

บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและวิจารณ์ผล

3.1 ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ไซบูทรามินด้วยวิธีที่แอลซี

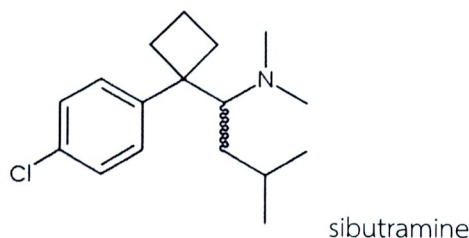
3.1.1 ชนิดของวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่

ชนิดของวัฏภาคคงที่ที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ แผ่นที่แอลซีชนิดอะลูมิเนียมและชนิดพลาสติกเคลือบด้วย silica gel 60 F₂₅₄ แผ่น HPTLC ชนิดอะลูมิเนียมเคลือบด้วย silica gel 60 F₂₅₄ และ แผ่นที่แอลซีชนิดอะลูมิเนียมเคลือบด้วย Al₂O₃ ขนาด 1.5 x 10 cm ค่า R_f และลักษณะจุดของสารไซบูทรามินที่ปรากฏบนแผ่นที่แอลซีโดยการพ่นหรือจุ่มลงในสารละลาย Dragendorff โดยการใช้วัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดต่าง ๆ เป็นดังแสดงในตารางที่ 3.1

จากผลการศึกษาโดยรวมพบว่า การใช้วัฏภาคคงที่ที่เป็นแผ่นอะลูมิเนียมเคลือบด้วย silica gel 60 F₂₅₄ ทั้งแบบชนิดที่แอลซีและชนิด HPTLC ให้ผลการแยกที่ไม่แตกต่างกันมาก ในขณะที่การใช้แผ่นที่แอลซีชนิด Al₂O₃ ให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่ดี ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้แผ่นที่แอลซีที่เคลือบด้วย silica gel 60 F₂₅₄ เนื่องจากมีราคาไม่สูงมากเมื่อเทียบกับแผ่นชนิด HPTLC และใช้แผ่นชนิดพลาสติกเนื่องจากมีข้อดีคือเมื่อจุ่มลงในสารละลาย Dragendorff พบว่าให้ผลการสังเกตสีชัดเจนและไม่มีจุดดำเล็ก ๆ กระจายตัวรบกวนการวิเคราะห์ ปรากฏบนแผ่นพลาสติกเมื่อเทียบการใช้แผ่นชนิดอะลูมิเนียม

สำหรับผลการศึกษาเพื่อพัฒนาปรับเปลี่ยนวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดต่าง ๆ พบว่า

- เนื่องจากโครงสร้างของสารไซบูทรามินค่อนข้างมีความเป็นขั้วต่ำ (non-polar) ความแรง (solvent strength) ของระบบวัฏภาคเคลื่อนที่จึงไม่ควรสูงมากนักเพื่อไม่ให้สารเคลื่อนที่ไปบนแผ่นที่แอลซีเป็นระยะทางมากเกินไป (ค่า R_f มากกว่า 0.7)



- ควรมี diethylamine เป็นส่วนผสมในปริมาณเล็กน้อย เพื่อช่วยลดการเกิดลักษณะวงแบบหางลาก (tailing) ของจุดสารบนแผ่นที่แอลซี เนื่องจากสารไซบูทรามินมีคุณสมบัติเป็นด่าง การมี diethylamine ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นด่างใช้เป็นส่วนผสมในวัฏภาคคงที่อาจช่วยลดการแตกตัวของโครงสร้างยา ลดการจับกันระหว่างโครงสร้างของยาที่แตกตัวกับ silica gel 60 บนแผ่นที่แอลซี ทำให้ช่วยลดการเกิดลักษณะวงแบบหางลากลงได้
- เมื่อใช้ n-hexane หรือ cyclohexane เป็นส่วนประกอบหลักในการผสมกับ diethylamine แม้ว่าจุดของสารที่ได้ปรากฏมีลักษณะกลมแคบ ไม่มีหางลากยาว แต่มักพบว่าค่า R_f ของสารไซบูทรามินที่ได้จากการพัฒนาแผ่นในแต่ละครั้งค่อนข้างแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากตัวทำละลายเหล่านี้มีการระเหยค่อนข้างเร็ว ทำให้สัดส่วนของตัวทำละลายที่ใช้ในวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เตรียมขึ้นในแต่ละครั้งอาจเปลี่ยนแปลงไปจากสัดส่วนที่ต้องการ ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของสารบนแผ่นที่แอลซี อย่างไรก็ตาม หากใช้แต่เฉพาะ toluene เป็นส่วนประกอบหลักผสมกับ diethylamine พบว่าลักษณะของจุดหรือแถบสารไซบูทรามินที่ปรากฏบนแผ่นที่แอลซีมีลักษณะเป็นแบบ front tail เล็กน้อย แต่เมื่อผสม hexane ลงไปด้วยพบว่าจุดที่ได้มีลักษณะกลมขึ้น ไม่ปรากฏหางลาก
- จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่า การใช้ toluene-hexane-diethylamine (9:1:0.3) ให้ลักษณะของจุดที่แยกได้เป็นวงกลมไม่มีหางลาก และค่า R_f ที่ได้ยังอยู่ในช่วงที่เหมาะสมไม่สูงเกินไป

