

ปีที่ 24 ฉบับที่ 2 [2568] Vol.24, No.2 [2025]

พฤษภาคม – สิงหาคม 2568

ISSN 2822-1508 [Online]



Approved by TCI during  
2025-2029



ศูนย์ดัชนีการอ้างอิงวารสารไทย  
Thai-Journal Citation Index Centre

#### **Advisory Board**

**from King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Thailand**

Professor Dr. Saowanit Sukparungsee

Professor Dr. Vilai Rungsardthong

Associate Professor Dr. Surapun Yimman

Associate Professor Dr. Pianpool Kamoljitprapa

Associate Professor Dr. Malinee Sriariyanun

#### **Editor-in-Chief**

**from King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Thailand**

Associate Professor Narumol Kreua-ongarjnukool

#### **Editor**

**from King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Thailand**

Associate Professor Dr. Nonchanutt Chudpooti

Associate Professor Dr. Sekson Sirisubtawee

#### **Co-Editor**

**from King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Thailand**

Professor Dr. Yupaporn Areepong

Assistant Professor Dr. Chatchawan Singhapol

Dr. Wannarak Nopcharoenkul

#### **Managing Editor**

**from King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Thailand**

Assistant Professor Dr. Chonnikarn Rodmorn

#### **Editorial Team**

**from King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Thailand**

Associate Professor Dr. Orathai Polsen

Associate Professor Dr. Suvimol Phanyaem

Associate Professor Dr. Walaiporn Prissanaroon Ouajai

Associate Professor Dr. Tanapat Anusas-amornkul

Associate Professor Dr. Sukanya Thepwatee

Assistant Professor Dr. Anusara Srisrual

Assistant Professor Dr. Theerawut Phusantisampan

Assistant Professor Dr. Jintawat Tanamatayarat

Assistant Professor Dr. Thidarat Wangkham

Assistant Professor Dr. Saowapa Thumsing Niyomthai

#### **Editorial Board**

Professor Dr. Paul Pigram

La Trobe University, Australia

Professor Dr. Melvin Pascall

The Ohio State University, USA

Professor Dr. Andrea De Gaetano

Óbuda University, Budapest, Hungary and CNR-IASI Rome and CNR-IRIB Palermo, Italy

### Editorial Board (cont.)

Associate Professor Dr. Nutapong Somjit

University of Leeds, United Kingdom

Dr. Nutsuda Sumonsiri

Teesside University, United Kingdom

Professor Dr. Sergey Meleshko

Suranaree University of Technology, Thailand

Emeritus Professor Dr. Yongwimon Lenbury

Mahidol University, Thailand

Professor Dr. Sutthisak Phongthanapanich

King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Thailand

Professor Dr. Anuvat Sirivat

Chulalongkorn University, Thailand

Professor Dr. Supa Hannongbua

Kasetsart University, Thailand

Associate Professor Dr. Yaowadee Temtanapat

Thammasat University, Thailand

Associate Professor Dr. Khongsak Srikaeo

Pibulsongkram Rajabhat University, Thailand

Associate Professor Dr. Weeradej Meeinkuirt

Mahidol University, Thailand

Associate Professor Dr. Wararit Panichkitkosolkul

Thammasat University, Thailand

Associate Professor Dr. Montip Tiensuwan

Mahidol University, Thailand

Associate Professor Dr. Piyapatr Busababodhin

Maharakham University, Thailand

Associate Professor Dr. Wantida Chaiyana

Chiang Mai University, Thailand

Associate Professor Dr. Pranee Phinyocheep

Mahidol University, Thailand

Assistant Professor Dr. Kwan Arayathanitkul

Mahidol University, Thailand

Assistant Professor Dr. Narumon Emarat

Mahidol University, Thailand

Assistant Professor Dr. Kitiporn Plaimas

Chulalongkorn University, Thailand

Assistant Professor Dr. Chatchai Khunboa

Khon Kaen University, Thailand

Assistant Professor Dr. Julaluk Khemacheewakul

Chiang Mai University, Thailand

Assistant Professor Dr. Jutarat Iewkittayakorn

Prince of Songkla University, Thailand

Assistant Professor Dr. Yanisa Laoong-u-thai

Burapha University, Thailand

Assistant Professor Dr. Sararat Mahasaranon

Naresuan University, Thailand

**Editorial Board (cont.)**

Dr. Worawut Srisukkhram

Chiang Mai University, Thailand

**Management Staff**

from King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Thailand

Miss Wilawan Sae-jeng

Miss Kitsiya Chuchuaysuwan

---

## JOURNAL POLICY

Journal of Applied Science and Emerging Technology (JASET) is an academic journal published Triannually by the Faculty of Applied Science, King Mongkut's University of Technology North Bangkok. The JASET publishes papers in four types: (1) original research articles in Thai or English, (2) academic articles in Thai or English, (3) review articles in Thai or English, and (4) editorial corner/invitation articles in English, encompassing all areas of applied science and technology. The journal will not accept articles, which have been published or are being considered for publication by another journal, nor should papers published here be submitted to other journals.

"Journal of Applied Science and Emerging Technology does not have policy to collect publication fee"

"Journal of Applied Science and Emerging Technology published both as electronic journal [ISSN 2822-1508 (Online)] available on ThaiJO system"

## Scope of the Journal

To publish academic, research and review articles covering all areas of both basic and applied science and technology including pure and applied mathematics, statistics, chemistry and applied chemistry, physics and industrial physics, environmental science and technology, biotechnology, agro-industrial and food technology, medical science and applications, health and beauty technology, computer and informatic science and materials science

## Peer Review Process

Each article must be double blind peer reviewed by at least 3 reviewers from the related field.

## Human and Animal Ethics in Research

The authors are requested for the appropriate disclosures and declarations if their research involves human participants and animals having an impact on their right, prestige, safety, and health. Hence, they must receive approval from the appropriate ethics committees for research involving humans and/or animals and submit the evidence of approval with the manuscript. Starting from May, 1st 2022)

## Language

Both Thai and English

## Publication Frequency

Once every four months (Triannual)

First Issue: January to April

Second Issue: May to August

Third Issue: September to December

## Remarks

Authors have to be responsible for any legal effects that may occur due to their opinions expressed in the articles.

**Website for submissions:** [www.tci-thaijo.org/index.php/JASCI](http://www.tci-thaijo.org/index.php/JASCI)

**Contact:** [jaset@sci.kmutnb.ac.th](mailto:jaset@sci.kmutnb.ac.th)

**Copyright©2025** by Faculty of Applied Science, King Mongkut's University of Technology North Bangkok.  
All rights reserved.

No part of this publication may be reproduced stored or transmitted in any material form or by any methods including electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise without the prior written permission of the publisher, except in accordance with the provisions of the Copyright Design and Patents Act 1988.

---

## TABLE OF CONTENT

### Editorial Corner (invitation article)

#### Modern Calculus

*Jessada Tariboon\** .....e900006

### Research Articles

#### Modeling Global Ice Volume Changes: A Nonlinear Autoregressive Neural Network Approach

*Porawat Visutsak\*, and Keun Ho Ryu* .....e260276

#### Development of Ideal Gas Kit using Pressure and Temperature Sensors via Arduino

*Kanitta Supawan, Anusorn Tong-on, Parinya Saphet, and Preedaporn Suwandeek\** .....e260523

#### The Impact of Extract from *Astragalus membranaceus* on Blood Coagulation in Individuals with Diabetes Mellitus

*Duangmanee Sanmun\*, Chatchawan Changtam, Soramon Sutin, Kanjana Sirirat, Nonthaya Tangrua,*

*Nopphadet Manoowong, Yupha Arsarach, Korawan Worakunchanakit, Natnicha Thipphasorn,*

*Sasivimol Khunnen, Nattarika Suwannakam, and Watcharapon Phengrueang* .....e260143

#### Development of Smear-Sputum Slides with Acid Fast Bacilli Positive Using Polyvinylidene Fluoride Nanofiber Filters

การพัฒนาสไลด์เสมียร์เสมหะที่มีผลบวกต่อแบคทีเรียทนกรดโดยใช้แผ่นกรองเส้นใยนาโนพอลิไวนิลิดีนฟลูออไรด์

*Peerada Phuechpisut, Wijit Wonglumsom, Napat Monkamnoed, Noppavan Chanunpanich, Sudaluck Thunyaharn,*

*and Kanokwan Kittiniyom\** .....e258823

#### The Application of Using Local Plant for Determination of Formalin Contaminated in Food

การประยุกต์ใช้พืชท้องถิ่นเพื่อตรวจวัดฟอร์มาลินปนเปื้อนในอาหาร

*Warangkham Khadee\*, Orranee Manoyana, Thanawat Komonnithiphong, and Anodar Ratchawet* .....e258261

## Modern Calculus

Jessada Tariboon

Department of Mathematics, Faculty of Applied Science, King Mongkut's University of Technology North  
Bangkok, Bangkok, 10800 Thailand

\* Corresponding Author, E-mail: jessada.t@sci.kmutnb.ac.th DOI: 10.14416/JASET.KMUTNB.2025.02.001

Received 20 August 2025; Revised 28 August 2025; Accepted 29 August 2025

### ABSTRACT

Calculus, since its inception by Newton and Leibniz, has served as a foundational tool for understanding change, motion, and accumulation. Over the centuries, its scope has expanded beyond the classical framework, giving rise to modern extensions that address new mathematical and scientific challenges. This article provides a comprehensive review of three significant branches: fractional calculus, multiplicative calculus, and difference calculus. Fractional calculus generalizes differentiation and integration to non-integer orders, offering powerful models for viscoelastic materials, anomalous diffusion, and memory effects in physical and biological systems. Multiplicative calculus, rooted in proportional change, reinterprets differentiation in terms of ratios, providing natural formulations for processes in finance, population dynamics, and biological growth. Difference calculus, along with its quantum variants, extends the principles of calculus to discrete settings, enabling applications in numerical methods, dynamical systems, and quantum models. By highlighting their theoretical foundations and practical applications, this paper illustrates how these non-Newtonian approaches enrich the classical view of calculus, bridging continuous and discrete analysis and offering versatile tools for modern science and engineering.

**KEYWORDS:** Fractional calculus; Multiplicative calculus; Difference calculus



## 1. INTRODUCTION

Calculus, developed by Isaac Newton and Gottfried Wilhelm Leibniz in the seventeenth century, has profoundly shaped mathematics and science by providing systematic methods to describe motion, change, and accumulation. Newton's approach, grounded in limits, derivatives, and integrals, defined fundamental physical concepts such as velocity, acceleration, and force. Leibniz, working independently, introduced a powerful notation and general framework for solving differential equations. Although many view the Newton–Leibniz era as the culmination of calculus, the field has continued to evolve over the past three centuries. These modern developments—often referred to as 'non-Newtonian calculus' or 'modern calculus' - extend differentiation and integration beyond the classical framework. This review focuses on three such extensions: fractional calculus, multiplicative calculus, and difference calculus, with emphasis on their definitions, theoretical foundations, and applications.

## 2. FRACTIONAL CALCULUS

The idea of fractional calculus originated in 1695, when Guillaume de l'Hôpital encountered Leibniz's notation for the  $n$ th derivative,  $D^n$ . He wrote to Leibniz asking what would happen if  $n = 1/2$  (Kilbas et al. (2006), Oldman & Spanier (1974), and Podlubny (1999)). At that time, Leibniz could not give a precise answer, as the rigorous formulation required the Gamma function, which later appeared in the definitions of fractional derivatives and integrals:

$$I^\alpha f(t) = \frac{1}{\Gamma(\alpha)} \int_0^t (t-\tau)^{\alpha-1} f(\tau) d\tau. \quad (1)$$

Although the development of fractional calculus was initially slow—mainly due to the difficulty of computing values of the Gamma function from cumbersome tables—modern computational

software has made such evaluations straightforward. This has allowed fractional calculus to find widespread applications, particularly in materials science. In this field, solids are described by derivatives of order zero, fluids by order one, and viscoelastic materials by fractional orders between zero and one, providing a natural framework for describing non-Newtonian materials. The Riemann–Liouville fractional derivative of order  $\alpha$  is defined as:

$${}^{RL}D^\alpha f(t) = \frac{1}{\Gamma(n-\alpha)} \frac{d^n}{dt^n} \int_0^t (t-\tau)^{n-\alpha-1} f(\tau) d\tau, \quad n-1 < \alpha < n. \quad (2)$$

Later, Caputo proposed a modified definition, widely used in applied sciences due to its compatibility with classical initial conditions:

$${}^C D^\alpha f(t) = \frac{1}{\Gamma(n-\alpha)} \int_0^t (t-\tau)^{n-\alpha-1} f^{(n)}(\tau) d\tau. \quad (3)$$

A classical application is the fractional Maxwell model in viscoelasticity, where fractional derivatives ( $0 < \alpha \leq 1$ ) are used to encode memory effects:

$$D^\alpha \varepsilon(t) = \frac{1}{E} D^\alpha \sigma(t) + \frac{1}{\eta} \sigma(t). \quad (4)$$

An equivalent form is:

$$\sigma(t) + \left( \frac{\eta}{E} \right)^\alpha D^\alpha \sigma(t) = \eta D^\alpha \varepsilon(t). \quad (5)$$

Here,  $E$  denotes the elastic modulus,  $\eta$  the viscosity,  $\sigma(t)$  the stress, and  $\varepsilon(t)$  the strain. The parameter  $\alpha$  interpolates material behavior between perfectly elastic solids ( $\alpha \rightarrow 0$ ) and Newtonian fluids ( $\alpha = 1$ ).

Applications of fractional calculus span physics, rheology, materials science, and biology. Fractional models describe viscoelastic behavior, anomalous diffusion, and memory effects in complex systems.

## 3. MULTIPLICATIVE CALCULUS

Multiplicative calculus offers a framework for proportional rather than additive change. It is

naturally motivated by compound interest. Suppose depositing \$ $a$  yields \$ $b$  after one year. The growth factor is  $b/a$ . With monthly compounding, the monthly growth becomes  $(b/a)^{\frac{1}{12}}$ . As compounding frequency increases, the limiting process gives rise to the multiplicative derivative Grossman & Katz (1972).

The multiplicative derivative of a positive function  $f$  at point  $x$  is defined as:

$$D_*f(x) = \lim_{h \rightarrow 0} \left( \frac{f(x+h)}{f(x)} \right)^{\frac{1}{h}}. \quad (6)$$

Compared with the Newtonian derivative

$$f'(x) = \lim_{h \rightarrow 0} (f(x+h) - f(x)) / h, \quad (7)$$

the difference is replaced by a ratio, and the division by  $h$  is replaced by raising to the reciprocal power  $1/h$ . This formulation directly links multiplicative calculus to continuous compounding.

The exponential growth law  $f(t) = f(0)e^{rt}$  emerges seamlessly from multiplicative calculus, where  $r$  represents the relative growth rate. This shows how multiplicative differentiation provides a natural setting for proportional processes such as finance, population dynamics, and biological growth.

Beyond finance, multiplicative calculus has been applied to signal processing, where relative changes are more meaningful than absolute ones, and to models of economic and population growth, offering insights into systems governed by proportional change.

#### 4. DIFFERENCE CALCULUS

Difference calculus addresses the discrete analog of classical calculus, where functions are defined on discrete sets rather than continuous intervals Jordan (1956). The forward difference

operator is defined as  $\Delta f(x) = f(x+1) - f(x)$ , while the backward difference operator is  $\nabla f(x) = f(x) - f(x-1)$ . These operators provide the basis for numerical methods and discrete modeling.

A well-known tool in this context is the Newton–Gregory forward interpolation formula, used to approximate functions from equally spaced data points:

$$f(x) \approx f(x_0) + \frac{(x-x_0)}{h} \Delta f(x_0) + \frac{(x-x_0)(x-x_1)}{2!h^2} \Delta^2 f(x_0) + \dots, \quad (8)$$

where  $h$  is the interval between data points and  $\Delta^n f(x_0)$  is the  $n$ th forward difference at  $x_0$ . This formula underlies many interpolation and numerical computation techniques.

Difference equations, the discrete counterparts of differential equations, are fundamental in modeling population growth, economic cycles, and computer simulations. For example, the logistic map  $x_{n+1} = rx_n(1-x_n)$  demonstrates how discrete dynamics connect to chaos theory, highlighting the importance of difference calculus in modern dynamical systems.

Further extensions include the Hahn difference calculus, which blends the  $h$ - and  $q$ -calculus into a unified operator, and fractional versions of  $q$ - and Hahn calculus, which extend differentiation to non-integer orders. These advanced forms have been employed in boundary value problems, stability analysis, and the construction of orthogonal polynomials. Thus, quantum calculus enriches the landscape of discrete analysis, providing bridges between classical calculus, difference equations, and modern applications in science and engineering.

The  $q$ -difference operator, for  $q \in (0,1)$ , is defined for a function  $f$  as:

$$D_q f(t) = \frac{f(t) - f(qt)}{(1-q)t}, \quad t \neq 0. \quad (9)$$

Its inverse leads to the  $q$ -integral, often expressed via the Jackson sum. As  $q \rightarrow 1$ , the  $q$ -difference operator recovers the classical derivative. This makes  $q$ -calculus a natural framework to interpolate between discrete and continuous models. Applications of quantum calculus can be found in number theory, combinatorics, special functions, and even physics, such as models of quantum mechanics, relativity, and cosmology.

An important extension of difference calculus is Quantum Calculus, often described as 'calculus without limits.' In this framework, derivatives and integrals are replaced by difference operators that do not rely on the notion of limits. Quantum calculus includes several variants such as the  $h$ -difference calculus,  $q$ -difference calculus, and the Hahn difference calculus. These generalizations provide powerful tools for analyzing systems where standard differentiation is not possible.

## 5. CONCLUSION

From Newton and Leibniz to contemporary extensions, calculus remains a dynamic and evolving discipline. Fractional calculus extends differentiation and integration to arbitrary orders, multiplicative calculus reframes change in terms of ratios, and difference calculus adapts methods for discrete settings. Together, these approaches expand the modeling capabilities of calculus, enhancing its relevance across physics, engineering, finance, and computational sciences.

## ACKNOWLEDGMENT

The editorial board would like to thank author(s) for your contribution to Journal of Applied Science.

## REFERENCES

- Grossman, M. & Katz, R. (1972). *Non-Newtonian Calculus*, Lee Press.
- Jordan, C. (1956). *Calculus of Finite Differences*, Chelsea Publishing.
- Kilbas, A. A. (2006). Theory and applications of fractional differential equations. *North-Holland Mathematics Studies*, 204.
- Oldham, K. B. & Spanier, J. (1974) *The Fractional Calculus*, Academic Press.
- Podlubny, I. (1999). *Fractional Differential Equations*, Academic Press.

# Modeling Global Ice Volume Changes: A Nonlinear Autoregressive Neural Network Approach

Porawat Visutsak<sup>1\*</sup> and Keun Ho Ryu<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Applied Science, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Bangkok, 10800 Thailand

<sup>2</sup>Database/Bioinformatics Laboratory Chungbuk National University, Chungbuk, 28644 Republic of Korea

<sup>3</sup>Faculty of Information Technology, Data Science Laboratory, Ton Duc Thang University, Vietnam

\* Corresponding Author, E-mail: porawatv@kmutnb.ac.th DOI: 10.14416/JASET.KMUTNB.2025.02.002

Received 28 December 2024; Revised 12 July 2025; Accepted 17 July 2025

## ABSTRACT

A single time series prediction problem is solved with a neural network. The nonlinear autoregressive (NAR) type of network is used. The network is trained in an open loop and then transformed to closed loop for multistep prediction. The prediction is made 20 time steps into the future. The delay is removed from the network to get the prediction one time step earlier. The shallow neural network is trained on the global ice volume dataset, which contains 219 measurements of global ice volume over 440,000 years. The network is able to predict future ice volume based on past values with a high degree of accuracy. Three different backpropagation training algorithms were used to train the network: Levenberg-Marquardt, Bayesian Regularization, and Scaled Conjugate Gradient. The Levenberg-Marquardt algorithm achieved the lowest MSE (0.02257 at epoch 13) and the highest  $R^2$  (0.99254). The Bayesian Regularization algorithm achieved an MSE of 0.027209 at epoch 4 and an  $R^2$  of 0.99192. The Scaled Conjugate Gradient algorithm achieved an MSE of 0.01878 at epoch 3 and an  $R^2$  of 0.99018. This work contributes to the field of climate studies by providing a tool for predicting future ice volume. This information can be used to better understand Earth's glacial cycles and to develop strategies for mitigating the effects of climate change.

**KEYWORDS:** Time-series prediction, Neural network, NAR, Backpropagation, Glacial cycles

## 1. INTRODUCTION

Global ice volume has fluctuated significantly over the past 440,000 years, with major implications for Earth's climate and sea level. Understanding these fluctuations is essential for predicting future climate change and its potential impacts on human societies. This paper explores the use of shallow neural networks for time-series prediction, focusing on modeling global ice volume.

The objective of this study is to develop a neural network model that can accurately predict future global ice volume based on past values. The model will be trained on the global ice volume dataset, which contains 219 measurements of global ice volume over 440,000 years. This single time-series prediction problem leverages the network's ability to learn patterns in historical data. By analyzing past ice volume trends, the network can forecast future changes, contributing valuable insights to climate studies and our understanding of Earth's glacial cycles.

The neural network model will be trained using three different backpropagation algorithms: Levenberg-Marquardt, Bayesian Regularization, and Scaled Conjugate Gradient. The performance of the models will be evaluated based on their mean squared error (MSE) and  $R^2$ .

The Levenberg-Marquardt algorithm achieved the lowest MSE (0.02257 at epoch 13) and the highest  $R^2$  (0.99254). The Bayesian Regularization algorithm achieved an MSE of 0.027209 at epoch 4 and an  $R^2$  of 0.99192. The Scaled Conjugate Gradient algorithm achieved an MSE of 0.01878 at epoch 3 and an  $R^2$  of 0.99018.

This paper is organized as follows: Section 2 describes the materials and methods used in this study, including the global ice volume dataset and the neural network model. Section 3 presents the results of the experiments, including the training

state, MSE, and  $R^2$  for each backpropagation algorithm. We also discuss the implications of the research findings for climate studies and our understanding of Earth's glacial cycles. Section 4 concludes the paper with a summary of the main findings and suggestions for future research.

The study of using nonlinear autoregressive neural network models for predicting oil-dissolved gas concentrations has been proposed by Pereira et al. (2018). The authors propose a hybrid model to predict the concentration of gases dissolved in transformer oil, which is crucial for monitoring equipment health and diagnosing potential faults. This model combines a Nonlinear Autoregressive (NAR) neural network with the Discrete Wavelet Transform (DWT). The DWT is first used to process and simplify historical gas data, which is then fed into the NAR network to forecast future gas concentration values. Tested on seven months of real-world data from a transformer in Brazil, the proposed NAR-DWT model demonstrated high accuracy and robustness, proving to be less sensitive to training parameters like time delay and the specific wavelet function used. The results showed that this approach significantly outperformed other methods like GRNN, BPNN, and SVM, with a prediction error for ethylene gas that was approximately 70% smaller than the other tested models. The study concludes that this model serves as a reliable tool for fault diagnosis systems, enabling the anticipation of failures by providing accurate, multi-step ahead predictions of gas levels.

Boussaada et al. (2018) presents a model for predicting daily direct solar radiation specifically designed to manage the power supply for a race sailboat, an application where location is constantly changing. The authors utilize a Nonlinear Autoregressive Exogenous (NARX) neural network

that takes two primary inputs: a deterministic component derived from a “clear sky” model that accounts for the sun’s geometric position, and a statistical component represented by predicted cloud cover. A key finding is that the model performs best when trained periodically—specifically, once every day at midnight using a moving window of the last 10 days of data. This daily retraining strategy allows the model to adapt to the sailboat’s changing coordinates and meteorological conditions. After optimizing the network’s structure to 15 neurons in the hidden layer and using specific activation functions, the final predictor achieved a Daily Mean of the Power Error (DMPE) of 24.0584 W/m<sup>2</sup>, successfully forecasting the general solar radiation curve.

Moreover, to aid in strategic planning for sustainable energy systems, Adedeji et al. (2019) addresses the challenge of forecasting energy consumption, which is subject to hemispherical seasonal patterns. The research employs a non-linear autoregressive neural network (NARNET) to predict daily energy usage across the four campuses of a South African university, utilizing three years of historical consumption data. A critical component of the methodology involved preprocessing the data with Singular Spectrum Analysis (SSA) for filtering. The authors identified three potential window lengths ( $L=54$ , 103, and 155) via periodogram analysis and compared their impact on the network’s training performance. The data filtered with a window length of  $L=103$  produced the best results, yielding R-values of 0.951, 0.983, 0.945, and 0.940 for campuses A, B, C, and D, respectively. Following network validation, a short-term forecast achieved accuracies of 85.87% (Campus A), 75.62% (Campus B), 85.02% (Campus C), and 76.83% (Campus D). The study concludes by demonstrating the significance of data filtering as a

crucial step for improving the accuracy of forecasts based on univariate autoregressive series.

It’s essential to understand how regional climates will change under different human-caused emission scenarios to help societies adapt and mitigate the impacts (Mansfield et al., 2020). Traditional climate models require immense computing power, posing a major challenge. However, Mansfield et al. (2020) proposed a solution: using machine learning. Their innovative approach leverages a unique dataset of existing climate model simulations to identify connections between short-term and long-term temperature responses under various climate forcing scenarios. This method offers a twofold advantage. First, it can speed up climate change projections by reducing the computational burden. Second, it helps identify early warning signs of long-term climate responses, which is vital for climate change detection, predictability, and attribution. The research emphasizes the need for increased data sharing between research institutions. By pooling resources to build larger datasets, the scientific community can create even more powerful climate response emulators. This will lead to faster and more accurate climate change projections. Such a collaborative approach is crucial for navigating the challenges and opportunities of data-driven climate modeling.

Baig et al. (2021) investigated hydro-meteorological variables in the Chitral Basin of Pakistan to predict climate change impacts on temperature, precipitation, humidity, and river flow using observed data from 1990 to 2019. The researchers employed statistical methods, including trend variability analysis and regression models, to analyze the relationships between these variables. Their findings revealed an inverse relationship between temperature and precipitation, with temperature decreasing by 0.309 °C for every unit

increase in precipitation. Temperature also showed a negative correlation with humidity. Conversely, precipitation positively influenced both humidity and river flow. These results challenge the notion that increased river flow in the Chitral Basin is primarily due to glacial recession caused by rising temperatures.

