 10 µg/mL ของสารมาตรฐานทั้ง 2 ชนิด แสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงผลของร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ย (% mean recovery)

Analytes	ร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ย (% mean recovery)		
	0.5 µg/mL	2.5 µg/mL	10 µg/mL
Clobetasol propionate	97.69±2.73	95.69±1.69	94.43±1.56
Betamethasone dipropionate	93.91±2.41	94.73±3.19	95.31±2.20

3.3 ความเที่ยงตรง (Precision)⁽¹⁵⁾

เป็นคุณลักษณะที่แสดงความสามารถในการทดสอบตัวอย่างซ้ำ ๆ ครั้งแล้วให้ผลใกล้เคียงกันโดยความเที่ยงตรงแสดงความใกล้เคียงกันระหว่างค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวจากการทดสอบซ้ำ ๆ หลายครั้ง ภายใต้เงื่อนไขที่ถูกระบุไว้ของการทดสอบ อย่างไรก็ตามความเที่ยงตรงไม่ได้บอกถึงความแม่นยำของผลการทดสอบ แต่เป็นค่าที่บ่งชี้ว่าการทดสอบมีความสม่ำเสมอและเที่ยงตรงในระดับใดเมื่อมีการทดสอบซ้ำหลาย ๆ ครั้ง โดยจะมีเงื่อนไขที่ถูกระบุของการวัดความเที่ยงตรงดังนี้

3.3.1 เงื่อนไขการทวนซ้ำได้ของการวัด (Repeatability)

เป็นสภาวะการทดสอบที่ทำในสภาวะเดิมทั้งหมด การวิเคราะห์ซ้ำที่ทำในสภาวะเดียวกันโดยเงื่อนไขต่างๆที่รวมถึงวิธีดำเนินการวัดเดียวกัน เช่น ผู้ปฏิบัติงานคนเดียวกัน สถานที่ปฏิบัติงานเดียวกัน และการวัดซ้ำหลาย ๆ ครั้งบนวัตถุเดิมหรือที่มีลักษณะคล้ายเดิมในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ ระยะเวลาหนึ่ง จากการตรวจสอบสภาวะนี้ชี้ให้เห็นคุณลักษณะวิธีได้ แต่ไม่สามารถใช้ควบคุมสภาวะการทดสอบระยะยาวได้

3.3.2 เงื่อนไขความเที่ยงระดับกลางของการวัด (Intermediate precision)

คือการแสดงความเที่ยงของการวิเคราะห์ชุดการวิเคราะห์ที่ทำซ้ำ โดยมีเงื่อนไขของการวัดหนึ่งจากชุดของเงื่อนไขต่าง ๆ ที่รวมถึงวิธีดำเนินการวัดเดียวกัน ผู้ปฏิบัติงานคนเดียวกัน ระบบวัดเดียวกัน ภาชนะปฏิบัติงานเดียวกันและสถานที่ปฏิบัติงานเดียวกัน และการวัดซ้ำหลาย ๆ ครั้งบนวัตถุเดิมหรือที่มีลักษณะคล้ายเดิมในช่วงระยะเวลาระยะหนึ่งที่ไม่

สิ้นจนเกินไป แต่อาจรวมถึงเงื่อนไขอื่นที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลง เช่น เปลี่ยนผู้ทดสอบ เพื่อให้ครอบคลุมการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นในสถานะการทำงานจริง ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ควบคุมคุณภาพการทดสอบในระยะยาวของห้องปฏิบัติการได้

โดยทั่วไปความเที่ยงตรงของการวัดจะถูกแสดงด้วยตัวเลขซึ่งบอกขนาดของความไม่เที่ยง ได้แก่ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) และนำมาคิดเป็นค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation; RSD) ซึ่งการประเมินและยอมรับผลการตรวจสอบความใช้ได้ของความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์มีเกณฑ์การยอมรับตามองค์กร AOAC international ดังที่แสดงในตารางที่ 7 ดังนี้

ตารางที่ 7 แสดงค่าแนะนำสำหรับการยอมรับความเที่ยงของสารที่สนใจที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (AOAC 20th edition 2016)⁽¹⁷⁾

Analyte %	Mass fraction (C)	Unit	%RSD
100	1	100%	1.3
10	10 ⁻¹	10%	1.9
1	10 ⁻²	1%	2.7
0.1	10 ⁻³	0.1%	3.7
0.01	10 ⁻⁴	100 ppm (mg/kg)	5.3
0.001	10 ⁻⁵	10 ppm (mg/kg)	7.3
0.0001	10 ⁻⁶	1 ppm (mg/kg)	11
0.00001	10 ⁻⁷	100 ppb (µg/kg)	15
0.000001	10 ⁻⁸	10 ppb (µg/kg)	21
0.0000001	10 ⁻⁹	1 ppb (µg/kg)	30

3.4 การทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD)⁽¹⁵⁾

เป็นขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ คือค่าความเข้มข้นหรือปริมาณต่ำสุดของตัวของสารที่สนใจในสารตัวอย่าง ที่วิธีวิเคราะห์จะสามารถตรวจวัดได้ ซึ่งระดับความเข้มข้นดังกล่าวต้องมากกว่าค่าความไม่แน่นอนที่ประเมินได้ ตามข้อแนะนำของ ICH ได้ระบุในเอกสาร Q2(R1) กำหนดวิธีการหาค่า LOD มี 3 แบบดังนี้

- Based on visual evaluation คือการประเมินด้วยการมองเห็น โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้น และหาค่าต่ำสุดของตัวอย่างที่วิธีวิเคราะห์สามารถตรวจวัดได้
- Based on signal-to-noise วิธีนี้สามารถใช้กับเทคนิคที่ให้ baseline noise เช่น เทคนิค HPLC โดยทำการเปรียบเทียบ signal ที่วัดได้จากตัวอย่างที่รู้ความเข้มข้นต่ำของสารที่วิเคราะห์กับตัวอย่างที่เป็น blank เรียกว่า signal-to-noise ratio โดยทั่วไปสำหรับ LOD ค่าที่ยอมรับคือ 3 หรือ 2 ต่อ 1
- Based on the standard deviation of the response on the slope เป็นวิธีการหา LOD จากส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณและความชันของกราฟมาตรฐาน จากสมการ

$$DL = \frac{3.3\sigma}{S}$$

เมื่อ σ คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ

s คือ ความชันของกราฟมาตรฐาน

จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยหัวข้อ วิธีวิเคราะห์ปริมาณโคลเบทาซอลโพรพิโอเนตในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี⁽⁸⁾ มีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในหัวข้อขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) โดยการฉีดสารละลายตัวอย่างที่เตรียมโดยเติมสารละลายมาตรฐาน clobetasol propionate ลงใน sample blank ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้ขนาดสัญญาณเป็น 3 เท่าของขนาดสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio) วิเคราะห์ซ้ำ 7 ครั้ง ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่ามีผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจสอบผลเท่ากับ 0.8 mg/kg

จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยหัวข้อ Monitoring of clobetasol propionate and betamethasone dipropionate as undeclared steroids in cosmetic products manufactured in Korea⁽¹⁴⁾ มีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในหัวข้อ LOD ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่ามีผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจสอบผลเท่ากับ 0.18 และ 0.20 µg/mL ใน clobetasol propionate และ betamethasone dipropionate ตามลำดับ

3.5 การทดสอบหาขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)⁽¹⁵⁾

เป็นปริมาณต่ำสุดของสารที่สนใจในสารตัวอย่างที่เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์สามารถตรวจวัดและอ่านค่าได้อย่างถูกต้องเที่ยงตรงในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยทั่วไปจะเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 10 เท่าของค่า SD ของ blank การหา LOQ มีหลายวิธี ได้แก่

- Based on visual evaluation คือการประเมินด้วยการมองเห็น โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้นและหาค่าต่ำสุดซึ่งสามารถหาปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ด้วยความเที่ยงและความแม่นยำที่เหมาะสม
- Based on signal-to-noise วิธีนี้สามารถใช้กับเทคนิคที่ให้ baseline noise เช่น เทคนิค HPLC โดยทำการเปรียบเทียบ signal ที่วัดได้จากตัวอย่างที่รู้ความเข้มข้นต่ำของสารที่วิเคราะห์กับตัวอย่างที่เป็น blank เรียกว่า signal-to-noise ratio โดยทั่วไปสำหรับ LOQ ค่าที่ยอมรับคือ 10 ต่อ 1
- Based on the standard deviation of the response on the slope

$$DL = \frac{10\sigma}{S}$$

เมื่อ σ คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ

s คือ ความชันของกราฟมาตรฐาน

จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยหัวข้อ วิธีวิเคราะห์ปริมาณโคลเบทาซอลโพรพิโอเนตในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี⁽⁸⁾ มีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในหัวข้อขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) ที่เตรียมโดยเติมสารละลายมาตรฐาน clobetasol propionate ลงใน sample blank ที่ระดับความเข้มข้นที่ให้ขนาดสัญญาณเป็น 10 เท่าของขนาดสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio) วิเคราะห์ซ้ำ 10 ครั้งแล้วคำนวณร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) ต้องอยู่ในช่วง 80-110 และร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ต้องไม่เกิน 8.8 ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่าค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 3.2 mg/kg โดยมี % recovery เฉลี่ยร้อยละ 90.3 และมีค่า %RSD เท่ากับร้อยละ 4.7

จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยหัวข้อ Monitoring of clobetasol propionate and betamethasone dipropionate as undeclared steroids in

cosmetic products manufactured in Korea⁽¹⁴⁾ มีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในหัวข้อ LOQ ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่ามีผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจสอบการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 0.59 และ 0.66 µg/mL ใน clobetasol propionate และ betamethasone dipropionate ตามลำดับ

3.6 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)⁽¹⁶⁾

เป็นความสามารถของวิธีที่สามารถแยกหรือวิเคราะห์เฉพาะสารที่สนใจเท่านั้น ออกจากสารปนเปื้อนอื่นในสารตัวอย่าง และสามารถตรวจแยกเฉพาะเจาะจงสำหรับสารที่สนใจออกจากสารประกอบอื่นในตัวอย่างภายใต้สภาวะการทดลองที่ระบุไว้ ซึ่งหากวิธีทดสอบสามารถทดสอบได้โดยไม่มีการรบกวนจากสารเจือปนทุกระดับ แสดงว่าวิธีนั้นมีความจำเพาะสูง

การตรวจสอบความเฉพาะเจาะจงของวิธีการวิเคราะห์ทำได้โดยการวัดตัวอย่างหลายชนิด ตั้งแต่สารมาตรฐานไปจนถึงการวัดสิ่งที่มีส่วนประกอบซับซ้อน ในกรณีนี้การทำการกลับคืนของสาร (% recovery) โดยการเติมสารที่ต้องการจะวัดลงในตัวอย่าง นอกจากการศึกษาเฉพาะเจาะจงแล้วยังต้องคำนึงถึงสารรบกวน (interfering substances) ด้วยซึ่งในบางครั้งสารรบกวนอาจทำให้ค่าที่วัดได้เพิ่มขึ้นและอาจไปรบกวนความแม่นยำของการวัดได้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- 1.1 HPLC Photodiode Array Detector (Shimadzu)
- 1.2 SPE cartridge with SPE vacuum manifold
- 1.3 Centrifuge
- 1.4 Vortex mixer
- 1.5 Nylon Syringe Filter 0.22 μ m
- 1.6 Steroid test kit
- 1.7 HPLC Column (C18, 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m)

2. สารเคมีที่ใช้

- 2.1 สารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide
- 2.2 สารมาตรฐาน Betamethasone valerate
- 2.3 สารมาตรฐาน Clobetasol propionate
- 2.4 เครื่องสำอางตัวอย่าง
- 2.5 Methanol
- 2.6 Acetonitrile
- 2.7 Water
- 2.8 Cream base
- 2.9 ตัวอย่างยาทาสเตียรอยด์ชนิดครีม
- 2.10 ตัวอย่างครีมในท้องตลาด

*สารเคมีที่ใช้เป็น HPLC grade

3. ทบทวนวรรณกรรม (Review literature)

เนื่องจากการทำงานวิจัยเกี่ยวข้องกับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับสารสเตียรอยด์ที่ปนเปื้อนในเครื่องสำอางได้ใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง โดยทำการหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ รวมถึงการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ จึงได้ทำการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องในเรื่องต่าง ๆ ได้แก่ สถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์ ระบบการวิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง การใช้วิธีการเตรียมสารตัวอย่างทั้งวิธีแบบดั้งเดิม (conventional) และวิธีการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (solid-phase extraction) เป็นต้น

4. การออกแบบการทดลอง (Design of experiment)

สถานะของเครื่อง HPLC

ใช้ระบบการแยกและวิเคราะห์สารแบบ Gradient Elution โดย Mobile phase ที่ใช้คือ Acetonitrile (ACN) และ Water โดยการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของ Mobile phase ในการวิเคราะห์เพื่อให้สามารถแยกสารสเตียรอยด์ทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้

HPLC column: C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m)

Detector: UV-PDA detector ที่ 240 nm และ 254 nm

Injection volume: 10 μ L

Flow rate: 1 mL/min

Mobile phase: Acetonitrile (ACN) : Water

ตารางที่ 8 แสดงอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่

Time (min)	ACN : Water
0	30 : 70
10	30 : 70
20	50 : 50
30	50 : 50
40	70 : 30
45	70 : 30
55	30 : 70

5. การวิเคราะห์สารมาตรฐาน

5.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

ชั่ง Triamcinolone acetonide, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate อย่างละ 5 mg ใส่ volumetric flask ขนาด 5 mL นำมาละลายด้วย methanol ปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ปิเปตสารละลายมา 1 mL ใส่ volumetric flask ขนาด 10 mL จากนั้นปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 10 mL จะได้สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.1 mg/mL และทำการเจือจางสารละลายมาตรฐานให้ได้ความเข้มข้น 0.5, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ จากนั้นนำไปกรองด้วย nylon syringe filter 0.22 μm เตรียมไปฉีด HPLC

5.2 การเตรียม spiked sample

ชั่ง Triamcinolone acetonide, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate อย่างละ 5 mg ใส่ volumetric flask ขนาด 5 mL นำมาละลายด้วย methanol ปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ปิเปตสารละลายมา 1 mL ใส่ volumetric flask ขนาด 10 mL จากนั้นปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 10 mL จะได้สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.1 mg/mL

ชั่ง cream base 1 g นำมาละลายด้วย methanol ประมาณ 2 mL แล้วเทลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL และเติมสารละลายมาตรฐานเพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 2.5, 10, 20, 30 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ จากนั้นปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 10 mL และนำไปปั่นผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer

