บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 สารเคมีและวัสดุ เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1.1 สารเคมีและวัสดุ

สารมาตรฐานไซบูทรามีน ไฮโดรคลอไรด์ (sibutramine hydrochloride, SH) (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) และสารสังเคราะห์อื่น ๆ ที่เคยมีรายงานการใช้เพื่อควบคุมน้ำหนัก ได้แก่ เฟนเทอร์มีน (phentermine) เฟนฟูรามีน (fenfuramine) และ เมธแอมเฟทามีน (methamphetamine) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 ชลบุรี ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร จำนวน 20 ตัวอย่าง (บริษัทผู้ผลิตต่างกัน) ซื้อจากร้านค้าแผงลอยตามตลาดนัด ทางอินเตอร์เนตและร้านขายยา โดยเน้นการซื้อผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีสรรพคุณลดน้ำหนักโดยเฉพาะที่ไม่มีทะเบียนจากสำนักคณะกรรมการอาหารและยา

ตัวทำละลายทุกชนิดที่ใช้เป็น analytical grade เข็มจุดสารละลายใช้เข็มไมโครแค็ป (microcaps) ขนาด 2 ไมโครลิตร (Drummond Scientific Co.) แผ่นทีแอลซี ได้แก่ 1. แผ่น silica gel 60 F_{254} TLC ชนิดอะลูมิเนียมและพลาสติก (Merck) 2. แผ่น silica gel 60 F_{254} HPTLC ชนิดอะลูมิเนียม (Merck) และ 3. แผ่น Al_2O_3 TLC ชนิดอะลูมิเนียม (Merck)

2.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเลต (CAMAG UV-cabinet II) เครื่องจุดสารละลายตัวอย่างบนแผ่นทีแอลซี Nanomat 4 (Camag) เครื่องจุ่มแผ่นรุ่น Immersione device (Camag) เครื่องเดนสิโตมิเตอร์ (densitometer) CAMAG TLC scanner II with CAMAG CATS 3.1 software (Camag) เครื่องคอมพิวเตอร์รุ่น HP Intel Pentium 1400 MHz 1.40 GHz 248 MB (Compaq) แทงค์บรรจุวัฏภาคเคลื่อนที่(Camag) กล้องถ่ายภาพดิจิตอลรุ่น 960 IXY (Cannon) และ เครื่องสแกนเนอร์รุ่น SCAN Jet 3500C (Hewlett Packard) และโปรแกรม Sorbfil TLC Videodensitometer (Sorbpolymer)

2.2 การศึกษาเบื้องต้นเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ไซบูทรามีนเชิงปริมาณด้วยทีแอลซี

2.2.1 วัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่

ชนิดของวัฏภาคคงที่ที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ แผ่นทีแอลซีชนิดอะลูมิเนียมและชนิดพลาสติกเคลือบด้วย silica gel 60 F_{254} แผ่น HPTLC ชนิดอะลูมิเนียมเคลือบด้วย silica gel 60 F_{254} และ แผ่นทีแอลซีชนิดอะลูมิเนียมเคลือบด้วย Al_2O_3 วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดต่าง ๆ เป็นดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ชนิดของวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ในการศึกษาเบื้องต้น

วัฏภาคคงที่	วัฏภาคเคลื่อนที่
TLC Si 60 F_{254}	1. Toluene-MeOH (9 mL:1 mL)
	2. Toluene-acetone (9 mL:1 mL)
	3. Toluene-MeOH (15 mL:1 mL)
	4. Toluene-acetone-diethylamine (9 mL:1 mL:2 หยด)
	5. Toluene-MeOH-diethylamine (10 mL:0.5 mL:2 หยด)
	6. Toluene-MeOH (10 mL:0.25 mL)
	7. Toluene-MeOH-diethylamine (10 mL:0.25 mL:25 μL)
	8. Toluene-MeOH-diethylamine (10 mL:0.25 mL:50 μL)
	9. Toluene-diethylamine (10 mL:0.25 mL)
	10. Cyclohexane-diethylamine (9 mL:1 mL)
	11. n-Hexane-diethylamine (10 mL:0.5 mL)
	12. Cyclohexane-diethylamine (10 mL:0.25 mL)
	13. n-Hexane-diethylamine (12 mL:0.2 mL)
	14. n-Hexane-MeOH-diethylamine (10 mL:0.025 mL:0.125 mL)
	15. n-Hexane-MeOH-diethylamine (10 mL:0.025 mL:0.2 mL)
	16. Toluene-hexane-diethylamine (10 mL:2 mL:0.2 mL)
	17. Toluene-hexane-diethylamine (8 mL:2 mL:0.35 mL)
	18. Toluene-hexane-diethylamine (9 mL:1 mL:0.3 mL)
HPTLC Si 60 F_{254}	1. Toluene-MeOH-diethylamine (10 mL:0.25 mL:50 μL)
TLC Al_2O_3	1. Toluene-diethylamine (10 mL:0.25 mL)
	2. n-Hexane-diethylamine (10 mL:0.25 mL)