Zhou et al. (2021) investigated carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) emissions in China, focusing on identifying key emission sources and driving factors to mitigate global warming. The study utilized multiple linear regression models to analyze data from 1990 to 2017, identifying the energy industry, fuel combustion in other industries, and industrial processes as the primary CO<sub>2</sub> emission sources. The researchers developed driving force models for each source, incorporating both quantitative and qualitative factors. Their models predict a continued decrease in CO<sub>2</sub> emission intensity and total emissions in China but emphasize the need for greater efforts to meet the Paris Agreement goals. The study highlights the importance of energy structure adjustment, technological innovation, and policy interventions in achieving significant CO<sub>2</sub> emission reductions.

Cummins et al. (2022) addressed the statistical validity of commonly used climate change detection and attribution (D&A) methods. These methods, based on Hasselmann's "optimal fingerprinting," employ linear regression of historical climate observations on climate model output, raising concerns about spurious regression due to the non-stationary nature of climate variables. Using an idealized linear-response-model framework, the authors demonstrated the consistency of the optimal fingerprinting estimator under standard assumptions, particularly for global mean surface temperature (GMST). Analysis of historical GMST observations and CMIP6 model

output supported these assumptions, indicating that D&A of GMST trends is likely not spurious. Furthermore, the study revealed "superconsistent" properties of the least-squares estimator due to cointegration between observations and model output. This finding led to the development of a new method for quantifying D&A uncertainty, eliminating the need for pre-industrial control simulations.

Duan et al. (2022) investigated temperature trends in Australia using a joint model of quantile regression and variability to analyze daily maximum and minimum temperature data. This approach accounts for heterogeneity in the data, including quasi-periodic heterogeneity in variance, which has often been overlooked in previous climate studies. Their analysis revealed an overall warming trend of approximately 0.21°C per decade for daily maximum temperatures and 0.13°C per decade for daily minimum temperatures. Moreover, the study identified nuanced spatial and temporal patterns of change, varying across locations, seasons, and temperature percentiles.

Subhra et al. (2023) investigated the effectiveness of polynomial regression for predicting future temperatures and, consequently, climate variation. Using a preprocessed dataset from NASA's Jet Propulsion Laboratory, the researchers applied a polynomial regression model to predict future temperatures. Their findings demonstrate the efficacy of this approach, achieving a 93.31% training accuracy and a 91.01% testing accuracy. The authors suggest that this prediction model can aid environmental agencies in mitigating the impact of climate change and forecasting extreme weather conditions. They recommend further research incorporating additional climate-influencing factors.

Utami et al. (2023) investigated the impact of climate change on heat stress in Indonesia, measured by the Thermal Humidity Index (THI). Recognizing the limitations of coarse-resolution Earth System Models (ESMs), the researchers employed statistical downscaling (SD) and nonparametric regression to correct biases in temperature and humidity projections from the Coupled Model Intercomparison Project (CMIP5). Their bias correction method achieved high accuracy, with R-square values of 95% for relative humidity and 94% for temperature. Based on THI projections, the study found that 50% of the Indonesian population will experience comfortable conditions from 2006 to 2059, while uncomfortable conditions are expected from 2060 to 2100, with THI values ranging from 27.0730°C to 27.7800°C.

Wang and Xia (2023) reviewed the application of quantile regression in addressing climate change. Quantile regression, an extension of linear regression, estimates the median or other quantiles of the outcome variable, making it suitable for analyzing data with non-normal residuals, outliers, and heteroscedasticity. This approach is particularly useful in climate change research as it allows for the examination of relationships between variables beyond the mean, capturing the impact of unusually distributed outcomes and nonlinear relationships. The authors highlighted the advantages of quantile regression in identifying factors influencing variables at different quantiles and their robustness against outliers. The review emphasizes the potential of quantile regression in advancing climate change research and provides directions for future studies.

Chang et al. (2024) examined various methods for extracting long-term temperature trends from sea surface temperature (SST) data, including the seasonal-trend decomposition procedure based on

loess (STL) and linear regression methods (ordinary least square regression [OLSR], orthogonal regression [OR], and geometric mean regression [GMR]). STL was identified as the most accurate method but computationally expensive. Linear regression methods were more efficient, but GMR was deemed unsuitable due to its assumption of a random temporal component. OLSR and OR required correction for seasonal signal-induced bias, which could be achieved by trimming the SST data. Grover and Sharma (2024) explored the use of ridge regression to analyze rainfall trends and temporal patterns, aiming to enhance the understanding of precipitation dynamics. Ridge regression, an improved regression technique, addresses multi-collinearity and overfitting issues, thus improving the accuracy of rainfall forecasting. The study examined rainfall variations, considering the impact of climate change parameters. The authors found that ridge regression, by balancing bias and variance, led to more robust and reliable rainfall predictions. This research contributes valuable insights to hydrology and climate science, emphasizing the importance of accurate rainfall forecasting for effective water resource management and climate studies. The study highlights the potential of ridge regression in capturing complex temporal processes, which could be applied to various climate-related issues.

Malik et al. (2024) assessed the impact of climate change on Pakistan's energy sector, focusing on demand, transmission, and generation. Using climate projections and an ANN-based approach, they predicted a significant increase in energy demand across most regions of Pakistan. Their analysis also revealed potential capacity losses of up to 23.34% in some transmission lines due to rising temperatures. The study emphasized the importance of incorporating renewable energy



sources to enhance energy efficiency and grid resilience. The authors concluded that without infrastructure upgrades, efficient technologies, and demand-side management, climate change could severely impact Pakistan's energy grid.

Takefuji (2024) investigated the relationship between global carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) levels and temperature anomaly using linear regression analysis on datasets from the National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). The study found that the relationship between these two variables can vary over time, with long-term data (March 1958 to June 2023) suggesting a strong positive association and short-term data (March 1990 to March 1994) showing a negative association. The author concluded that further research is needed to fully understand the complex relationship between global CO<sub>2</sub> levels and temperature anomaly, taking into account other potential influencing factors such as changes in climate patterns and human activities.

## 2. MATERIALS AND METHODS

We begin by briefly outlining the contributions of this work, followed by an illustration of the methodology. Further details will be discussed later in this section.

This work uses a NAR neural network to predict future global ice volume based on past measurements. The dataset used to train and evaluate the network is from Newton & North (1991) and contains 219 measurements of global ice volume over the past 440,000 years, stored in a variable called "iceTargets".

The NAR network is chosen due to the nature of the dataset, which is a single time-series. This means the data consists of a sequence of measurements taken over time, with each measurement representing the global ice volume

at a particular point in time. The NAR network is designed to capture temporal dependencies in such time-series data by using past values to predict future ones. The NAR equation can be derived as shown in Equation 1:

$$y(t) = f(y(t-1), \dots, y(t-d)) \quad (1)$$

Where,

- $y(t)$ : This represents the value of the time series one is trying to predict at time "t" (the "present" value).
- $f(\dots)$ : This is a nonlinear function. It can be anything from a simple nonlinear transformation to a complex neural network. This function is what the model learns from the data.
- $y(t-1), \dots, y(t-d)$ : These are the past values of the time series. "d" represents the number of past values (or "delays") used to make the prediction.

The network is trained using the Levenberg-Marquardt backpropagation algorithm, a common and effective algorithm for training neural networks. To ensure the network's generalization ability and prevent overfitting, the data is divided into training, validation, and testing sets.

The training process involves two stages. First, the network is trained in an open-loop configuration, where the network's own predictions are not fed back as input during training. This helps the network learn the fundamental patterns in the data. Second, the network is transformed into a closed-loop configuration for multistep prediction, where the network's own predictions are used as input for future predictions. This allows the network to generate a sequence of predictions extending beyond the training data.

Finally, the network's performance is evaluated using metrics such as MSE and R<sup>2</sup>. These metrics provide a quantitative measure of how well the

network can predict future global ice volume based on past measurements.

## 2.1 Data selection and preparation

The foundation of this study is the global ice volume dataset, a well-established time series in paleoclimatology literature originating from the work of Newton & North (1991). This dataset contains 219 measurements that estimate global ice volume over the past 440,000 years. It's important to note that these are not direct measurements but are proxy-based estimates derived from geological records, designed to capture the long-term glacial cycles of the Earth. All modeling was implemented in

MATLAB R2024a. Before training, the data requires specific preparation for the NAR network architecture. This was handled using the `preparets` function in MATLAB, which performs two critical tasks:

- **Initial State Configuration:** The function sets aside the initial data points required to populate the network's feedback delays (or "tapped delay lines"). For our model, which uses delays of  $t-1$  and  $t-2$ , the first two data points are used to establish the initial state.
- **Data Restructuring:** These initial values are then removed from the training data, as their information is now embedded in the network's delay lines. This ensures that the network has the necessary historical context to begin the prediction process from the very first training step.

### 2.1.1 Dataset Limitations

While the global ice volume dataset is valuable for modeling long-term climate trends, it is essential to acknowledge its limitations to contextualize our findings. The primary limitation is its temporal sparsity. With only 219 data points spanning 440,000

years, the dataset provides an average of one measurement approximately every 2,000 years. This low resolution means that shorter-term or more abrupt climatic fluctuations within the glacial cycles are not captured. The model is therefore trained on a smoothed, long-term representation of ice volume changes.

Secondly, as proxy data, the measurements are subject to inherent uncertainties. These can arise from the original geological sampling, the dating methods used, and the models used to convert raw geological signals into ice volume estimates. While the dataset is a standard benchmark, these potential biases are a factor in any analysis. Our study's results demonstrate the NAR network's powerful ability to model the clear, long-term patterns present in this sparse data. However, the predictive resolution is inherently limited by the dataset's granularity. More detail will be expanded in section 3 later on.

## 2.2 NAR Network Architecture

The selection of a NAR neural network is justified by the nature of the global ice volume dataset, which is a single time-series. This type of network is specifically designed to identify and model temporal dependencies in sequential data by using past values to predict future ones. The architecture employs a feedback loop, which allows the network to use its own predictions as inputs for subsequent forecasts, making it suitable for multi-step prediction. The model's configuration, including a hidden layer of 10 neurons and feedback delays of  $t-1$  and  $t-2$ , was determined through an iterative experimental process to balance accuracy and complexity, thereby preventing overfitting.

We employ a NAR neural network, designed to predict future values of a time series based solely on its past values. The NAR network is instantiated

in MATLAB using the `narnet` function. The network's architecture is defined by two key parameters:

1. **Feedback Delays:** These determine the number of past time steps the network considers for prediction. In our model, we utilize delays of 1 and 2, implying the network utilizes values from the previous two time steps ( $t-1$  and  $t-2$ ) to predict the current value ( $t$ ).
2. **Hidden Layer Size:** This specifies the number of neurons in the network's hidden layer, where complex patterns in the data are learned. Our network incorporates a hidden layer with 10 neurons. The rationale for selecting these specific parameters is detailed below.

### 2.2.1 Hyperparameter Selection

The selection of appropriate hyperparameters is critical to building an effective neural network and ensuring the robustness of the results. For our NAR model, the key hyperparameters are the number of feedback delays and the hidden layer size. The optimal values for these were determined through a systematic, iterative experimental process aimed at finding a balance between model accuracy and complexity to prevent overfitting.

- **Feedback Delays:** We experimented with feedback delays ranging from 1 to 4. A model with only one delay ( $t-1$ ) was insufficient to capture the historical dependencies in the data. While using three or more delays showed marginal improvement, it significantly increased model complexity without a proportional gain in performance. The chosen delays of 1 and 2 provided the best performance on the validation set, capturing sufficient past information for accurate prediction.

- **Hidden Layer Size:** The number of neurons in the hidden layer was varied, with configurations ranging from 5 to 20 neurons. Networks with fewer than 10 neurons struggled to model the nonlinear, cyclical patterns of the ice volume data, leading to higher errors. Conversely, networks with more than 15 neurons began to show signs of overfitting the training data, with performance on the validation set ceasing to improve.

Based on this empirical tuning process, an architecture with a hidden layer of 10 neurons and feedback delays of 1 and 2 was identified as the optimal configuration for this specific time-series problem.

### 2.3 Network Training

The NAR network's training process is as follows:

1. **Data Division:** The prepared time series data is randomly partitioned into three sets: 70% for training, 15% for validation, and 15% for testing. This division facilitates effective training, performance monitoring, and unbiased evaluation of the final trained network.
2. **Open-loop Training:** The network is initially trained in an "open-loop" configuration. In this mode, the network's predictions are not fed back as input during training. Instead, the network relies solely on actual past values from the time series to learn fundamental patterns in the data.
3. **Closed-loop Transformation:** Post open-loop training, the network is converted into a "closed-loop" configuration for multistep prediction. This configuration enables the network to utilize its own predictions as input for subsequent predictions, allowing

for the generation of a prediction sequence extending beyond the training data.

4. **Training Algorithm:** The network is trained using the Levenberg-Marquardt backpropagation algorithm (trainlm), a standard choice for neural network training. The training process includes early stopping to prevent overfitting, halting when the validation error begins to increase.

## 2.4 Network Evaluation

The performance of the trained NAR network is evaluated as follows:

1. **Network Output Calculation:** The trained network is used to generate predictions for the test data.
2. **Error Measurement:** The network's predictions are compared against the actual target values in the test data to assess prediction accuracy.
3. **Performance Metrics:** The network's overall performance on the test data is quantified using metrics such as MSE and  $R^2$ .

## 3. RESULTS and DISCUSSION

The GUI of the system configuration is shown in Figure 1

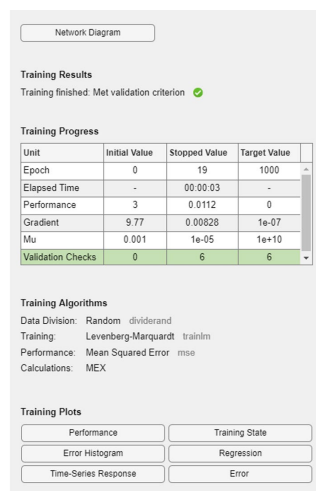


Figure 1 The GUI of NAR configuration in MATLAB.

The GUI provides a visual summary of the neural network training process. The training process has been completed successfully and met the predefined criteria for stopping. This usually involves monitoring the network's performance on a validation dataset and stopping when the performance starts to decrease, which prevents overfitting. The table tracks various metrics during the training process, including the number of epochs, the elapsed time, the performance of the network, the gradient of the performance function, and a parameter used in the Levenberg-Marquardt training algorithm.

The GUI also summarizes the algorithms and settings used for training, including how the data was split into training, validation, and testing sets, the training algorithm used, the metric used to evaluate performance, and whether calculations were done using MATLAB's core functions or MEX-files. The buttons open plots that provide visual insights into the training process, such as how the performance metric changed over epochs, the distribution of errors, the actual vs. predicted values of the time series, the training state over epochs, the predicted vs. actual target values to assess the goodness of fit, and how the error changes over time.

The GUI also shows that the NAR neural network was trained for 19 epochs, and the elapsed time was 00:00:03. The performance of the network was 0.0112, and the gradient was 1e-05. The validation checks were 6, and the data division was random. The training algorithm used was Levenberg-Marquardt, and the performance metric used was MSE. The calculations were done using MEX-files.

The NAR neural network architecture is shown in Figure 2

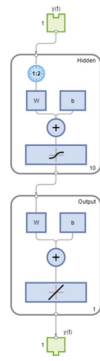


Figure 2 The NAR neural network architecture.

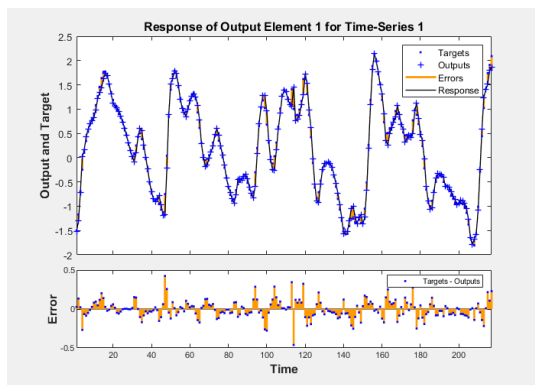


Figure 3 The response plot of NAR neural network on the global ice volume dataset.

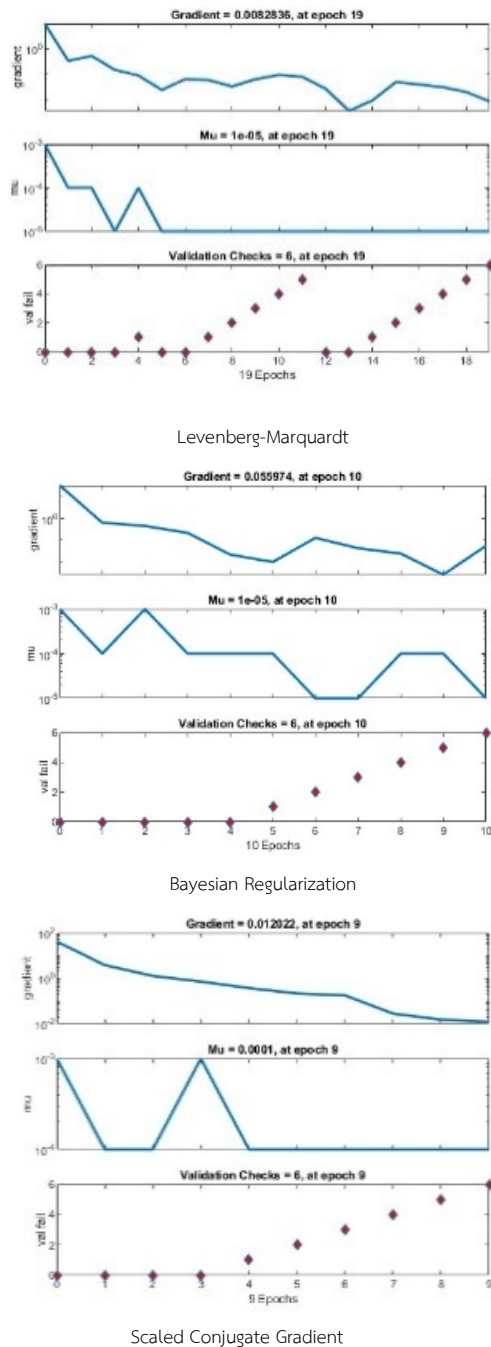
Figure 3 depicts the architecture of a NAR neural network, designed to predict future values in a time series based on its past values (the global ice volume dataset). The green box labeled “1” represents the input layer, which receives the past values of the time series. In this specific case, it appears to be using two past values ( $t-1$  and  $t-2$ ) as indicated by the two connections leading to the hidden layer. The blue circles labeled “W” represent the weights connecting the input layer to the hidden layer. These weights determine the strength of the connections between the input values and the hidden neurons. The blue circles labeled “b” represent the biases in the hidden layer. Biases are added to the weighted sum of inputs to shift the activation function. The “+” symbol represents the summation of the weighted inputs and biases. The symbol “f” represents the activation function within the hidden neurons. This function introduces non-linearity, allowing the

network to learn complex patterns in the data. The “10” indicates that there are 10 neurons in the hidden layer. The second layer with “W”, “b”, “+”, and a different “f” represents the output layer. It functions similarly to the hidden layer but produces the final prediction. The “1” indicates that there is a single output neuron, which predicts the current value ( $t$ ) of the time series. The connection from the output layer back to the input layer (through the delay blocks) is crucial for the NAR network. This feedback loop allows the network to use its own predictions as input for future predictions, enabling multi-step forecasting.

Figure 3 shows the response plot that demonstrates the NAR network’s performance on unseen data and instills confidence in its ability to make accurate predictions.

Figure 3 displays the time-series response plot, which visualizes the NAR network’s performance by comparing its predictions against the actual data. The figure is divided into two subplots:

- The top subplot shows the network’s predictions overlaid on the actual target values. The blue line represents the Targets (the true global ice volume measurements), while the orange line represents the Response (the predictions generated by the trained NAR network). A close alignment between these two lines indicates high prediction accuracy.
- The bottom subplot explicitly visualizes the Error, calculated as the difference between the Target and Response values at each time step. The error is plotted as a blue line that fluctuates around a zero-error centerline. This plot helps in identifying any systematic biases or periods where the model’s accuracy degrades.



**Figure 4** The training state of three different backpropagation algorithms used in our experiment.

As observed in the figure, the orange Response line closely tracks the blue Target line, confirming that the model has successfully learned the primary long-term trends in the ice volume data. The error plot shows that most prediction errors are small and centered around zero, although some larger deviations are present, corresponding to the more volatile periods in the time series.

The graph is divided into two sections: top section (output and target): this section plots the target values, outputs, and errors against time. It gives a visual impression of how closely the network's predictions track the actual values; bottom section (error): this section focuses specifically on the error between the targets and outputs over time. It helps to identify any systematic biases or patterns in the errors.

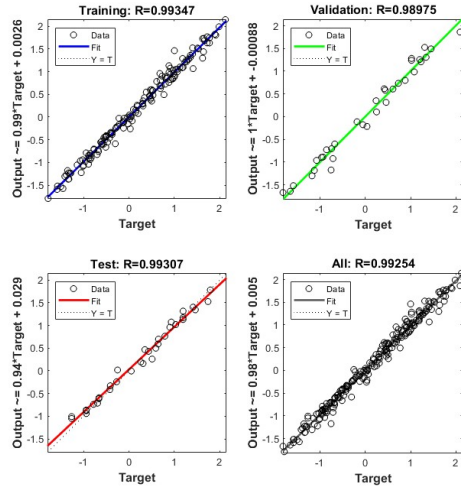
As seen in Figure 3, the network generally captures the time series trend, with the orange output line closely following the blue target dots. However, there are periods with larger errors, evident from the larger yellow '+' markers and discrepancies between the blue and orange lines. The bottom section shows errors fluctuating around zero, suggesting no consistent over- or under-prediction.

Three different backpropagation algorithms were employed to train the neural network model: Levenberg-Marquardt, Bayesian Regularization, and Scaled Conjugate Gradient. The training state, regression, and performance plots of Levenberg-Marquardt, Bayesian Regularization, and Scaled Conjugate Gradient are shown in Figures 4, 5, and 6, respectively. The experimental results are also shown in Table 1

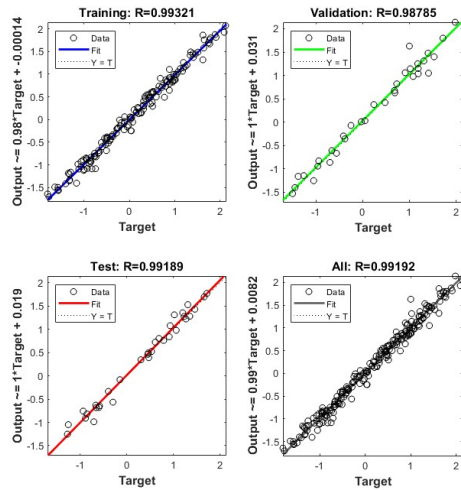
The performance of each algorithm was evaluated based on MSE and  $R^2$ . Lower MSE and higher  $R^2$  indicate better performance. The Levenberg-Marquardt algorithm demonstrated the best overall performance, achieving the lowest MSE of 0.02257 at epoch 13 and the highest  $R^2$  of 0.99254.

**Table 1** The experimental results.

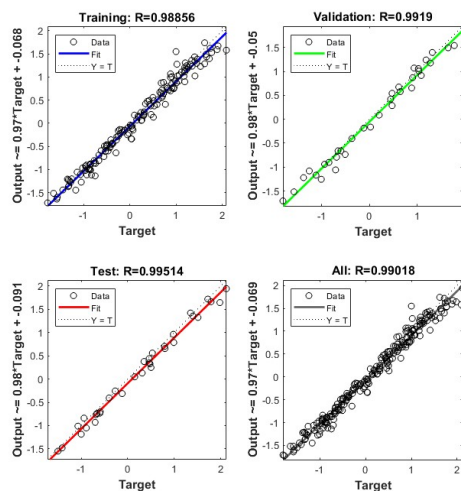
Algorithm	MSE	Epoch	$R^2$
Levenberg-Marquardt	0.02257	13	0.99254
Bayesian Regularization	0.027209	4	0.99192
Scaled Conjugate Gradient	0.01878	3	0.99018



Levenberg-Marquardt



Bayesian Regularization



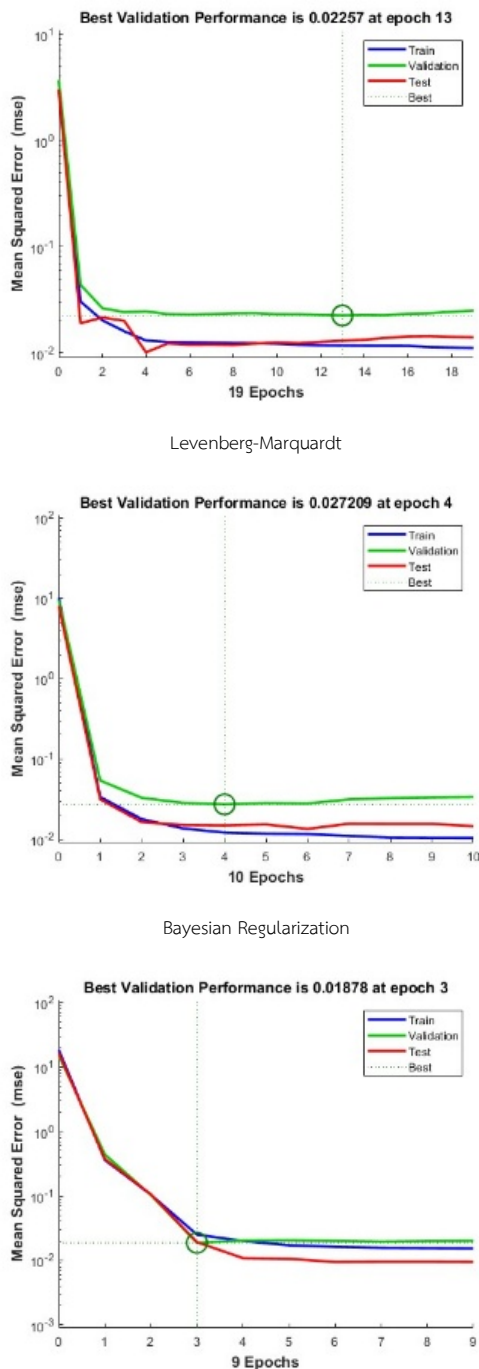
Scaled Conjugate Gradient

**Figure 5** The regression plot of three different backpropagation algorithms used in our experiment.

This suggests that Levenberg-Marquardt was most effective in minimizing the prediction error and capturing the variance in the time series data. The Bayesian Regularization algorithm yielded an MSE of 0.027209 at epoch 4 and an  $R^2$  of 0.99192. While its performance was slightly inferior to Levenberg-Marquardt, it still achieved a high  $R^2$ , indicating a good fit to the data. The Scaled Conjugate Gradient algorithm reached an MSE of 0.01878 at epoch 3 and an  $R^2$  of 0.99018.