5.2.1 วิธีการสกัดแบบดั้งเดิม (Conventional)

นำสารละลาย spiked sample ที่ 5 ความเข้มข้น ไป sonicate เป็นเวลา 15 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5500 rpm เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นดูดส่วนใสด้านบน และนำไปกรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.22 μm ฉีดเข้า HPLC

5.2.2 วิธีการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid-phase extraction, SPE)

นำสารละลาย spiked sample ที่ 5 ความเข้มข้น ไป sonicate เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่ลง SPE เพื่อสกัดสารมาตรฐาน โดยการสกัดด้วย

วิธี SPE เริ่มจากการชะ cartridge ด้วย methanol 3 mL และ water 3 mL ปิดสารละลายส่วนใสที่ได้มา 3 mL ลง cartridge และเติม 5% v/v methanol ลงไป 3 mL เพื่อกำจัดสารที่ไม่จับกับตัวดูดซับ และ elute สารสเตรอยด์ออกจาก cartridge ด้วย methanol 3 mL หลังจากนั้นนำไปกรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.22 μ m และฉีดเข้า HPLC

6. การประยุกต์ใช้

6.1 การวิเคราะห์ยาทาสเตรอยด์ชนิดครีมในท้องตลาด

ซังยาทาสเตรอยด์ชนิดครีม 0.5 g ใส่ในหลอดทดลอง ละลายด้วย methanol จากนั้นนำไปปรับปริมาตรใน volumetric flask ขนาด 5 mL และทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 30 μ g/mL ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer นำไป sonicate เป็นเวลา 15 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ 5500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบน จากนั้นนำไปกรองด้วย nylon syringe filter 0.22 μ m และฉีดเข้า HPLC

6.2 การวิเคราะห์ตัวอย่างครีมในท้องตลาด

6.2.1 การตรวจสอบสารสเตรอยด์เบื้องต้นโดยใช้ชุดทดสอบสเตรอยด์

นำเครื่องสำอางตัวอย่างมาตรวจสอบสารสเตรอยด์โดยใช้ชุดทดสอบสเตรอยด์เพื่อคัดกรองเบื้องต้น หากตรวจพบสารสเตรอยด์จะทำการสกัดแบบดั้งเดิมและฉีด HPLC ต่อไป เพื่อวิเคราะห์สารสเตรอยด์ที่ปนเปื้อนในเครื่องสำอาง

6.2.2 วิธีการสกัดแบบดั้งเดิม (Conventional)

ซังเครื่องสำอางตัวอย่าง 1 g ใส่ในหลอดทดลอง เติม methanol จำนวน 10 mL ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer นำไป sonicate เป็นเวลา 15 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ 5500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบน จากนั้นนำไปกรองด้วย nylon syringe filter 0.22 μ m และฉีดเข้า HPLC

6.2.3 วิธีการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid-phase extraction, SPE)

ซังเครื่องสำอางตัวอย่าง 1 g ใส่ในหลอดทดลอง เติม methanol จำนวน 10 mL ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer นำไป sonicate

เป็นเวลา 15 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ 5500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วน
ใสด้านบนนำไปลง SPE โดยการสกัดด้วยวิธี SPE เริ่มจากการทำการชะ
cartridge ด้วย methanol 3 mL และ water 3 mL ปิดเตาสารละลาย
ส่วนใสที่ได้ 3 mL ลง cartridge และเติม 5% v/v methanol ลงไป
3 mL เพื่อกำจัดสารที่ไม่จับกับตัวดูดซับ และ elute สารสเตรียรอยด์ออก
จาก cartridge ด้วย methanol 3 mL หลังจากนั้นนำไปกรองด้วย nylon
syringe filter 0.22 μ m และฉีดเข้า HPLC

7. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

7.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and range)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Triamcinolone acetonide, Betamethasone
valerate และ Clobetasol propionate ทั้งหมด 8 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.5, 2.5, 5, 10,
20, 30, 40 และ 50 μ g/mL แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC จากนั้นนำมาสร้างกราฟ
มาตรฐานหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟ และคำนวณหาค่า
สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r)

เตรียมสารละลาย spiked sample Triamcinolone acetonide,
Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ได้แก่
2.5, 10, 20, 30 และ 50 μ g/mL แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC จากนั้นนำมาสร้างกราฟ
มาตรฐานหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟ และคำนวณหาค่า
สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r)

7.2 การทดสอบความถูกต้องแม่นยำ (Accuracy)

นำสารละลายมาตรฐานและสารละลาย spiked sample ของ Triamcinolone
acetonide, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate ที่ 3 ความเข้มข้น
ได้แก่ 2.5, 20 และ 50 μ g/mL โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณทั้งหมดความเข้มข้นละ 3 ครั้ง
และคำนวณร้อยละของการคืนกลับ (% recovery)

7.3 การทดสอบความเที่ยงตรง (Precision)

7.3.1 Repeatability

- 1) เตรียมสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide, Betamethasone
valerate และ Clobetasol propionate ที่ 3 ความเข้มข้น คือ 2.5,

20 และ 50 µg/mL ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC และคำนวณร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

- 2) เตรียมสารละลาย spiked sample ของ Triamcinolone acetonide, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate ที่ 3 ความเข้มข้น คือ 2.5, 20 และ 50 µg/mL ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC และคำนวณร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

7.3.2 Intermediate precision

- 1) เตรียมสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate ที่ 3 ความเข้มข้น คือ 2.5, 20 และ 50 µg/mL ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง ทำ 3 วัน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC และคำนวณร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)
- 2) เตรียมสารละลาย spiked sample ของ Triamcinolone acetonide, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate ที่ 3 ความเข้มข้น คือ 2.5, 20 และ 50 µg/mL ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง ทำ 3 วัน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC และคำนวณร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

7.4 การทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection)

ค่า LOD หาได้จากการคำนวณจากสูตร

$$DL = \frac{3.3\sigma}{S}$$

σ = The standard deviation of the response

S = The slope of the calibration curve

และยืนยันค่า LOD โดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน Triamcinolone acetonide, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate ที่ระดับความเข้มข้นที่คำนวณได้ พร้อมทั้งรายงานค่า signal to noise ratio ณ ความเข้มข้นนั้น

7.5 การทดสอบหาขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (Limit of quantitation)

ค่า LOQ หาได้จากการคำนวณจากสูตร

$$DL = \frac{10\sigma}{S}$$

σ = The standard deviation of the response

S = The slope of the calibration curve

และยืนยันค่า LOQ โดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน Triamcinolone acetonide, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate ที่ระดับความเข้มข้นที่คำนวณได้ พร้อมทั้งรายงานค่า signal to noise ratio ณ ความเข้มข้นนั้น

7.6 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

นำสารละลายมาตรฐานและสารละลายสารละลาย spiked sample ของ Triamcinolone acetonide, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate ฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อศึกษา retention time จาก chromatogram โดยพีคของสารแต่ละชนิดจะต้องไม่ซ้อนทับกันและแยกออกจากสารรบกวนอื่นชัดเจน โดยเปรียบเทียบกับ cream base ที่ไม่มีสารตัวอย่าง หรือดูค่า peak purity จากโปรแกรมของเครื่อง HPLC

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ (Method development)

สภาวะของเครื่อง HPLC ใช้ระบบการแยกและวิเคราะห์สารแบบ Gradient Elution โดย Mobile phase ที่ใช้คือ Acetonitrile (ACN) และ Water โดยการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของ Mobile phase ในการวิเคราะห์เพื่อให้สามารถแยกสารสเตียรอยด์ทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้

HPLC column: C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m)

Detector: UV-PDA detector ที่ 240 nm และ 254 nm

Injection volume: 10 μ L

Flow rate: 1 mL/min

Mobile phase: Acetonitrile (ACN) : Water

ตารางที่ 8 แสดงอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่

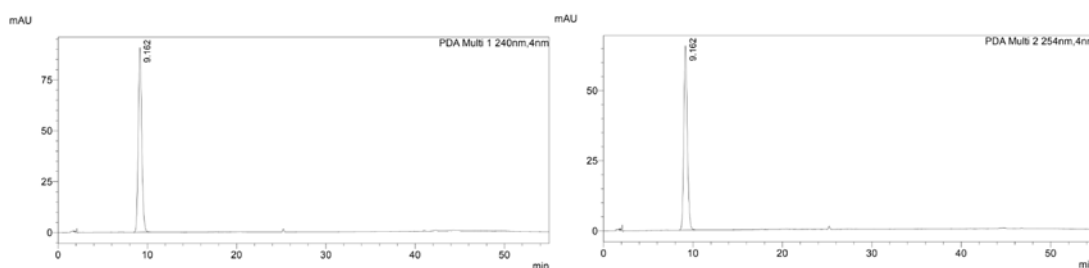
Time (min)	ACN : Water
0	30 : 70
10	30 : 70
20	50 : 50
30	50 : 50
40	70 : 30
45	70 : 30
55	30 : 70

ซึ่งจากการทดลองทดลองโดยใช้สภาวะของเครื่อง HPLC ดังที่กล่าวข้างต้น ในการทดสอบเพื่อแยกสารมาตรฐานทั้ง 3 ตัวโดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน Triamcinolone acetone, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate พบว่าสภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้

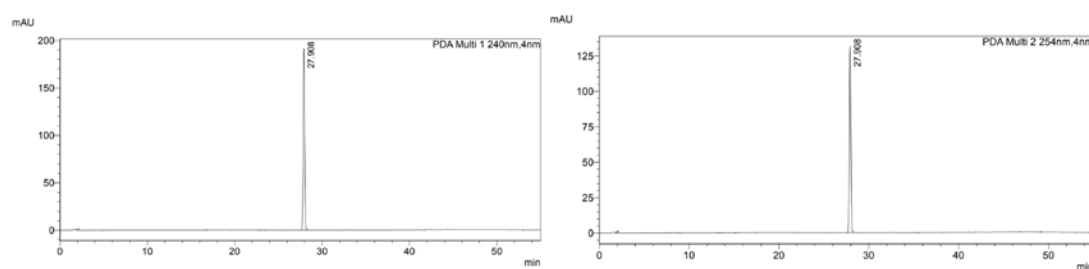
สามารถแยกสารมาตรฐานทั้ง 3 ตัวออกจากกันได้ชัดเจน สามารถดูได้จากค่า Retention time ซึ่งแสดงผลในตารางที่ 9 และ chromatogram ซึ่งแสดงในรูปที่ 1, 2 และ 3

ตารางที่ 9 แสดง Retention time ของสารมาตรฐานสเตียรอยด์

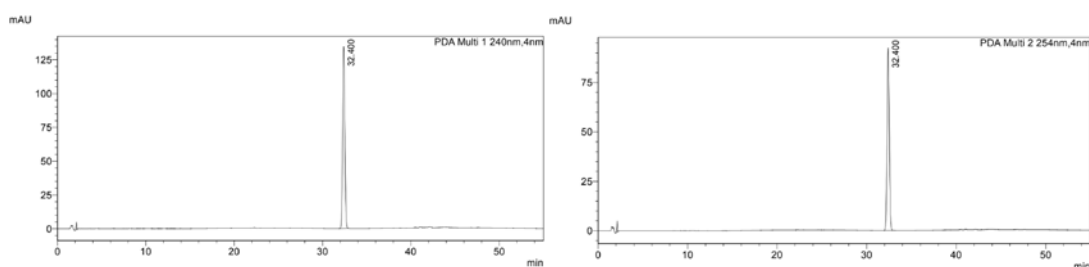
Standard	Retention time (min)	AUC	
		240 nm	254 nm
Triamcinolone acetonide	9.162	2489663	1800001
Betamethasone valerate	27.908	2289510	1574490
Clobetasol propionate	32.400	2280363	1564717



รูปที่ 1 แสดง chromatogram ของ Triamcinolone acetonide
ที่ 240 (ซ้าย) และ 254 (ขวา) nm



รูปที่ 2 แสดง chromatogram ของ Betamethasone valerate
ที่ 240 (ซ้าย) และ 254 (ขวา) nm



รูปที่ 3 แสดง chromatogram ของ Clobetasol propionate ที่ 240 (ซ้าย) และ 254 (ขวา) nm

จาก chromatogram ข้างต้นแสดงให้เห็นว่าพีคของสารมาตรฐานแต่ละชนิดไม่ซ้อนทับกัน และแยกออกจากกันชัดเจน โดยค่า Retention time ของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate มีค่าดังนี้ คือ 9.162, 27.908 และ 32.400 นาที ตามลำดับ โดยความยาวคลื่นที่ 240 nm จะพบค่า AUC มากกว่าที่ความยาวคลื่น 254 nm ดังนั้นในผลการวิเคราะห์ต่อจากนี้จะรายงานผลค่า AUC ที่ความเข้มข้น 240 nm

2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

ผลของการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ สามารถตรวจสอบได้จากการทำเป็น คุณลักษณะที่แสดงความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Typical validation characteristics) โดยมีหัวข้อ ดังนี้

2.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and range)

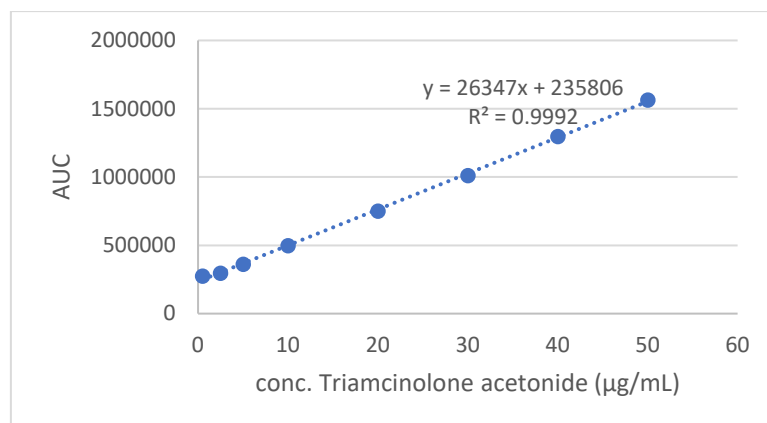
2.1.1 สารมาตรฐาน

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ของสารมาตรฐาน ได้ใช้ทั้งหมด 8 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.5, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 µg/mL

1) สารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide

ตารางที่ 10 แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide ที่ 8 ความเข้มข้น

สารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide			
ความเข้มข้น (µg/mL)	AUC 1	AUC 2	AUC เฉลี่ย
0.5	274509	275029	274769
2.5	294806	295290	295048
5	362189	360974	361581.5
10	497856	497907	497881.5
20	749079	750630	749854.5
30	1011372	1008574	1009973
40	1295810	1298151	1296980.5
50	1561497	1564770	1563133.5
สมการเส้นตรง: $y = 26347x + 235806$		$R^2 = 0.9992$ $R = 0.9996$	