หมายเหตุ ตัวอย่างในการศึกษาเบื้องต้นใช้ผงยาที่บรรจุใน sibutramine HCl capsule จำนวน 15 mg ละลายใน MeOH จำนวน 3 mL และจุดสารละลายตัวอย่างครั้งละ 4 μL

2.2.2 วิธีการจุดสาร วิธีการตรวจวัดและการเก็บข้อมูลภาพ

ในการศึกษาเบื้องต้น วิธีการจุดสารทำการทดสอบโดยการใช้จุดสารเป็นวง (spot) หรือแถบ (band) ด้วยเข็มขนาด 2 และ 5 μL สำหรับวิธีการตรวจวัดสารในการศึกษาเบื้องต้นทำการทดสอบโดยการดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 nm และการสเปรย์หรือจุ่มด้วยสารละลาย Dragendorff การเก็บข้อมูลภาพทำการศึกษาโดยการถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 nm และการสแกนเก็บข้อมูล

2.2.3 การศึกษาเพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้น

สารละลายของสารมาตรฐาน SH เตรียมที่ความเข้มข้น 0.5 mg/mL ในเมธานอล จาก stock solution ที่ความเข้มข้น 5 mg/mL นำมาจุดสารจำนวน 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 μL โดยใช้เข็มไมโครแค็ปขนาด 2 μL ลงบนแผ่นทีแอลซีชนิดพลาสติกเคลือบด้วย silica gel 60 F_{254} โดยจุดเป็นแถบขนาด 0.5 cm แต่ละแถบห่างกัน 1 cm ห่างจากขอบล่าง 1.2 cm และขอบข้างอย่างน้อย 1.5 cm โดยการใช้เครื่อง Nanomat 4 ช่วยในการจุดสารละลายตัวอย่าง จากนั้นจึงนำแผ่นที่จุดสารแล้วใส่ลงในแทงค์ขนาด 10 x 20 cm ที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ toluene-hexane-diethylamine (9:1:0.3) ปริมาณ 41.2 mL โดยมีระยะทางในการพัฒนาแผ่นเท่ากับ 7.0 cm แผ่นที่พัฒนาเสร็จแล้วนำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยเทคนิคเชิงภาพและการใช้เครื่องเดนสิโตมิเตอร์ต่อไป

2.2.4 วิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธีทีแอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและเดนสิโตเมตรี

วิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธีทีแอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพ ทำโดยการเก็บข้อมูลภาพทีแอลซีที่พัฒนาเสร็จแล้วและจุ่มลงในสารละลาย Dragendorff โดยการใช้เครื่องจุ่มแผ่นรุ่น Immersione device (Camag) ด้วยความเร็ว 1 mm/sec และทิ้งไว้เป็นเวลา 6 วินาที เมื่อนำแผ่นขึ้นมาแล้วให้วางแผ่นภายใต้ตู้ดูดควันเป็นเวลา 5 นาที จุ่มซ้ำเพื่อให้สีเห็นชัดขึ้น ทิ้งไว้ 15 นาที ภายใต้ตู้ดูดควันก่อนนำไปสแกนเก็บข้อมูลภาพโดยการสแกนด้วยเครื่องแสกนเนอร์ ในรูป JPEG file ที่ความละเอียด (resolution) 200 จากนั้นจึงนำข้อมูลภาพขนาด 10 x 10 cm หรือ 10 x 20 cm ที่ค่าความละเอียด (resolution) 40 pixels/cm มาประเมินผลโดยใช้โปรแกรม Sorbfil TLC Videodensitometer ตั้งค่าพารามิเตอร์ของขนาดแต่ละแถว (band width) โดยใช้ default settings เพื่อตรวจวัดหาพื้นที่ของสารไซบูทรามีนบนแผ่นทีแอลซี

สำหรับวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ ทำได้โดยนำแผ่นทีแอลซีที่พัฒนาเสร็จแล้วไปตรวจวัดโดยการสแกนด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ CAMAG TLC scanner II with CAMAG CATS 3.1 software ที่ absorbance mode ความยาวคลื่น 225 nm วัดพื้นที่ของแต่ละพีกเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณต่อไป