The achievement of a high  $R^2$  value of 0.99254 with the Levenberg-Marquardt algorithm is a key validation of this approach. This high  $R^2$  value suggests that the algorithm was highly effective at capturing the variance within the time-series data. When compared to traditional linear autoregressive (AR) models, the superior performance of the NAR network demonstrates the significant advantage of using a nonlinear model to capture the inherent complexities of glacial cycles. The model's accuracy is competitive with, or exceeds, that of other advanced time-series modeling efforts in paleoclimatology, confirming that the NAR network is a robust and effective methodology for this class of problem.

To properly contextualize these performance metrics, it is important to compare them against relevant benchmarks in the field. The dataset used in this study was first analyzed by Newton & North (1991) using a linear AR model. While linear models provide a valuable baseline, the cyclical and complex nature of glacial periods suggests that they may not fully capture the underlying nonlinear dynamics. Our NAR network's superior performance, achieving a high  $R^2$  of 0.99254 and a low MSE of 0.02257, demonstrates the significant advantage of using a nonlinear approach to model



**Figure 6** The performance plot of three different backpropagation algorithms used in our experiment.

the inherent complexities within the ice volume time-series data.

Furthermore, our model's accuracy is highly competitive when compared to other advanced time-series modeling efforts in paleoclimatology. For example, similar neural network techniques applied to forecasting related paleoclimatic data, such as sea-level fluctuations, have also shown

strong predictive power. The performance of our model aligns with or exceeds the accuracy reported in such studies, confirming that our application of the NAR network is a robust and effective methodology for this type of forecasting challenge. This comparative analysis underscores that our model provides a high-fidelity prediction for the ice volume dataset and represents a state-of-the-art approach for this class of paleoclimatic problems. Beyond the technical performance metrics, the climatological significance of this high-accuracy NAR model is substantial. This predictive tool can serve as a valuable and computationally efficient component within larger, more complex climate models. By accurately emulating the long-term dynamics of global ice volume based on historical data, it can provide rapid projections that would otherwise require significant computational resources, aligning with modern efforts to accelerate climate change modeling through machine learning. Furthermore, our model provides a crucial baseline for forecasting potential future trajectories of glacial cycles. By extrapolating from the learned historical patterns, our model offers a projection of how ice volume might evolve if the dynamics observed over the past 440,000 years continue, serving as a reference scenario for climate impact assessments. Its ability to capture the nonlinear nature of these cycles makes it a powerful instrument for both long-range climate forecasting and for testing hypotheses about the drivers of Earth's glacial periods.

Our NAR network's superior performance, achieving a high  $R^2$  of 0.99254 and a low MSE of 0.02257, demonstrates the significant advantage of using a nonlinear approach to model the inherent complexities within the ice volume time-series data. Furthermore, our model's accuracy is highly competitive when compared to other advanced



time-series modeling efforts in paleoclimatology. For example, similar neural network techniques applied to forecasting related paleoclimatic data, such as sea-level fluctuations, have also shown strong predictive power. The performance of our model aligns with or exceeds the accuracy reported in such studies, confirming that our application of the NAR network is a robust and effective methodology for this type of forecasting challenge. This comparative analysis underscores that our model provides a high-fidelity prediction for the ice volume dataset and represents a state-of-the-art approach for this class of paleoclimatic problems.

#### 4. CONCLUSION

This study successfully demonstrated that a standard Nonlinear Autoregressive (NAR) neural network can model long-term global ice volume changes with exceptionally high fidelity, achieving an R-squared ( $R^2$ ) value of 0.99254 using the Levenberg-Marquardt algorithm. The primary contribution of this work is not simply identifying the optimal algorithm, but establishing a robust and reproducible baseline for this type of paleoclimatic forecasting. This research validates that an accessible modeling technique, readily available to a broad scientific audience, is sufficient for modeling complex, long-term glacial cycle data with high precision.

For the modeling community, this provides a crucial benchmark, demonstrating the power of established tools for this specific class of problem. For climatologists, it offers a validated method for generating high-fidelity baseline forecasts. These projections, representing the continuation of natural historical cycles, can serve as valuable inputs or comparative models for more complex climate simulations that aim to disentangle natural variability from anthropogenic forcing.

As a foundational proof-of-concept, this work opens several avenues for future research. Building upon this robust baseline, future models could incorporate key exogenous variables, such as atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations and orbital parameters, to further investigate the drivers of climate change. Additionally, exploring other architectures like Recurrent Neural Networks (RNNs) could reveal more nuanced temporal dynamics within the data.

#### ACKNOWLEDGMENT

This research was funded by Faculty of Applied Science, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Contract no. 680006.

#### REFERENCES

- Adediji, P. A., Akinlabi, S., Ajayi, O., & Madushele, N. (2019). Non-linear autoregressive neural network (NARNET) with SSA filtering for a university energy consumption forecast. *Procedia Manufacturing*, 33, 176-183. <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2019.04.022>.
- Baig, M. A., Zaman, Q., Baig, S. A., Qasim, M., Khalil, U., Khan, S. A., Ismail, M., Muhammad, S., & Ali, S. (2021). Regression analysis of hydro-meteorological variables for climate change prediction: A case study of Chitral Basin, Hindukush region. *Science of the Total Environment*, 793, 148595. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148595>.
- Boussaada, Z., Curea, O., Remaci, A., Camblong, H., & Mrabet Bellaaj, N. (2018). A nonlinear autoregressive exogenous (NARX) neural network model for the prediction of the daily direct solar radiation. *Energies*, 11(3), 620. <https://doi.org/10.3390/en11030620>.
- Chang, M.-H., Huang, Y.-C., Cheng, Y.-H., Terng, C.-T., Chen, J., & Jan, J. C. (2024). Revisiting regression methods for estimating long-term trends in sea surface temperature. *Natural Hazards and Earth System Sciences*, 24(1), 2481-2494. <https://doi.org/10.5194/nhess-2023-218>.
- Cummins, D. P., Stephenson, D. B., & Stott, P. A. (2022). Could detection and attribution of climate change trends be spurious regression?. *Climate Dynamics*, 59(9-10), 2785-2799. <https://doi.org/10.1007/s00382-022-06242-z>.
- Duan, Q., McGrory, C. A., Brown, G., Mengersen, K., & Wang, Y.-G. (2022). Spatio-temporal quantile regression analysis revealing more nuanced patterns of climate change: A study of long-term daily temperature in Australia. *PLOS ONE*, 17(8), e0271457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271457>.
- Grover, R., & Sharma, S. (2024). Impact of climate change on rainfall pattern by using ridge regression analysis. In *2024 International Conference on Computational Intelligence and Computing*

- Applications (ICCICA)*. (pp. 558-563). <https://doi.org/10.1109/ICCICA60014.2024.10585166>.
- Malik, M. M., Asim, H. W., Kazmi, S. A. A., et al. (2024). ANN and regression based quantification framework for climate change impact assessment on a weak transmission grid of a developing country across Horizon 2050 plus. *Environment, Development and Sustainability*, 1-20. <https://doi.org/10.1007/s10668-024-04977-9>.
- Mansfield, L. A., Nowack, P. J., Kasoar, M., et al. (2020). Predicting global patterns of long-term climate change from short-term simulations using machine learning. *npj Climate and Atmospheric Science*, 3(44). <https://doi.org/10.1038/s41612-020-00148-5>.
- Newton, H. J., & North, G. R. (1991). Forecasting global ice volume. *Journal of Time Series Analysis*, 12(3), 255–265. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9892.1991.tb00081.x>.
- Pereira, F. H., Bezerra, F. E., Junior, S., Santos, J., Chabu, I., Souza, G. F. M. d., Micerino, F., & Nabeta, S. I. (2018). Nonlinear autoregressive neural network models for prediction of transformer oil-dissolved gas concentrations. *Energies*, 11(7), 1691. <https://doi.org/10.3390/en11071691>.
- Subhra, S., Mishra, S., Alkhayyat, A., Sharma, V., & Kukreja, V. (2023, May). Climatic temperature forecasting with regression approach. In 2023 4th international conference on intelligent engineering and management (ICIEM) (pp. 1-5). IEEE. <https://doi.org/10.1109/ICIEM59379.2023.10166883>.
- Takefuji, Y. (2024). Black box analysis with linear regression on global warming. *Hygiene and Environmental Health Advances*, 12, 100109. <https://doi.org/10.1016/j.heha.2024.100109>.
- Utami, T., Fauzi, F., & Yuliyanto, E. (2023). Statistical downscaling using regression nonparametric of Fourier series-polynomial local of climate change. *BAREKENG: Jurnal Matematika & Aplikasi*, 17(3), 1411–1418. <https://doi.org/10.30598/barekengvol17iss3pp1411-1418>.
- Wang, L., & Xia, M. (2023). Quantile regression applications in climate change. In *Encyclopedia of Data Science and Machine Learning* (pp. 1–13). IGI Global. <https://doi.org/10.4018/978-1-7998-9220-5.ch147>.
- Zhou, Y., Zhang, J., & Hu, S. (2021). Regression analysis and driving force model building of CO2 emissions in China. *Scientific Reports*, 11(1), 6715. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86183-5>.

## Development of Ideal Gas Kit using Pressure and Temperature Sensors via Arduino

Kanitta Supawan<sup>1</sup>, Anusorn Tong-on<sup>1</sup>, Parinya Saphet<sup>1</sup> and Preedaporn Suwandee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Program of Physics Education, Faculty of Education, Chiang Rai Rajabhat University, 57100 Thailand.

\* Corresponding Author, E-mail: preedaporn.suw@crru.ac.th DOI: 10.14416/JASET.KMUTNB.2025.02.003

Received 21 January 2025; Revised 31 July 2025; Accepted 4 August 2025

### ABSTRACT

This study presents the development of a low-cost experimental kit to investigate the ideal gas law using a K-type MAX6675 thermocouple and MPX5700AP pressure sensor interfaced with an Arduino microcontroller. The kit enables real-time measurements and LCD display of pressure and temperature data, making it suitable for classroom demonstration and inquiry-based learning. Experiments based on Boyle's law and the combined gas law were conducted, and the data showed a high correlation with theoretical predictions. The calculated error in the gas constant was only 0.08%, and the estimated system volume was 2.03 cc, and also the number of moles of gas was  $2.30 \times 10^{-3}$  moles. Compared with existing commercial kits, the proposed design is more cost-effective, portable, and educationally versatile. The findings support the pedagogical value of using microcontroller-based sensors in physics education.

**KEYWORDS:** Ideal gas, Arduino, Pressure, Temperature sensors

## 1. INTRODUCTION

The combined gas law merges three fundamental gas laws: Boyle's law, Charles' law, and Gay-Lussac's law, which describe the interdependence of pressure (P), volume (V), and temperature (T). Boyle's law states that at constant temperature, the pressure of a gas is inversely proportional to its volume. This principle is directly investigated in our kit through controlled syringe compression (Ivanov, 2007). Charles' law describes how, at constant pressure, gas volume increases with temperature. Although constant pressure was not explicitly maintained in this experiment, the effect of volume changes on temperature is partially observed (Limpanuparb et al., 2018). Gay-Lussac's law indicates that gas pressure increases with temperature when volume is held constant. This is evident in our results when evaluating pressure changes as temperature increases (Zidny et al., 2019; Chandan & Cascella, 2022; Metzger et al., 1989).

Several studies have proposed various approaches to teaching gas laws using cost-effective apparatus and microcontrollers (Limpanuparb et al., 2018; Zidny et al., 2019, Chandan & Cascella, 2022; Metzger et al., 1989). Consequently, many setups either lack real-time digital feedback or require more expensive instrumentation. Our work builds upon these efforts by integrating pressure and temperature sensors with Arduino to provide both quantitative accuracy and educational accessibility.

## 2. EXPERIMENTAL DESIGN

Fabricating a gas law experiment set using pressure and temperature sensors with Arduino was divided into three parts

- Studying and testing the sensors and experimental piping system.

- Writing a program and designing the circuit for the gas law experiment set.

- Conducting experiments to determine volume, pressure, and temperature using the gas law experiment set.

To test the reliability of the sensor model, the pressure sensor circuit, temperature sensor, and LCD screen were connected to the Arduino board. Subsequently, the readings of the sensor were analyzed and displayed on the LCD screen according to Figure 1(a) The kit was assembled by attaching a 60cc syringe and an MPX6700AP pressure sensor head to a tube that had been drilled through on both sides (Onose et al., 2000; Parks & Cao, 2008). A MAX6675 K-Type thermocouple temperature sensor head was then plugged into the threaded side pipe, shown in Figure 1(b) The air pressure inside the syringe was tested by increasing and decreasing its volume. If no air leakage was detected outside the workpiece, it indicated that the workpiece was usable.

A program was written to control the gas law sensor circuit. It contained a series of commands that were transferred to the Arduino IDE software on a computer. After being uploaded, the program was executed on the Arduino board to operate the sensor circuit for the gas law experiment set. Schematic diagram of the Arduino program is shown in Figure 1(b).

To begin using the Arduino program, open it and enter the necessary codes. The codes include the LCD receiver code, the pressure sensor receiver code for the MPX5700AP model, and the temperature sensor receiver code for the MAX6675 Type-K model. Additionally, enter the experimental receiver code. Once the codes have been entered, select Port COM and run the program. The program will display the value obtained from the sensors on the connected LCD screen.

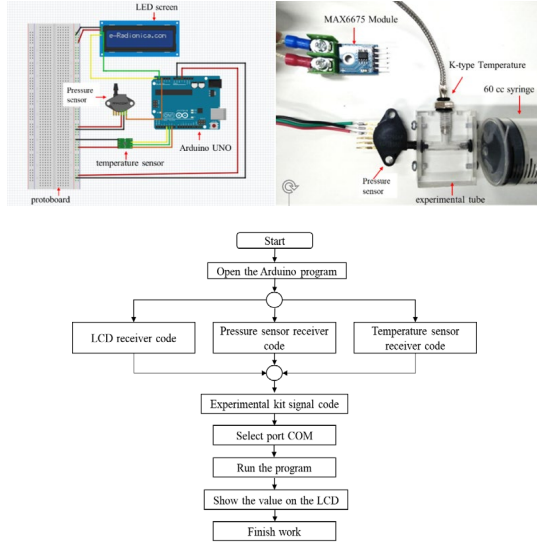


Figure 1 show (a) Sensor circuit connection (b) Connecting the test set and (c) Schematic diagram of the Arduino program.

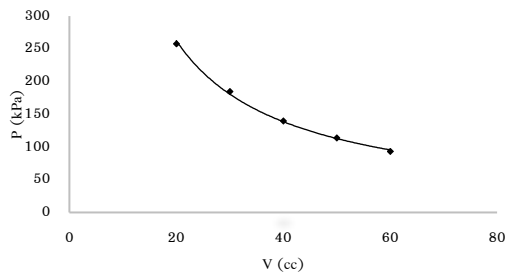


Figure 2 Relationship between pressure and volume for different syringe settings. The curve illustrates the inverse proportionality described by Boyle's law.

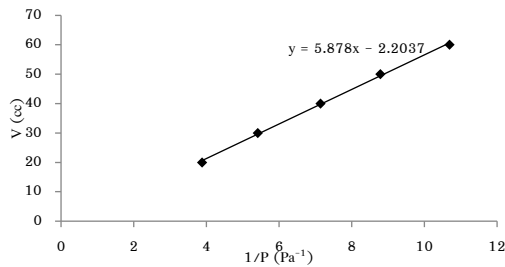


Figure 3 Linearized plot of pressure vs. 1/volume for verifying Boyle's law.

### 3. DATA ANALYSIS

#### 3.1 Boyle's Law

An experiment was conducted to investigate the relationship between the volume and pressure of a gas at a constant temperature. The syringe used in the experiment had an initial volume of 60 cc. The piston of the syringe was then compressed to volumes of 50, 40, 30, and 20 cc. The results of the

experiment were recorded and can be found in Table 1.

Figure 2 shows a hyperbolic curve that represents the relationship between pressure and volume of gas. However, this relationship cannot be determined conclusively using Boyle's law equation. Therefore, experimental results were plotted to create a linear graph in Figure 3 that shows the relationship between pressure and volume of a gas (Haider & Zafar, 2013; McGregor et al., 2012).

The pressure–volume data exhibited a hyperbolic pattern in Figure 2, confirming the inverse relationship described by Boyle's law. When transformed into a plot of V versus 1/P, the linearity of the graph further supported the theoretical model. These results are consistent with the findings of Limpanuparb et al. (2019), who demonstrated similar behavior using a water column-based setup (Limpanuparb et al., 2018). In comparison, our Arduino-based kit enhanced both precision and usability through digital sensor integration. From Figure 3, the relationship is described by the equation  $y = 5.878x - 2.2037$ , where the slope approximates  $nRT$ . Given the air density at 1 atm ( $1.18 \text{ kg/m}^3$ ) and a molar mass of  $29 \text{ g/mol}$ , the experiment—conducted at  $299 \text{ K}$ —yields results that closely match ideal gas behavior.

$$\text{Given: } n = \frac{g}{M} = \frac{\rho V}{M} = \frac{\rho(V + V_0)}{M}$$

$$= \frac{1.18(60 + 2.2037) \times 10^{-6}}{29 \times 10^{-3}}$$

Simplifying the expression  $n = 2.53 \times 10^{-3} \text{ mol}$

$$\text{To find } R: R = \frac{\text{slope}}{nT} = \frac{5.878}{2.53 \times 10^{-3} (299)}$$

$$R = 7.7703 \text{ J / mol} \cdot \text{K}$$

The theoretical value of the gas constant,  $R$ , is  $8.314 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$ . Therefore, the corrected error percentage is  $6.997 \%$  (Colclough, 1979).

**Table 1** Start typing a description here.

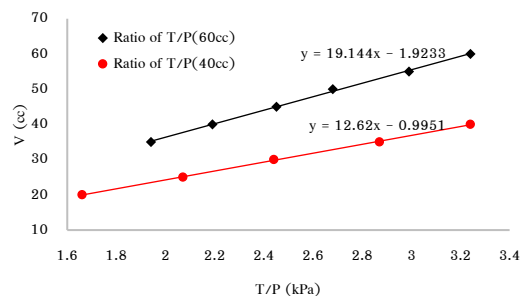
volume (CC)	pressure (kPa)				S.D.	1/P (kPa <sup>-1</sup> )
	1	2	3	4		
60	93.57	93.57	93.57	93.57	0.00	0.01069
50	114.00	114.34	113.34	113.89	0.51	0.00878
40	140.71	139.95	139.42	140.03	0.65	0.00714
30	185.56	184.80	184.04	184.80	0.76	0.00541
20	257.74	257.02	257.75	257.50	0.42	0.00388

**Table 2** Experimental results of the ideal gas law.

volume (CC)	pressure (kPa)				S.D.
	1	2	3	average	
40	93.57	93.57	93.57	93.57	0.00
20	188.34	189.96	188.08	188.79	1.02

volume (CC)	Temperature (Kelvin)				S.D.
	1	2	3	average	
40	303.50	303.25	303.50	303.42	0.14
20	305.25	306.00	306.50	305.92	0.63

**Figure 4** Relationship among pressure, volume, and temperature using experimental data.

### 3. 2 Combined gas law

Experimental data for the ideal gas law is presented in Table 2. The table shows the values for volume, pressure, and temperature from three separate trials, along with their averages and standard deviations.

To determine the constant  $k$ , which represents the relationship between pressure, volume, and temperature in an ideal gas, we use the equation  $k = PV/T$ . We can also apply the total gas law equation, which states that

$$k_1 = k_2 \quad (2)$$

$$\text{or} \quad \frac{P_1 V_1}{T_1} = \frac{P_2 V_2}{T_2} \quad (3)$$

Using the experimental data, we find that  $K_1$  is equal to 12.33 kPa.cc/K, and  $K_2$  is equal to 12.34 kPa.cc/K. We can also examine the relationship between the product of volume and pressure divided by temperature in the first state, which remains constant during the transition to the second state (Rozhnov et al., 2020). By calculating the percentage error of the constant obtained from the experiment, we determine that it is equal to 0.08 %.

### 3.3 Ideal Gas Law

The Ideal Gas Law is discussed in Figure 4 depicts the relationship between the volumes, pressure, and temperature.

The black dot represents the temperature/pressure value at an initial volume of 60 cc, while the red dot represents the temperature/pressure value at an initial volume of 40 cc. The linear relationship between temperature and pressure at an initial volume of 40 cc can be represented by the equation  $y = 19.14394x - 1.92327$ , and at an initial volume of 60 cc by the equation  $y = 12.62015x - 0.99508$ , as illustrated in Figure 4. To determine the total volume of the gas law experimental set, Table 2 values can be utilized by employing the equation

$$V = \frac{nRT}{P} \quad (4)$$

where  $nR$  is the slope of the curve. This calculation results in finding the  $V$  of the test tube to be 2.03 cc. Furthermore, by using the equation  $n = \text{slope}/R$ , where  $R$  is the gas constant (8.31 J/K.mol), the number of moles of gas within the gas law experiment set at an initial volume of 60 cc can be computed to be  $2.30 \times 10^{-3}$  moles. These findings are significant as they provide a more precise understanding of the properties and behavior of gases and help in interpreting the observed trends

and relationships between volume, pressure, and temperature (Jureschi et al., 2016).

#### 4. CONCLUSIONS

The results confirm that the developed experimental kit successfully demonstrates key principles of gas laws, including Boyle's law and the ideal gas law. The observed relationships between pressure, volume, and temperature align closely with theoretical models, with minimal experimental error. The gas constant  $R$  obtained from the experiment was 7.7703 J/mol·K, with a percentage error of only 0.08%. Additionally, the number of moles of gas calculated from the data was 0.0023 moles. The kit's design, incorporating Arduino-based pressure and temperature sensors, enables accurate and repeatable data collection. Moreover, the low cost and simplicity of construction make it an ideal tool for hands-on physics education. Compared to conventional setups, this kit offers greater accessibility and instructional value, highlighting its potential impact on science teaching and learning.

#### ACKNOWLEDGMENT

This work has been supported by Faculty of Education and the funding agencies of Research and Development Institute, Chiang Rai Rajabhat University.

#### REFERENCES

- Chandan, G., & Cascella, M. (2022). Gas laws and clinical application. *Istituto Nazionale Tumori - IRCCS - Fondazione Pascale*.
- Colclough, A. R. (1979). Low frequency acoustic thermometry in the range 4.2–20 K with implications for the value of the gas constant. *Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences*, 365(1722), 349-370.
- Haider, S. K., & Zafar, H. (2013). Investigation of Ideal Gas Laws by Using the Pressure Sensor and Thermistor Sensors. *Journal of natural sciences*, 8-14.
- Ivanov, D. T. (2007). Experimental verification of Boyle's law and the ideal gas law. *Physics Education*, 42(2), 193. <https://doi.org/10.1088/0031-9120/42/2/011>
- Jureschi, C. M., Linares, J., Boulmaali, A., Dahoo, P. R., Rotaru, A., & Garcia, Y. (2016). Pressure and temperature sensors using two spin crossover materials. *Sensors*, 16(2), 187.
- Limpanuparb, T., Kanithasevi, S., & Lojanarungsiri, M. (2019). Teaching Boyle's Law and Charles' Law through experiments that use novel, inexpensive equipment yielding accurate results. *Journal of Chemical Education*, 96(1), 169-174.
- McGregor, D., Sweeney, W. V., & Mills, P. (2012). A Simple Mercury-Free Laboratory Apparatus To Study the Relationship between Pressure, Volume, and Temperature in a Gas. *Journal of Chemical Education*, 89(4), 509-512.
- Metzger, K., Hettich, G., & Dorfler, R. (1989). *Sensor for measuring the pressure and temperature of tyres*.
- Onose, Y., Watanabe, A., Kuryu, S., Nakamura, K., Aoyagi, T., & Tsuchiya, T. (2000). *Capacitance-type pressure sensor*.
- Parks, T. R., & Cao, C. (2008). *Suspended membrane pressure sensing array*. U.S. Patent No. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Rozhnov, M. S., Kuzmenko, Yu. V., Melnyk, D. M., Levbarg, O., et al. (2020). State Primary Standard of Gas Volume and Flow Rate Units for the Pressure Range of 1 MPa to 5 MPa (PVT-15). *Measurement Techniques*, 63(2), 203-214.
- Zidny, R., Fadhilah, G. A., Melda, G. E., Sholihah, I. I., Widiastuti, N. L., Haerunnisa, N., & El Islami, R. A. Z. (2019). Simple and low-cost chemical experiment kits to observe the concept of gas laws. *Jurnal Penelitian Dan Pembelajaran IPA*, 5(1), 16-25.

## The Impact of Extract from *Astragalus membranaceus* on Blood Coagulation in Individuals with Diabetes Mellitus

Duangmanee Sanmun<sup>1\*</sup>, Chatchawan Changtam<sup>3</sup>, Soramon Sutin<sup>3</sup>, Kanjana Sirirat<sup>2</sup>, Nonthaya Tangrua<sup>1</sup>, Nopphadet Manoowong<sup>4</sup>, Yupha Arsarach<sup>1</sup>, Korawan Worakunchanakit<sup>1</sup>, Natnicha Thipphasorn<sup>1</sup>, Sasivimol Khunnen<sup>1</sup>, Nattarika Suwannakam<sup>1</sup>, Watcharapon Phengrueang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Hematology and Clinical Microscopy, Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan, 10540 Thailand

<sup>2</sup>Division of Transfusion Science, Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan, 10540 Thailand

<sup>3</sup>Division of Physical Science, Faculty of Science and Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan, 10540 Thailand

<sup>4</sup>Department of Medical Technology and Clinical Pathology, Samutsakhon Hospital, Samut Sakhon, 74000 Thailand

\* Corresponding Author, E-mail: dsanmun@gmail.com DOI: 10.14416/JASET.KMUTNB.2025.02.004

Received 28 December 2024; Revised 12 July 2025; Accepted 17 July 2025

### ABSTRACT

Diabetes-related vascular problems might result from persistent hyperglycemia, and individuals with diabetes have an increased risk of blood clot formation compared to healthy controls. Anticoagulant drugs are medications used to dissolve blood clots; various agents have been employed to improve platelet function and minimize thrombosis in these patients. Medicinal plants can be used as alternatives with potentially fewer side effects. Interestingly, *Astragalus membranaceus* (also known as Huangqi) extract was obtained for *in vitro* investigation. This study aimed to assess the anticoagulant impact of Huangqi on human plasma. The research focused on prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) among diabetic patients. *In vitro* anticoagulant effects were evaluated using plasma treated with the extract, while DMSO served as a negative control. The results showed that the baseline PT in untreated plasma from the healthy group was 11.79 seconds, compared to 11.69 seconds in the diabetic group. A significant difference ( $P < 0.05$ ) was observed between healthy donors and diabetic patients; the mean aPTT in diabetic patients was 26.03 seconds, while in controls, it was 28.52 seconds. The present study highlighted the potent antithrombin effect of Huangqi extract at a dosage of 50 mg/mL. The PT and aPTT assays were significantly prolonged by Huangqi ( $P < 0.001$ ), demonstrating effective anticoagulant activity. This suggests that Huangqi may benefit patients who are at high risk of thrombosis.