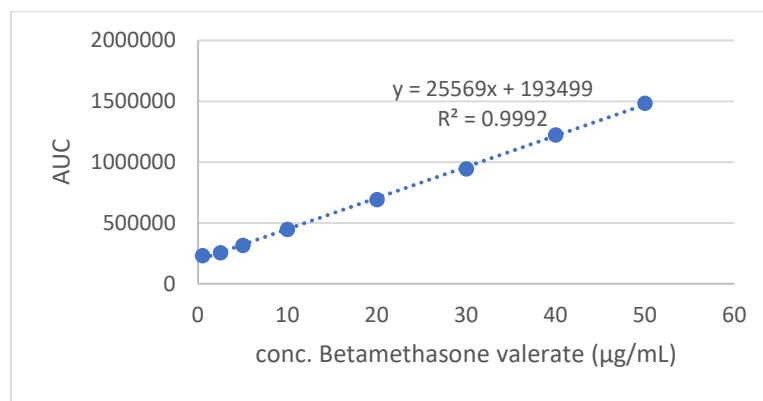
รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide กับพื้นที่ใต้กราฟ

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide ด้วยเครื่อง HPLC ได้ค่าพื้นที่ใต้กราฟแสดงดังตารางที่ 10 ซึ่งเมื่อนำค่าพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นมาพล็อตกราฟเส้นตรง ได้สมการ คือ $y = 26347x + 235806$ โดยมีค่า $R^2 = 0.9992$ และค่า $R = 0.9996$ แสดงดังรูปที่ 4

2) สารมาตรฐาน Betamethasone valerate

ตารางที่ 11 แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของสารมาตรฐาน Betamethasone valerate ที่ 8 ความเข้มข้น

สารมาตรฐาน Betamethasone valerate			
ความเข้มข้น (µg/mL)	AUC 1	AUC 2	AUC เฉลี่ย
0.5	230636	230515	230575.5
2.5	252951	253225	253088
5	315789	315540	315664.5
10	447107	447796	447451.5
20	691075	692262	691668.5
30	944244	942208	943226
40	1222132	1224921	1223526.5
50	1481388	1484134	1482761
สมการเส้นตรง: $y = 25569x + 193499$		$R^2 = 0.9992$ $R = 0.9996$	



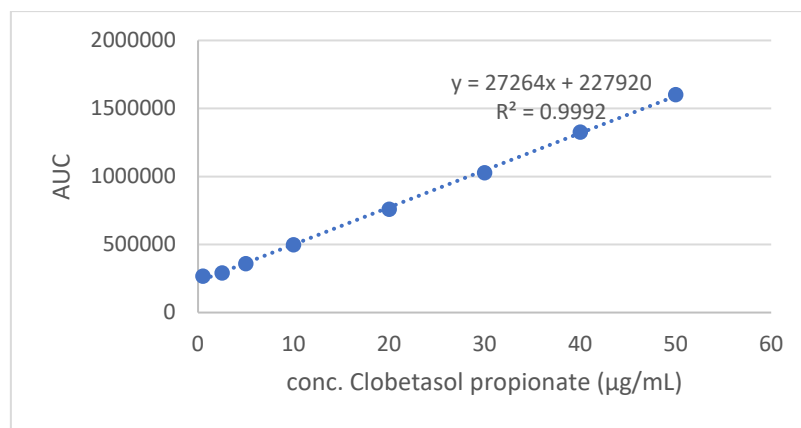
รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Betamethasone valerate กับพื้นที่ใต้กราฟ

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ของสารมาตรฐาน Betamethasone valerate ด้วยเครื่อง HPLC ได้ค่าพื้นที่ใต้กราฟแสดงดังตารางที่ 11 ซึ่งเมื่อนำค่าพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นมาพล็อตกราฟเส้นตรง ได้สมการ คือ $y = 25569x + 193499$ โดยมีค่า $R^2 = 0.9992$ และค่า $R = 0.9996$ แสดงดังรูปที่ 5

3) สารมาตรฐาน Clobetasol propionate

ตารางที่ 12 แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของสารมาตรฐาน Clobetasol propionate ที่ 8 ความเข้มข้น

สารมาตรฐาน Clobetasol propionate			
ความเข้มข้น (µg/mL)	AUC 1	AUC 2	AUC เฉลี่ย
0.5	267237	267552	267394.5
2.5	290648	291201	290924.5
5	358715	358340	358527.5
10	498675	498140	498407.5
20	759068	760128	759598
30	1028506	1026789	1027647.5
40	1324997	1328267	1326632
50	1598366	1605625	1601995.5
สมการเส้นตรง: $y = 27264x + 227920$		$R^2 = 0.9992$ $R = 0.9996$	



รูปที่ 6 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Clobetasol propionate กับ พื้นที่ใต้กราฟ

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ของสารมาตรฐาน Clobetasol propionate ด้วยเครื่อง HPLC ได้ค่าพื้นที่ใต้กราฟแสดงดังตารางที่ 12 ซึ่งเมื่อนำค่าพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นมาพล็อตกราฟเส้นตรง ได้สมการ คือ $y = 27264x + 227920$ โดยมีค่า $R^2 = 0.9992$ และค่า $R = 0.9996$ แสดงดังรูปที่ 6

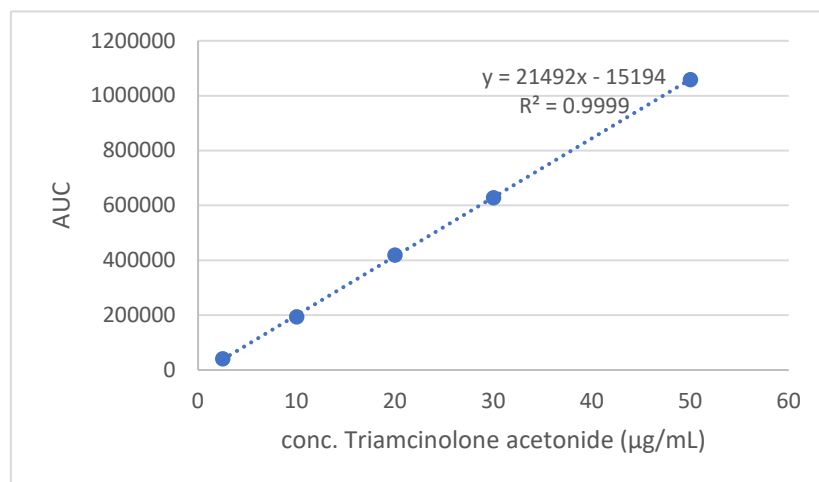
2.1.2 สารละลาย spiked sample โดยใช้วิธีการสกัดแบบดั้งเดิม

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ของสารละลาย spiked sample ได้ใช้ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 2.5, 10, 20, 30, 40 และ 50 µg/mL

1) Triamcinolone acetonide (spiked)

ตารางที่ 13 แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของ Triamcinolone acetonide (spiked) ที่ 5 ความเข้มข้น

Triamcinolone acetonide (spiked)			
ความเข้มข้น (µg/mL)	AUC 1	AUC 2	AUC เฉลี่ย
2.5	40573	41620	41096.5
10	193644	194077	193860.5
20	421618	417115	419366.5
30	627357	628848	628102.5
50	1058688	1060132	1059410
สมการเส้นตรง: $y = 21492x - 15194$		$R^2 = 0.9999$ $R = 0.9999$	



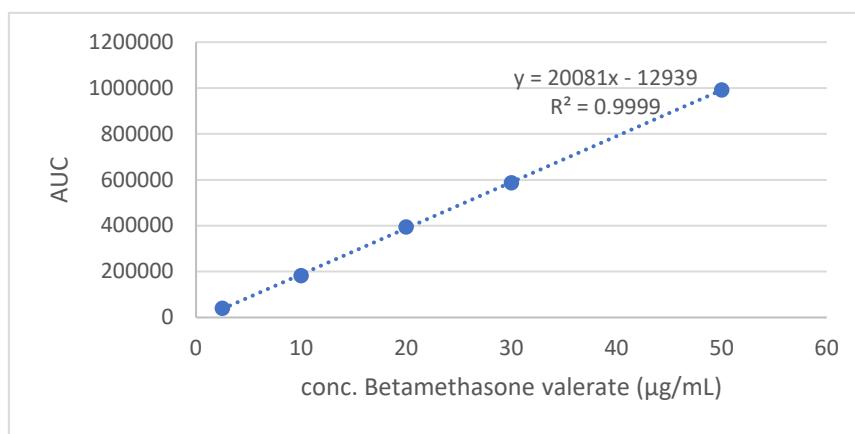
รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของ Triamcinolone acetonide (spiked) กับพื้นที่ใต้กราฟ

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ของ Triamcinolone acetonide (spiked) ด้วยเครื่อง HPLC ได้ค่าพื้นที่ใต้กราฟแสดงดังตารางที่ 13 ซึ่งเมื่อนำค่าพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นมาพล็อตกราฟเส้นตรง ได้สมการ คือ $y = 21492x - 15194$ โดยมีค่า $R^2 = 0.9999$ และค่า $R = 0.9999$ แสดงดังรูปที่ 7

2) Betamethasone valerate (spiked)

ตารางที่ 14 แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของ Betamethasone valerate (spiked) ที่ 5 ความเข้มข้น

Betamethasone valerate (spiked)			
ความเข้มข้น (µg/mL)	AUC 1	AUC 2	AUC เฉลี่ย
2.5	39512	39564	39538
10	181298	182046	181672
20	395213	393995	394604
30	587718	587461	587589.5
50	989673	992321	990997
สมการเส้นตรง: $y = 20081x - 12939$		$R^2 = 0.9999$ $R = 0.9999$	



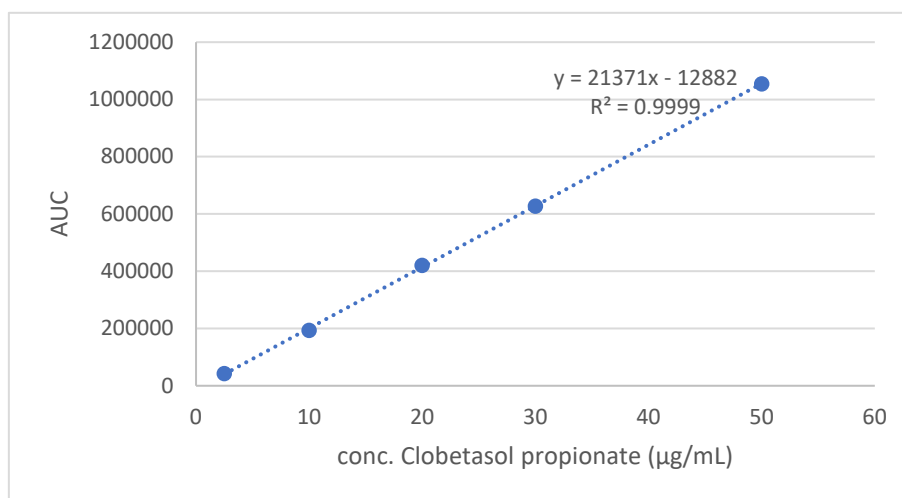
รูปที่ 8 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของ Betamethasone valerate (spiked) กับ พื้นที่ใต้กราฟ

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ของ Betamethasone valerate (spiked) ด้วยเครื่อง HPLC ได้ค่าพื้นที่ใต้กราฟแสดงดังตารางที่ 14 ซึ่งเมื่อนำค่าพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นมาพล็อตกราฟเส้นตรง ได้สมการ คือ $y = 20081x - 12939$ โดยมีค่า $R^2 = 0.9999$ และค่า $R = 0.9999$ แสดงดังรูปที่ 8

3) Clobetasol propionate (spiked)

ตารางที่ 15 แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของ Clobetasol propionate (spiked) ที่ 5 ความเข้มข้น

Clobetasol propionate (spiked)			
ความเข้มข้น (µg/mL)	AUC 1	AUC 2	AUC เฉลี่ย
2.5	42743	42601	42672
10	194343	193484	193913.5
20	420851	420651	420751
30	628216	627177	627696.5
50	1053851	1055710	1054780.5
สมการเส้นตรง: $y = 21371x - 12882$		$R^2 = 0.9999$ $R = 0.9999$	



รูปที่ 9 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของ Clobetasol propionate (spiked) กับ พื้นที่ใต้กราฟ

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ของ Clobetasol propionate (spiked) ด้วยเครื่อง HPLC ได้ค่าพื้นที่ใต้กราฟ แสดงดังตารางที่ 15 ซึ่งเมื่อนำค่าพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นมาพล็อต กราฟเส้นตรง ได้สมการ คือ $y = 21371x - 12882$ โดยมีค่า $R^2 = 0.9999$ และค่า $R = 0.9999$ แสดงดังรูปที่ 9

2.2 การทดสอบความถูกต้องแม่นยำ (Accuracy)

2.2.1 สารมาตรฐาน

1) สารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide

ตารางที่ 16 แสดง % recovery ของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide

ที่ 3 ความเข้มข้น

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ความเข้มข้นเฉลี่ย ($\mu\text{g/mL}$)	% Recovery
2.5	1	295048	2.248529244	2.31279336	92.51173442
	2	296508	2.303943523		
	3	298667.5	2.385907314		
20	1	749854.5	19.51070331	20.10874736	100.5437368
	2	756514.5	19.76348351		
	3	790464.5	21.05205526		
50	1	1563133.5	50.37869587	50.53629762	101.0725952
	2	1569882.5	50.63485406		
	3	1568841.5	50.59534292		

จากการทดสอบความถูกต้องแม่นยำของสารมาตรฐาน

Triamcinolone acetonide พบว่าที่ความเข้มข้น 2.5 $\mu\text{g/mL}$ มี % recovery อยู่ที่ 92.52% ที่ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/mL}$ มี % recovery อยู่ที่ 100.54% และที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ มี % recovery อยู่ที่ 101.07%

2) สารมาตรฐาน Betamethasone valerate

ตารางที่ 17 แสดง % recovery ของสารมาตรฐาน Betamethasone valerate

ที่ 3 ความเข้มข้น

ความเข้มข้น (µg/mL)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (µg/mL)	% Recovery
2.5	1	253088	2.330517423	2.309697942	92.38791766
	2	251224.5	2.2576362		
	3	253354.5	2.340940201		
20	1	691668.5	19.4833392	19.94737117	99.73685583
	2	694942.5	19.61138488		
	3	723989	20.74738942		
50	1	1482761	50.4228558	50.48509914	100.9701983
	2	1486648.5	50.57489538		
	3	1483648	50.45754625		