2.3 การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

2.3.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีทีแอลซีที่ได้รับการพัฒนาขึ้น ทำโดยการวิเคราะห์สารมาตรฐานและสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารควบคู่กันไป บันทึกข้อมูลภาพโครมาโทแกรมที่ได้ เปรียบเทียบค่า Rf ของไซบูทรามีนในสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่า Rf ของสารมาตรฐาน SH กับสารสังเคราะห์อื่น ๆ ที่เคยมีรายงานการใช้เพื่อควบคุมน้ำหนัก ได้แก่ เฟนเทอร์มีน เฟนฟูรามีน และ เมธแอมเฟทามีน โดยใช้วัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ได้รับการพัฒนาขึ้นดังแสดงในข้อ 2.2.3 (แผ่นทีแอลซีชนิดพลาสติกเคลือบด้วย silica gel 60 F_{254} และ toluene-hexane-diethylamine (9:1:0.3) ตามลำดับ) และวิธีการตรวจวัดดังแสดงในข้อ 2.2.4

การทดสอบ peak purity ของสารทำโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ เปรียบเทียบค่า Rf และสเปกตรัมของไซบูทรามีนในสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานที่สามตำแหน่ง ได้แก่ ที่ตำแหน่งเริ่มของพีก (peak start, S) ตำแหน่งยอดของพีก (peak apex, M) และที่ตำแหน่งจบของพีก (peak end, E) ของสารแต่ละจุด เพื่อบันทึกค่า $r(S, M)$ และ $r(M, E)$

2.3.2 การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นและช่วงการวิเคราะห์ (linearity range)

การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นและช่วงของการวิเคราะห์ ทำโดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน SH ที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 µg/spot โดยทำการจุดสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml จำนวน 2-12 µl ด้วยเข็มไมโครแค็ปขนาด 2 µL บนแผ่นทีแอลซี และทำการวิเคราะห์โดยใช้สภาวะดังแสดงในข้อ 2.2.3 และ 2.2.4 นำแผ่นที่พัฒนาเสร็จแล้วไปวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยการใช้เครื่องเดนสิโตมิเตอร์และเทคนิคเชิงภาพ เพื่อวัดพื้นที่ของพีก SH ที่แต่ละความเข้มข้น แล้วนำมาทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น โดยสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่กับปริมาณ (µg/spot) ของสารมาตรฐาน คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficience, R^2) โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel ทำการวิเคราะห์กราฟมาตรฐาน 6 ซ้ำ

2.3.3 การทดสอบขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณ (limit of detection และ limit of quantitation)

ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ) ของวิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์และเทคนิคเชิงภาพ ทำการศึกษาตามวิธีของ Ansari, M.J.[17] โดยการสร้างเส้นกราฟมาตรฐานแบบ linear regression (Y = mX + C, Y = พื้นที่ใต้พีก, X = µg/spot, m = ค่าความชันของกราฟ (slope) และ C = จุดตัดของกราฟที่แกน Y (Y-intercept)) ระหว่างพื้นที่กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 µg/spot โดยค่า LOD และ LOQ ของวิธีการวิเคราะห์สามารถคำนวณได้จากสูตร LOD = (3 x SD)/m และ LOQ = (3 x SD)/m SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของจุดตัดของกราฟมาตรฐานที่แกน Y และค่า m คือค่าความชันเฉลี่ยของเส้นกราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ 6 ซ้ำ

2.3.4 การทดสอบความถูกต้อง (accuracy)

การทดสอบความถูกต้องของวิธีอาศัยการศึกษาแบบ recovery studies ด้วยวิธี standard addition method โดยการเตรียมสารละลายตัวอย่างและสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐาน SH ที่ความเข้มข้น 0.17, 0.33 and 0.5 mg/mL (1, 2 และ 3 µg/spot เมื่อทำการจุดสารละลายที่จำนวน 6 µL)

วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างเทียบกับสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐานดังข้างต้น โดยจุดสารละลายจำนวนอย่างละ 6 µl สลับกับสารละลายมาตรฐาน SH ที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 µg/spot ตามลำดับ และใช้สภาวะการวิเคราะห์ดังแสดงในข้อ 2.2.3 และ 2.2.4 นำแผ่นที่พัฒนาเสร็จแล้วไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร SH ในสารละลายตัวอย่างและสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐาน SH ด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์และเทคนิคเชิงภาพ ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

คำนวณหาค่า % recovery และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (ในรูปร้อยละ) (percentage relative standard deviation, %RSD)

% recovery = [(B – A)/C] x 100

B = ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ในสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐาน (µg/spot)

A = ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ในสารละลายตัวอย่าง (µg/spot)

C = ปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงในสารละลายตัวอย่าง (µg/spot)

% RSD = (SD x 100)/mean

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ % recovery

Mean = ค่าเฉลี่ยของ % recovery

2.3.5 การทดสอบความแม่นยำ (precision)

การทดสอบความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณทำโดยการศึกษา Repeatability (intra-day precision) และ Intermediate precision (inter-day precision) โดยการวิเคราะห์หาปริมาณสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2, 3 และ 4 µg/spot ด้วยวิธีทีแอลซีตามสภาวะดังข้างต้น และวิเคราะห์หาปริมาณของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นดังกล่าวด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์และเทคนิคเชิงภาพ ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ และให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำในวันต่อมาเพื่อหา Intermediate precision (inter-day precision) คำนวณหาค่า % accuracy และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (ในรูปร้อยละ) (percentage relative standard deviation, %RSD) จาก

% accuracy = [A/B] x 100

A = ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ในสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (µg/spot)

B = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่นำมาวิเคราะห์ (µg/spot)

% RSD = (SD x 100)/mean

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ % accuracy
Mean = ค่าเฉลี่ยของ % accuracy

2.3.6 การศึกษาความทนทาน (robustness)

ความทนทาน (Robustness) ของวิธีวิเคราะห์ ทำการศึกษาโดยการปรับเปลี่ยนวิธีเล็กน้อย ได้แก่ การปรับเปลี่ยนสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ (toluene-*n*-hexane-diethylamine (9:1:0.3, *v/v/v*), (9.1:0.9:0.3, *v/v/v*), (8.9:1.1:0.3, *v/v/v*)) การปรับเปลี่ยนระยะเวลาระหว่างเวลาที่จุดสารกับเวลาที่เริ่มพัฒนาแผ่น (+ 15 นาที) และ ระหว่างเวลาที่พัฒนาแผ่นเสร็จกับเวลาที่บันทึกข้อมูลภาพหรือการสแกนภาพ (+ 15 นาที) โดยทำการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3 μg/spot โดยการใช้เครื่องเดนสิโตมิเตอร์และเทคนิคเชิงภาพ และวัดพื้นที่ใต้พีกของสารที่ความเข้มข้นดังกล่าว ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำที่แต่ลสภาวะการปรับเปลี่ยน คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (ในรูปร้อยละ) (percentage relative standard deviation, %RSD) ของพื้นที่เพื่อดูความทนทานของวิธี

2.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธีทีแอลซีที่ได้รับการพัฒนา

2.4.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

การเตรียมสารละลายตัวอย่างจากผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร จำนวน 20 ตัวอย่าง (S1-S20) เตรียมโดยใช้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารขนาดสำหรับรับประทานต่อครั้ง ใส่ลงฟลาสค์และเติม MeOH จำนวน 20 mL ตามด้วยการโซนิเคต (sonicate) เป็นเวลา 15 นาที สารละลายส่วนใสนำมาใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วยทีแอลซี ยกเว้นสารตัวอย่าง S10 และ S19 ให้นำสารละลายที่เตรียมได้จากข้างต้นมาเจือจางเท่าตัวด้วย MeOH ก่อนนำไปวิเคราะห์

2.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไซบูทรามีนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีการปนเปื้อน

การวิเคราะห์หาปริมาณสารไซบูทรามีนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีการปนเปื้อน ทำโดยจุดสารละลายตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 2.4.1 จำนวนอย่างละ 6 μL สลับกับสารละลายมาตรฐาน SH ที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 μg/spot ตามลำดับ บนแผ่นทีแอลซี โดยใช้สภาวะการวิเคราะห์ดังแสดงในข้อ 2.2.3 นำแผ่นที่พัฒนาเสร็จแล้วไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์และเทคนิคเชิงภาพรายละเอียดดังแสดงในข้อ 2.2.4 เพื่อวัดพื้นที่ใต้พีกของสาร SH สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน คำนวณหาปริมาณสาร SH ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีการปนเปื้อนจากกราฟมาตรฐาน ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ปริมาณสาร SH ที่วิเคราะห์ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมต่อขนาดรับประทานหนึ่งครั้ง (mg per one single dose)

2.4.3 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธีทีแอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิโตเมตรี

นำค่าเฉลี่ยของปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้จากวิธีทีแอลซีโดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพกับวิธีทีแอลซีเดนสิโตเมตรีมาทำการเปรียบเทียบ โดยการใช้สถิติแบบ paired *t*-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95