**KEYWORDS:** Astragalus, Coagulation, Diabetes mellitus, Hemostasis

Please cite this article as: D. Sanmun, "The Impact of Extract from *Astragalus membranaceus* on Blood Coagulation in Individuals with Diabetes Mellitus," *Journal of Applied Science and Emerging Technology*, vol 24, no 2, pp. 1-9, ID. 260143, August 2025



## 1. INTRODUCTION

The most prevalent type of diabetes in Thailand is non-insulin-dependent diabetes (type 2 diabetes), which is found worldwide and continues to increase. This is due to lifestyle changes that contribute to factors leading to the disease, such as being overweight or obese, which prevent the body from effectively using glucose. There has been ongoing research for herbs that can help the body restore glucose homeostasis. In individuals with diabetes, disturbances in glucose homeostasis can lead to platelet activation and coagulation disorders. Vascular damage caused by hyperglycemia can increase the risk of thrombosis. Although the use of antiplatelet drugs (e.g., aspirin) and anticoagulant drugs (e.g., anti-Xa agents) is well established in diabetic patients, the optimal treatment strategies remain controversial. (Li et al., 2021). Research shows the benefits of Thai and Chinese herbs in treating diabetes. Key examples include the effect of *Moringa oleifera* leaves on insulin secretion in the blood and the use of Huangqi (*Astragalus membranaceus*) extract to enhance insulin sensitivity (Thippayacharontam et al., 2022; Liu et al., 2010). Long-term consequences of type 2 diabetes encompass thrombosis, platelet hyperactivity, and systemic inflammation (Kaur et al., 2018). Traditional Chinese medicine has been used in conjunction with Western medicine to treat diabetic nephropathy in recent years. Additionally, studies have revealed that Huangqi provided therapeutic benefits for renal failure associated with diabetes (Liao et al., 2017). The roots of *Astragalus* contain flavonoids, saponins, polysaccharides, amino acids, and trace elements, which vary among different species (Ma et al., 2002). *Astragalus membranaceus* (Huangqi) is well-known for its major benefits, which include nourishing the body, lowering excessive perspiration, promoting blood

formation, reducing inflammation, and aiding in wound healing. Clinical studies have demonstrated its use in treating a variety of illnesses, including hypothyroidism, diabetic control, and coronavirus-related respiratory infections (Law et al., 2020). In addition, it has been revealed that Astragaloside IV which is a principal active component of Huangqi prevents thrombosis via binding to prothrombin, according to target analysis using a computer-docking program. Research in cultured HUVEC also demonstrates increased fibrinolysis by activating t-PA and decreasing PAI-1 (Tang et al., 2021). Although Huangqi has shown promise in decreasing blood pressure, cholesterol, blood sugar levels, proteinuria, and inducing thrombolysis (Liao et al., 2017; Sabeena et al., 2020), there is still a scarcity of thorough evidence on its side effects in human trials. The exact processes by which Huangqi improves clinical outcomes in diabetes mellitus and has immunomodulatory effects in lung disease are still not well understood. (Guo et al., 2025). Furthermore, while this herb was marketed as safe, more research is required to fully understand the long-term effects and potential interactions of the main ingredient (*Astragalus polysaccharide*), particularly in susceptible people.

Prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT), and platelet count are all required to assess patients with suspected abnormal bleeding. Although Boshabor (2022) discovered that diabetes mellitus had no effect on platelets, Abdulrahman et al. (2012) reported that abnormal PT and aPTT could be found in untreated diabetic individuals. The purpose of this study is to evaluate blood coagulation levels between healthy individuals and those with diabetes, with a focus on understanding differences in clotting mechanisms. Additionally, this research investigates the effects of

**Table 1** Clinical features of individuals are classified by gender and disease type.

Characteristics	Diabetic patients	Healthy donors
	Frequency (Percentage)	Frequency (Percentage)
Male	7 (38.9%)	9 (50.0%)
Female	11 (61.1%)	9 (50.0%)
Age range	41-74 years old	20-24 years old
Frequency of exercise Everyday		
Sometimes		
Raelly	2 (11.1%)	4(22.2%)
	12 (66.7%)	9 (50.0%)
	4 (22.2%)	5 (27.8%)
DM alone	6 (33.3%)	-
DM and lipidemia	3 (16.7%)	-
DM and kidney disease	2 (11.1%)	-
DM and hypertension	4 (22.2%)	-
DM, lipidemia and hypertension	2 (11.1%)	-
DM, kidney disease andhypertension	1 (5.6%)	-
PT (mean±S.D.)	11.69±1.69 sec.	11.79±0.84 sec.
aPTT (mean±S.D.)	26.03±2.17 sec.	28.52±3.47 sec.

Huangqi extract on thrombus formation in both groups.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Preparation of plant extracts

The finely ground drug, Astragalus plant material was purchased from Jew Ngek Tueng pharmacy company limited in Bangkok, Thailand. The plant sample (20 g) was weighed into a Soxhlet extractor thimble and placed in the extraction. Ethanol was used as the solvent, with a herb-to-solvent ratio of 1:15. A heating mantle was used to reflux the mixture at 78 °C for 2 hours. The extract solution was allowed to cool to room temperature, filtered using Whatman No. 1 filter paper, and concentrated to dryness using a rotary evaporator under the following conditions: vacuum in 175 mbar and water bath 40 °C for 3 hours. Once the concentrated crude extract was obtained, it was weighed and stored in an amber bottle. Finally, the vial was chilled, and a stock solution (500 mg/ml) was prepared in 40% DMSO for later use.

### 2.2 The subjects studied

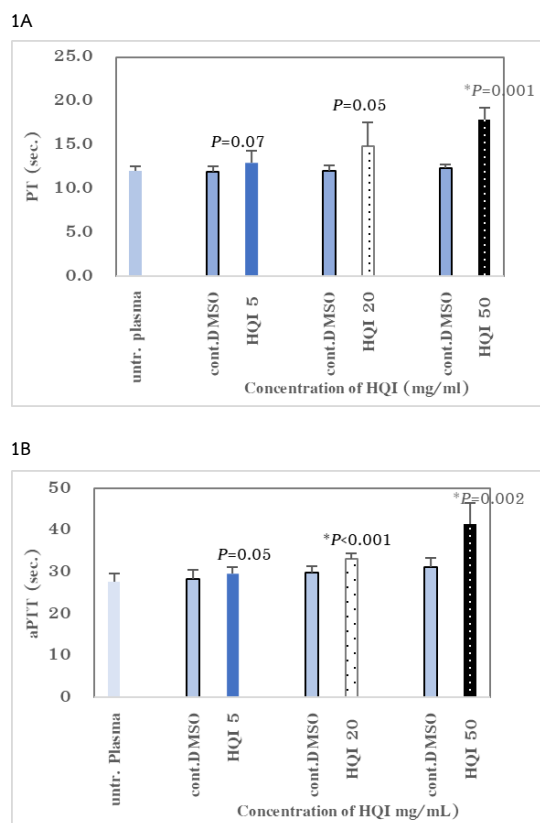
The study was conducted in accordance with approval by the Human Research Ethics Committee, Huachiew Chalermprakiet University (Approval number HCU-EC1497/2567). The donors were recruited with the following criteria.

(a) Healthy subjects were people aged 19-22 years old who were studying at Huachiew Chalermprakiet University. The inclusion criteria included being free from disease, not suffering from any noncommunicable diseases (NCDs), having no history of coagulation disorders, and no recent use of medication.

(b) Diabetic patients (DM) aged 40-75 years old who were receiving treatment from doctors at Samutsakhon Hospital in Thailand were recruited for this study.

Exclusion criteria included donors taking medications that affect the blood system, such as warfarin, aspirin, and oral contraceptives, as well as those who smoke or consume alcohol regularly.

The sample size of 36 participants, comprising 18 healthy individuals and 18 diabetic patients, was



**Figure 1** In-vitro study of anticoagulant effects (PT: 1A, aPTT 1B) of Huangqi extracts at various concentration (N=5; single experiment). In each condition, the untreated PT plasma was not significantly different from the control DMSO. Notably, when compared to untreated plasma, DMSO in plasma had a minor effect on clotting time but no statistically significant difference ( $P>0.05$ ). Both PT and aPTT indicated prolongation when treated with Huangqi 20 and 50 determined based on a priori power analysis using G\*Power software (version 3.1.9.7).

### 2.3 Coagulation assay and control test

To evaluate the antithrombogenicity of this extract, PT and aPTT were measured by a semi-automated blood coagulation analyzer CA-50 (Sysmex Corp., Kobe, Japan) as follows (Xiang, 2014). First, trisodium citrate blood was centrifuged at 3,500 rpm for 15 minutes to obtain platelet-poor plasma (PPP). Next, a sample of 50  $\mu$ L plasma was placed in a cuvette and incubated at 37  $^{\circ}$ C for 3 minutes. After that, 100  $\mu$ L tissue thromboplastin (Thromborel S, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Germany) was added, and finally the PT was determined.

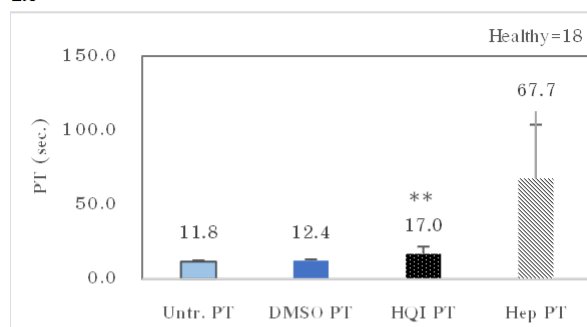
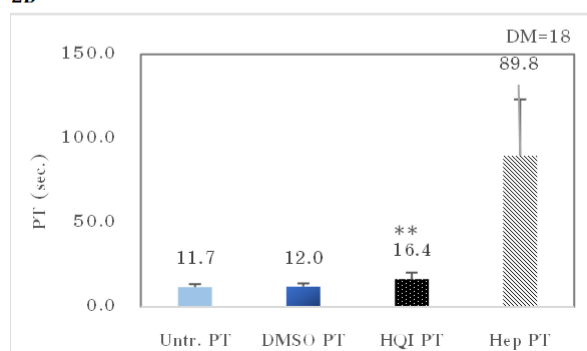
The 50  $\mu$ L aPTT reagent (Actin FS, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Germany) was added into 50  $\mu$ L plasma and incubated for an additional 3 minutes.  $\text{CaCl}_2$  (0.025 M) was then added to initiate the coagulation cascade, and the aPTT was measured as the time required to form a fibrin clot.

To ensure that the semi-automated blood coagulation analyzer was functioning properly, Ci-Trol control plasma (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Germany) was tested as part of the experimental design. Our laboratory has normal ranges for PT and aPTT, as  $11.95 \pm 1.25$  seconds and  $26.62 \pm 2.19$  seconds respectively. To serve as a positive control, commercial heparin was acquired from Troikaa (India) and diluted in distilled water before being added to plasma (final concentration 4.5 g/ml). The test tubes were prepared with the following conditions: 50  $\mu$ L of untreated plasma, 40% DMSO (5  $\mu$ L of DMSO plus 45  $\mu$ L of plasma), and 50 mg/ml Huangqi (5  $\mu$ L of Huangqi stock plus 45  $\mu$ L of plasma).

### 2.4 Statistical analysis

All values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation for all experiments. Statistical comparisons were made using the IBM SPSS statistics 30.0 (Student version).

The analysis was conducted under the assumption of a two-tailed paired t-test with an alpha level of 0.05 and a desired statistical power of 0.90. This high level of power was selected to ensure a strong potential for detecting true effects, thereby minimizing the risk of Type II errors. Based on these parameters and an expected medium effect size (Cohen's  $d_z = 0.6$ ), the required sample size was calculated to be 32 participants. The actual sample size used in this study ( $n = 36$ ) exceeded this requirement, further enhancing the reliability and robustness of the statistical conclusions.

**2A****2B**

**Figure 2** Effect of Huangqi extracts (50 mg/ml) on prothrombin time in human plasma. (2A): Plasma conditions of healthy donors, (2B): Plasma conditions of diabetics subjects. A paired t-test revealed a significant difference (\*\* $P < 0.001$ ) between Huangqi and the DMSO tube. As calculated, the proportion of increment prolongation was 27.1% in HQI-treated healthy plasma and 26.8% in HQI-treated DM plasma.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

The results of the history-taking in a sample group of healthy individuals, from a total of 18 respondents, as shown in Table 1, revealed the following: there were 9 females and 9 males. The average age was  $21.22 \pm 0.81$  years. The diabetic group also consisted of 18 participants, including 11 females and 7 males, with an average age of  $55.39 \pm 9.68$  years. This study included diabetic patients who were receiving modern medical treatment. Furthermore, some patients had comorbidities such as hypertension, hyperlipidemia, and kidney disease.

#### 3.1 Comparison of PT and aPTT between patients and healthy controls

An independent t-test was used to assess the mean difference in PT and aPTT values between

diabetic and healthy groups. Baseline PT and aPTT levels in samples are shown in table 1. For PT, the difference between diabetic group and healthy donors was not significant ( $P > 0.05$ ). However, our study showed that diabetic patients had significantly lower aPTT scores than healthy individuals ( $P < 0.05$ ). Notably, shortened aPTT levels may be associated with coagulopathy in diabetes (mean aPTT in healthy individuals = 28.52 seconds; DM = 26.03 seconds).

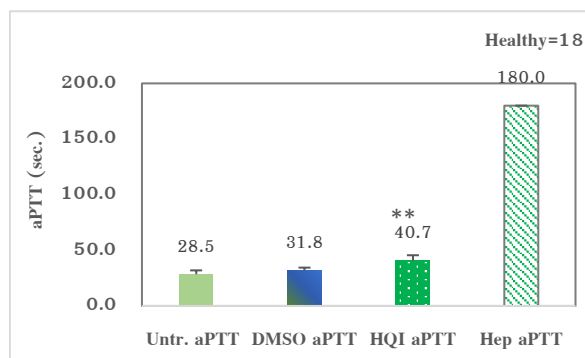
#### 3.2 Optimal dosage of Huangqi extract for coagulation tests

Preliminary experiments were conducted in five healthy donors to determine the optimal Huangqi concentration for use in our study. The baseline mean for PT value ( $12.0 \pm 0.5$  seconds) and aPTT value ( $27.7 \pm 2.0$  seconds) of five donors were indicated as untreated plasma (Figure 1). Huangqi extract showed prolonged PT in a dose dependent manner (concentration 5-50 mg/ml). As a negative control, plasma treatment with DMSO resulted in PT values of 11.9, 12.0, and 12.3 seconds. Huangqi treated plasma at various doses increased PT from 12.9 to 14.8 and 17.8 seconds, respectively (Figure 1A). The extract also showed concentration dependent anticoagulant properties as assayed by aPTT. The aPTT in extract-treated plasma at doses ranging from 5 mg to 50 mg/ml increased to 29.6, 33.2, and 41.5 seconds, whereas in the DMSO control it was approximately 28.4, 29.8, and 31.2 seconds (Figure 1B). Bars marked with an asterisk (HQI) showed significant difference compared to 40% DMSO (cont.DMSO). Here, we selected a dose of 50 mg/ml Huangqi extract as a test and used heparin 4.5 g/ml as a standard drug for comparison.

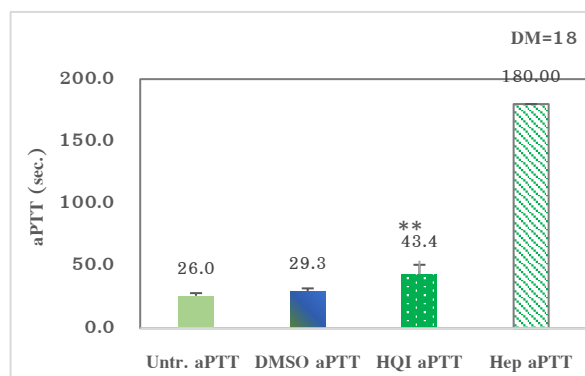
#### 3.3 Effect of Huangqi extract on coagulation test

In a single experiment, the coagulation test was performed on each sample. The baseline values of

3A



3B



**Figure 3** Effect of Huangqi extract (50 mg/ml) on activated partial thromboplastin time in human plasma. (3A): Plasma conditions of healthy donors, (3B): Plasma conditions of diabetics subjects. Here, all condition tubes were tested in one replicate. A paired t-test was used to compare the tube containing Huangqi with the DMSO treated plasma (\*\* $P < 0.0001$ ). The calculated percentage of increment prolongation in HQI-treated healthy plasma was 21.9%, while in HQI-treated DM plasma,

PT and aPTT were measured as untreated plasma (plasma alone). DMSO-treated plasma was used as a negative control. In addition, plasma was treated with heparin as a positive control.

### 3.3.1 Anticoagulant effect of Huangqi extract on partial thromboplastin time

At a dose of 50 mg/mL, significant increase in PT was observed both in normal and patients (Figure 2). Huangqi extract markedly increased the PT compared to the control DMSO. (2A: \*\* $P < 0.001$ , 2B: \*\* $P < 0.001$ ).

### 3.3.2 Anticoagulant effect of Huangqi extract on activated partial thromboplastin time

Anticoagulation potential of 50 mg/ml Huangqi was observed *in vitro* using the aPTT test (Figure 3).

Huangqi significantly increased compared to the DMSO control (Figure 3A: \*\* $P < 0.001$ , 3B: \*\* $P < 0.001$ ).

As illustrated by figures 2 and 3, in the healthy group, plasma treatment with Huangqi (50 mg/ml) raised PT and aPTT from baseline values by 44.1% and 42.8%, respectively. Overall, the extract prolonged PT and aPTT in the patient group by 40.0% and 66.9%, respectively.

Prolongation of PT and aPTT revealed that Huangqi inhibits the extrinsic pathway (coagulation factor VIIa) and the intrinsic pathway (coagulation factors XIIa, XIa, IXa, and VIIa), respectively. This plant extract may also suppress other coagulation cascades in the common pathway, comprising factor Xa, thrombin, and fibrin (Tripathara and Chumpia, 2004).

## 4. DISCUSSION

Our work clearly demonstrated the prolongation of clot formation via both the intrinsic and extrinsic pathways by Huangqi extract. Figure 2 shows that the percentage increase in PT prolongation was 26.8% in HQI-treated DM plasma and 27.1% in HQI-treated healthy plasma. Accordingly, as shown in Figure 3, percentage increase in aPTT prolongation in HQI-treated healthy plasma was 21.9%, whereas it was 32.5% in HQI-treated DM plasma. This recent study supports the findings of Liu et al. (2025), which indicated that Huangqi, in combination with Honghua (*Carthamus tinctorius*), may have anti-thrombotic properties by promoting the removal of blood stasis in ischemic stroke rats. In the same way, a previous study by Mazhar et al., (2020) revealed that extract from *Astragalus* genus (*A. sarcocolla*) exhibited *in vitro* anticoagulant activity, potentially paving the way which could combat cardiovascular diseases.

The main components of the *Astragalus* genus include flavonoids and saponins (Li et al., 2014).

*Astragalus sarcocolla* was noted for its antiplatelet and anticoagulant properties (Mazhar et al., 2022). Our research has validated the *in vitro* antithrombotic potential of the *Astragalus* plant. Therefore, many *Astragalus* species have been widely used in traditional medicine for their antiviral, antioxidant, and cardioprotective properties, as well as in preventing typical consequences from diabetes, such as damage to the kidneys, blood vessels, and nerves. (Danthaiwattana et al., 2021; Law et al., 2020). Astragaloside IV (AS-IV), one of the major components of the aqueous extract of *Astragalus membranaceus*, has been reviewed for its pharmacological effects, including neuroprotection, liver protection, anti-cancer, and anti-diabetic properties (Zhang et al., 2020). Hence, Cai et al. (2025) identified AS-IV as a potent inhibitor of von Willebrand factor-binding protein, which is involved in prothrombin activation and disrupts the coagulation factor cascade. Therefore, AS-IV effectively prolongs coagulation time and reduces the virulence of *Staphylococcus aureus*, a virulent bacterium that evades host immune responses. These findings are relevant to our study, which confirms the effect of Huangqi extract on the prolongation of PT and aPTT.

Primary hemostasis (platelet plug formation) and secondary hemostasis (fibrin clot formation) are two essential steps in the blood clotting process. Subsequently, thrombotic blockages are dissolved through fibrinolysis (Tripatara and Chumpia, 2004). The fibrinolytic activity of Huangqi was also tested using the euglobulin lysis time and clot lysis assays in healthy blood (data not shown). As anticipated, Huangqi-treated samples showed increased fibrin clot lysis and mild hemolysis in clotted blood, which aligned with the findings of Kim (2012) and Sabeena et al. (2022), respectively. Nevertheless,

the methods described above are rarely used for routine analysis in hematology laboratories.

Due to the limited volume of blood available for testing, this study was unable to perform fibrinolysis tests in diabetic individuals. This limitation reduces the scope of the findings, as including diabetic subjects could have provided more information about the thrombolytic efficacy of Huangqi extract in a group at risk of coagulation problems. Future studies with larger sample sizes and duplicate experiments are recommended to allow a more thorough investigation across various patient groups. Here, we suggest that testing blood clotting time and performing a clot lysis test using a modified method, as previously described by Janwitayanuchit I. *et al.* (2024), could serve as an alternative approach.

Aspirin is a cornerstone of antiplatelet therapy for cardiovascular thrombotic disorders. As a result, many patients on long-term aspirin therapy are required to co-administer gastric-protective agents or switch to alternative anti-platelet drugs (Chen et al., 2025). Our findings suggest that Huangqi extract could serve as a promising therapeutic option for alleviating the side effects of patients with long-term aspirin use. However, further investigation is needed to determine the optimal dose that balances antiplatelet and antithrombotic effects. Maschirow et al. (2015) discovered a link between inflammation and coagulation during the asymptomatic stage of diabetes. To the best of our knowledge, this study demonstrates the potential of Huangqi for long-term disease prevention, particularly in preventing endothelial impairment associated with diabetes, which can lead to prothrombotic events. Importantly, Huangqi should be used in conjunction with conventional medical treatments under the guidance of healthcare

professionals to minimize potential risks associated with herbal use.

## 5. CONCLUSION

This investigation showed significant effects on coagulation *in vitro*, with Huangqi extract (at a concentration 50 mg/ml) able to prolong PT and aPTT. By considering the above characteristics, the study discovered Huangqi's potential therapeutic effects on blood coagulation, which could lead to new approaches for managing thrombosis in high-risk groups. However, further studies on the toxicity of the crude ethanol extract of the herb should be conducted to ensure that the active compounds derived from the Huangqi herb can safely reduce blood clotting in diabetic patients with vascular complications.

Differences in growing conditions, harvesting schedules, and processing techniques could result in variations in the Huangqi extract. These differences may impact the concentration of active ingredients such as saponins and polysaccharides, which may impact the herb's efficacy. Overall, Huangqi appears to have few negative effects when taken appropriately; nonetheless, excessive doses may interfere with immunosuppressive medications.

## ACKNOWLEDGMENT

The Huachiew Chalermprakiet University grant provided funding for this project. We appreciate the generous assistance provided by the Samutsakhon Hospital in Thailand.

## REFERENCES

Abdulrahman, Y., & Dallatu, M. K. (2012). Evaluation of Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin in Patients with Diabetes Mellitus. *Nigerian Journal of Basic and Applied Science*, 20(1), 60-63.

Boshabor, S. O. (2022). Prothrombin time, activated partial thromboplastin time and platelet count in patients with diabetes

mellitus. *MINAR International Journal of Applied Sciences and Technology*, 04(02):186-195.

Cai, C., Gao, S., Wang, B., Zhao, T., Gao, H., Shi, Y., Guo, X., Xu, Y., Sun, Y., Guo, D., Zhang, J., Gao, F., Liu, Q., Fu, Z., Zhu, L., Liu, X., Wang, L., & Zhao, Y. (2025). Astragaloside IV as a potent vWbp inhibitor: An innovative strategy to mitigate foodborne *Staphylococcus aureus* infections. *Biochemical Pharmacology*, 239, 117017. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2025.117017>

Chen, M., Fu, B., Zhou, H., & Wu, Q. (2025). Therapeutic potential and mechanistic insights of astragaloside IV in the treatment of arrhythmia: a comprehensive review. *Frontiers in Pharmacology*, 16, 1528208. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1528208>

Danthaiwattana, S., Pojpanichphong, S., & Solod, W. (2021). Roles of Chinese Medicine: Huangqi (黄芪: Astragalus) in the Prevention and Treatment of Coronavirus Disease 2019. *Regional Health Promotion Center 9 Journal*, 15(37), 365-76. (in Thai)

Guo, Y., Yang, P., Wu, Z., Zhang, S., & You, F. (2025). Mechanisms of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao (huang qi) and *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels (dang gui) in Ameliorating Hypoxia and Angiogenesis to Delay Pulmonary Nodule Malignant Transformation. *Integrative cancer therapies*, 24, 15347354241311917. <https://doi.org/10.1177/15347354241311917>

Janwitayanuchit, I., Semsri, S., Janwitayanuchit, W., & Choowongkorn, K. (2024). Effect of mangiferin isolated from *Mangifera indica* leaves on in vitro blood coagulation and cell migration activities. *Journal of Associated Medical Sciences*, 57(2), 67-75. retrieved from <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/bulletinAMS/article/view/267475>

Kaur, R., Kaur, M., & Singh, J. (2018). Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovascular diabetology*, 17(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0763-3>

Kim, J. H. (2012). Studies on the biological activity of *Astragalus membranaceus* extracts. *Biomedical Science Letters*, 18(1), 35-41.

Law, S., Lo, C. H. U. I. M. A. N., Han, J., Leung, A. W., & Xu, C. (2020). Traditional Chinese herb, *Astragalus*: possible for treatment and prevention of COVID-19?. *Herba Polonica*, 66(4).