จากการทดสอบความถูกต้องแม่นยำของสารมาตรฐาน

Betamethasone valerate พบว่าที่ความเข้มข้น 2.5 µg/mL มี %

recovery อยู่ที่ 92.39% ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มี % recovery อยู่ที่

99.74% และที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มี % recovery อยู่ที่ 100.97%

3) สารมาตรฐาน Clobetasol propionate

ตารางที่ 18 แสดง % recovery ของสารมาตรฐาน Clobetasol propionate

ที่ 3 ความเข้มข้น

ความเข้มข้น (µg/mL)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (µg/mL)	% Recovery
2.5	1	290924.5	2.310904489	2.339635906	93.58543623
	2	290897	2.309895833		
	3	293302	2.398107394		
20	1	759598	19.50110035	20.09222173	100.4611087
	2	767381.5	19.78658671		
	3	800163.5	20.98897814		
50	1	1601995.5	50.39889598	50.58123044	101.1624609
	2	1610143	50.69773327		
	3	1608761.5	50.64706206		

จากการทดสอบความถูกต้องแม่นยำของสารมาตรฐาน
Clobetasol propionate พบว่าที่ความเข้มข้น 2.5 µg/mL มี
% recovery อยู่ที่ 93.59% ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มี % recovery
อยู่ที่ 100.46% และที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มี % recovery อยู่ที่
101.16%

2.2.2 Spiked sample โดยใช้วิธีการสกัดแบบดั้งเดิม

1) Triamcinolone acetone (spiked)

ตารางที่ 19 แสดง % recovery ของ Triamcinolone acetone (spiked)

ที่ 3 ความเข้มข้น

ความเข้มข้น (µg/mL)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (µg/mL)	% Recovery
2.5	1	62740.5	2.630787648	2.615090154	104.6036062
	2	62203	2.60897618		
	3	62117.5	2.605506635		
20	1	419366.5	20.13559847	20.18622636	100.9311318
	2	421165.5	20.2213877		
	3	420752.5	20.20169289		
50	1	1059410	50.65746304	49.94079638	99.88159275
	2	1036699	49.57443968		
	3	1037035.5	49.59048641		

จากการทดสอบความถูกต้องแม่นยำของ Triamcinolone
acetone (spiked) พบว่าที่ความเข้มข้น 2.5 µg/mL มี % recovery
อยู่ที่ 104.60% ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มี % recovery อยู่ที่
100.93% และที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มี % recovery อยู่ที่ 99.88%

2) Betamethasone valerate (spiked)

ตารางที่ 20 แสดง % recovery ของ Betamethasone valerate (spiked)

ที่ 3 ความเข้มข้น

ความเข้มข้น (µg/mL)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (µg/mL)	% Recovery
2.5	1	58201	2.828256585	2.758234785	110.3293914
	2	55785	2.720032252		
	3	55927.5	2.726415517		
20	1	394604	20.03057672	20.00457473	100.0228737
	2	394390	20.019779		
	3	393272	19.96336848		
50	1	990997	50.12255916	49.36021831	98.72043662
	2	969642.5	49.045083		
	3	967025	48.91301277		

จากการทดสอบความถูกต้องแม่นยำของ Betamethasone valerate (spiked) พบว่าที่ความเข้มข้น 2.5 µg/mL มี % recovery อยู่ที่ 110.33% ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มี % recovery อยู่ที่ 100.02% และที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มี % recovery อยู่ที่ 98.72%

3) Clobetasol propionate (spiked)

ตารางที่ 21 แสดง % recovery ของ Clobetasol propionate (spiked)

ที่ 3 ความเข้มข้น

ความเข้มข้น (µg/mL)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (µg/mL)	% Recovery
2.5	1	58411.5	2.763689215	2.753661724	110.146469
	2	58069	2.748253639		
	3	58086.5	2.749042318		
20	1	420751	20.33261131	20.34209386	101.7104693
	2	421405	20.36409146		
	3	420688	20.32957882		
50	1	1054780.5	50.85148014	50.23316486	100.4663297
	2	1034745.5	49.88709988		
	3	1036279	49.96091456		

จากการทดสอบความถูกต้องแม่นยำของ Clobetasol propionate (spiked) พบว่าที่ความเข้มข้น 2.5 µg/mL มี % recovery อยู่ที่ 110.15% ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มี % recovery อยู่ที่ 101.71% และที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มี % recovery อยู่ที่ 100.47%

2.3 การทดสอบความเที่ยงตรง (Precision)

2.3.1 Repeatability

1) สารมาตรฐาน

(1) สารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide

ตารางที่ 22 แสดง %RSD ของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide ที่ 3 ความเข้มข้น

ความเข้มข้น (µg/mL)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (µg/mL)	SD	%RSD
2.5	1	74623	3.059071961	3.051320023	0.01349806357	0.442368007
	2	74624.5	3.059154234			
	3	74197.5	3.035733875			
20	1	378060	19.70217201	19.72362696	0.02165416786	0.1097879609
	2	378444	19.72323387			
	3	378849.5	19.74547499			
50	1	931901.5	50.07961277	50.19785725	0.1304959231	0.2599631343
	2	933660.5	50.17609149			
	3	936610	50.33786749			

จากการทดสอบ Repeatability ของสารมาตรฐาน

Triamcinolone acetonide พบว่าที่ความเข้มข้น 2.5 µg/mL มี %RSD เท่ากับ 0.44% ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มี %RSD เท่ากับ 0.11% และที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มี %RSD เท่ากับ 0.26%

(2) สารมาตรฐาน Betamethasone valerate

ตารางที่ 23 แสดง %RSD ของสารมาตรฐาน Betamethasone valerate ที่ 3 ความเข้มข้น

ความเข้มข้น (µg/mL)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (µg/mL)	SD	%RSD
2.5	1	68904.5	3.040826239	3.040902425	0.02371302248	0.7798021498
	2	68491.5	3.017227587			
	3	69321.5	3.064653448			
20	1	360726.5	19.71541626	19.62539283	0.08028830959	0.4091042165
	2	358699	19.59956574			
	3	358027.5	19.5611965			
50	1	892670.5	50.1104794	50.13760166	0.1476716746	0.2945327853
	2	890831	50.00537112			
	3	895934	50.29695446			

จากการทดสอบ Repeatability ของสารมาตรฐาน

Betamethasone valerate พบว่าที่ความเข้มข้น 2.5 µg/mL มี

%RSD เท่ากับ 0.78% ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มี %RSD

เท่ากับ 0.41% และที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มี %RSD เท่ากับ

0.29%

(3) สารมาตรฐาน Clobetasol propionate

ตารางที่ 24 แสดง %RSD ของสารมาตรฐาน Clobetasol propionate ที่ 3 ความเข้มข้น

ความเข้มข้น (µg/mL)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (µg/mL)	SD	%RSD
2.5	1	78512.5	3.058603888	3.059998588	0.001215081603	0.03970856744
	2	78554.5	3.060828346			
	3	78549.5	3.060563529			
20	1	393452.5	19.73886447	19.82880497	0.09042542713	0.4560306446
	2	395132.5	19.8278428			
	3	396867	19.91970764			
50	1	967175	50.12509931	50.33615804	0.2026559064	0.4026050344

ความเข้มข้น (µg/mL)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (µg/mL)	SD	%RSD
	2	971500	50.35416556			
	3	974805	50.52920926			

จากการทดสอบ Repeatability ของสารมาตรฐาน

Clobetasol propionate พบว่าที่ความเข้มข้น 2.5 µg/mL มี

%RSD เท่ากับ 0.04% ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มี %RSD

เท่ากับ 0.46% และที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มี %RSD เท่ากับ

0.40%

2) สารละลาย spiked sample โดยใช้วิธีการสกัดแบบดั้งเดิม

(1) Triamcinolone acetonide (spiked)

ตารางที่ 25 แสดง %RSD ของ Triamcinolone acetonide (spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น

ความเข้มข้น (µg/mL)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (µg/mL)	SD	%RSD
2.5	1	41180.5	2.869559967	2.924093127	0.06296026837	2.153155377
	2	42012	2.909723229			
	3	43736	2.992996184			
20	1	390644	19.7494083	19.83021784	0.07000978377	0.3530459641
	2	393113.5	19.86869053			
	3	393193.5	19.8725547			
50	1	1020458.5	50.17082065	50.45420953	0.3384161162	0.6707391104
	2	1034083	50.82891368			
	3	1024435	50.36289427			

จากการทดสอบ Repeatability ของ Triamcinolone

acetonide (spiked) พบว่าที่ความเข้มข้น 2.5 µg/mL มี %RSD

เท่ากับ 2.15% ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มี %RSD เท่ากับ

0.35% และที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มี %RSD เท่ากับ 0.67%

(2) Betamethasone valerate (spiked)

ตารางที่ 26 แสดง %RSD ของ Betamethasone valerate (spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น

ความเข้มข้น (µg/mL)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (µg/mL)	SD	%RSD
2.5	1	37946	2.901896082	2.898989105	0.01203813136	0.4152527284
	2	37638	2.885763671			
	3	38087.5	2.909307563			
20	1	359734	19.75649487	19.61503073	0.1293316938	0.6593499421
	2	356474	19.58574272			
	3	354891.5	19.5028546			
50	1	941368.5	50.22132307	50.35220686	0.1859671579	0.3693326857
	2	947931.5	50.56507961			
	3	942302	50.27021789			

จากการทดสอบ Repeatability ของ Betamethasone valerate (spiked) พบว่าที่ความเข้มข้น 2.5 µg/mL มี %RSD เท่ากับ 0.42% ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มี %RSD เท่ากับ 0.66% และที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มี %RSD เท่ากับ 0.37%

(3) Clobetasol propionate (spiked)

ตารางที่ 27 แสดง %RSD ของ Clobetasol propionate (spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น

ความเข้มข้น (µg/mL)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (µg/mL)	SD	%RSD
2.5	1	43867.5	2.262890324	2.279683886	0.02475656496	1.085964818
	2	43974.5	2.268046453			
	3	44806	2.30811488			
20	1	400115	19.4297899	19.49914065	0.06970681215	0.3574865858
	2	401539.5	19.49843389			
	3	403008	19.56919815			
50	1	1038872	50.21029298	50.51160531	0.3368112677	0.6667997694
	2	1052670.5	50.87521685			
	3	1043832	50.44930609			

จากการทดสอบ Repeatability ของ Clobetasol propionate (spiked) พบว่าที่ความเข้มข้น 2.5 µg/mL มี %RSD เท่ากับ 1.09% ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มี %RSD เท่ากับ 0.36% และที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มี %RSD เท่ากับ 0.67%

2.3.2 Intermediate precision

1) สารมาตรฐาน

(1) สารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide

ตารางที่ 28 แสดง %RSD ของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide ที่ 3 ความเข้มข้น ทำซ้ำ 3 วัน

ความเข้มข้น (µg/mL)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (µg/mL)	SD	%RSD
2.5	1	94111.5	2.452872853	2.313895365	0.1390337902	6.008646386
	2	95055.5	2.483586023			
	3	94608	2.469026549			
	1	58014.5	2.127893419			
	2	58729	2.158749352			
	3	59558	2.194550009			
	1	295048	2.248529244			
	2	296508	2.303943523			
	3	298667.5	2.385907314			
20	1	378060	19.70217201	20.1807637	0.6042155867	2.994017449
	2	378444	19.72323387			
	3	378849.5	19.74547499			
	1	486056	20.61301606			
	2	485533	20.59043013			
	3	493310.5	20.9263042			
	1	749854.5	19.51070331			
	2	756514.5	19.76348351			
	3	790464.5	21.05205526			
50	1	931901.5	50.07961277			

ความเข้มข้น (µg/mL)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (µg/mL)	SD	%RSD
	2	933660.5	50.17609149	50.28480389	0.2157431259	0.429042393
	3	936610	50.33786749			
	1	1167914	50.05929349			
	2	1169504.5	50.12797979			
	3	1170558.5	50.17349715			
	1	1563133.5	50.37869587			
	2	1569882.5	50.63485406			
	3	1568841.5	50.59534292			

จากการทดสอบ Intermediate precision ของสาร
มาตรฐาน Triamcinolone acetonide โดยการทำซ้ำ 3 วัน ที่
ความเข้มข้น 2.5 µg/mL มี %RSD เฉลี่ยของทั้ง 3 วันเท่ากับ
6.01% ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มี %RSD เฉลี่ยของทั้ง 3 วัน
เท่ากับ 2.99% และที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มี %RSD เฉลี่ย
ของทั้ง 3 วันเท่ากับ 0.43%

(2) สารมาตรฐาน Betamethasone valerate

ตารางที่ 29 แสดง %RSD ของสารมาตรฐาน Betamethasone valerate ที่ 3 ความเข้มข้น
ทำซ้ำ 3 วัน

ความเข้มข้น (µg/mL)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (µg/mL)	SD	%RSD
2.5	1	92629.5	2.472522146	2.353300184	0.1161552573	4.935845334
	2	94215.5	2.525539027			
	3	93267	2.493832525			
	1	67573	2.273543933			
	2	65595	2.200118787			
	3	67883	2.285051412			
	1	253088	2.330517423			
	2	251224.5	2.2576362			

ความเข้มข้น (µg/mL)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้น เฉลี่ย (µg/mL)	SD	%RSD
	3	253354.5	2.340940201			
20	1	360726.5	19.71541626	20.05217577	0.5533451303	2.75952663
	2	358699	19.59956574			
	3	358027.5	19.5611965			
	1	561920	20.62415086			
	2	556535.5	20.42427336			
	3	564040.5	20.70286573			
	1	691668.5	19.4833392			
	2	694942.5	19.61138488			
	3	723989	20.74738942			
50	1	931901.5	50.07961277	50.23616034	0.2090402037	0.4161150102
	2	933660.5	50.17609149			
	3	936610	50.33786749			
	1	1167914	50.05929349			
	2	1169504.5	50.12797979			
	3	1170558.5	50.17349715			
	1	1563133.5	50.37869587			
	2	1569882.5	50.63485406			
	3	1568841.5	50.59534292			

จากการทดสอบ Intermediate precision ของสาร
มาตรฐาน Betamethasone valerate โดยการทำซ้ำ 3 วัน ที่
ความเข้มข้น 2.5 µg/mL มี %RSD เฉลี่ยของทั้ง 3 วันเท่ากับ
4.94% ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มี %RSD เฉลี่ยของทั้ง 3 วัน
เท่ากับ 2.76% และที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มี %RSD เฉลี่ย
ของทั้ง 3 วันเท่ากับ 0.42%