Liao, H., Hu, L., Cheng, X., Wang, X., Li, J., Banbury, L., & Li, R. (2017). Are the therapeutic effects of Huangqi (*Astragalus membranaceus*) on diabetic nephropathy correlated with its regulation of macrophage iNOS activity?. *Journal of Immunology Research*, 2017(1), 3780572. <https://doi.org/10.1155/2017/3780572>

Li, X., Weber, N. C., Cohn, D. M., Hollmann, M. W., DeVries, J. H., Hermanides, J., & Preckel, B. (2021). Effects of Hyperglycemia and Diabetes Mellitus on Coagulation and Hemostasis. *Journal of Clinical Medicine*, 10(11), 2419. <https://doi.org/10.3390/jcm10112419>

Li, X., Qu, L., Dong, Y., Han, L., Liu, E., Fang, S., & Wang, T. (2014). A review of recent research progress on the astragalus genus. *Molecules*, 19(11), 18850-18880. <https://doi.org/10.3390/molecules191118850>

Liu, C., Zhang, J., Mao, K., Xu, H., & He, Y. (2025). *Astragalus membranaceus*-*Carthamus tinctorius* herb pair antagonizes parthanatos in cerebral ischemia/reperfusion injury via regulating PARP-1/TAX1BP1-mediated mitochondrial respiratory chain

- complex I. *Journal of Ethnopharmacology*, 340, 119260. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.119260>
- Liu, S., Wang, L., Zhang, Z., Leng, Y., Yang, Y., Fu, X., Xie, H., Gao, H., & Xie, C. (2024). The potential of astragalus polysaccharide for treating diabetes and its action mechanism. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1339406. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1339406>
- Liu, M., Wu, K., Mao, X., Wu, Y., & Ouyang, J. (2010). Astragalus polysaccharide improves insulin sensitivity in KK<sup>AY</sup> mice: regulation of PKB/GLUT4 signaling in skeletal muscle. *Journal of ethnopharmacology*, 127(1), 32-37.
- Ma, X. Q., Shi, Q., Duan, J. A., Dong, T. T., & Tsim, K. W. (2002). Chemical analysis of Radix Astragali (Huangqi) in China: a comparison with its adulterants and seasonal variations. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(17), 4861-4866. <https://doi.org/10.1021/jf0202279>
- Maschirow, L., Khalaf, K., & Al-Aubaidy, et al. (2015). Inflammation, coagulation, endothelial dysfunction and oxidative stress in prediabetes — Biomarkers as a possible tool for early disease detection for rural screening. *Clinical Biochemistry*, 48(9), 581-585. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.02.015>
- Mazhar, M. U., Anwar, F., Saleem, U., Ahmad, B., Mirza, M. U., & Ahmad, S. (2022). Antiplatelet and anticoagulant activities of Astragalus sarcocolla Dymock. *Pharmacognosy Magazine*, 18(80).
- Mazhar, M. U., Muneer, K., Anwar, F., Siddiqui, W. A., Qureshi, A. Q., Bilal, R., & Ahmad, B. (2020). In-vitro anticoagulant activity of three extracts of Astragalus sarcocolla. *Pakistan J Med Heal Sci*, 14(2), 393-6.
- Sabeena, S., Reddy, K. S., Banu, K. F., Ramya, N., Sudheer, A., & Chidrawar, V. R. (2022). Evaluation of Anti-Thrombotic Activity of Astragalus Membranaceus Var. Mongholicus) Root Extract: In Vitro. *Neuroquantology*, 20(17), 1020-1024. <https://doi.org/10.14704/Nq.2022.20.17.Nq880130>
- Thippayacharontam, C., Narajeenrone, K., Chaowpeerapong, T., Wannachalee, T., & Akarasereenont, P. (2022). Management of Diabetic Patients with Thai Traditional Medicine. *Siriraj Medical Bulletin*, 15(3), 181-188.
- Tang, X., Liu, X., Mikaye, M. S., Hongrui, Z., & Zhang, Yong. (2021). Traditional Chinese medicine in the treatment of high incidence diseases in cold areas: the thrombotic diseases. *Frigid Zone Medicine*, 1(1), 23-44. <http://doi.org/10.2478/fzm-2021-0005>
- Tripatara, A., & Chumpia, W. (2004). *Hemostasis testing* (2nd ed.). Khon Kaen University Press. (in Thai)
- Xiang, T., Wang, L.R., Ma, L., Han, Z. Y., Wang, R., Cheng, C., Xia, Y., Qin, H., & Zhao, C. S. (2014). From Commodity Polymers to Functional Polymers. *Scientific Reports*, 4(1), 4604. <https://doi.org/10.1038/srep04604>
- Zhang, J., Wu, C., Gao, L., Du, G., & Qin, X. (2020). Astragaloside IV derived from Astragalus membranaceus: A research review on the pharmacological effects. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 87, 89–112. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2019.08.002>



## การพัฒนาสไลด์สเมียร์เสมหะที่มีผลบวกต่อแบคทีเรียทนกรดโดยใช้แผ่นกรองเส้นใยนาโนพอลิไวนิลลิดีนฟลูออไรด์

พีรดา พิชพิสุทธิ์<sup>1</sup> วิจิตร วงศ์ลำชา<sup>2</sup> ณภัทร มั่นกำเนิด<sup>1</sup> นพวรรณ ชนัญพานิช<sup>3</sup> สุดาลักษณ์ ธัญญาหาร<sup>4</sup> และ กนกวรรณ กิตตินิยม<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิกและเทคโนโลยีประยุกต์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม 73170 ประเทศไทย

<sup>2</sup>คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิต กรุงเทพมหานคร 10210 ประเทศไทย

<sup>3</sup>ศูนย์บูรณาการทางเคมีเพื่อเทคโนโลยีที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ กรุงเทพมหานคร 10800 ประเทศไทย

<sup>4</sup>สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ วิทยาลัยนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา 30000 ประเทศไทย

\* ผู้นิพนธ์ประสานงาน อีเมล: kanokwan.kit@mahidol.ac.th DOI: 10.14416/JASET.KMUTNB.2025.02.005

รับเมื่อ 15 ตุลาคม 2567 แก้ไขเมื่อ 4 สิงหาคม 2568 ตอรับเมื่อ 7 สิงหาคม 2568

### บทคัดย่อ

การย้อมเสมหะด้วยสีทนกรดเป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยวัณโรคปอดที่ทำได้ง่ายและใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก โดยวิธีนี้มีความจำเพาะสูง แต่ต้องอาศัยความชำนาญของผู้ปฏิบัติงานในการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นการประกันคุณภาพของวิธีทดสอบนี้จึงมีความสำคัญ ซึ่งการใช้สไลด์สเมียร์เสมหะเป็นหนึ่งในวัสดุควบคุมคุณภาพ การศึกษานี้จึงมุ่งพัฒนาการเตรียมสไลด์สเมียร์เสมหะโดยใช้แบคทีเรียทนกรดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและทำให้เชื้อกระจายตัวด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองเส้นใยนาโนพอลิไวนิลลิดีนฟลูออไรด์ที่เคลือบด้วยพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ โดยทำการเปรียบเทียบแผ่นกรอง 4 ชนิดคือ 2Hz 8M, 2Hz 4M, 3Hz 8M และ 3Hz 4M ที่ผลิตขึ้นมา ซึ่งมีความพรุนสูงถึงร้อยละ 99.98 และมีความหนาของแผ่นกรอง 222, 158, 81 และ 48 ไมโครเมตร ตามลำดับ เมื่อนำไปกรองเชื้อแบคทีเรียทนกรด พบว่าการใช้แผ่นกรอง PVDF ชนิด 2Hz 4M ทำให้สไลด์สเมียร์เสมหะพบแบคทีเรียย้อมติดสีทนกรดแบบตัวเดียวจำนวนมาก (เฉลี่ย  $4.0 \pm 2.8$  ตัวต่อวงกลอง) และแบบที่เกาะกลุ่มเพียงขนาดเล็ก 2-5 ตัวต่อกลุ่ม (เฉลี่ย  $4.67 \pm 0.2$  กลุ่มต่อวงกลอง) ซึ่งมีสัดส่วนของเชื้อแบบเดี่ยวสูงกว่าจำนวนกลุ่มเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แผ่นกรองชนิดอื่น ในขั้นตอนการเตรียมสไลด์สเมียร์เสมหะ สามารถปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้เพื่อเตรียมให้ได้ผลการรายงานเป็น AFB 3+, AFB 2+ และ AFB 1+ ตามเกณฑ์การรายงานผลขององค์การอนามัยโลกได้โดยการเจือจางเชื้อ 1:10 ในแต่ละระดับการรายงานผล สไลด์สเมียร์เสมหะที่เตรียมได้นี้มีความคล้ายคลึงกับเสมหะจริงของผู้ป่วย โดยพบเม็ดเลือดขาวและแบคทีเรียย้อมติดสีทนกรดที่กระจายตัวดีเป็นแบบตัวเดียวเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ งานวิจัยนี้ถือเป็นงานวิจัยแรกที่ประยุกต์ใช้แผ่นกรองเส้นใยนาโนในการกรองแบคทีเรียทนกรดสำหรับการเตรียมสไลด์สเมียร์เสมหะ ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและสะดวก สามารถนำไปใช้ในงานประกันคุณภาพวิธีการย้อมสีทนกรดในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ และใช้ประโยชน์ในการฝึกอบรมบุคลากรทางการแพทย์ได้

**คำสำคัญ:** สไลด์สเมียร์เสมหะ, เส้นใยนาโนพอลิไวนิลลิดีนฟลูออไรด์, แบคทีเรียทนกรด

## Development of Smear-Sputum Slides with Acid Fast Bacilli Positive Using Polyvinylidene Fluoride Nanofiber Filters

Peerada Phuechpisut<sup>1</sup>, Wijit Wonglumsom<sup>2</sup>, Napat Monkamnoed<sup>1</sup>, Noppavan Chanunpanich<sup>3</sup>, Sudaluck Thunyaharn<sup>4</sup> and Kanokwan Kittiniyom<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Microbiology and Applied Technology, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Nakhon Pathom, 73170 Thailand

<sup>2</sup>Faculty of Medical Technology, Dhurakij Pundit University, Bangkok, 10210 Thailand

<sup>3</sup>Integrated Chemistry Research Center for Sustainable Technology, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Bangkok, 10800 Thailand

<sup>4</sup>Faculty of Allied Health Sciences, Medical Technology Nakhonratchasima College, Nakhonratchasima, 30000 Thailand

\* Corresponding Author, E-mail: kanokwan.kit@mahidol.ac.th DOI: 10.14416/JASET.KMUTNB.2025.02.005

Received 15 October 2024; Revised 4 August 2025; Accepted 7 August 2025

### ABSTRACT

Acid-fast staining of sputum is a simple and widely used method for diagnosis of pulmonary tuberculosis worldwide. This method is high specificity but requires the expertise of the operator in analysis. Therefore, quality assurance of the testing method is essential, with sputum smear slides used as one of the quality control materials. This study aimed to develop a method for the preparing sputum smear slides using cultured acid fast bacilli (AFB) which were dispersed by filtration through a polyvinylidene fluoride (PVDF) nanofiber membrane coated with polyvinyl alcohol (PVA). Four types of the homemade nanofiber filters as 2Hz 8M, 2Hz 4M, 3Hz 8M and 3Hz 4M with a porosity of up to 99.98 percent and filter thicknesses of 158, 222, 48 and 81 micrometers, respectively were compared for filtration efficiency. When used to filter AFB, the 2Hz 4M PVDF membrane produced sputum smear slides with a high number of single AFB (averaging  $4.0 \pm 2.8$  cells per oil power field) and small clusters of 2-5 AFB per cluster (averaging  $4.67 \pm 0.2$  clusters per oil power field). The proportion of single AFB by the 2Hz 4M was higher than the number of AFB clumping in clusters compared to the use of other types of filters. In the preparation process of sputum smear slides, the concentration of AFB could be adjusted to give the result of AFB 3+, AFB 2+, and AFB 1+ according to the World Health Organization's reporting criteria by diluting AFB at a 1:10 ratio for each reporting level. This prepared slides closely resembled the actual patient sputum, showing leukocytes and welled-dispersed single AFB under microscopic examination. This study is the first to apply nanofiber membrane filtration for dispersing AFB in sputum smear preparation. This method is simple, practical, and suitable for use in quality assurance of acid-fast staining in clinical laboratories as well as in training healthcare personnel.

**KEYWORDS:** Sputum smear slide, Polyvinylidene fluoride nanofiber, Acid fast bacilli

Please cite this article as: K. Kittiniyom, "Development of Smear-Sputum Slides with Acid Fast Bacilli Positive Using Polyvinylidene Fluoride Nanofiber Filters," *Journal of Applied Science and Emerging Technology*, vol 24, no 2, pp. 1-11, ID. 258823, August 2025 (in Thai).

## 1. บทนำ

วัณโรค (Tuberculosis) เป็นโรคติดเชื้อเรื้อรังที่สำคัญ ส่งผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ โดยในปี พ.ศ. 2565 คาดว่าทั่วโลกมีรายงานผู้ป่วยเสียชีวิตจากโรคนี้ 1.3 ล้านคน และพบผู้ป่วยทั่วโลกประมาณ 10.6 ล้านคน (World Health Organization, 2023) ส่วนในประเทศไทยคาดการณ์อุบัติการณ์วัณโรค 155 คนต่อประชากรแสนคนต่อปี หรือจำนวน 111,000 คน และมีผู้ป่วยวัณโรคเสียชีวิต 14,000 คน (Department of Disease Control, 2024) วัณโรคเกิดจากการติดเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติทนกรด (Acid-fast bacilli; AFB) มีขนาดของเซลล์กว้างประมาณ 0.2-0.6 ไมครอน และยาวประมาณ 1.0-10 ไมครอน (Gunasingam, 2022) การติดต่อของเชื้อนี้จากคนสู่คนโดยผ่านทางอากาศ เชื้อที่ผ่านเข้าปอดจะถูกจับโดยแมโครโครฟาจในถุงลม (Alveolar macrophage) เชื้อสามารถมีชีวิตเพิ่มจำนวนและดำรงอยู่ได้ภายในเซลล์เป็นระยะเวลานาน ภายหลังได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายอาจเกิดพยาธิสภาพทำให้ป่วยเป็นวัณโรคได้ หรือยังไม่มีอาการของโรคเป็นผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะแฝง (Vynnycky & Fine, 2000) ในประเทศไทยมีรายงานบุคลากรทางการแพทย์ในโรงพยาบาลเป็นผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงในอัตราความชุกร้อยละ 9.50 (Saengngoen, 2022) การวินิจฉัยวัณโรคใช้การตรวจคัดกรองทางคลินิก (Department of Disease Control, 2018) ร่วมกับการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อยืนยันผลการวินิจฉัย (Department of Disease Control, 2019) การตรวจทางห้องปฏิบัติการควรเลือกใช้วิธีทดสอบที่มีความถูกต้องแม่นยำ เพื่อประโยชน์ในการรักษา ติดตาม และควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อ ให้มีอัตราการเจ็บป่วยและอัตราการเสียชีวิตลดลง (Lewinsohn et al., 2017; Campelo et al., 2021)

วิธีตรวจหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์มีการใช้กันมานานกว่าหนึ่งร้อยปี โดยเฉพาะในประเทศที่มีรายได้ต่ำและปานกลาง หรือมีข้อจำกัดด้านทรัพยากรต่าง ๆ (World Health Organization, 2021) เป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายต่ำ ขั้นตอนการทำค่อนข้างง่าย ทำได้รวดเร็ว จึงนิยมใช้ในการคัดกรอง ค้นหาและวินิจฉัยผู้ป่วยวัณโรค (Department of Disease Control, 2023; Opota et al., 2016) นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในการติดตามการตอบสนองต่อการ

รักษา ซึ่งต่างจากวิธีทางอณูชีววิทยา เช่น PCR ที่อาจให้ผลบวกคงอยู่ต่อไปได้นานในสิ่งส่งตรวจของระบบทางเดินหายใจ แม้ว่าผลการรักษาจะเป็นไปด้วยดี การย้อมสไลด์เสมียร์เสมหะผู้ป่วยด้วยสีทนกรดแล้วตรวจหา AFB ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จัดเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง (Boldi et al., 2023) และควรมีปริมาณเชื้ออย่างน้อย  $10^3$ - $10^4$  เซลล์ต่อมิลลิตรของเสมหะ (van Zyl-Smit et al., 2011) ทั้งนี้การตรวจหา AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์ต้องอาศัยประสบการณ์ และความชำนาญของผู้ปฏิบัติงานด้วย ในกรณีรายงานผลบวกปลอมจะส่งผลเสียต่อผู้ป่วย โดยอาจทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่ไม่จำเป็น อาจเกิดผลข้างเคียงของยาต่อร่างกาย มีผลกระทบต่อจิตใจของผู้ป่วยและครอบครัวและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการรักษา (Ridderhof et al., 2002) ส่วนการรายงานผลลบปลอมจะส่งผลต่อการเจ็บป่วยเรื้อรัง เสี่ยงต่อการเสียชีวิต และแพร่กระจายเชื้อสู่ผู้อื่น

การประกันคุณภาพของวิธีทดสอบ นับว่ามีความสำคัญสำหรับห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ซึ่งมีทั้งการควบคุมคุณภาพภายใน (Internal quality control; IQC) และการประเมินคุณภาพโดยองค์กรภายนอก (External quality assessment; EQA) วัสดุควบคุมคุณภาพที่ใช้ในการประกันคุณภาพวิธีย้อมสีทนกรดเพื่อตรวจหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์ มักนิยมใช้เป็นเสมียร์เสมหะของผู้ป่วยวัณโรคที่ตรึงบนสไลด์ หรือตัวอย่างเสมียร์เสมหะจำลองหรือแบบเสมือนจริง (Department of Medical Sciences, 2024; Faculty of Medical Technology, 2024; UK NEQAS, 2022; CMPT, 2023) วัสดุควบคุมคุณภาพตามข้อกำหนดมาตรฐานสากล ISO/IEC 17043 (ISO, 2023) ที่ระบุให้มีคุณสมบัติและลักษณะใกล้เคียงกับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยให้มากที่สุดและต้องมีความเป็นเนื้อเดียวกัน และมีความคงตัว ดังนั้นตามแนวทางสากลจึงแนะนำให้ใช้เสมหะจากผู้ป่วยที่ AFB เป็นผลบวกและลบมาใช้เตรียมตัวอย่างเพื่อให้มีความเหมือนของจริง (Department of Public Health, 2015) หรือทำการเตรียมเสมหะแบบเข้มข้นโดยใช้ sodium hydroxide หรือ N-acetyl-L-cysteine ทำให้เสมหะผู้ป่วยมีความเหลวที่เหมาะสมในการใช้เตรียมตัวอย่างเสมหะที่ตรึงบนสไลด์ ในการเตรียมเสมียร์โดยใช้เสมหะของผู้ป่วยวัณโรคต้องคำนึงถึงความปลอดภัย และปริมาณเสมหะของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต้องมีมากพอสำหรับการเตรียม

ตัวอย่างสเมียร์สไลด์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน และมีเพียงพอกับจำนวนสมาชิก จึงนิยมใช้วิธีการเตรียมเช่นนี้ในประเทศที่มีความชุกของวัณโรคสูง อีกวิธีเป็นการเตรียมตัวอย่างสเมียร์สเมียร์สจำลองหรือแบบเสมือนจริง โดยการเพาะเชื้อ Mycobacteria แล้วนำเชื้อมาผสมกับเชื้อประจำถิ่นในเสมหะ ก่อนนำส่วนผสมมาสเมียร์บนสไลด์ (Farnia et al., 2003; Somoskővi et al., 2001) แต่การเตรียมเช่นนี้เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นไม่เหมือนการใช้เสมหะจริง และการเจริญของ Mycobacteria ในอาหารเหลวจะพบการเกาะกลุ่มกันของเชื้อ จำเป็นต้องมีขั้นตอนการเตรียมที่ทำให้เชื้อที่เป็นกลุ่มเกิดการกระจายตัวจนได้เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ก่อนนำมาใช้งาน วิธีหนึ่งที่ยอมรับใช้คือการกรอง

ปัจจุบันเส้นใยนาโนจัดเป็นวัสดุที่ได้รับความสนใจในการประยุกต์ใช้ในหลายเทคโนโลยี เส้นใยนาโนสามารถสร้างรูพรุนขนาดเล็กที่มีลักษณะต่อเนื่องได้ในปริมาณที่มาก และมีพื้นที่ผิวสูงเมื่อเทียบกับน้ำหนัก (Song et al., 2020) การผลิตเส้นใยนาโนด้วยเทคนิคการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต (Electrospinning) สามารถขึ้นรูปเส้นใยจากพอลิเมอร์ หลอมเหลวหรือสารละลายได้ ทำให้เส้นใยมีรูพรุนขนาดต่างๆ กันตามความต้องการในการใช้งาน ต่อมาได้มีการนำสารพอลิไวนิลลิดีนฟลูออไรด์ (Polyvinylidene fluoride; PVDF) มาใช้ผลิตแผ่นกรองเส้นใยนาโน ทำให้วัสดุที่ได้มีความทนทานต่อสารเคมีและอุณหภูมิสูง มีความยืดหยุ่นสูง ไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต ขั้นตอนการผลิตไม่ยุ่งยาก และสามารถผลิตผสมกับสารชนิดอื่นได้ดี (Aghayari, 2022) แผ่นกรอง PVDF ที่ผลิตได้จะมีน้ำหนักเบา จึงสามารถนำมาซ้อนทับกันให้หนาขึ้นเพื่อใช้กรองอนุภาคที่มีขนาดเล็กกระด้างไมโครเมตรและนาโนเมตรได้ และยังเพิ่มคุณสมบัติการดูดซับน้ำของแผ่นกรอง PVDF โดยการผสมกับสารพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl alcohol; PVA) ที่มีคุณสมบัติชอบน้ำและช่วยเพิ่มความแข็งแรงคงทนให้กับแผ่นกรอง ซึ่งมีงานวิจัยที่ได้พัฒนาวิธีการเตรียมแผ่นเส้นใยนาโน โดยอาศัยหลัก การนี้ด้วยการฉีดขึ้นรูปแบบ batch ในสถานะที่เหมาะสม เพื่อเตรียมเป็นแผ่นกรอง สำหรับกรองแบคทีเรียในอากาศ และน้ำ (Kittiniyom et al., 2020; Suwanboon et al., 2018) ส่วนงานวิจัยนี้ถือเป็นงานวิจัยแรกที่ประยุกต์ใช้แผ่นกรองเส้นใยนาโน PVDF ที่ผลิตแบบ continuous ในการกรองแบคทีเรียทนกรดสำหรับการเตรียมสไลด์สเมียร์สเมหะ

ดังนั้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ การพัฒนาการเตรียมสไลด์สเมียร์สเมหะที่ให้ผลบวกสำหรับการย้อมสีทนกรด โดยการสเมียร์สไลด์ด้วยส่วนผสมของเชื้อ AFB ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและผ่านการกรองด้วยแผ่นกรอง PVDF ให้เป็นเชื้อตัวเดียว ผสมกับเสมหะของผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นวัณโรคที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมให้มีเม็ดเลือดขาวเหมือนเสมหะจริง สไลด์ สเมียร์สเมหะที่เตรียมด้วยวิธีนี้ทำได้ง่าย และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลายในงานทางด้านทางการแพทย์และสาธารณสุข

## 2. วัสดุและวิธีการ

### 2.1 การขึ้นรูปเส้นใยนาโนและการผลิตแผ่นกรอง

เส้นใยนาโน PVDF ขึ้นรูปด้วยเครื่องปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตแบบต่อเนื่อง 45 เซม โดยฉีดสารละลาย PVDF ความเข้มข้นร้อยละ 18 โดยน้ำหนัก ให้เป็นเส้นใยบนผ้าสปันบอนด์ที่มีความกว้าง 30 เซนติเมตร เคลื่อนที่ด้วยความเร็ว  $0.04 \pm 5$  เมตรต่อนาที (2 Hertz; Hz) ความกว้างของเส้นใยปรับด้วยรางเลื่อนเคลื่อนที่ซ้ายขวาเป็นระยะทาง 18 เซนติเมตร และเคลื่อนด้วยอัตราเร็ว 170 รอบต่อนาที โดยมีสถานะการขึ้นรูปเส้นใยนาโนคือใช้ศักย์ไฟฟ้า 18 กิโลโวลต์ ระยะห่างจากปลายเข็มถึงฉากรับ 10 เซนติเมตร อัตราการไหลของสาร 45 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ต่อนำเส้นใยนาโน PVDF ที่เตรียมมาซ้อนทับกัน 4 ชั้น (แผ่นกรอง 2Hz 4M) หรือ 8 ชั้น (แผ่นกรอง 2Hz 8M) แล้วพันเคลือบด้วยสารละลาย PVA ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก นำไปรีดด้วยเครื่องเคลือบบัตรที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส โดยรองด้วยแผ่น Teflon ทั้งด้านบนและด้านล่างของเส้นใย จากนั้นนำเส้นใยนาโนที่ได้ มาตัดให้เป็นวงกลมขนาด 25 มิลลิเมตร สำหรับการเตรียมแผ่นกรอง 3Hz 4M และ 3Hz 8M อาศัยหลักการฉีดขึ้นรูปด้วยสภาวะเดียวกันกับสภาวะที่กล่าวข้างต้นแต่ใช้การฉีดสารละลาย PVDF เคลื่อนที่ด้วยความเร็วจาก 2 Hz เป็น 3 Hz และในการทดลองนี้ใช้กระดาษกรองเชิงพาณิชย์ชนิดเซลลูโลสที่มีรูพรุนขนาด 8 ไมโครเมตรเป็นแผ่นกรองเปรียบเทียบกับแผ่นกรอง PVDF ที่ผลิตขึ้นมา

### 2.2 การหาความพรุน (Porosity) ของแผ่นกรอง

นำแผ่นกรอง PVDF มาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง และวัดความหนาของแผ่นกรองจำนวน 5 ตำแหน่ง ด้วยไมโครมิเตอร์ จากนั้นคำนวณหาความ

หนาแน่นปรากฏ ( $\rho_{mat}$ ) ตามด้วยความพรุน (Porosity) ดังสมการที่ (1) และ (2) ตามลำดับ

$$\rho_{mat} (g/cm^3) = \frac{Mass}{Volume} = \frac{Mass}{Area \times Thickness} \quad (1)$$

$$Porosity (\%) = (1 - \frac{\rho_{mat}}{\rho_{PVDF}}) \times 100 \quad (2)$$

เมื่อ  $Mass$  คือ น้ำหนักของแผ่นกรอง PVDF (กรัม)

$Volume$  คือ ปริมาตรของแผ่นกรอง PVDF

(ลูกบาศก์เซนติเมตร)

$Area$  คือ พื้นที่ของแผ่นกรอง PVDF

(ตารางเซนติเมตร)

$Thickness$  คือ ความหนาของแผ่นกรอง PVDF

(เซนติเมตร)

$\rho_{mat}$  คือ ความหนาแน่นปรากฏของแผ่นกรอง PVDF (กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)

$\rho_{PVDF}$  คือ ความหนาแน่นของ PVDF (1.76 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)

### 2.3 การเตรียมเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*

เชื้อแบคทีเรียทوبرคูลอส (Acid fast bacilli; AFB) ที่ใช้ คือ *Mycobacterium tuberculosis* สายพันธุ์ H37Ra ATCC 25177 นำเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Dubos ปริมาตร 40 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการฆ่าเชื้อโดยเติม 37% Formaldehyde ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ต่อมาทำให้เชื้อ AFB ที่เกาะกลุ่มในขณะเจริญเติบโตให้กระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยว โดยนำอาหารเหลวที่เพาะเชื้อไว้มาใส่ลงในหลอดแก้ว และใส่ลูกแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตรลงไป ทำให้เชื้อกระจายตัวด้วยเครื่อง Vortex mixer เขย่านาน 5 นาที ใช้กระบอกฉีดยาที่ใส่เข็มเบอร์ 21 ทำการดูดอาหารเหลวเข้าออกกระบอกฉีดยาผ่านรูเข็มจำนวน 20 ครั้ง ต่อมาใช้กระบอกฉีดยาที่ใส่เข็มเบอร์ 29 ทำการดูดอาหารเหลวเข้าออกกระบอกฉีดยาผ่านรูเข็มจำนวน 1 ครั้ง จากนั้นนำอาหารเหลวที่ได้มากรองโดยเปรียบเทียบการกรองผ่านหัวกรองที่มีแผ่นกรองชนิดต่างๆ ได้แก่ กระดาษกรองเชิงพาณิชย์ (Whatman No. 2), แผ่นกรอง PVDF ชนิด 2Hz 4M, ชนิด 2Hz 8M, ชนิด 3Hz 4M และ ชนิด 3Hz 8M เทียบกับเชื้อตั้งต้นก่อนกรอง นำเชื้อส่วนที่กรองผ่านกระดาษกรองแต่ละชนิดไปวัดความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland Standard และนับจำนวนเชื้อโดยวิธี

Spread Plate บนจานเพาะเลี้ยง Dubose agar ในการทดลองนี้มีการเตรียม AFB ให้เข้มข้นขึ้นโดยนำเชื้อส่วนที่กรองผ่านแผ่นกรอง 2Hz 4M ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที (rpm) นาน 10 นาที จากนั้นนำตะกอนมาเติมน้ำกลั่นในปริมาตรลดลง 10 เท่าจากของเหลวเริ่มต้น จึงทำให้เชื้อเข้มข้นขึ้น 10 เท่า และเจือจางเชื้อด้วยน้ำกลั่น 1:10 เพื่อใช้ในการเตรียมเชื้อแบบ Grading

### 2.4 การเตรียมตัวอย่างเสมหะ

ใช้ตัวอย่างเสมหะผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นวัณโรคที่เหลือจากการใช้งานในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คัดเลือกเสมหะที่มีคุณภาพดีคือเมื่อนำมาย้อมสีแกรมแล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบปริมาณเม็ดเลือดขาว > 50 เซลล์ต่อ Low power field (LPF), Epithelium cell < 20 เซลล์/LPF และแบคทีเรีย 1-5 เซลล์/Oil power field (OPF) และเมื่อนำเสมหะมาย้อมสีทึบกรดต้องไม่พบ AFB จากนั้นนำเสมหะที่คัดเลือกรวมให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเติม 37% Formaldehyde ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า Vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ต่อมาเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 3 นาทีก่อนนำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จะได้เสมหะที่พร้อมใช้งาน

### 2.5 การเตรียมสไลด์สเมียร์เสมหะที่ผสมเชื้อ AFB

นำเชื้อ AFB ที่ผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองแต่ละชนิดที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เติมนลงในเสมหะปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.4 แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า จากนั้นดูดเสมหะที่ผสมเชื้อ AFB นี้ปริมาตร 25 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์ที่สะอาด สเมียร์เสมหะเป็นรูปร่างรีขนาดกว้าง 2 เซนติเมตรและยาว 3 เซนติเมตร ผึ่งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้ววางสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที นำสไลด์ไปย้อมสีทึบกรด

### 2.6 การย้อมสีทึบกรดและการรายงานเชื้อ AFB ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำสไลด์สเมียร์เสมหะมาย้อมสีทึบกรด โดยหยดสี Carbol Fuchsin ให้ท่วมบริเวณที่สเมียร์ของสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำประปา ต่อมาใช้ 3 % Acid alcohol หยดทับให้ท่วมสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที หรือล้างจนไม่มีสีหลุดออกมา ล้างตามด้วยน้ำประปา และ

ย้อมทับด้วยสี Methylene blue โดยให้สีทึบสมเียรนานประมาณ 1 นาที จึงล้างสีออกด้วยน้ำประปา ตั้งทิ้งไว้ให้สไลด์แห้ง แล้วตรวจหาเชื้อ AFB ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ทำการรายงานผล 2 แบบ คือ 1) ตรวจนับปริมาณเชื้อ AFB ที่ติดสีแดง โดยนับจำนวน 100 วงกลอง (OPF) บันทึกจำนวนเชื้อตัวเดียวที่นับได้ต่อวงกลอง และจำนวนกลุ่มที่มีเชื้อ AFB เกาะรวมกันเป็นปริมาณตัวเชื้อต่างๆ ตามเกณฑ์ดังนี้ Group Code A: มีจำนวนเชื้อ AFB 2-5 ตัวต่อกลุ่ม; Group Code B: มีจำนวนเชื้อ AFB 6-10 ตัวต่อกลุ่ม; Group Code C: มีจำนวนเชื้อ AFB ประมาณ 11-20 ตัวต่อกลุ่ม; และ Group Code D: มีจำนวนเชื้อ AFB ประมาณ >20 ตัวต่อกลุ่ม (รูปที่ 1) และ 2) รายงานผลบวกแบบระดับปริมาณเชื้อ (Grading) อ้างอิงตามแนวทางขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization, 1998)

## 2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน มีการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey-Kramer Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

## 3. ผลลัพธ์และการอภิปราย

### 3.1 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของแผ่นกรองเส้นใยนาโน

คุณสมบัติของแผ่นกรอง PVDF ที่ผลิตขึ้นดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าแผ่นกรองทั้ง 4 ชนิดมีความหนาที่สม่ำเสมอ การใช้แรงอัดจากเครื่องรีดภายใต้ความร้อนสูงช่วยให้เส้นใยนาโนแต่ละเส้นติดกันได้เป็นแผ่นที่ดี ซึ่งผลสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา (Suwanboon et al., 2018) แผ่นกรอง PVDF ชนิด 2Hz 4M, 3Hz 8M และ 3Hz 4M มีความบางกว่าเมื่อเปรียบเทียบความหนาของแผ่นกระดาษกรองเชิงพาณิชย์ ซึ่งมีค่าความหนาเท่ากับ 190 ไมโครเมตร สำหรับค่าความพรุนของแผ่นแต่ละชนิดมีค่าใกล้เคียงกันทั้งการซ้อนทับกัน 4 ชั้นและ 8 ชั้น เนื่องจากแผ่นเส้นใยนาโนสามารถสร้างรูพรุนที่เปิดต่อเนื่องถึงกันได้ดี (Interconnectivity pore)

### 3.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแผ่นกรองในการเตรียมสไลด์สเมียร์เสมหะผสมเชื้อ AFB

ในการเตรียมเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* เมื่อนำเชื้อส่วนที่กรองผ่านแผ่นกรองไปวัดความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland Standard ได้ค่าดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าการวัดค่าความขุ่นสามารถประมาณการจำนวนเชื้อ AFB

เริ่มต้นก่อนการผสมเชื้อลงในเสมหะที่เตรียมขึ้นได้ โดยในกรณีเชื่อก่อนกรองจะมีค่าความขุ่นมากที่สุดคือค่าเฉลี่ยความขุ่นเท่ากับ 3.17 ซึ่งมีเชื้อปริมาณมากที่มีการเกาะกันเป็นกลุ่มขนาดใหญ่สังเกตได้จากการนำเชื้อมาย้อมสีทึบทรด ในขณะที่การกรองด้วยกระดาษกรองเชิงพาณิชย์มีค่าความขุ่นมากรองลงมาด้วยค่าเฉลี่ยความขุ่นเท่ากับ 0.64 โดยจากการย้อมสีทึบทรดพบว่าปริมาณเชื้อในระดับปานกลางมีการเกาะกันเป็นกลุ่มหลายขนาด ส่วนที่กรองด้วยแผ่นกรอง PVDF จะมีค่าความขุ่นน้อยที่สุดที่ค่าเฉลี่ยความขุ่นในช่วง 0.24 ถึง 0.37 โดยจากการย้อมสีทึบทรดพบว่าปริมาณเชื้อน้อย และส่วนใหญ่พบลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวในทุกชนิดของแผ่นกรอง PVDF

ผลการทดลองหาจำนวนเชื้อ AFB ที่มีชีวิตโดยวิธี Spread Plate บนจานเพาะเลี้ยง Dubose agar ซึ่งใช้เชื้อที่ผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองชนิด 2Hz 4M ที่ให้ค่าความขุ่นเท่ากับ 0.36 พบว่ามีจำนวน AFB ประมาณ  $10^5$  colony forming unit (cfu) ต่อมิลลิลิตร ซึ่งตามมาตรฐานความขุ่น 0.5 McFarland Standard จะมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ  $1.5 \times 10^8$  cfu ต่อมิลลิลิตร แต่จำนวนเชื้อที่มีชีวิตที่แท้จริงตามความขุ่นนี้ยังขึ้นอยู่กับขนาดเชื้อ การมีชีวิตของเชื้อ (Viability) และการเกาะกลุ่ม (Clumping) ของเชื้อเช่นกัน (Isenberg, 1992) โดยเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* จะใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งนานถึงสองสัปดาห์เป็นเชื้อรูปแท่งทงยาวและการเจริญเติบโตมักมีการเกาะกลุ่ม จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตค่อนข้างต่ำกว่าของมาตรฐานความขุ่น McFarland Standard

ผลการตรวจสอบสไลด์สเมียร์เสมหะผสมเชื้อ AFB ที่ได้กรองผ่านแผ่นกรอง หลังจากนำไปย้อมสีทึบทรดแล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจนับเชื้อ AFB โดยนับทั้งเชื้อตัวเดี่ยว (Single cell) และเป็นกลุ่มต่อวงกลองโดยผู้เชี่ยวชาญสามคน ค่าเฉลี่ยจากการนับเชื้อจากการใช้แผ่นกรองแต่ละชนิดแสดงดังรูปที่ 2 พบว่าการใช้แผ่นกรองชนิด 2Hz 4M และ 2Hz 8M มีการกระจายตัวของเชื้อ AFB ที่มีเชื้อแบบตัวเดียวจำนวนมากและพบเพียงการเกาะกลุ่มแบบ Group code A (จำนวน 2-5 ตัวต่อกลุ่ม) ซึ่งการเกาะกลุ่มแบบนี้ยังพบว่ามีน้อยกว่าที่พบจากแผ่นกรองชนิด 3Hz 4M, 3Hz 8M และกระดาษกรองเชิงพาณิชย์ ส่วนผลการกรองโดยใช้แผ่นกรองชนิด 3Hz 4M และ 3Hz 8M พบการ

ตารางที่ 1 ความหนาเฉลี่ย (Thickness) และความพรุน (Porosity) ของแผ่นกรอง PVDF

แผ่นกรอง PVDF	ความหนาเฉลี่ย±SD (ไมโครเมตร)	ความพรุนเฉลี่ย±SD (%)
2Hz 4M	158±0	99.9833±0
2Hz 8M	222±0	99.9832±0
3Hz 4M	48±0	99.9841±0
3Hz 8M	81±0	99.9805±0

ตารางที่ 2 แสดงค่าความขุ่นเทียบกับ McFarland Standard ของเชื้อที่กรองผ่านแผ่นกรองชนิดต่าง ๆ

แผ่นกรอง	ค่าเฉลี่ยความขุ่น McFarland Standard
2Hz 4M	0.37
2Hz 8M	0.37
3Hz 4M	0.31
3Hz 8M	0.24
กระดาษกรองเชิงพาณิชย์	0.64
เชือกกรอง	3.17

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวน AFB แบบเชื้อเดี่ยวและแบบเกาะกลุ่ม Code A ที่พบในเสมหะ และผล grading โดยกรองเชื้อด้วยแผ่นกรอง 2Hz 4M และใช้เชื้อที่ไม่เจือจางและเจือจางในอัตราส่วน 1:10 สำหรับการทดลองสองครั้ง

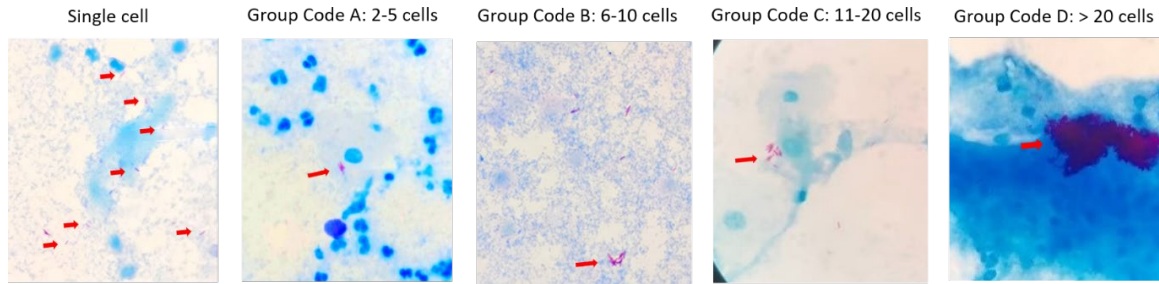
การทดลอง	จำนวนเฉลี่ย AFB แบบเดี่ยว ต่อ OPF ± SD	จำนวนเฉลี่ย AFB แบบกลุ่ม Code A ต่อ OPF ± SD	จำนวนเฉลี่ย AFB รวม ต่อ OPF (ช่วงค่า)	Grading
ครั้งที่ 1: เชื้อที่ไม่เจือจาง	13.22 ± 8.50	2.05 ± 0.44	15.27 (14.07-18.17)	AFB 3+ (>10 AFB ต่อ OPF)
ครั้งที่ 1: เชื้อที่เจือจาง 1:10	1.69 ± 1.59	0.20 ± 0.08	1.89 (1.78-2.17)	AFB 2+ (1-10 AFB ต่อ OPF)
ครั้งที่ 2: เชื้อที่ไม่เจือจาง	7.56 ± 4.23	1.26 ± 0.50	8.82 (8.10-10.62)	AFB 2+ (1-10 AFB ต่อ OPF)
ครั้งที่ 2: เชื้อที่เจือจาง 1:10	0.41 ± 0.93	0.18 ± 0.16	0.59 (0.49-0.84) (59 AFB ใน 100 OPF)	AFB 1+ (10-99 AFB ใน 100 OPF)

กระจายตัวของเชื้อเป็นแบบเดี่ยวและแบบกลุ่มที่หลากหลายทั้งแบบ Group code A, Group code B (จำนวน 6-10 ตัวต่อกลุ่ม), Group code C (จำนวน 11-20 ตัวต่อกลุ่ม), และ Group code D (จำนวน >20 ตัวต่อกลุ่ม) ซึ่งเป็นแบบเดียวกันกับการใช้กระดาษกรองเชิงพาณิชย์ เมื่อเปรียบเทียบการใช้แผ่นกรอง PVDF ชนิด 2Hz และ 3Hz พบว่าแผ่นกรองชนิด 2Hz สามารถดักจับกลุ่มเชื้อขนาดใหญ่ตั้งแต่ 6-10 ตัวต่อกลุ่มขึ้นไปได้ดีกว่าชนิด 3Hz เนื่องจากการเตรียมแผ่นกรอง PVDF ชนิด 2Hz ใช้การเคลื่อนที่ของตัวรับสปีบนอนต์ที่ช้ากว่าการเตรียมชนิด 3Hz ทำให้ได้แผ่นใยสะสมที่มีความหนากว่าประมาณสามเท่า (ตารางที่ 1) จึงมีโอกาสดักจับกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ได้ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบแผ่นกรอง PVDF ที่มีจำนวนชั้นต่างกันคือชนิด 4 M และ 8 M พบว่าแผ่นกรองชนิด 8 M จะกรองเชื้อชนิดตัวเดี่ยวได้น้อยกว่าชนิด 4 M เนื่องจากแผ่นกรองชนิด 8 M มีความหนาแน่นกว่าชนิด 4 M ประมาณ 1.5 เท่า (ตารางที่ 1) ความหนาของแผ่นกรองอาจส่งผลต่อขนาดรูพรุน (pore size)

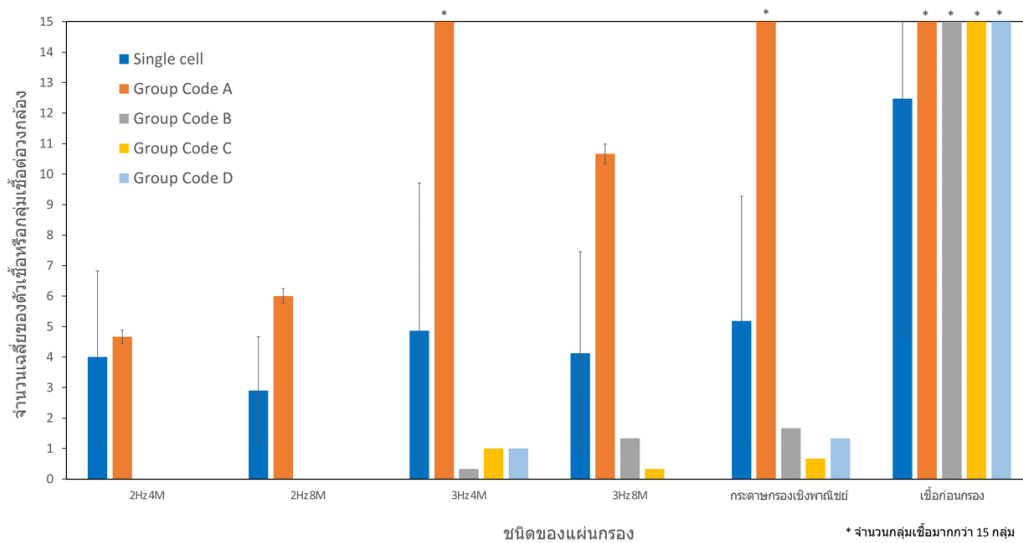
ความหนาที่มากขึ้นจะทำให้ขนาดรูพรุนของแผ่นกรองลดลง ดังผลการทดลองของ Suwanboon et al., 2018 ดังนั้นเมื่อกรองด้วยแผ่นกรองที่มีความหนาจึงมีผลให้เชื้อตัวเดี่ยวลอดผ่านรูได้น้อยลง

อย่างไรก็ตามจำนวนเฉลี่ยของเชื้อตัวเดี่ยวต่อวงกลองของการใช้แผ่นกรองแต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเชือกกรองและหลังกรองด้วยทุกชนิดแผ่นกรอง ( $p < 0.00$ )

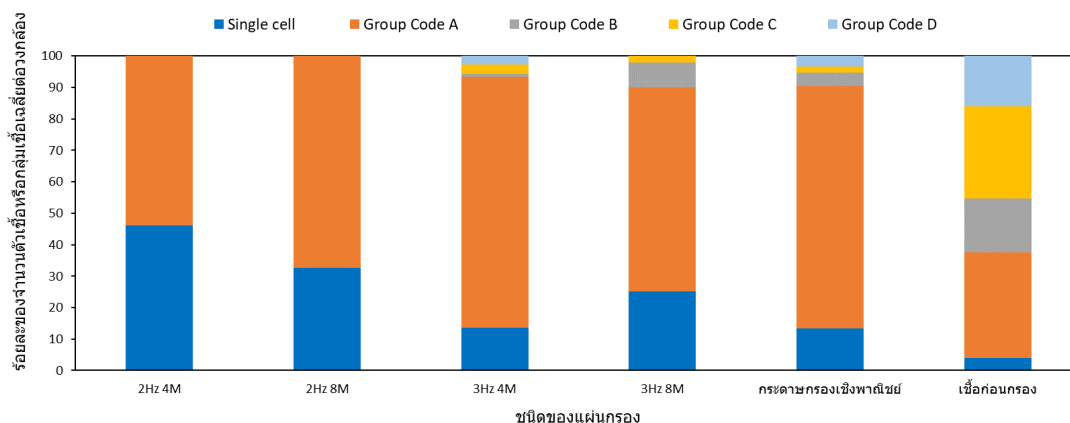
ผลการ grading ตามเกณฑ์การรายงานผลการย้อมสีทึบกรดขององค์การอนามัยโลก พบว่าสไลด์เสมหะที่เตรียมจากทุกชนิดของแผ่นกรองได้ค่า AFB 2+ ซึ่งหมายถึงพบเชื้อ AFB จำนวน 1-10 ตัวต่อ Oil power field ซึ่งมีการใช้จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^5$  cfu ต่อมิลลิลิตร ในการเปรียบเทียบสัดส่วนเชิงร้อยละของจำนวนตัวเชื้อหรือกลุ่มเชื้อเฉลี่ยต่อวงกลอง ทั้งแบบเชื้อตัวเดี่ยวและกลุ่มเชื้อแบบ Group code A, B, C และ D สำหรับกระดาษกรอง



**รูปที่ 1** แสดงการกระจายตัวของเชื้อ AFB ในสไลด์สเมียร์เสมหะ และเกณฑ์การนับปริมาณเชื้อ AFB ตาม Code ที่กำหนด: นับปริมาณเชื้อ AFB ที่เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง ติดสีแดง (ใช้ตัวลูกศรสีแดง) ทั้งแบบเชื้อตัวเดี่ยว (Single cell) และแบบเกาะกลุ่มดังนี้ Group Code A: มีจำนวนเชื้อ AFB 2-5 ตัวต่อกลุ่ม; Group Code B: มีจำนวนเชื้อ AFB 6-10 ตัวต่อกลุ่ม; Group Code C: มีจำนวนเชื้อ AFB ประมาณ 11-20 ตัวต่อกลุ่ม; และ Group Code D: มีจำนวนเชื้อ AFB ประมาณ >20 ตัวต่อกลุ่ม



**รูปที่ 2** แสดงจำนวนเฉลี่ยของตัวเชื้อ AFB รูปแบบต่างๆ บนสไลด์สเมียร์เสมหะที่เตรียมด้วยแผ่นกรองแต่ละชนิด: ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพที่ใช้เตรียมเชื้อ AFB ของแผ่นกรอง 5 ชนิด ได้แก่ แผ่นกรอง PVDF ชนิด 2Hz 4M, 2Hz 8M, 3Hz 4M, และ 3Hz 8M, กระดาษกรองเชิงพาณิชย์ (Whatman No. 2) เทียบกับเชือกก่อนกรอง โดยตรวจนับเชื้อ AFB ในรูปแบบต่างๆ เฉลี่ยต่อวงกลอง โดยนับทั้งรูปแบบที่เป็นเชื้อตัวเดี่ยว (Single cell) และเป็นกลุ่มเชื้อแบบ Group Code A (จำนวน 2-5 ตัวต่อกลุ่ม), Group Code B (จำนวน 6-10 ตัวต่อกลุ่ม), Group Code C (จำนวน 11-20 ตัวต่อกลุ่ม), และ Group Code D (จำนวน >20 ตัวต่อกลุ่ม)



**รูปที่ 3** แสดงสัดส่วนเป็นร้อยละของจำนวนตัวเชื้อเดี่ยวและกลุ่มเชื้อ AFB เฉลี่ยต่อวงกลอง บนสไลด์สเมียร์เสมหะที่เตรียมด้วยแผ่นกรองแต่ละชนิด: ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพที่ใช้เตรียมเชื้อ AFB ของแผ่นกรอง 5 ชนิด ได้แก่ แผ่นกรอง PVDF ชนิด 2Hz 4M, 2Hz 8M, 3Hz 4M, และ 3Hz 8M, กระดาษกรองเชิงพาณิชย์ (Whatman No. 2) เทียบกับเชือกก่อนกรอง โดยตรวจนับเชื้อ AFB ในรูปแบบต่างๆ เฉลี่ยต่อวงกลอง โดยนับทั้งรูปแบบที่เป็นเชื้อตัวเดี่ยว (Single cell) และเป็นกลุ่มเชื้อแบบ Group Code A (จำนวน 2-5 ตัวต่อกลุ่ม), Group Code B (จำนวน 6-10 ตัวต่อกลุ่ม), Group Code C (จำนวน 11-20 ตัวต่อกลุ่ม), และ Group Code D (จำนวน >20 ตัวต่อกลุ่ม)



เชื้อตัวเดียวเฉลี่ยต่อวงกลองเมื่อใช้แผ่นกรองชนิด 2Hz 4M, 2Hz 8M, 3Hz 4M, 3Hz 8M, กระดาษกรองเชิงพาณิชย์, และเชื้อก่อนกรอง มีค่าเท่ากับร้อยละ 46, 33, 14, 25, 13, และ 4 ตามลำดับ

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแผ่นกรอง PVDF ชนิด 2Hz 4M มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการใช้กรองเชื้อ AFB เพื่อให้ได้เชื้อส่วนใหญ่เป็นแบบตัวเดียว หรือมีการเกาะกลุ่มของเชื้อเพียงขนาดเล็ก 2-5 ตัวต่อกลุ่ม โดยไม่พบกลุ่มเชื้อขนาดใหญ่ซึ่งยากต่อการนับจำนวนเชื้อ และส่งผลให้จำนวนเชื้อ AFB ที่นับได้คลาดเคลื่อน ขั้นตอนการเตรียมเชื้อ AFB ด้วยแผ่นกรองดังกล่าวผสมกับสมมติที่ผ่านกรรมวิธีของงานวิจัยนี้