(3) สารมาตรฐาน Clobetasol propionate

ตารางที่ 30 แสดง %RSD ของสารมาตรฐาน Clobetasol propionate ที่ 3 ความเข้มข้น
ทำซ้ำ 3 วัน

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ความเข้มข้น เฉลี่ย ($\mu\text{g/mL}$)	SD	%RSD
2.5	1	89631.5	2.457205496	2.361164214	0.1112882215	4.713277494
	2	91457.5	2.520249275			
	3	90911.5	2.501398288			
	1	58685.5	2.22370497			
	2	59165	2.244719081			
	3	60068	2.284293102			
	1	290924.5	2.310904489			
	2	290897	2.309895833			
	3	293302	2.398107394			
20	1	393452.5	19.73886447	20.22728383	0.5861584785	2.89786055
	2	395132.5	19.8278428			
	3	396867	19.91970764			
	1	477387.5	20.57334122			
	2	480288.5	20.70047769			
	3	487320.5	21.00865545			
	1	759598	19.50110035			
	2	767381.5	19.78658671			
	3	800163.5	20.98897814			
50	1	967175	50.12509931	50.34893218	0.23921906	0.47512241
	2	971500	50.35416556			
	3	974805	50.52920926			
	1	1149340.5	50.02171531			
	2	1152817	50.1740731			
	3	1153236	50.1924358			
	1	1601995.5	50.39889598			
	2	1610143	50.69773327			
	3	1608761.5	50.64706206			

จากการทดสอบ Intermediate precision ของสาร
มาตรฐาน Clobetasol propionate โดยการทำซ้ำ 3 วัน ที่ความ
เข้มข้น 2.5 µg/mL มี %RSD เฉลี่ยของทั้ง 3 วันเท่ากับ 4.71%
ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มี %RSD เฉลี่ยของทั้ง 3 วันเท่ากับ
2.90% และที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มี %RSD เฉลี่ยของทั้ง 3
วันเท่ากับ 0.48%

2) สารละลาย spiked sample โดยใช้วิธีการสกัดแบบดั้งเดิม

(1) Triamcinolone acetonide (spiked)

ตารางที่ 31 แสดง %RSD ของ Triamcinolone acetonide (spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น
ทำซ้ำ 3 วัน

ความ เข้มข้น (µg/mL)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (µg/mL)	SD	%RSD
2.5	1	41096.5	2.619137353	2.715103477	0.1675196538	6.169917839
	2	42909.5	2.703494323			
	3	41764	2.650195422			
	1	58335.5	2.534201178			
	2	58654	2.547998614			
	3	60053.5	2.608625022			
	1	41180.5	2.869559967			
	2	42012	2.909723229			
	3	43736	2.992996184			
20	1	419366.5	20.21963987	19.93905903	0.2569747015	1.288800545
	2	421165.5	20.30334543			
	3	420752.5	20.28412898			
	1	400076.5	19.77929468			
	2	398326.5	19.69381625			
	3	398057	19.68065257			
	1	390644	19.7494083			
	2	393113.5	19.86869053			
	3	393193.5	19.8725547			

ความเข้มข้น (µg/mL)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (µg/mL)	SD	%RSD
50	1	1059410	50.00018612	49.95289278	0.6200741608	1.241317822
	2	1036699	48.94346734			
	3	1037035.5	48.95912433			
	1	1019622.5	50.04090754			
	2	1020083.5	50.063425			
	3	1023008.5	50.2062961			
	1	1020458.5	50.17082065			
	2	1034083	50.82891368			
	3	1024435	50.36289427			

จากการทดสอบ Intermediate precision ของ
 Triamcinolone acetonide (spiked) โดยการทำซ้ำ 3 วัน ที่
 ความเข้มข้น 2.5 µg/mL มี %RSD เฉลี่ยของทั้ง 3 วันเท่ากับ
 6.17% ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มี %RSD เฉลี่ยของทั้ง 3 วัน
 เท่ากับ 1.29% และที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มี %RSD เฉลี่ย
 ของทั้ง 3 วันเท่ากับ 1.24%

(2) Betamethasone valerate (spiked)

ตารางที่ 32 แสดง %RSD ของ Betamethasone valerate (spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น
 ทำซ้ำ 3 วัน

ความเข้มข้น (µg/mL)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (µg/mL)	SD	%RSD
2.5	1	39538	2.613266272	2.683696708	0.1647305959	6.138197187
	2	39697.5	2.621209103			
	3	39201.5	2.596509138			
	1	57564.5	2.528055687			
	2	58358.5	2.565526192			
	3	57642.5	2.531736668			
	1	37946	2.901896082			

ความเข้มข้น (µg/mL)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (µg/mL)	SD	%RSD
	2	37638	2.885763671			
	3	38087.5	2.909307563			
20	1	394604	20.29495543	19.79964128	0.3712116362	1.87484021
	2	394390	20.28429859			
	3	393272	20.22862407			
	1	418703	19.70270807			
	2	414090.5	19.47351553			
	3	411958.5	19.36757764			
	1	359734	19.75649487			
	2	356474	19.58574272			
	3	354891.5	19.5028546			
50	1	990997	49.99432299	49.83860551	0.6331621875	1.270425167
	2	969642.5	48.93090484			
	3	967025	48.80055774			
	1	1030806.5	50.11778882			
	2	1033215	50.23746584			
	3	1016558	49.40978882			
	1	941368.5	50.22132307			
	2	947931.5	50.56507961			
	3	942302	50.27021789			

จากการทดสอบ Intermediate precision ของ
 Betamethasone valerate (spiked) โดยการทำซ้ำ 3 วัน ที่
 ความเข้มข้น 2.5 µg/mL มี %RSD เฉลี่ยของทั้ง 3 วันเท่ากับ
 6.14% ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มี %RSD เฉลี่ยของทั้ง 3 วัน
 เท่ากับ 1.87% และที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มี %RSD เฉลี่ย
 ของทั้ง 3 วันเท่ากับ 1.27%

(3) Clobetasol propionate (spiked)

ตารางที่ 33 แสดง %RSD ของ Clobetasol propionate (spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น ทำซ้ำ 3 วัน

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ครั้งที่	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ความเข้มข้น เฉลี่ย ($\mu\text{g/mL}$)	SD	%RSD
2.5	1	42672	2.599504001	2.488524968	0.1594381447	6.406933697
	2	43244	2.626269243			
	3	42795.5	2.60528286			
	1	52321.5	2.54225764			
	2	52697.5	2.560583906			
	3	53994	2.623775406			
	1	43867.5	2.262890324			
	2	43974.5	2.268046453			
	3	44806	2.30811488			
20	1	420751	20.29072107	19.91053563	0.3549293859	1.782620983
	2	421405	20.32132329			
	3	420688	20.28777315			
	1	381977	19.78994568			
	2	386881	20.04125243			
	3	385420	19.96638311			
	1	400115	19.4297899			
	2	401539.5	19.49843389			
	3	403008	19.56919815			
50	1	1054780.5	49.95847176	50.11614352	0.6789962765	1.354845423
	2	1034745.5	49.02098638			
	3	1036279	49.0927425			
	1	971929.5	50.02221482			
	2	983854	50.63328892			
	3	986771	50.78277134			
	1	1038872	50.21029298			
	2	1052670.5	50.87521685			
	3	1043832	50.44930609			

จากการทดสอบ Intermediate precision ของ Clobetasol propionate (spiked) โดยการทำซ้ำ 3 วัน ที่ความเข้มข้น 2.5 µg/mL มี %RSD เฉลี่ยของทั้ง 3 วันเท่ากับ 6.41% ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL มี %RSD เฉลี่ยของทั้ง 3 วันเท่ากับ 1.78% และที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มี %RSD เฉลี่ยของทั้ง 3 วันเท่ากับ 1.35%

2.4 การทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD)

2.4.1 สารมาตรฐาน

1) สารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide

ตารางที่ 34 แสดง LOD ของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide

สมการเส้นตรง	slope	SD of y-intercept	LOD	Signal-to-noise ratio
$y = 23156x + 8741$	23156	8741	1.564314872	45.49
$y = 29482x - 14472$	29482	-14472		
$y = 23310x - 8149$	23310	-8149		
เฉลี่ย	25316	12000.66525		

จากการทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide เมื่อนำค่า slope กับ SD of y-intercept มาคำนวณได้ค่า LOD เท่ากับ 1.56 จากนั้นนำความเข้มข้น 1.56 µg/mL ไปฉีด HPLC พบว่าได้ค่า Signal-to-noise ratio ที่ได้จากการคำนวณของเครื่องเท่ากับ 45.49

2) สารมาตรฐาน Betamethasone valerate

ตารางที่ 35 แสดง LOD ของสารมาตรฐาน Betamethasone valerate

สมการเส้นตรง	slope	SD of y-intercept	LOD	Signal-to-noise ratio
$y = 26939x + 6326$	26939	6326	1.353008076	76.41
$y = 27832x - 13852$	27832	-13852		
$y = 19512x - 5720$	19512	-5720		
เฉลี่ย	24761	10152.07059		

จากการทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ของ
 สารมาตรฐาน Betamethasone valerate เมื่อนำค่า slope กับ SD of
 y-intercept มาคำนวณได้ค่า LOD เท่ากับ 1.35 จากนั้นนำความเข้มข้น
 1.35 µg/mL ไปฉีด HPLC พบว่าได้ค่า Signal-to-noise ratio ที่ได้จาก
 การคำนวณของเครื่องเท่ากับ 76.41

3) สารมาตรฐาน Clobetasol propionate

ตารางที่ 36 แสดง LOD ของสารมาตรฐาน Clobetasol propionate

สมการเส้นตรง	slope	SD of y- intercept	LOD	Signal-to- noise ratio
$y = 22818x + 7945$	22818	7945	1.423905046	63.14
$y = 28005x - 13107$	28005	-13107		
$y = 24766x - 7293$	24766	-7293		
เฉลี่ย	25196.33333	10871.8746		

จากการทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ของสาร
 มาตรฐาน Clobetasol propionate เมื่อนำค่า slope กับ SD of
 y-intercept มาคำนวณได้ค่า LOD เท่ากับ 1.42 จากนั้นนำความเข้มข้น
 1.42 µg/mL ไปฉีด HPLC พบว่าได้ค่า Signal-to-noise ratio ที่ได้จาก
 การคำนวณของเครื่องเท่ากับ 63.14

2.4.2 สารละลาย spiked sample โดยใช้วิธีการสกัดแบบดั้งเดิม

1) Triamcinolone acetonide (spiked)

ตารางที่ 37 แสดง LOD ของ Triamcinolone acetonide (spiked)

สมการเส้นตรง	slope	SD of y- intercept	LOD	Signal-to- noise ratio
$y = 20703x - 18228$	20703	-18228	1.10669825	39.25
$y = 21492x - 15194$	21492	-15194		
$y = 20473x - 4865$	20473	-4865		
เฉลี่ย	20889.33333	7005.511711		

จากการทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ของ Triamcinolone acetonide (spiked) เมื่อนำค่า slope กับ SD of y-intercept มาคำนวณได้ค่า LOD เท่ากับ 1.11 จากนั้นนำความเข้มข้น 1.11 µg/mL ไปฉีด HPLC พบว่าได้ค่า Signal-to-noise ratio ที่ได้จากการคำนวณของเครื่องเท่ากับ 39.25

2) Betamethasone valerate (spiked)

ตารางที่ 38 แสดง LOD ของ Betamethasone valerate (spiked)

สมการเส้นตรง	slope	SD of y-intercept	LOD	Signal-to-noise ratio
$y = 19092x - 17457$	19092	-17457	3.623147695	284.40
$y = 20081x - 12939$	20081	-12939		
$y = 20125x + 22186$	20125	22186		
เฉลี่ย	19766	21701.55677		

จากการทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ของ Betamethasone valerate (spiked) เมื่อนำค่า slope กับ SD of y-intercept มาคำนวณได้ค่า LOD เท่ากับ 3.62 จากนั้นนำความเข้มข้น 3.62 µg/mL ไปฉีด HPLC พบว่าได้ค่า Signal-to-noise ratio ที่ได้จากการคำนวณของเครื่องเท่ากับ 284.40

3) Clobetasol propionate (spiked)

ตารางที่ 39 แสดง LOD ของ Clobetasol propionate (spiked)

สมการเส้นตรง	slope	SD of y-intercept	LOD	Signal-to-noise ratio
$y = 20752x - 3092$	20752	-3092	0.8609382547	38.89
$y = 21371x - 12882$	21371	-12882		
$y = 19514x - 4204$	19514	-4204		
เฉลี่ย	20545.66667	5360.166788		

จากการทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ของ Clobetasol propionate (spiked) เมื่อนำค่า slope กับ SD of y-intercept มาคำนวณได้ค่า LOD เท่ากับ 0.86 จากนั้นนำความเข้มข้น 0.86 µg/mL ไปฉีด HPLC พบว่าได้ค่า Signal-to-noise ratio ที่ได้จากการคำนวณของเครื่องเท่ากับ 38.89

2.5 การทดสอบหาขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

2.5.1 สารมาตรฐาน

1) สารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide

ตารางที่ 40 แสดง LOQ ของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide

สมการเส้นตรง	slope	SD of y-intercept	LOQ
$y = 23156x + 8741$	23156	8741	4.740348098
$y = 29482x - 14472$	29482	-14472	
$y = 23310x - 8149$	23310	-8149	
เฉลี่ย	25316	12000.66525	

จากการทดสอบหาขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (LOQ) ของ สารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide เมื่อนำค่า slope กับ SD of y-intercept มาคำนวณได้ค่า LOQ เท่ากับ 4.74 µg/mL

2) สารมาตรฐาน Betamethasone valerate

ตารางที่ 41 แสดง LOQ ของสารมาตรฐาน Betamethasone valerate

สมการเส้นตรง	slope	SD of y-intercept	LOQ
$y = 26939x + 6326$	26939	6326	4.100024471
$y = 27832x - 13852$	27832	-13852	
$y = 19512x - 5720$	19512	-5720	
เฉลี่ย	24761	10152.07059	

จากการทดสอบหาขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (LOQ) ของ สารมาตรฐาน Betamethasone valerate เมื่อนำค่า slope กับ SD of y-intercept มาคำนวณได้ค่า LOQ เท่ากับ 4.10 µg/mL

3) สารมาตรฐาน Clobetasol propionate

ตารางที่ 42 แสดง LOQ ของสารมาตรฐาน Clobetasol propionate

สมการเส้นตรง	slope	SD of y-intercept	LOQ
$y = 22818x + 7945$	22818	7945	4.314863777
$y = 28005x - 13107$	28005	-13107	
$y = 24766x - 7293$	24766	-7293	
เฉลี่ย	25196.33333	10871.8746	

จากการทดสอบหาขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (LOQ) ของสารมาตรฐาน Clobetasol propionate เมื่อนำค่า slope กับ SD of y-intercept มาคำนวณได้ค่า LOQ เท่ากับ 4.31 µg/mL

2.5.2 สารละลาย spiked sample โดยใช้วิธีการสกัดแบบดั้งเดิม

1) Triamcinolone acetonide (spiked)

ตารางที่ 43 แสดง LOQ ของ Triamcinolone acetonide (spiked)

สมการเส้นตรง	slope	SD of y-intercept	LOQ
$y = 20703x - 18228$	20703	-18228	3.353631061
$y = 21492x - 15194$	21492	-15194	
$y = 20473x - 4865$	20473	-4865	
เฉลี่ย	20889.33333	7005.511711	

จากการทดสอบหาขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (LOQ) ของ Triamcinolone acetonide (spiked) เมื่อนำค่า slope กับ SD of y-intercept มาคำนวณได้ค่า LOQ เท่ากับ 3.35 µg/mL

2) Betamethasone valerate (spiked)

ตารางที่ 44 แสดง LOQ ของ Betamethasone valerate (spiked)

สมการเส้นตรง	slope	SD of y-intercept	LOQ
$y = 19092x - 17457$	19092	-17457	10.97923544
$y = 20081x - 12939$	20081	-12939	
$y = 20125x + 22186$	20125	22186	
เฉลี่ย	19766	21701.55677	

จากการทดสอบหาขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (LOQ) ของ
Betamethasone valerate (spiked) เมื่อนำค่า slope กับ SD of
y-intercept มาคำนวณได้ค่า LOQ เท่ากับ 10.98 µg/mL

3) Clobetasol propionate (spiked)

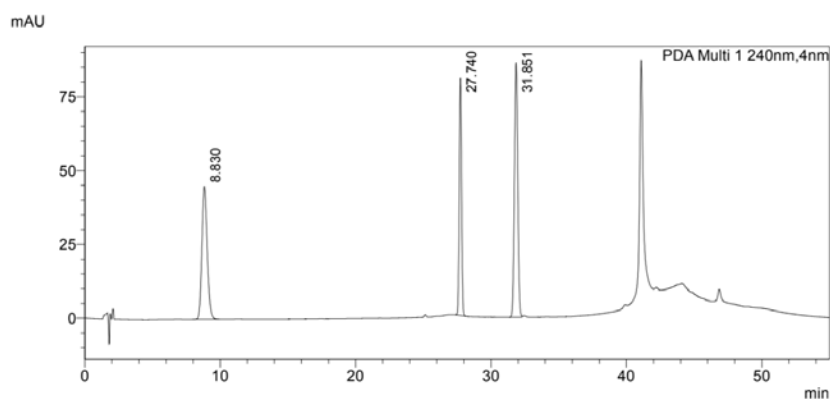
ตารางที่ 45 แสดง LOQ ของ Clobetasol propionate (spiked)

สมการเส้นตรง	slope	SD of y-intercept	LOQ
$y = 20752x - 3092$	20752	-3092	2.608903802
$y = 21371x - 12882$	21371	-12882	
$y = 19514x - 4204$	19514	-4204	
เฉลี่ย	20545.66667	5360.166788	

จากการทดสอบหาขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (LOQ) ของ
Clobetasol propionate (spiked) เมื่อนำค่า slope กับ SD of
y-intercept มาคำนวณได้ค่า LOQ เท่ากับ 2.61 µg/mL

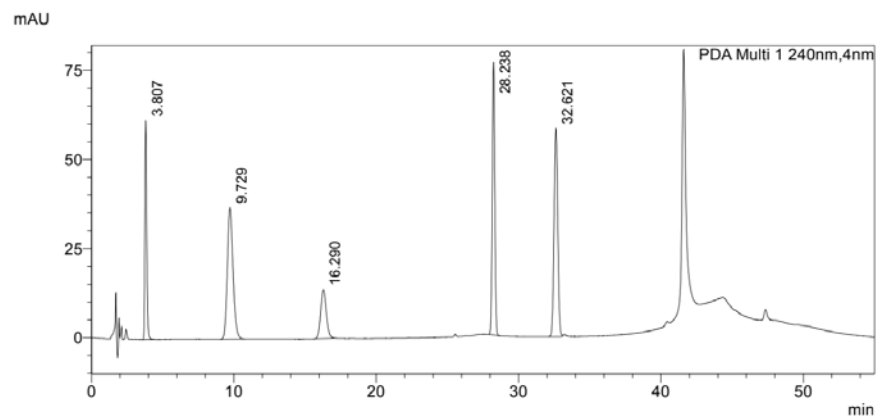
2.6 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

2.6.1 สารมาตรฐาน



รูปที่ 10 แสดง chromatogram ของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetone, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate ตามลำดับ

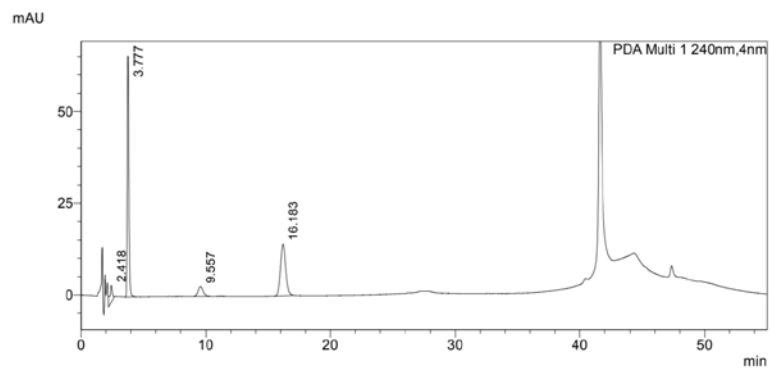
2.6.2 สารละลาย spiked sample



รูปที่ 11 แสดง chromatogram ของสารละลาย spiked sample
Triamcinolone acetonide, Betamethasone valerate และ
Clobetasol propionate ตามลำดับ

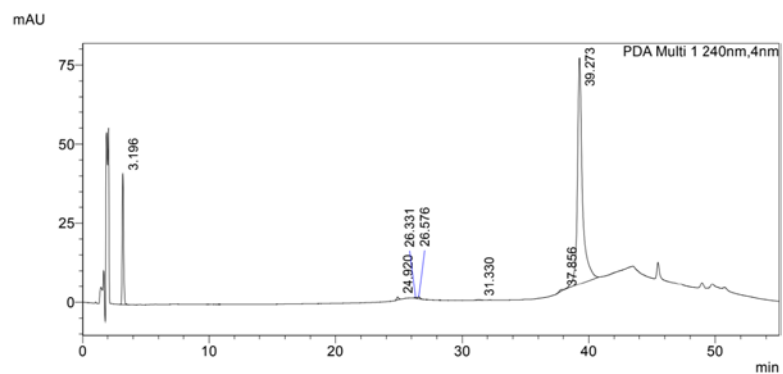
2.6.3 cream base 3 ยี่ห้อ

- Cream base 1



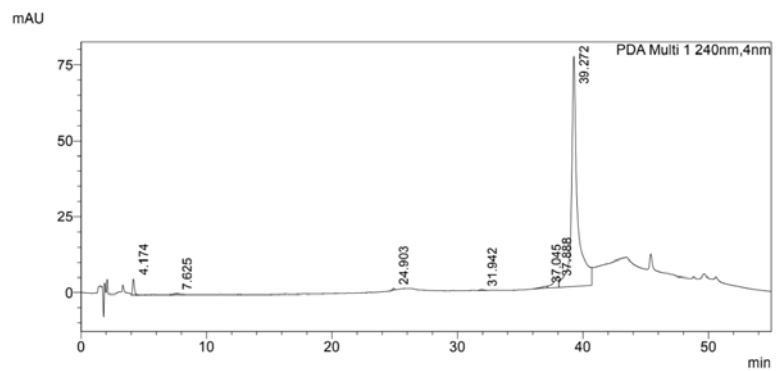
รูปที่ 12 แสดง chromatogram ของ cream base 1

- Cream base 2



รูปที่ 13 แสดง chromatogram ของ cream base 2

- Cream base 3



รูปที่ 14 แสดง chromatogram ของ cream base 3

จาก chromatogram ของสารมาตรฐานและสารละลาย spiked sample แสดงให้เห็นว่าพีคของสารสแตียรอยด์ทั้ง 3 ชนิดไม่ซ้อนทับกัน และแยกออกจากสารรบกวนอื่นชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับ cream base ทั้ง 3 ยี่ห้อ

3. การทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (SPE)

การทำให้สารบริสุทธิ์โดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (SPE) โดยทำการสกัดสารละลาย spiked sample ของ steroid ทั้ง 3 ชนิดและทำการเก็บสารในขั้นตอนการชะสาร (elution) จากนั้นทำมาวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 46, 47 และ 48

ตารางที่ 46 แสดง % recovery ของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide ที่ 5 ความเข้มข้น

สารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide				
ความเข้มข้น (µg/mL)	AUC 1	AUC 2	AUC เฉลี่ย	% Recovery
2.5	-	-	-	-
10	-	-	-	-
20	-	5744	5744	2.243078136
30	12126	12390	12258	2.565113147
50	21394	20778	21086	2.408907282

ตารางที่ 47 แสดง % recovery ของสารมาตรฐาน Betamethasone valerate ที่ 5 ความเข้มข้น

สารมาตรฐาน Betamethasone valerate				
ความเข้มข้น (µg/mL)	AUC 1	AUC 2	AUC เฉลี่ย	% Recovery
2.5	-	-	-	-
10	4859	4894	4876.5	4.307386815
20	9736	9600	9668	3.422292825
30	16394	16817	16605.5	3.506045362
50	26511	26620	26565.5	3.158432618

ตารางที่ 48 แสดง % recovery ของสารมาตรฐาน Clobetasol propionate ที่ 5 ความเข้มข้น

สารมาตรฐาน Clobetasol propionate				
ความเข้มข้น (µg/mL)	AUC 1	AUC 2	AUC เฉลี่ย	% Recovery
2.5	-	-	-	-
10	6626	6633	6629.5	4.180072904
20	11418	11013	11215.5	3.204495747
30	18508	18684	18596	3.332037262
50	30181	29717	29949	3.102794654

การทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (SPE) พบว่าสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด มี % recovery ไม่เกิน 5% ดังนั้นผู้จัดทำจึงใช้สารละลายมาตรฐานในการวิเคราะห์ และเก็บทุกขั้นตอนในกระบวนการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง โดยใช้ SPE cartridge 2 ยี่ห้อ คือ Welch[®] และ Strata[®] แสดงผลดังตารางที่ 49 และ 50

ตารางที่ 49 แสดง % recovery ของสารมาตรฐานโดยใช้ SPE cartridge ยี่ห้อ Welch[®]

Standard		Welch [®]		
		AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	% Recovery
Load	Triamcinolone acetonide	975813	46.67095851	93.34191702
	Betamethasone valerate	868901	43.96200616	87.92401231
	Clobetasol propionate	968371.5	46.69220217	93.38440433
Wash	Triamcinolone acetonide	112400.5	5.497257988	10.99451598
	Betamethasone valerate	56338.5	2.96283869	5.92567738
	Clobetasol propionate	84005.5	4.123441637	8.246883273
Elute	Triamcinolone acetonide	12106	0.7144969003	1.428993801
	Betamethasone valerate	16071.5	0.9311014683	1.862202937
	Clobetasol propionate	18030.5	0.9477496992	1.895499398

ตารางที่ 50 แสดง % recovery ของสารมาตรฐานโดยใช้ SPE cartridge ยี่ห้อ Strata[®]

Standard		Strata [®]		
		AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	% Recovery
Load	Triamcinolone acetonide	935545	44.75069146	89.50138293
	Betamethasone valerate	862592.5	41.27179304	82.54358608
	Clobetasol propionate	930021.5	44.48729137	88.97458274
Wash	Triamcinolone acetonide	150295.5	7.304363376	14.60872675
	Betamethasone valerate	83580	4.122889843	8.245779685
	Clobetasol propionate	116714	5.702956605	11.40591321
Elute	Triamcinolone acetonide	23539.5	1.259728183	2.519456366
	Betamethasone valerate	28646	1.503242728	3.006485455
	Clobetasol propionate	31464.5	1.637649022	3.275298045

จากการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (SPE) และเก็บทุกขั้นตอนในกระบวนการสกัด spiked sample ได้แก่ การบรรจุสาร (load), การล้าง (wash) และการชะสาร (elute) พบว่าส่วนใหญ่ สารสเตียรอยด์ทั้ง 3 ชนิดอยู่ในขั้นตอน load ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 51 และ 52 ตารางที่ 51 แสดง % recovery ของสารละลาย spiked sample โดยใช้ SPE cartridge ยี่ห้อ Welch[®]

Spike		Welch [®]		
		AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	% Recovery
Load	Triamcinolone acetonide	794691.5	37.68311465	75.36622929
	Betamethasone valerate	674578	32.09436069	64.18872138
	Clobetasol propionate	782045.5	37.09470966	74.18941932
Wash	Triamcinolone acetonide	211705.5	10.55739345	21.1147869
	Betamethasone valerate	52177	3.134701284	6.269402568
	Clobetasol propionate	151239	7.743951238	15.48790248
Elute	Triamcinolone acetonide	48695	2.972687512	5.945375023
	Betamethasone valerate	40111.5	2.573306347	5.146612693
	Clobetasol propionate	56299	3.326493579	6.652987158

ตารางที่ 52 แสดง % recovery ของสารละลาย spiked sample โดยใช้ SPE cartridge ยี่ห้อ Strata[®]

Spike		Strata [®]		
		AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	% Recovery
Load	Triamcinolone acetonide	895694.5	42.38267728	84.76535455
	Betamethasone valerate	816800	38.71179974	77.42359948
	Clobetasol propionate	880157	41.65973385	83.31946771
Wash	Triamcinolone acetonide	149748	7.674576587	15.34915317
	Betamethasone valerate	67928	3.867578634	7.735157268
	Clobetasol propionate	87409.5	4.774032198	9.548064396
Elute	Triamcinolone acetonide	33204	2.251907687	4.503815373
	Betamethasone valerate	39940.5	2.565349898	5.130699795
	Clobetasol propionate	43535	2.732598176	5.465196352