### 3.3 การเตรียมสไลด์สเมียร์สมมติสำหรับรายงานผลบวกการย้อมสีทนกรดแบบระดับปริมาณเชื้อ (Grading)

ในการเตรียมสไลด์สเมียร์สมมติสำหรับการย้อมสีทนกรด เพื่อให้รายงานผลบวกแบบระดับปริมาณเชื้อ (Grading) ตามเกณฑ์การรายงานผลขององค์การอนามัยโลก เป็น AFB 3+, AFB 2+ และ AFB 1+ นั้น ทำโดยนำเชื้อที่เตรียมได้จากการใช้แผ่นกรอง PVDF ชนิด 2 Hz 4M มาทำให้เข้มข้นขึ้น 10 เท่าโดยการปั่น เพื่อให้มีจำนวนเชื้อ AFB มากเพียงพอในการเตรียมสไลด์สเมียร์สมมติให้มีการรายงานผลการ Grading เป็น AFB 3+ และเจือจางเชื้อลง 10 เท่าเพื่อให้รายงานผลได้เป็น AFB 2+ และ AFB 1+ ในการทดลองครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการคำนวณปริมาณเชื้อรวม จากจำนวนเฉลี่ยของเชื้อแบบเดี่ยวและแบบกลุ่ม Code A ที่นับได้ต่อวงกลอง เช่น ในการทดลองครั้งที่ 1 เมื่อรวบรวมจำนวนเฉลี่ยเชื้อ AFB แบบเดี่ยว (13.22) กับจำนวนเชื้อเฉลี่ยในกลุ่ม Code A (2.05) จะได้เป็น 15.27 ตัวต่อ OPF ซึ่ง >10 AFB ต่อ OPF (Grading 3+) และเมื่อเจือจาง 10 เท่า พบจำนวนเชื้อเฉลี่ยรวมเป็น 1.89 ตัวต่อ OPF ซึ่งค่าอยู่ในช่วง 1-10 AFB ต่อ OPF (Grading 2+) เช่นเดียวกับจำนวนเชื้อเฉลี่ยรวมในการทดลองที่ 2 สำหรับการใส่เชื้อไม่เจือจาง 8.82 ตัวต่อ OPF และ 0.59 ตัวต่อ OPF (59 ตัว ใน 100 OPF) ซึ่งตรงกับผล Grading AFB 2+ และ AFB 1+ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 จะเห็นว่าในการเจือจางเชื้อลง 10 เท่ามีผลลดค่า Grading ลงหนึ่งระดับได้จาก Grading AFB 3+ เป็น AFB 2+ และจาก Grading AFB 2+ เป็น AFB 1+ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yamada และคณะ

(Yamada et al., 2006; Yamada et al., 2011) ที่ใช้การเจือจางเชื้อ 10 เท่าเพื่อการลดผลการ Grading AFB ลงหนึ่งระดับ นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ข้อมูลแสดงให้เห็นว่าการพบการเกาะกลุ่มของเชื้อ AFB 2-5 ตัวต่อกลุ่ม แบบ Code A อาจมีผลกระทบต่อการรายงานค่า Grading เพียงเล็กน้อยหรือไม่มีผลกระทบขึ้นอยู่กับการเตรียมจำนวนเชื้อ AFB อยู่ในระดับมากน้อยเพียงใด

## 4. บทสรุป

การย้อมสไลด์สเมียร์สมมติด้วยสีทนกรด เป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยวัณโรคปอดที่ยังใช้กันแพร่หลายในปัจจุบัน ดังนั้นความถูกต้อง แม่นยำและความน่าเชื่อถือของการทดสอบนับว่าเป็นสิ่งสำคัญ จึงควรมีการประกันคุณภาพของวิธีการทดสอบและประเมินทักษะผู้ตรวจวิเคราะห์อย่างสม่ำเสมอด้วยวัสดุควบคุมคุณภาพที่มีความเหมือนจริงและปลอดภัย โดยการเตรียมสไลด์สเมียร์สมมติให้ผลบวกของแบคทีเรียทนกรด ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้เป็นอีกทางเลือกในการผลิตวัสดุควบคุมคุณภาพ ที่ทำได้ค่อนข้างง่าย และสะดวกในทางปฏิบัติ ซึ่งใช้เชื้อ AFB สายพันธุ์ที่ไม่รุนแรง เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว และกรองด้วยนวัตกรรมแผ่นกรองเส้นใยพอลิไวนิลลิดีนฟลูออไรด์ (PVDF) ชนิด 2Hz 4M ที่ทำให้เชื้อกระจายเป็นตัวเดียวจำนวนมาก ผสมกับสมมติที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมให้มีลักษณะคล้ายกับสมมติจากผู้ป่วยจริง ที่มีทั้งเม็ดเลือดขาว เซลล์เยื่อ เชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ในสมมติ และเชื้อ AFB ที่สามารถปรับปริมาณ grading นอกจากจะใช้สไลด์สเมียร์สมมติในการควบคุมคุณภาพทางห้องปฏิบัติการแล้ว ยังสามารถใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา การแพทย์ และสาธารณสุข เช่น งานผลิตสื่อการสอนแก่นักศึกษา และการฝึกอบรมบุคลากรทางการแพทย์

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะเทคนิคการแพทยมหาวิทยาลัยมหิดล ที่สนับสนุนการใช้เครื่องมืออุปกรณ์ สารเคมี สถานที่ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

- Aghayari, S. (2022). PVDF composite nanofibers applications, *Heliyon*, 8(11), e11620. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11620>.
- Boldi, M. O., Denis-Lessard, J., & Neziri, R., et al. (2023). Performance of microbiological tests for tuberculosis diagnostic according to the type of respiratory specimen: A 10-year retrospective study. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1131241. <http://doi: 10.3389/fcimb.2023.1131241>
- Campelo, T. A., Cardoso de Sousa, P. R., Nogueira, L. D. L., Frota, C. C., & Zuquim Antas, P. R. (2021). Revisiting the methods for detecting *Mycobacterium tuberculosis*: what has the new millennium brought thus far?. *Access microbiology*, 3(8), 000245. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000245>.
- Canadian Microbiology Proficiency Testing (CMPT). (2023). EQA Program Catalog 2023. Retrieved October 3, 2024, from <https://cmpt.ca/wp-content/uploads/2023/07/CMPT-Catalogue-2023.pdf>
- Department of Disease Control. (2018). *Systematic screening for active TB and drug-resistant TB*. 2<sup>nd</sup> ed., Aksorn Grphic Design Publishing. (in Thai)
- Department of Disease Control. (2019). *Management and practice guideline for tuberculosis laboratory*. Aksorn Grphic Design Publishing. (in Thai)
- Department of Disease Control. (2023). *Guidelines for the investigation of tuberculosis*. Aksorn Grphic Design Publishing. (in Thai)
- Department of Disease Control. (2024). *Situation and operation of tuberculosis in Thailand Fiscal Year 2023*. Retrieved October 3, 2024, from <https://www.tbthailand.org/statustb.html>. (in Thai)
- Department of Medical Sciences. (2024). *Conditions and Requirements for Members of the Quality Assessment of Analysis for the Fiscal Year 2025*. Retrieved October 3, 2024, from <https://pt.dmsc.moph.go.th/proficiency>. (in Thai)
- Department of Public Health, Federal Republic of Nigeria. (2015). *National Guidelines on External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy, Xpert MTB/RIF Assay, Line Probe Assay, Culture and Drug Susceptibility Testing*. Retrieved October 3, 2024, from <https://www.health.gov.ng/doc/National-Guidelines-on-EQA-December-2015.pdf>
- Faculty of Medical Technology, Mahidol University. (2024) Member Handbook 2024. The External Quality Assessment Schemes in Clinical Laboratory). Retrieved October 3, 2024, from <https://eqamt.mahidol.ac.th/eqab/>. (in Thai)
- Farnia, P., Masjedi, M. R., & Mohammadi, F., et al. (2003). The results of three years surveillance on sputum smear microscopy in 285 district and regional tuberculosis laboratories of Iran. *Tanaffos*, 2(5), 29-36.
- Gunasingam, N. (2022). Morphology and pathological characteristics of mycobacteria. *Mycobact Dis*, 12(S4), No. 1000005.
- Internal Organization Standard (ISO). (2023). *ISO/IEC 17043:2023 Conformity assessment — General requirements for the competence of proficiency testing providers*. ISO/IEC.
- Isenberg, H.D. (1992). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol I, Washington, DC: ASM.
- Kittinijom, K., Suwanboon, C., & Chanunpanich, N. (2020). Antimicrobial assay on PVDF nanofiber membrane. In *Key Engineering Materials*, 856 (pp. 339-346). Trans Tech Publications Ltd. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/kem.856.339>.
- Lewinsohn, D. M., Leonard, M. K., & LoBue, P. A., et al. (2017). Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention clinical practice guidelines: diagnosis of tuberculosis in adults and children. *Clinical Infectious Diseases*, 64(2), e1-e33.
- Opota, O., Senn, L., Prod'homme, G., Mazza-Stalder, J., Tissot, F., Greub, G., & Jaton, K. (2016). Added value of molecular assay Xpert MTB/RIF compared to sputum smear microscopy to assess the risk of tuberculosis transmission in a low-prevalence country. *Clinical microbiology and infection*, 22(7), 613-619. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.010>
- Ridderhof, J., Humes, J., & Boulahbal, F. (2002). *External quality assessment for AFB smear microscopy*. Retrieved October 3, 2024, from [https://www.aphl.org/aboutAPHL/publications/Documents/External\\_Quality\\_Assessment\\_for\\_AFB\\_Smear\\_Microscopy.pdf](https://www.aphl.org/aboutAPHL/publications/Documents/External_Quality_Assessment_for_AFB_Smear_Microscopy.pdf)
- Somoskövi, A., Hotaling, J. E., & Fitzgerald, M., et al. (2001). Lessons from a proficiency testing event for acid-fast microscopy. *Chest*, 120(1), 250-257.
- Saengngoen, T. (2022). Prevalence and risk factors of latent tuberculosis infection among medical personnel in Roi Et Hospital. *Srinagarind Medical Journal*, 37(4), 407-418. (in Thai)
- Song, J., Kim, M., & Lee, H. (2020). Recent Advances on Nanofiber Fabrications: Unconventional State-of-the-Art Spinning Techniques. *Polymers*, 12(6), 1386. <https://doi.org/10.3390/polym12061386>
- Suwanboon, C., Chanunpanich, N., & Kitinijom, K. (2018). Antibacterial membrane from mixed polyvinylidene fluoride nanofiber and polyvinyl alcohol nanofiber. *The Journal of KMUTNB*, 28(4), 881-891. (in Thai)
- UK NEQAS Microbiology. (2022). Bacteriology schemes. Retrieved October 3, 2024, from [https://ukneqasmicro.org.uk/scheme\\_areas/bacteriology/](https://ukneqasmicro.org.uk/scheme_areas/bacteriology/)
- van Zyl-Smit, R. N., Binder, A., & Meldau, R., et al. (2011). Comparison of quantitative techniques including Xpert MTB/RIF to evaluate mycobacterial burden. *PLoS ONE*, 6(12), e28815. <http://doi:10.1371/journal.pone.0028815>
- Vynnycky, E., & Fine, P. E. M. (2000). Lifetime risks, incubation period, and serial interval of tuberculosis. *American journal of epidemiology*, 152(3), 247-263.
- World Health Organization. (1998) *Laboratory Services in Tuberculosis Control. PART II: Microscopy*. WHO.
- World Health Organization. (2021). *WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 2: screening— systematic screening for tuberculosis disease*. Retrieved October 1, 2024, from <https://www.who.int/publications/i/item/9789240022676>
- World Health Organization. (2023). *Global Tuberculosis Report 2023*. Retrieved October 1, 2024, from <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023>
- Yamada, H., Mitarai, S., Aguiaman, L., Matsumoto, H., & Fujiki, A. (2006). Preparation of mycobacteria-containing artificial sputum for TB panel testing and microscopy of sputum smears. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 10(8), 899-905.
- Yamada, H., Mitarai, S., & Wahyunitisari, M. R., et al. (2011). Improved polyacrylamide-based artificial sputum with formalin-fixed tubercle

bacilli for training of tuberculosis microscopists. *J Clin Microbiol*, 49(10). <https://doi-org.ejournal.mahidol.ac.th/10.1128/JCM.00370-11>

Yamada, H., Mitarai, S., Wahyunitisari, M. R., Mertaniasih, N. M., Sugamoto, T., Chikamatsu, K., & Fujiki, A. et al. (2011). Improved polyacrylamide - based artificial sputum with formalin-fixed tubercle bacilli for training of tuberculosis microscopists. *Journal of clinical microbiology*, 49(10), 3604-3609.

## การประยุกต์ใช้พืชท้องถิ่นเพื่อตรวจวัดฟอร์มาลินปนเปื้อนในอาหาร

วารangkนา เขตติ<sup>1</sup>\* อรรณิ มะโนยานะ<sup>1</sup> ฐณะวัฒน์ โคมลณิธิพงศ<sup>1</sup> และ อโนดาษ รัชเวทย์<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม๋ จังหวัดเชียงใหม๋ 50300 ประเทศไทย

\* ผู้นิพนธ์ประสานงาน อีเมล: warangkna\_kha@g.cmru.ac.th DOI: 10.14416/JASET.KMUTNB.2025.02.006

รับเมื่อ 10 กันยายน 2567 แก้ไขเมื่อ 13 พฤษภาคม 2568 ตอบรับเมื่อ 15 กรกฎาคม 2568

### บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้สารสกัดจากพืชในท้องถิ่นเพื่อตรวจวัดฟอร์มาลินตกค้างในอาหาร โดยปฏิกิริยาจะมีตะกอนเกิดขึ้น งานวิจัยนี้ได้ศึกษาพืช 4 ชนิด ที่อยู่ในวงศ์ *Phyllanthaceae* โดยที่ 2 ชนิดมีสารอะดีโนซีนเป็นองค์ประกอบ (มะยม (*Phyllanthus acidus*) และ ผักหวานบ้าน (*Sauropus androgynus*)) และอีก 2 ชนิด ได้แก่ มะเฒ่า (*Antidesma bunius*) และ มะขามป้อม (*Phyllanthus emblica*) พบว่าสารสกัดจากใบผักหวานบ้านเท่านั้นที่เกิดตะกอนกับฟอร์มาลินได้ สารสกัดจากใบผักหวานบ้านถูกทำให้เป็นผงโดยขบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง เมื่อใช้อัตราส่วนของผงสารสกัดใบผักหวานบ้าน 0.5 กรัม ต่อสารละลายฟอร์มาลิน 5 มิลลิลิตร ความเข้มข้นต่ำสุดของฟอร์มาลินที่สามารถตรวจวัดได้คือ 5% w/v งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้จริงกับการตรวจวัดฟอร์มาลินในตัวอย่างอาหารทะเล คือ ปลาหมึกกระดอง และกุ้งขาว การทดสอบความใช้ได้ของวิธีนี้โดยเปรียบเทียบผลการตรวจวัดฟอร์มาลินกับชุดทดสอบที่มีขายในท้องตลาด พบว่าให้ผลการตรวจวัดที่มีความสอดคล้องกัน งานวิจัยนี้ทำให้เห็นการใช้ประโยชน์จากพืชเพื่อพัฒนาการตรวจวัดฟอร์มาลินที่ง่าย และรวดเร็ว อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มคุณค่าให้กับพืชท้องถิ่น

**คำสำคัญ:** ฟอร์มาลดีไฮด์, ฟอร์มาลิน, ผักหวานบ้าน, สารตกค้าง

## The Application of Using Local Plant for Determination of Formalin Contaminated in Food

Warangkhanha Khaodee<sup>1\*</sup>, Orranee Manoyana<sup>1</sup>, Thanawat Komonnithiphong<sup>1</sup>, and Anodar Ratchawet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Chiangmai Rajabhat University, Chiang Mai, 50300 Thailand

\* Corresponding Author, E-mail: warangkhanha\_kha@cmru.ac.th DOI: 10.14416/JASET.KMUTNB.2025.02.006

Received 10 September 2024; Revised 13 May 2025; Accepted 15 July 2025

### ABSTRACT

This research aimed to apply extracted from local plants to determine formalin residue in food. The precipitation would be appeared from this reaction. Four plants in *Phyllanthaceae* family were studied, 2 plants were consisted of adenosine (*Phyllanthus acidus* and *Sauropus androgynus*) and another 2 were *Antidesma bunius* and *Phyllanthus emblica*. It was found that only the extract from *Sauropus androgynus* was precipitated with formalin. The *Sauropus androgynus* extract was made to be powder by freeze drying process. Using 0.5 gram of extract powder in 5 milliliters of formalin solution showed 5% w/v formalin concentration as the detection limit. This extract powder was then applied to determine formalin in squid and white shrimp. For method validation, the results were compared with those determined by commercial formalin test kit. Formalin detection of this developed method showed the similar results with all commercial products. This research showed the useful of determination of formalin in food by using plant extracted to be simple and rapid test kit. Moreover, this research is also adding value to the local plant.

**KEYWORDS:** Formaldehyde, Formalin, Local plant, Residue chemical

## 1. บทนำ

อาหารเป็นปัจจัยสำคัญในการดำรงชีวิตของมนุษย์เป็นอย่างมาก ในการรับประทานอาหารทุกครั้ง นอกจากต้องคำนึงถึงคุณค่าทางโภชนาการแล้ว สิ่งสำคัญที่ควรคำนึงถึงก็คือ เรื่องของความสะอาด และความปลอดภัย เพราะกว่าอาหารจะมาถึงมือผู้บริโภคนั้น ต้องผ่านกระบวนการหลายขั้นตอน นับตั้งแต่การผลิต ตลอดจนวิธีการเก็บรักษาอาหารก่อนจะมาถึงมือผู้บริโภค ซึ่งกระบวนการทั้งหลายเหล่านี้ ล้วนก่อให้เกิดความเสี่ยงของอาหารที่ไม่ปลอดภัย และเป็นอันตรายต่อร่างกาย เมื่อมีการบริโภคเข้าไปได้ทั้งสิ้น เช่น การใช้ “สารฟอร์มาลิน” ในการถนอมอาหารและยืดอายุของอาหาร โดยผู้จำหน่ายมีการนำฟอร์มาลินผสมน้ำ แล้วราดใส่หรือแช่ อาหารบางชนิด เช่น ปลาหมึก กุ้ง ปลาหู เพื่อป้องกันการเน่าเสีย โดยอาหารเหล่านี้จะถูกแช่ฟอร์มาลินก่อนนำมาวางขาย เพื่อให้มีความสดได้นาน ไม่เน่าเสียเร็ว และเก็บไว้นานจำหน่ายได้นานหลายวัน ฟอร์มาลินที่ปนเปื้อนมาในอาหารทะเลเป็นสารอันตรายมีพิษต่อร่างกายและอาจเพิ่มความเสี่ยงที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้ หากผู้บริโภคได้รับในปริมาณมาก (Zhang, 2018) สำหรับประเทศไทยฟอร์มาลิน (Formalin) จัดเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 2 ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 และเป็นอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 391 (พ.ศ. 2561) การกินอาหารที่ปนเปื้อนฟอร์มาลินในปริมาณมากถึง 30-60 มิลลิกรัม จะทำให้เกิดอาการปวดท้องรุนแรง อาเจียน ท้องเดิน หมดสติ และอาจเสียชีวิตได้ U.S. EPA กำหนดค่าขนาดของสารที่ยอมรับให้บริโภคได้ต่อวันแล้วไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษหรือผลเสียใด ๆ ต่อร่างกาย (Reference dose; RfD) ไว้ไม่เกิน 0.2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน (United States Environmental Protection Agency, 1999.) World Health Organization; WHO กำหนดค่าปริมาณได้รับประจำวันที่ทนได้ (Tolerable daily intake; TDI) ไว้ไม่เกิน 0.15 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน (World Health Organization, 2005.)

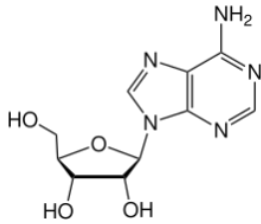
การวิเคราะห์และตรวจสอบหาฟอร์มาลินหรือฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร ทดสอบได้หลายวิธี ทั้งวิธีทั้งโครมาโทกราฟีและสเปกโตรเมตรี ซึ่งวิธีทางโครมาโทกราฟีให้ความถูกต้องและมีสภาพไวสูง (Abe et al, 2021) อย่างไรก็ตาม

เครื่องมือยังมีราคาแพงและการใช้งานค่อนข้างยุ่งยาก (Zhao & Fan, 2006) วิธีทางสเปกโตรเมตรีใช้รีเอเจนต์มากมาย เช่น Schiff's reagent, p-phenylenediamine, chromotropic acid, brilliant cresyl blue and fluoral-P (Thepchuay et al., 2022) แต่ข้อเสียของวิธีทางสเปกโตรเมตรี คือ สีของสารประกอบไม่เสถียร และมีสารอื่นๆ รบกวนมากมาย อีกทั้งต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง (Teixeira et al., 2004) แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีความง่ายกว่า ราคาถูกกว่าวิธีทางโครมาโทกราฟี นอกจากนี้ยังมีวิธีโวลแทมเมตรี และ ฟลูออโรเมตรีที่มีความไวต่อการวัดฟอร์มาลดีไฮด์ (Yasri et al., 2015) มีการพัฒนาหัวตรวจวัดขนาดเล็ก (Nanoprobe) เพื่อตรวจฟอร์มาลินในอาหาร (Zhang et al., 2024) ซึ่งผลการตรวจวัดที่ถูกต้อง สะดวก และปัจจุบันวิธีตรวจด้วยชุดน้ำยาทดสอบอย่างง่าย ซึ่งสะดวกรวดเร็วผลิตโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ วิธี Enzymatic method โดยการใช้เอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase ย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ อย่างไรก็ตามเอนไซม์มีราคาสูง และไม่คงตัว เนื่องจากเอนไซม์จะเป็นโปรตีนที่เสถียรภาพได้ง่าย (Sibirny et al., (2011)

สารประกอบอัลดีไฮด์ (Aldehyde) สามารถทำให้โปรตีนตกตะกอนด้วยวิธี alkylation โดยจะทำปฏิกิริยากับหมู่ amino, carbonyl และ hydroxyl และมีการศึกษาเกี่ยวกับปฏิกิริยาระหว่างอัลดีไฮด์กับหมู่เอมีน เช่น Marsal et al., (2018) ได้ศึกษาการลดลงของปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในกระบวนการทำหนังโดยใช้เรซินสังเคราะห์ด้วยสีย้อม ซึ่งฟอร์มาลดีไฮด์จะเกิดปฏิกิริยากับกลุ่มอะมิโนที่มีอยู่ในโครงสร้างของสีย้อมจึงเป็นการกำจัดฟอร์มาลดีไฮด์ได้ ส่วน Yangyu et al., (2019) ได้ศึกษาการดัดแปร apoka ที่ได้จากธรรมชาติด้วยสาร 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) ที่เติมไปด้วยหมู่เอมีนสามารถกำจัดแก๊สฟอร์มาลดีไฮด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากการศึกษาพบว่าในพืชทั่วไปส่วนใหญ่จะมีสารอะดีโนซีน (Adenosine) เป็นองค์ประกอบ มีรายงานครั้งแรกที่พบว่าอะดีโนซีน 9- $\beta$ -L(+) เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติซึ่งได้รับจากไตรอะคอนทาล (Stanley et al., 1990)

อะดีโนซีนมีหมู่ amine และ hydroxyl ในโครงสร้าง (รูปที่ 1) จึงคาดว่าจะมีความสามารถทำปฏิกิริยากับฟอร์มาลดีไฮด์หรือฟอร์มาลินตกตะกอนได้เช่นเดียวกัน



รูปที่ 1 โครงสร้างของอะดีโนซีน (Adenosine)

ทั้งนี้ ผู้วิจัยได้เลือกพืชที่หาง่ายในท้องถิ่นมาประยุกต์เพื่อใช้ในการตรวจวัดฟอร์มาลินตกค้างในอาหารอย่างง่าย โดยสังเกตจากการตกตะกอน โดยเลือกพืชท้องถิ่นที่มีรายงานว่ามีสารอะดีโนซีน คือ มะยม (*Phyllanthus acidus*) (Sousa et al, 2007; Leeya et al., 2010) และ ผักหวานบ้าน (*Sauropus androgynus*) (Wang, 1997) รวมถึงคัดเลือกพืชในวงศ์ *Phyllanthaceae* เดียวกันอีก 2 ชนิด ได้แก่ มะเฒ่า (*Antidesma bunius* (L.) Spreng) และ มะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* (L.)) ทั้งนี้ เพื่อเป็นการทดสอบฟอร์มาลินในเบื้องต้น เพื่อให้มีความสะดวก รวดเร็ว สามารถทดสอบได้นอกห้องปฏิบัติการ อีกทั้งยังเป็นการใช้ประโยชน์จากพืชท้องถิ่น ลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อผู้ทำการทดลอง

## 2. วิธีการ

### 2.1 การคัดเลือกพืชท้องถิ่น

การศึกษาในครั้งนี้ จะเลือกใช้พืชที่เป็นผักพื้นบ้านทั่วไป โดยเลือกพืชที่มีรายงานว่ามีสารอะดีโนซีน คือ มะยม และ ผักหวานบ้าน รวมถึงคัดเลือกพืชในวงศ์ *Phyllanthaceae* เดียวกันอีก 2 ชนิด ได้แก่ มะเฒ่า และ มะขามป้อม ซึ่งจะเลือกใช้ส่วนใบแก่ของพืชเท่านั้น โดยนำตัวอย่างใบพืชทั้ง 4 ชนิด มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง ชั่งน้ำหนักให้ได้ 10 g แล้วนำมาบดละเอียดด้วยครกหิน เติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำมากรองกากออก ด้วยผ้าขาวบาง เอาส่วนน้ำที่กรองผ่านผ้าขาวบางแล้ว มากรองซ้ำอีกครั้งด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำสารสกัดที่ได้ใส่ลงในขวดพลาสติกบรรจุสาร และเก็บไว้ในตู้เย็น

### 2.2 ทดสอบเบื้องต้นของการทำปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดจากพืชกับสารมาตรฐานฟอร์มาลิน

เตรียมถาดหลุมอะลูมิเนียมขนาด 4 หลุม โดยแต่ละหลุม เติมสารมาตรฐานฟอร์มาลิน 37% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารสกัดจากใบมะเฒ่า ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลุม

ที่ 1, เติมสารสกัดจากใบมะยม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลุมที่ 2 เติมสารสกัดจากใบผักหวานบ้าน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลุมที่ 3 และ เติมสารสกัดจากใบมะขามป้อม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลุมที่ 4 สังเกตผลการเปลี่ยนแปลง

### 2.3 การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารสกัดผักหวานบ้าน

จากการทดสอบพบว่าพืชที่ตกตะกอนกับฟอร์มาลินได้ คือ ผักหวานบ้าน จึงนำสารสกัดจากใบผักหวานบ้านมาผ่านการทำให้แห้งแบบแช่แข็ง (Freeze drying) แล้วละลายในน้ำปราศจากไอออน ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200 - 800 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible spectrophotometer) และนำสารสกัดแบบผงตรวจวัดรูปแบบการดูดกลืนแสงย่านอินฟราเรดด้วยเครื่อง FT-IR โดยใช้เทคนิค ATR และหาปริมาณอะดีโนซีนด้วยเทคนิค HPLC