จากนั้นเก็บทุกขั้นตอนในกระบวนการสกัดอีกครั้งโดยใช้สารมาตรฐาน ซึ่งในขั้นตอนการปรับสภาวะ (Conditioning) ก่อนบรรจุสาร ได้ทดลอง 2 แบบ คือ แบบปกติใช้ methanol และ water อย่างละ 3 mL และแบบที่สองใช้ methanol เพียงอย่างเดียว 3 mL

ตารางที่ 53 แสดง % recovery ของสารมาตรฐานโดยใช้ SPE cartridge ยี่ห้อ Welchrom® ในสภาวะที่ใช้ methanol และ water

STD		Welchchrom® (Normal)		
		AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	% Recovery
Load	Triamcinolone acetonide	929799.5	46.65986445	93.31972891
	Betamethasone valerate	916410	47.21354434	94.42708869
	Clobetasol propionate	890066	47.21988397	94.43976793
Wash	Triamcinolone acetonide	215674	11.0728061	22.1456122
	Betamethasone valerate	181269.5	9.440422362	18.88084472
	Clobetasol propionate	183287.5	9.94253692	19.88507384
Elute	Triamcinolone acetonide	19737.5	1.308690886	2.617381771
	Betamethasone valerate	62569	3.341331826	6.682663652
	Clobetasol propionate	25476	1.61914557	3.238291139

ตารางที่ 54 แสดง % recovery ของสารมาตรฐานโดยใช้ SPE cartridge ยี่ห้อ Welchchrom® ในสภาวะที่ใช้ methanol เพียงอย่างเดียว

STD		Welchchrom® (Methanol only)		
		AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	% Recovery
Load	Triamcinolone acetonide	924270	46.38431255	92.76862511
	Betamethasone valerate	905862	46.6715651	93.3431302
	Clobetasol propionate	892010	47.32241561	94.64483122
Wash	Triamcinolone acetonide	149971	7.798624608	15.59724922
	Betamethasone valerate	25736	1.448771966	2.897543932
	Clobetasol propionate	115048	6.343407173	12.68681435
Elute	Triamcinolone acetonide	21841.5	1.413539642	2.827079284
	Betamethasone valerate	33873	1.86686877	3.73373754
	Clobetasol propionate	36689	2.210548523	4.421097046

จากนั้นจึงได้ทำการปรับขึ้นการปรับสภาวะจากการใช้ methanol เป็นสารละลาย methanol: dichloromethane 1:9 (v/v) ทำเปรียบเทียบระหว่างสารมาตรฐานและสารละลาย spiked sample ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL โดยทำการเก็บสารในขั้นตอนการชะสาร (elution) จากนั้นนำมาวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 55 และ 56

ตารางที่ 55 แสดง % recovery ของสารมาตรฐานโดยใช้ SPE ที่ปรับสภาวะโดยใช้สารละลาย methanol: dichloromethane 1:9 (v/v)

Standard 30 µg/mL		AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	% Recovery
Elute	Triamcinolone acetonide	16541	0.6985110028	2.328370009
	Betamethasone valerate	19815	0.9562117152	3.187372384
	Clobetasol propionate	21480.5	0.8991450211	2.99715007

ตารางที่ 56 แสดง % recovery ของสารละลาย spiked sample โดยใช้ SPE ที่ปรับสภาวะโดยใช้สารละลาย methanol: dichloromethane 1:9 (v/v)

Spike 30 µg/mL		AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	% Recovery
Elute	Triamcinolone acetonide	9379.5	0.3839548469	1.27984949
	Betamethasone valerate	17664.5	0.8532972818	2.844324273
	Clobetasol propionate	17270.5	0.7035221412	2.345073804

4. การประยุกต์ใช้

4.1 ตัวอย่างยาทาสดียรรอยด์ชนิดครีมในท้องตลาด



รูปที่ 15 แสดงตัวอย่างยาทาสดียรรอยด์ชนิดครีมในท้องตลาด

ตารางที่ 57 แสดง % recovery ของตัวอย่างยาทาสดียรรอยด์ชนิดครีมในท้องตลาด

ยา	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	% Label amount
Triamcinolone acetonide cream (0.1% w/w)	664404	27.04597655	90.15325515
Betamethasone valerate cream (0.1% w/w)	705807	31.8376635	106.125545
Clobetasol propionate cream (0.05% w/w)	663695	30.04222813	100.1407604

4.2 ตัวอย่างเครื่องสำอางในท้องตลาด



รูปที่ 16 แสดงตัวอย่างเครื่องสำอางในท้องตลาด 1, 2 และ 3 (ซ้ายไปขวา)

นำตัวอย่างของเครื่องสำอางที่ขายทางอินเทอร์เน็ตจำนวน 3 ตัวอย่าง มาตรวจสอบสารสเตียรอยด์เบื้องต้นโดยใช้ชุดทดสอบสเตียรอยด์ก่อนนำมาวิเคราะห์หาโดยใช้ HPLC

หมายเหตุ:

ตัวอย่างเครื่องสำอาง 1 คือ ครีมแบ่งขายใส่กระปุกที่มีฉลากระบุสรรพคุณแก้สิว, ฝ้ากระและจุดต่างดํา

ตัวอย่างเครื่องสำอาง 2 คือ ครีมแบ่งขายใส่กระปุกที่มีฉลากระบุสรรพคุณหน้าขาว, หน้าใสและมีวิธีใช้ทาเช้า-ก่อนนอน

ตัวอย่างเครื่องสำอาง 3 คือ ครีมที่มีฉลากแสดงชื่อและเลขจดแจ้งทะเบียน ระบุสรรพคุณหน้าขาวใสและลดสิว

4.2.1 การตรวจสอบสารสเตียรอยด์เบื้องต้นโดยใช้ชุดทดสอบสเตียรอยด์



รูปที่ 17 แสดงการตรวจสอบสารสเตียรอยด์เบื้องต้นโดยใช้ชุดทดสอบสเตียรอยด์ก่อนหยดน้ำยาทดสอบ (ซ้าย) และ หลังหยดน้ำยาทดสอบ 15 นาที (ขวา)

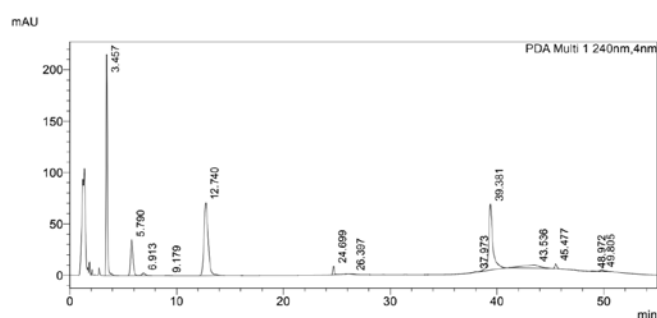
จากการตรวจสอบสารสเตียรอยด์เบื้องต้นโดยใช้ชุดทดสอบสเตียรอยด์พบว่าหลังจากหยดน้ำยาทดสอบและรอผล 15 นาที สังเกตการเปลี่ยนสีของสารตัวอย่าง โดยสีของตัวอย่างเครื่องสำอาง 1 และ 2 เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม คือ เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเขียวอมเทา ซึ่งแปลผลได้ว่าอาจมีการปนเปื้อนสเตียรอยด์ ได้แก่ Betamethasone valerate, Dexamethasone, Hydrocortisone, Prednisolone และ Triamcinolone acetonide แต่ไม่สามารถระบุได้ว่าปนเปื้อนสเตียรอยด์ชนิดใดและมีปริมาณเท่าใด จึงต้องนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ต่อไป

สำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นในครั้งนี้นี้มีการใช้ตัวอย่างยาทาสดสเตียรอยด์ชนิดครีมเป็น positive control พบว่าหลังจากหยดน้ำยาทดสอบและรอผล

15 นาที สีของยาทาสเตียรอยด์ชนิดครีมเปลี่ยนจากเนื้อครีมสีขาวเป็นสีม่วงอ่อน ซึ่งแปลผลได้ว่าการตรวจพบสเตียรอยด์ อีกทั้งมีการใช้ cream base เป็น negative control พบว่าหลังจากหยดน้ำยาทดสอบและรอผล 15 นาที สีของ cream base ไม่เปลี่ยนแปลงเนื้อครีมยังเป็นสีขาว ซึ่งแปลผลได้ว่าไม่พบสเตียรอยด์

4.2.2 การตรวจสอบสารสเตียรอยด์โดย HPLC ด้วยวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม

ตัวอย่างเครื่องสำอาง 1 (ซังครีม 500.6 mg)

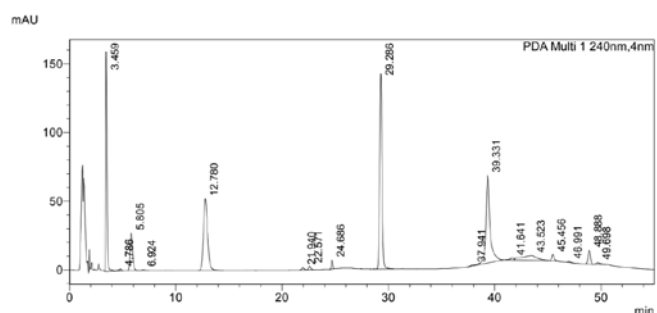


รูปที่ 18 แสดง chromatogram ของตัวอย่างเครื่องสำอาง 1

ตารางที่ 58 แสดงปริมาณสารสเตียรอยด์ที่คาดว่าจะพบในตัวอย่างเครื่องสำอาง 1

Cream1	Retention time	AUC1	AUC2	AUC เฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ปริมาณสาร (µg) ในครีม 1 g
TA	6.913	53413	63523	58468	2.54007994	25.37035498
BV	26.397	3050	3903	3476.5	0.1743156585	1.741067304
CP	-	-	-	-	-	-

ตัวอย่างเครื่องสำอาง 2 (ซังครีม 500.7 mg)

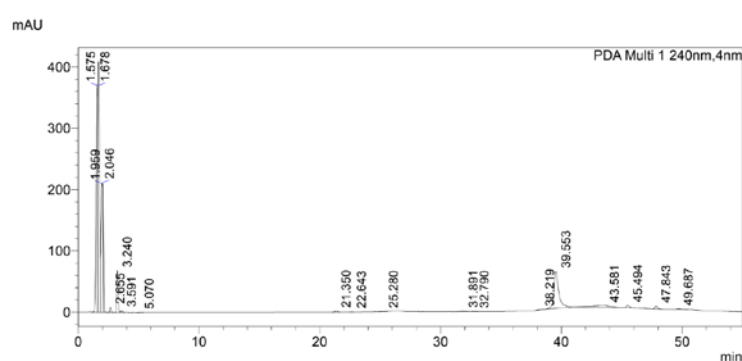


รูปที่ 19 แสดง chromatogram ของตัวอย่างเครื่องสำอาง 2

ตารางที่ 59 แสดงปริมาณสารสเตียรอยด์ที่คาดว่าจะพบในตัวอย่างเครื่องสำอาง 2

Cream2	Retention time	AUC1	AUC2	AUCเฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ปริมาณสาร (µg) ในครีม 1 g
TA	6.924	13078	14935	14006.5	0.5871875961	5.863666827
BV	-	-	-	-	-	-
CP	29.286	2207312	2210715	2209013.5	102.5455834	1024.022203

ตัวอย่างเครื่องสำอาง 3 (ซังครีม 500.2 mg)



รูปที่ 20 แสดง chromatogram ของตัวอย่างเครื่องสำอาง 3

ตารางที่ 60 แสดงปริมาณสารสเตียรอยด์ที่คาดว่าจะพบในตัวอย่างเครื่องสำอาง 3

Cream 3	Retention time	AUC1	AUC2	AUCเฉลี่ย	ความเข้มข้น (µg/mL)	ปริมาณสาร (µg) ในครีม 1 g
TA	-	-	-	-	-	-
BV	-	-	-	-	-	-
CP	-	-	-	-	-	-

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

จากผลการวิเคราะห์ข้างต้นพบว่าสถานะที่ใช้มีความเหมาะสมในการแยกสารสเตียรอยด์ทั้ง 3 ชนิดออกจากกัน โดยที่พีคของสารไม่เกิดการซ้อนทับกันและแยกออกจากกันชัดเจน ดังรูปที่ 10 และ 11

2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

2.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and range)

ในการทดสอบความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานได้กราฟเส้นตรงที่มีค่า $R^2 = 0.9992$ และค่า $R = 0.9996$ และสารละลาย spiked sample มีค่า $R^2 = 0.9999$ และค่า $R = 0.9999$ ซึ่งมีค่าใกล้เคียง 1 มีช่วงของการวิเคราะห์อยู่ที่ 0.5-50 $\mu\text{g/mL}$

2.2 การทดสอบความถูกต้องแม่นยำ (Accuracy)

จากผลการวิเคราะห์หา % recovery ของสารมาตรฐานดังตารางที่ 16, 17 และ 18 พบว่าทุกความเข้มข้นที่ทดสอบมี % recovery ของสารมาตรฐานอยู่ในช่วง 90-107% ซึ่งเป็นไปตามที่กำหนดใน Association of official analytical chemists (AOAC) 2016

จากผลการวิเคราะห์หา % recovery ของสารละลาย spiked sample ดังตารางที่ 19, 20 และ 21 พบว่าที่ความเข้มข้น 2.5 $\mu\text{g/mL}$ มีเพียง Triamcinolone acetonide ที่มี % recovery อยู่ในช่วงที่กำหนด สำหรับความเข้มข้นที่ 20 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ ของ spiked sample มี % recovery อยู่ในช่วงที่กำหนดทั้ง 3 ชนิด

2.3 การทดสอบความเที่ยงตรง (Precision)

จากผลการวิเคราะห์ Repeatability หา %RSD ของสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด แสดงดังตารางที่ 22, 23 และ 24 และสารละลาย spiked sample ดังตารางที่ 25, 26 และ 27 พบว่ามีค่าอยู่ในช่วงตามที่กำหนดใน AOAC 2016 คือน้อยกว่า 5.3%

จากการวิเคราะห์ Intermediate precision หา % RSD ของสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 28, 29 และ 30 พบว่าทุกความเข้มข้นมี %RSD ของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide มีค่าไม่เกิน 6.01%, Betamethasone valerate มีค่าไม่เกิน 4.94% และ Clobetasol propionate มีค่าไม่เกิน 4.71% และ spiked sample ทั้ง 3 ชนิด ที่ทุกความเข้มข้นพบว่า %RSD ของสารละลาย spiked sample Triamcinolone acetonide มีค่าไม่เกิน 6.17%, spiked sample Betamethasone valerate มีค่าไม่เกิน 6.14% และ spiked sample Clobetasol propionate มีค่าไม่เกิน 6.41%