### 2.4 ศึกษาอัตราส่วนของสารสกัดใบผักหวานบ้านที่ทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐานฟอร์มาลิน

เตรียมหลอดทดลอง 4 หลอด เติมสารมาตรฐานฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 5 % w/v ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารสกัดแบบผง 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.5 กรัม ลงในหลอดทดลองที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ เขย่าหลอดทดลองเบา ๆ ทุกหลอด และสังเกตผลการเปลี่ยนแปลง

### 2.5 ศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัดฟอร์มาลินของสารสกัดใบผักหวานบ้าน

เตรียมหลอดทดลองทั้งหมด 10 หลอด ให้หลอดที่ 1 เป็น blank (น้ำปราศจากไอออน 5 มิลลิลิตร) และหลอดที่ 2 - 9 ให้เติมสารมาตรฐานฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 % w/v ตามลำดับ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารสกัดแบบผง 0.05 กรัม ลงในหลอดทดลองทั้ง 10 หลอด เขย่าหลอดทดลองเบา ๆ ทุกหลอด และสังเกตผลการเปลี่ยนแปลง

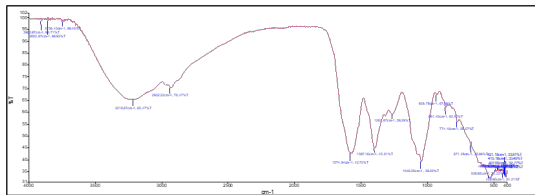
### 2.6 ศึกษาการตรวจวัดฟอร์มาลินของสารสกัดใบผักหวานบ้านเทียบกับชุดทดสอบอย่างง่ายที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด

ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกชุดทดสอบมา 2 ยี่ห้อ คือ ชุดทดสอบ ETK Easy Formalin Test จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และชุดทดสอบ GPO Test Kit for formalin in food จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยทดสอบกับ ตัวอย่างอาหารทะเล 2 ชนิด ได้แก่ ปลาหมึก

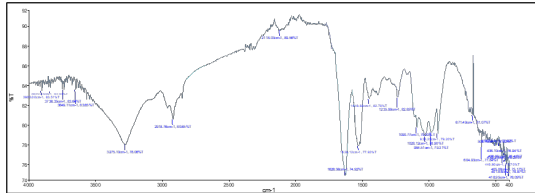
กระดอง และกุ้งขาว จากตลาดศิริวัฒนา จังหวัดเชียงใหม่ โดยจะศึกษาทั้งในน้ำแช่ตัวอย่างปกติ และในน้ำแช่ตัวอย่างที่ บดละเอียด

## 2.7 ศึกษาอายุการใช้งานของสารสกัดแบบผง

การเก็บรักษาสารสกัดจากใบผักหวานบ้านที่ดัดแปร เป็นผง จะเก็บรักษาไว้ในขวดสีชา และเก็บไว้ในตู้เย็น เมื่อครบทุก ๆ 1 เดือน นำผงมาตรวจสอบความคงสภาพและ การใช้งาน โดยสังเกตลักษณะของผง และนำมาทดสอบกับ สารมาตรฐานฟอร์มาลินความเข้มข้น 20% w/v และ 10% w/v เตรียมหลอดทดลอง 3 หลอด หลอดที่ 1 (Blank) เติมน้ำปราศจากไอออน 5 มิลลิลิตร ,หลอดที่ 2 เติมสาร มาตรฐานฟอร์มาลินความเข้มข้นที่ 20% w/v ปริมาตร 5

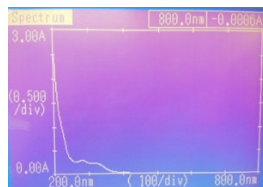


รูปที่ 6 การดูดกลืนแสงย่านอินฟราเรดของผงสารสกัดใบผักหวานบ้าน

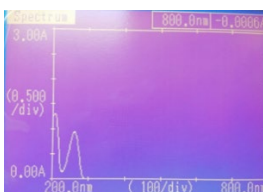


รูปที่ 7 การดูดกลืนแสงย่านอินฟราเรดของตะกอนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง สารสกัดแบบผงกับสารมาตรฐานฟอร์มาลิน

รูปที่ 3 ลักษณะสารสกัดแบบผง จากการทำ Freeze drying



รูปที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดใบผักหวานบ้าน ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์



รูปที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงของอะดีโนซีนบริสุทธิ์ ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

มิลลิลิตร, หลอดที่ 3 เติมสารมาตรฐานฟอร์มาลินความเข้มข้นที่ 10% w/v ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมสารสกัดแบบผง 0.05 g ลงไปทั้ง 3 หลอด เขย่าหลอดทดลองเบา ๆ ทุกหลอด และสังเกตผลการเปลี่ยนแปลง โดยในขั้นตอนนี้จะใช้ระยะเวลาในการศึกษาเป็นระยะเวลารวม 6 เดือน

## 3. ผลลัพธ์และอภิปรายผล

### 3.1 การทำปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดจากพืชกับสารมาตรฐานฟอร์มาลิน

เมื่อเติมสารสกัดจากพืชทั้ง 4 ชนิด ลงในหลอดที่ 1- 4 ที่มีเติมสารมาตรฐานฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 37% w/v ปริมาตร 1 มิลลิลิตร พบว่า มีการตกตะกอนอย่างเห็นได้ชัด ในหลอดที่ 3 ที่เป็นสารสกัดจากใบผักหวานบ้าน ส่วนหลอดอื่นที่เป็นสารสกัดจากใบมะเเฒ่า ใบมะยม และใบมะขามป้อม ไม่เกิดการตกตะกอน ดังรูปที่ 2

ดังนั้น ในการทดลองจึงได้เลือกสารสกัดจากใบผักหวานบ้าน มาเป็นสารสกัดที่ใช้ในการตรวจวัด เนื่องจากสามารถทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐานฟอร์มาลิน และทำให้เกิดการตกตะกอนขึ้นโดยสังเกตเห็นเป็นตะกอนได้อย่างชัดเจน เมื่อนำสารสกัดจากใบผักหวานบ้านผ่านกระบวนการทำผงด้วยการทำ Freeze drying ผงที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล ดังรูปที่ 3 คิดเป็นร้อยละผลผลิต 6.42

### 3.2 สมบัติเบื้องต้นของสารสกัดผักหวานบ้าน

จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของกบอะดีโนซีนบริสุทธิ์ ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible spectrophotometer) มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 207 และ 260 nm ดังรูปที่ 4 ส่วนสารสกัดใบผักหวานบ้าน ได้ค่าความยาวคลื่นแสงที่ถูกดูดกลืนเด่นชัดที่ 200 nm และในช่วง ที่ 259 - 274 nm รูปที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบกับพบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสอดคล้องกันแต่อย่างไรก็ตามผงสารสกัดได้จากกระบวนการคั้นน้ำแล้วทำ freeze drying เท่านั้น ไม่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ ทำให้มีอะดีโนซีนปริมาณน้อย และมีสารอื่นๆ ปนมาได้ เช่น สารจำพวกฟลาโวนอยด์ซึ่งมีการดูดกลืนแสงที่ 240-280 nm และ 300-400 nm (Feng, 2017)

เมื่อนำสารสกัดผงผักหวานบ้าน 20 กรัม ตรวจสอบหาปริมาณอะดีโนซีนในใบผักหวานบ้าน ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่า ในผักหวานบ้าน มีอะดีโนซีนเป็นองค์ประกอบ เมื่อคิดเป็น

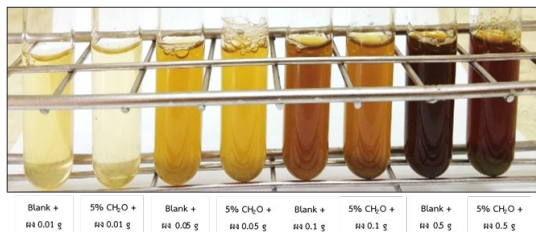


ตารางที่ 1 ปริมาณอะดีโนซีนในผงผักหวานบ้าน

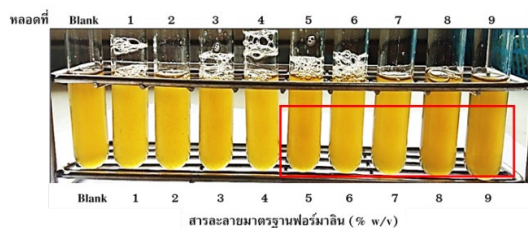
ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	ชื่อตัวอย่าง	วิธีการ	ปริมาณ Adenosine (mg/100g sample)
1	6309082	Adenosine (1)	HPLC-UV	3.66

หมายเหตุ: N.d. = ไม่พบ

หมายเหตุ: ข้อมูลการวิเคราะห์ จากห้องปฏิบัติการกลาง ศูนย์บริการวิชาการและถ่ายทอดเทคโนโลยีการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



รูปที่ 8 การเกิดตะกอนจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารมาตรฐานฟอร์มาลิน 5% w/v กับสารสกัดแบบผงในปริมาณต่าง ๆ



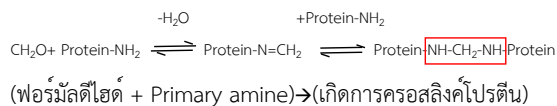
รูปที่ 9 ชีตจำกัดของสารสกัดแบบผง ในการตกตะกอนกับสารมาตรฐานฟอร์มาลินที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ

ปริมาณอะดีโนซีนจะได้ 2.35 มิลลิกรัม ต่อผักหวานบ้าน 1 กิโลกรัม ดังตารางที่ 1

จากการศึกษาการดูดกลืนแสงย่านอินฟราเรดพบ O-H ที่  $3193.00\text{ cm}^{-1}$ , N-H ที่  $1591.36\text{ cm}^{-1}$ , C=C ที่  $1402.13\text{ cm}^{-1}$ , C-N ที่  $1255.96\text{ cm}^{-1}$  และ C-O ที่  $1046.61\text{ cm}^{-1}$  รูปที่ 6

นอกจากนี้ยังศึกษาหมู่ฟังก์ชันของตะกอนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดแบบผงกับสารมาตรฐานฟอร์มาลิน ด้วยเทคนิค ATR-IR พบ O-H ที่  $3275.10\text{ cm}^{-1}$ , N-H ที่  $1625.56\text{ cm}^{-1}$ , C-N ที่  $1235.99\text{ cm}^{-1}$ , C-H ที่  $2118.03\text{ cm}^{-1}$ , C-O ที่ ช่วง  $1000-1300\text{ cm}^{-1}$  และ  $\text{CH}_2$  (Alkane) ที่  $1448.82\text{ cm}^{-1}$  รูปที่ 7

ซึ่งหมู่ฟังก์ชันที่พบในการตรวจวัด คาดว่ามีความเป็นไปได้ และมีความใกล้เคียงกับหมู่ฟังก์ชันของสารอะดีโนซีน และมี  $\text{CH}_2$  ที่มาจากสารมาตรฐานฟอร์มาลิน ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) และได้คาดการณ์การเกิดปฏิกิริยาครอสลิงค์ (Cross link) ของฟอร์มาลดีไฮด์กับโปรตีนที่ปลายกรดอะมิโนชนิด Primary amine เกิดเป็น Secondary amine ที่เสถียร ดังสมการ



### 3.3 ศึกษาอัตราส่วนของสารสกัดใบผักหวานบ้านที่ทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐานฟอร์มาลิน




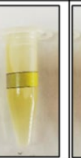











จากการทำปฏิกิริยากันของสารมาตรฐานฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 5 % w/v ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กับสารสกัดแบบผง ปริมาณ 0.5, 0.1, 0.05 และ 0.01 g ตามลำดับพบว่า ในหลอด Blank ทุกหลอดที่ใส่ผงปริมาณแตกต่างกัน เกิดเป็นสารละลายไม่มีตะกอน รวมถึงหลอดที่เติมสารมาตรฐานฟอร์มาลินเข้มข้น 5 % w/v กับสารสกัดแบบผง ที่ปริมาณ 0.01 g แต่ในหลอดเติมสารมาตรฐานฟอร์มาลินเข้มข้น 5 % w/v กับสารสกัดแบบผง ที่ปริมาณ 0.05 g ขึ้นไปเริ่มมีการตกตะกอนและตะกอนที่เกิดขึ้นจะมีปริมาณมากขึ้นตามปริมาณของสารสกัดแบบผงที่เติมลงไป ดังรูปที่ 8

ดังนั้น ในการทดลองครั้งนี้ จะเลือกใช้สารสกัดแบบผงที่ 0.05 กรัม เนื่องจากเป็นการใช้ผงในปริมาณน้อยที่สุด และมีตะกอนที่สังเกตเห็นได้ชัด

### 3.4 ศึกษาขีดจำกัดของสารสกัดใบผักหวานบ้านในการตรวจวัดฟอร์มาลิน

จากการศึกษาขีดจำกัดของสารสกัดแบบผง ในการตกตะกอนสารมาตรฐานฟอร์มาลิน ความเข้มข้นที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9% w/v พบว่า ที่ความเข้มข้น 1-4% w/v ไม่มีการตกตะกอน ส่วนที่ความเข้มข้น 5 % w/v เริ่มมีการตกตะกอนไปจนถึงความเข้มข้น 9% w/v ตะกอนที่เกิดขึ้นจะมีปริมาณมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟอร์มาลิน ดังนั้นสารสกัดจากสารสกัดแบบผง 0.05 กรัม สามารถทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐาน

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบผลการตรวจวัดสารฟอรัมาลินในอาหารทะเลของทั้งสามวิธี

วิธี	Blank	ตัวอย่าง			
		น้ำแช่ปลาหมึกกระดอง	น้ำแช่ปลาหมึกบดละเอียด	น้ำแช่กุ้งขาว	น้ำแช่กุ้งขาวบดละเอียด
ETK Easy Formalin Test					
ผล	-	พบ < 100 mg/kg	พบ < 100 mg/kg	พบ 100 mg/kg	ไม่สามารถระบุได้
GPO Test Kit for formalin in food					
ผล	-	มีฟอรัมาลิน	มีฟอรัมาลิน	มีฟอรัมาลิน	มีฟอรัมาลิน
สารสกัดใบผักหวานบ้านแบบผง					
ผล	-	มีฟอรัมาลิน	มีฟอรัมาลิน	มีฟอรัมาลิน	มีฟอรัมาลิน

ฟอรัมาลินได้ในความเข้มข้นต่ำสุดคือ 5% w/v ดังรูปที่ 9 ซึ่งถือเป็นขีดจำกัดหรือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดฟอรัมาลินได้

อย่างไรก็ตามความเข้มข้นต่ำสุดที่ผ้งจากผักหวานบ้านจะตรวจวัดได้ยังคงสูงกว่าค่าที่กำหนดไม่ควรพบในอาหารตามที่ระบุใน U.S.EPA และ WHO แต่วิธีตรวจสอบด้วยวิธีนี้จะเห็นว่าการทำงานง่ายเพียงขั้นตอนเดียว ใช้สารปริมาณน้อย และไม่เป็นอันตรายต่อผู้ใช้งาน อีกทั้งไม่มีของเสียหลังการทดสอบ

### 3.5 การเปรียบเทียบผลการตรวจวัดสารฟอรัมาลินในอาหารทะเลกับชุดทดสอบอย่างง่าย

จากการเปรียบเทียบผลจากการตรวจวัดสารฟอรัมาลินในอาหารทะเลของทั้งสามวิธี คือการตรวจวัดด้วยผงสารสกัดใบผักหวานบ้าน และจากชุดทดสอบที่มีขายในท้องตลาดทั้ง 2 ยี่ห้อ พบผลการตรวจวัดฟอรัมาลินดังตารางที่ 2

จากตารางที่ 2 พบว่า ชุดทดสอบ ETK Easy Formalin Test จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มีการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีเหลืองเล็กน้อย ซึ่งรายงานได้ว่าพบฟอรัมาลินในปริมาณน้อยกว่า 100 mg/kg ในหมึกกระดองทั้งในน้ำแช่และในเนื้อบดละเอียด สำหรับในตัวอย่างน้ำแช่กุ้งขาว ชุดทดสอบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน รายงานได้ว่าพบสารฟอรัมาลินในระดับ 100 mg/kg แต่เมื่อวิเคราะห์ในเนื้อกุ้งขาวบดละเอียด เกิดการรบกวนของสีจากสารตัวอย่างจึงไม่

สามารถรายงานค่าได้ เป็นข้อจำกัดของชุดทดสอบนี้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดสอบ GPO Test Kit for formalin in food จากองค์การเภสัชกรรม พบว่าตัวอย่างที่นำมาตรวจวัดมีการเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนทั้งหมด รายงานได้ว่าพบฟอรัมาลินในทุกตัวอย่าง ซึ่งชุดทดสอบนี้มีค่าการตรวจต่ำสุด 0.5 ppm สอดคล้องกับการทดสอบจากผงสารสกัดใบผักหวานบ้านเมื่อเติมลงในสารละลายตัวอย่าง พบว่ามีความขุ่นเกิดขึ้นแม้จะไม่เกิดเป็นตะกอนขนาดใหญ่ รายงานว่าอาจจะพบฟอรัมาลินในตัวอย่างทั้งหมดด้วยเช่นกัน ทั้งนี้ชุดทดสอบ GPO Test Kit for formalin in food ก็มีข้อจำกัดเรื่องผลบวกเทียม ทดสอบเฉพาะในน้ำแช่หรือน้ำล้างตัวอย่างเท่านั้น หลีกเลี่ยงการบดตัวอย่าง ภายใต้ปฏิกิริยา Schryver's method ซึ่งมีความไวต่อปริมาณฟอรัมาลดีไฮด์ในระดับต่ำสามารถเกิดปฏิกิริยากับ Trimethylamine (Reay, 1936) และฟอรัมาลดีไฮด์ในระดับที่อาจจะไม่ได้ตามธรรมชาติ ไม่ใช่ฟอรัมาลินที่เกิดการเติมลงในตัวอย่าง (Wahed et al., 2016)

จะเห็นว่าผงสารสกัดจากผักหวานบ้านสามารถนำมาประยุกต์ตรวจวัดฟอรัมาลินตกค้างเบื้องต้นได้ แม้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ผ้งจากผักหวานบ้านจะตรวจวัดได้ยังคงสูง แต่มีการใช้งานง่ายเพียงขั้นตอนเดียว ใช้สารปริมาณน้อย ไม่เป็นอันตรายต่อผู้ใช้งาน และไม่มีของเสียหลังการทดสอบ การดูสีอาจจะเป็นข้อเสีย แต่งานนี้ดูการตกตะกอน ซึ่งอาจจะต้องพัฒนาต่อไป อาจมีวิธีการตรวจวัดโดยใช้เครื่องวัดความขุ่นร่วมด้วย

### 3.6 ศึกษาอายุการใช้งานของสารสกัดแบบผง

เมื่อนำสารสกัดจากใบผักหวานบ้านที่ตัดแปรเป็นผงเก็บรักษาไว้ในขวดสีชา และเก็บไว้ในตู้เย็น เมื่อครบทุก ๆ 1 เดือน นำผงมาตรวจสอบความคงสภาพและการใช้งานโดยสังเกตลักษณะของผง และนำมาทดสอบกับสารมาตรฐานฟอรัมาลินความเข้มข้นที่ 10% w/v และ 20% w/v พบว่าทั้ง 6 เดือนให้ผลที่เหมือนกัน คือ มีการตกตะกอนทั้งกับสารมาตรฐานฟอรัมาลิน 10% w/v และ 20% w/v w/v อย่างไรก็ตามในเดือนที่ 5-6 เมื่อตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้นาน ๆ พบว่าที่หลอดทดลองของ Blank มีตะกอนเล็ก ๆ ตกด้วย ซึ่งอาจจะมาจากความชื้นหรือการทำปฏิกิริยากับอากาศ ทำให้สารที่เป็นองค์ประกอบอื่น ๆ ในสารสกัดแบบผงเกิดการเสื่อมสภาพได้ ดังนั้น เพื่อให้

การตรวจวัดได้ถูกต้องอายุการใช้งานของสารสกัดจากใบ  
ผักหวานบ้านควรใช้ภายในระยะเวลา 5 เดือน

#### 4. บทสรุป

จากการทดลองการตรวจสอบหาฟอรัมาลินปนเปื้อนใน  
อาหาร โดยวิธีการใช้พืชท้องถิ่นมาทดสอบ และสังเกตการ  
เปลี่ยนแปลงด้วยการตกตะกอน พบว่าสารสกัดจากพืชทั้ง  
4 ชนิด ได้แก่ ใบผักหวานบ้าน มะยม มะเฒ่า และมะขามป้อม  
มีเพียงชนิดเดียวที่สามารถตกตะกอนฟอรัมาลินได้ คือ  
สารสกัดจากใบผักหวานบ้าน ซึ่งได้นำมาผ่านกระบวนการทำ  
ให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งได้สารสกัดในรูปแบบผง ซึ่งสามารถ  
ตรวจวัดฟอรัมาลินได้ที่ขีดความเข้มข้นต่ำสุดคือ 5 % w/v  
ซึ่งยังมีค่าสูงยังคงต้องพัฒนาต่อไป อย่างไรก็ตามเมื่อนำมา  
ทดสอบกับตัวอย่างอาหารทะเล พบว่าให้ผลใกล้เคียงกับชุด  
ทดสอบที่มีขายตามท้องตลาด จากงานวิจัยนี้ทำให้เห็นการ  
พัฒนาการตรวจวัดฟอรัมาลินสามารถทำได้ด้วยวิธีที่ง่าย  
สะดวก รวดเร็ว สามารถนำไปวิเคราะห์เบื้องต้น ทำนอก  
ห้องปฏิบัติการได้โดยไม่มีของเสียหลังการทดสอบ มีความ  
ปลอดภัยต่อผู้ทำการตรวจสอบ เนื่องจากมีการใช้สารสกัด  
ที่มาจากธรรมชาติ และช่วยลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์  
สามารถเก็บใช้งานได้ประมาณ 5 เดือน อาจต่อยอดพัฒนา  
เป็นชุดทดสอบหาสารฟอรัมาลินได้ในระดับเบื้องต้นได้

#### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ และกองทุนสนับสนุนทุนวิจัย  
จากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

#### เอกสารอ้างอิง

Abe, Y., Kobayashi, N., Yamaguchi, M., Mutsuga, M., Ozaki, A., Kishi, E., & Sato, K. (2021). Determination of formaldehyde and acetaldehyde levels in poly (ethylene terephthalate)(PET) bottled mineral water using a simple and rapid analytical method. *Food Chemistry*, 344, 128708.

Feng, W.-S, Hao, Z., & Meng, L. (2017). Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health. *Intech*. 24-25.

Leeya, Y., Mulvany, M. J., Queiroz, E. F., Marston, A., Hostettmann, K., & Jansakul, C. (2010). Hypotensive activity of an n-butanol extract and their purified compounds from leaves of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels in rats. *European journal of pharmacology*, 649(1-3), 301-313.

Liu, Y., Jia, H., Sun, Z., Pan, Y., Zhang, G., & Zheng, S. (2019). High-efficiency removal of gaseous HCHO by amine functionalized natural opoka. *Chemical Physics Letters*, 722, 32-38.

Marsal, A., Cuadros, S., Cuadros, R. M., Font, J., & Manich, A. M. (2018). Dyestuffs and formaldehyde content in split leather treated with formaldehyde resins. *Dyes and Pigments*, 158, 50-59. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.05.027>.

Reay, G. A. (1936). Testing for the presence of formaldehyde in salt-cured ling. *Analyst*, 61(719), 78-85.

Ries, S., Wert, V., O'Leary, N. F. D., & Nair, M. (1990). 9- $\beta$ -L (+) Adenosine: A new naturally occurring plant growth substance elicited by triacontanol in rice. *Plant growth regulation*, 9(3), 263-273.

Sibirny, V., Demkiv, O., Klepach, H., Honchar, T., & Gonchar, M. (2011). Alcohol oxidase-and formaldehyde dehydrogenase-based enzymatic methods for formaldehyde assay in fish food products. *Food Chemistry*, 127(2), 774-779.

Sousa, M., Ousingsawat, J., Seitz, R., Puntheeranurak, S., Regalado, A., Schmidt, A., & Kunzelmann, K. (2007). An extract from the medicinal plant *Phyllanthus acidus* and its isolated compounds induce airway chloride secretion: a potential treatment for cystic fibrosis. *Molecular Pharmacology*, 71(1), 366-376.

Teixeira, L. S., Leão, E. S., Dantas, A. F., Pinheiro, H. L., Costa, A. C., & De Andrade, J. B. (2004). Determination of formaldehyde in Brazilian alcohol fuels by flow-injection solid phase spectrophotometry. *Talanta*, 64(3), 711-715.

Thepchuay, Y., Chairit, W., Saengsane, N., Porrawatkul, P., & Pimsen, R. (2022). Simple and green colorimetric method for the detection of formaldehyde in vegetable samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 111, 104623. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104623>

United States Environmental Protection Agency. *Integrated Risk Information System (IRIS) on Formaldehyde*. National Center for Environmental Assessment. Office of Research and Development. Washington DC: U.S. EPA, 1999.

Wahed, P., Razzaq, M. A., Dharmapuri, S., & Corrales, M. (2016). Determination of formaldehyde in food and feed by an in-house validated HPLC method. *Food chemistry*, 202, 476-483.

Wang, P. H., & Lee, S. S. (1997). Active chemical constituents from *Sauropus androgynus*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 44(2), 145-149.

World Health Organization. Formaldehyde in Drinking-water. *Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality*. Geneva: WHO, 2005.

Yasri, N. G., Seddik, H., & Mosallb, M. A. (2015). Spectrophotometric determination of formaldehyde based on the telomerization reaction of tryptamine. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(4), 487-494.

Zhang, L. (2018). *Formaldehyde: Exposure, Toxicity and Health Effects*. 1<sup>st</sup> ed., Royal Society of Chemistry. pp 389.

Zhang, Y.-T., Liao, L.-G., & Tan, M., et al. (2024). Design of an ultra-sensitive nanoprobe based on poly  $\beta$ -cyclodextrin for formaldehyde detection in food and biological samples. *Microchemical Journal*. 199. 110090. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110090>

Zhao, J., & Fan, B. 2006. Spectrophotometric Determination Method of Formaldehyde. *Guangdong Trace Elements Science*, 13(2), 17-22.