2.4 การทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) และ ขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

ขีดจำกัดของการตรวจพบของสารมาตรฐาน Triamcinolone acetonide, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate มีค่าเท่ากับ 1.56, 1.35 และ 1.42 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ทำการยืนยันค่า LOD โดยการฉีดเข้าเครื่อง HPLC พบว่าให้ขนาดสัญญาณเกิน 3 เท่าของสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio) และขีดจำกัดของการวัดปริมาณของ Triamcinolone acetonide, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate มีค่าเท่ากับ 4.74, 4.10 และ 4.31 ตามลำดับ

ขีดจำกัดของการตรวจพบของสารละลาย spiked sample Triamcinolone acetonide, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate มีค่าเท่ากับ 1.11, 3.62 และ 0.86 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ทำการยืนยันค่า LOD โดยการฉีดเข้าเครื่อง HPLC พบว่าให้ขนาดสัญญาณเกิน 3 เท่าของสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio) และขีดจำกัดของการวัดปริมาณของ Triamcinolone acetonide, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate มีค่าเท่ากับ 3.35, 10.98 และ 2.60 ตามลำดับ

2.5 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

จาก chromatogram ของสารมาตรฐานและสารละลาย spiked sample ดังรูปที่ 10 และ 11 แสดงให้เห็นว่าพีคของสารสเตียรอยด์ทั้ง 3 ชนิดไม่เกิดการซ้อนทับกันและแยกออกจากสารรบกวนอื่นชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับ cream base ทั้ง 3 ยี่ห้อ

3. การทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (SPE)

จากผลการวิเคราะห์การทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (SPE) เมื่อสกัดสารจากสารละลาย spiked sample ทั้ง 3 ชนิดและทำการเก็บสารในขั้นตอนการชะสาร (elution) เนื่องจากโดยปกติการทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยวิธี SPE สารมาตรฐานที่สกัดออกมาได้ควรมีค่าใกล้เคียงกับสารละลาย spiked sample โดยสามารถดูได้จากค่า % recovery ที่มีค่าเข้าใกล้ 100% แต่จากการทดลองเมื่อนำสารที่สกัดออกมาไปตรวจด้วยเครื่อง HPLC พบว่าสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด มี % recovery น้อยกว่า 5% และที่ความเข้มข้นต่ำไม่สามารถตรวจพบสารได้เลย เช่น ที่ความเข้มข้น 2.5 µg/mL จึงได้มีการตั้งสมมติฐานว่าหากทำการเก็บสารในทุกขั้นตอนของการสกัดด้วย SPE ได้แก่ ขั้นตอนการบรรจุสาร (loading), ขั้นตอนการล้าง (washing) และขั้นตอนการชะสาร (elution) หากมีการพบสารมาตรฐานที่ขั้นตอน loading อาจสามารถบอกได้ว่าสารมาตรฐานไม่จับติดอยู่ใน cartridge แต่หากพบสารมาตรฐานที่ขั้นตอน washing อาจสามารถบอกได้ว่ากระบวนการล้างมีการใช้สารละลาย (washing solution) ไม่เหมาะสมทำให้ล้างสารมาตรฐานที่ต้องการวิเคราะห์ออกมาด้วย เนื่องจากในขั้นตอน washing ควรออกมาเพียงแค่สิ่งรบกวนที่ต้องการนำออกมาและควรพบสารมาตรฐานที่ต้องการวิเคราะห์ในขั้นตอน elution โดยสารที่ต้องการวิเคราะห์จะออกจาก stationary phase ในขั้นตอนนี้และหากเก็บทุกขั้นตอนในการสกัดด้วย SPE แล้วไม่พบสารมาตรฐานในทุกขั้นตอน แสดงว่าสารมาตรฐานอาจติดอยู่ที่ stationary phase ของ SPE cartridge ไม่ออกมากับการสกัด

ดังนั้นทางผู้จัดทำจึงได้ทำการสกัดสารด้วยตัวดูดซับของแข็ง (SPE) โดยใช้ SPE cartridge 2 ยี่ห้อคือ Welchrom® และ Strata® จากนั้นเก็บสารในทุกขั้นตอนของกระบวนการสกัด ได้ผลการวิเคราะห์คือสารสเตียรอยด์ทั้ง 3 ชนิดส่วนใหญ่อยู่ในขั้นตอน loading โดยดูได้จาก % recovery ที่มีค่ามาก ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 49 และ 50 สำหรับสารมาตรฐาน และตารางที่ 51 และ 52 สำหรับสารละลาย spiked sample แสดงว่าสารมาตรฐานไม่จับติดอยู่ที่ stationary phase ของ SPE cartridge

หลังจากนั้นได้ทำการคิดหาวิธีที่จะทำให้สารจับติดที่ stationary phase ของ SPE cartridge โดยการปรับขั้นตอนการปรับสภาวะ (conditioning) ในการชะ SPE cartridge ด้วยตัวทำละลาย methanol และน้ำ เปลี่ยนเป็นการใช้ตัวทำละลาย methanol เพียงอย่างเดียว เพื่อเป็นการทำความสะอาดก่อนการบรรจุสาร ผลการวิเคราะห์ที่ได้พบว่าไม่มีความแตกต่างของ % recovery จากสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดจากการใช้ตัวทำละลายที่เป็น methanol และน้ำ เทียบกับที่ใช้ methanol เพียงอย่างเดียว พบ % recovery มากที่สุดในขั้นตอนการบรรจุเช่นเดิม คณะผู้จัดทำ

จึงได้ตั้งสมมติฐานว่าสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นสูงทำให้สารถูกชะออกมากับ methanol จึงได้ทำการปรับขั้น conditioning จากการใช้ methanol เป็นสารละลายในการชะ SPE cartridge เป็น methanol: dichloromethane 1:9 (v/v) เพื่อลดความเข้มข้นของสารละลาย methanol ลงโดยตั้งสมมติฐานว่าสารมาตรฐานจะไม่ถูกชะออกมากับสารละลายและจับติดอยู่ที่ stationary phase ของ SPE cartridge และเมื่อทำการทดลองปรับขั้น conditioning เป็นสารละลาย methanol: dichloromethane 1:9 (v/v) โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างการ load สารมาตรฐานและสารละลาย spiked sample ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL เก็บสารในขั้น elution มาวิเคราะห์พบสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดจากทั้งสองแบบ แสดงให้เห็นว่าสารมาตรฐานไม่จับติดอยู่ใน cartridge ดังที่แสดงในตารางที่ 55 และ 56

4. การประยุกต์ใช้

จากผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 57 ตัวอย่างยาทาสเตียรอยด์ชนิดครีมในท้องตลาดที่นำมาวิเคราะห์พบว่า Triamcinolone acetonide cream และ Betamethasone valerate cream มี % recovery อยู่ในช่วงที่ USP43 กำหนด คือ 90.0-115.0% เช่นเดียวกับ Clobetasol propionate cream ที่มี % recovery อยู่ในช่วงที่ USP43 กำหนด คือ 90-110% ดังนั้นวิธีการสกัดสารสเตียรอยด์ออกจากครีมและสภาวะการวิเคราะห์ที่ใช้น่าจะมีความเหมาะสมสำหรับการตรวจสอบหาปริมาณสเตียรอยด์ในเครื่องสำอางได้เช่นกัน

จากผลการวิเคราะห์รูปที่ 17 ตัวอย่างเครื่องสำอางชนิดครีมในท้องตลาดที่นำมาวิเคราะห์พบว่ามี 2 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 3 ตัวอย่าง ที่เมื่อนำมาทดสอบกับชุดทดสอบสเตียรอยด์แล้วเนื้อครีมเกิดการเปลี่ยนสี และจากผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 58, 59 และ 60 เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่ามีตัวอย่างเครื่องสำอาง 2 ตัวอย่างที่มี retention time ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน ดังนั้นเครื่องสำอางดังกล่าวอาจมีการใส่สารสเตียรอยด์ชนิด Triamcinolone acetonide, Betamethasone valerate และ Clobetasol propionate ซึ่งหากต้องการยืนยันผลการวิเคราะห์มากขึ้น สามารถทำได้โดยเตรียมสารมาตรฐานสเตียรอยด์ spike ในเครื่องสำอางตัวอย่าง นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นพีคจากสารชนิดเดียวกันหรือไม่ หากเป็นสารชนิดเดียวกันพื้นที่ใต้พีคจะเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับพีคของเครื่องสำอางตัวอย่างเพียงอย่างเดียว

วิธีวิเคราะห์สำหรับการตรวจสอบสารสเตียรอยด์ที่ปนเปื้อนในเครื่องสำอางด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งที่พัฒนาขึ้น เป็นวิธีที่มีความถูกต้อง แต่การใช้ SPE มาสกัดสารอาจจะยังไม่สามารถสกัดสารออกมาได้ดีเท่าวิธีการสกัด

แบบดั้งเดิมซึ่งมีคุณสมบัติเฉพาะอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับตามมาตรฐานสากล สามารถวิเคราะห์ได้ง่าย และยังสามารถแยกสารสเตียรอยด์ในเครื่องสำอางชนิดครีมได้พร้อมกันหลายชนิด เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการเฝ้าระวังการปลอมปนสารสเตียรอยด์ในเครื่องสำอาง

เอกสารอ้างอิง

- (1) Coondoo A, Phiske M, Verma S, Lahiri K. Side-effects of topical steroids: A long overdue revisit. Indian Dermatol Online J. 2014;5(4):416-25.
- (2) มหาวิทยาลัยมหิดลฝ่ายเภสัชกรรม ค. อันตรายจากสารต้องห้ามในเครื่องสำอาง. [อินเทอร์เน็ต]. 2559 [เข้าถึงเมื่อ 13 สิงหาคม 2564]. เข้าถึงได้จาก:
<https://med.mahidol.ac.th/ramapharmacy/th/knowledge/general/04072016-2055-th>.
- (3) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดวัตถุที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง วันที่ 26 มีนาคม พ.ศ. 2551. กำหนดมาตรฐาน กลุ่มควบคุมเครื่องสำอาง สำนักควบคุมเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. รวมกฎหมายเกี่ยวกับเครื่องสำอาง (ฉบับภาษาไทย). 2555 : 13.
- (4) Desmedt B, Van Hoeck E, Rogiers V, Courselle P, De Beer J.O., De Paepe K, et al. Characterization of suspected illegal skin whitening cosmetics. J. Appl. Pharm. Sci. 2014;90: 85-91.
- (5) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดวัตถุที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง วันที่ 26 มีนาคม พ.ศ. 2551. กำหนดมาตรฐาน กลุ่มควบคุมเครื่องสำอาง สำนักควบคุมเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. รวมกฎหมายเกี่ยวกับเครื่องสำอาง (ฉบับภาษาไทย). 2555 : 13.
- (6) Giaccone V, Polizzotto G, Macaluso A, Cammilleri G, Ferrantelli V. Determination of ten corticosteroids in illegal cosmetic products by a simple, rapid, and high-performance LC-MS/MS method. Int J Anal Chem. 2017;2017:3531649.
- (7) Gimeno P, Maggio AF, Bancilhon M, Lassu N, Gornes H, Brenier C, et al. HPLC-UV method for the identification and screening of hydroquinone, ethers of hydroquinone and corticosteroids possibly used as skin-whitening agents in illicit cosmetic products. J Chromatogr Sci. 2016;54(3):343-52.
- (8) นวลพรรณ ไพบูลย์ศรีนครา, นันทนา กลิ่นสุนทร. วิธีวิเคราะห์ปริมาณโคลเบทาซอลโพรพิโอนेट ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2559;58(ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2559):108-19.

- (9) Q&A สตีเฟนรอยด์: สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. [อินเทอร์เน็ต]. 2560 [เข้าถึงเมื่อ 13 สิงหาคม 2564]. เข้าถึงได้จาก: <https://bdn.go.th/th/sDetail/15/51/>.
- (10) โปรแกรมวิชาเคมีและเคมีประยุกต์ อาคารศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. High Performance Liquid Chromatography (HPLC). [อินเทอร์เน็ต]. 2559 [เข้าถึงเมื่อ 13 สิงหาคม 2564].
เข้าถึงได้จาก : <https://sites.google.com/site/choothaivitayaborikarn/technical-knowledge/-instrumentation/-analyzer/-hplc?tmpl=%2Fsystem%2Fapp%2Ftemplates%2Fprint%2F&showPrintDialog=1>.
- (11) นโยบายการจัดการความรู้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. SPE (Solid phase extraction). [อินเทอร์เน็ต]. 2556 [เข้าถึงเมื่อ 13 สิงหาคม 2564]. เข้าถึงได้จาก : <http://share.psu.ac.th/blog/sci-discus/30396>.
- (12) Johnston SE, Gill NL, Wei YC, Markovich R, Rustum AM. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for simultaneous assay of betamethasone dipropionate, chlorocresol, and for the estimation of betamethasone dipropionate related compounds in a pharmaceutical cream and ointment. J Chromatogr Sci. 2010;48(9):733-41.
- (13) Luigi Gagliardi, Daniela De Orsi, Maria Rosaria Del Giudice, Franco Gatta, Rita Porra, Paola Chimenti, et al. Development of a tandem thin-layer chromatography–high-performance liquid chromatography method for the identification and determination of corticosteroids in cosmetic products. Analytica Chimica Acta. 2002;457(2):187-98.
- (14) Nam YS, Kwon IK, Lee KB. Monitoring of clobetasol propionate and betamethasone dipropionate as undeclared steroids in cosmetic products manufactured in Korea. Forensic Sci Int. 2011;210(1-3):144-8.
- (15) วรวิทย์ จันท์สุวรรณ. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ: คุณลักษณะเฉพาะที่แสดงคุณสมบัติของวิธีวิเคราะห์. [อินเทอร์เน็ต]. 2564 [เข้าถึงเมื่อ 31 มีนาคม 2565]. เข้าถึงได้จาก: https://web.rmutp.ac.th/woravith/?page_id=8366

(16) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. วิธีวิเคราะห์ (Analytical methods). ใน: ยุพดี พยัคฆพันธ์, ھرรษา ไซยวานิช, นวพร อนันตสินกุล, บรรณาธิการ. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว (A practice guide for single laboratory. Method validation of chemical methods). นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549. หน้า 13-16.

(17) The Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (20th edition, 2016). Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements [internet]. 2016 [cited 2022 March 25]. Available from: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf

(18) Rahmayuni E, Harmita H, Suryadi H. Development and validation method for simultaneous analysis of retinoic acid, hydroquinone and corticosteroid in cream formula by high-performance liquid chromatography. J. Appl. Pharm. Sci. 2018 Jan 1;8(9):87-92. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8913>