เนื่องจากสารไซบูทรามินมีโครโมฟอร์ในโครงสร้างที่สามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตได้ ดังนั้น เมื่อทำการตรวจวัดภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 nm จึงพบจุดของสารปรากฏเป็นจุดทึบแสงบนพื้นหลังสีเขียวย อย่างไรก็ตามพบว่าความชัดเจนในการตรวจพบสารไม่ดีเท่ากับการพ่นด้วยสารละลาย Dragendorff ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโครงสร้างของสารไซบูทรามินมีหมู่เอมีนชนิดตติยภูมิ (tertiary amine) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาเกิดสีกับสารพ่น Dragendorff ปรากฏเป็นจุดสีส้มเห็นผลได้ชัดเจน โดยพบว่ามีความไวในการตรวจวัดสูงกว่าการตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (รูปที่ 3.1) อย่างไรก็ตามเมื่อนำแผ่นที่ทำปฏิกิริยาการเกิดสีกับสาร Dragendorff แล้วไปตรวจดูต่อภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตพบว่าสามารถเห็นจุดของสารภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตได้ดีขึ้น (รูปที่ 3.1 ค และตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.1 ค่า R_f และลักษณะจุดไซบูทรามินโดยการใช้วัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดต่าง ๆ

วัฏภาคคงที่	วัฏภาคเคลื่อนที่	ค่า R_f
TLC Si 60 F ₂₅₄	1. Toluene-MeOH (9:1)	0.78 (วงกลมออกรีเล็กน้อย)
	2. Toluene-acetone (9:1)	0.58 (วงรีมีหางลากยาว)
	3. Toluene-MeOH (15:1)	0.67 (วงกลมออกรียาวเล็กน้อย)
	4. Toluene-acetone-diethylamine (9:1:2 หยด)	0.64 (วงกลมออกรียาวบ้าง)
	5. Toluene-MeOH-diethylamine (10:0.5:2 หยด)	0.70 (วงกลมออกรียาวบ้าง)
	6. Toluene-MeOH (10:0.25)	0.50 (วงกลมออกรียาวเล็กน้อย)
	7. Toluene-MeOH-diethylamine (10:0.25:25 µL)	0.64 (วงกลมออกรียาวบ้าง)
	8. Toluene-MeOH-diethylamine (10:0.25:50 µL)	0.68 (วงกลมออกรียาว)
	9. Toluene-diethylamine (10:0.25)	0.64 (วงกลมมี front-tail เล็กน้อย)
	10. Cyclohexane-diethylamine (9:1)	
	11. n-Hexane-diethylamine (10:0.5)	1.0
	12. Cyclohexane-diethylamine (10:0.25)	1.0
	13. n-Hexane-diethylamine (12:0.2)	0.78 (วงมีลักษณะแคบเป็นแถบ)
	14. n-Hexane-MeOH-diethylamine (10:0.025:0.125)	0.23 (วงมีลักษณะกลมแคบ) 0.48 (วงกลม)
	15. n-Hexane-MeOH-diethylamine (10:0.025:0.2)	0.76 (วงมีลักษณะกลมแคบ)
	16. Toluene-hexane-diethylamine (10:2:0.2)	0.10 (วงมีลักษณะกลมแคบ)
	17. Toluene-hexane-diethylamine (8:2:0.35)	0.72 (วงมีลักษณะกลม)
	18. Toluene-hexane-diethylamine (9:1:0.3)	0.47 (วงมีลักษณะกลม)
HPTLC Si 60 F ₂₅₄	1. Toluene-MeOH-diethylamine (10:0.25:50 µL)	0.68 (วงกลมออกรียาว)
TLC Al ₂ O ₃	1. Toluene-diethylamine (10:0.25)	1.0
	2. n-Hexane-diethylamine (10:0.25)	1.0

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



ก. วัสดุภาควัสดุที่ แผ่น TLC ชนิด silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 10 x 10 cm
วัสดุภาควัสดุที่ toluene-hexane-diethylamine (9:1:0.3)

รูปที่ 3.1 แผ่นที่แอลซีแสดงสารไซบูทรามินที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 µg/spot โดยการจุดเป็นวง (Track 1-7; Track 8: ไซบูทรามินที่ความเข้มข้น 10 µg/spot โดยการจุดเป็นแถบ) ก. ส่องแผ่นได้แสง UV ที่ 254 nm ข. จุ่มลงในสารละลาย Dragendorff ค. จุ่มลงในสารละลาย Dragendorff และตามด้วยการส่องแผ่นได้แสง UV ที่ 254 nm

ตารางที่ 3.2 วิธีการต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจพบไซบูทรามินบนแผ่นที่แอลซี

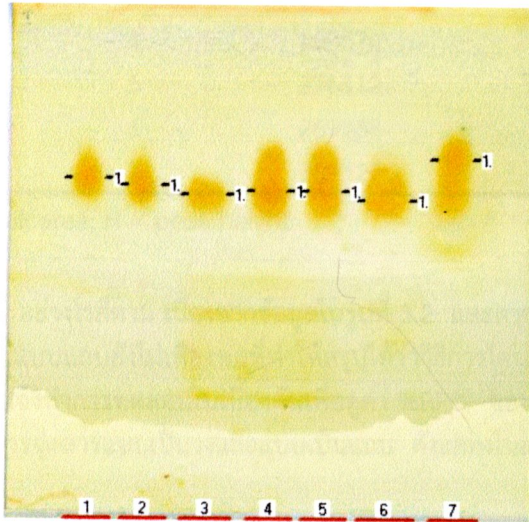
วิธีการ	ผลการทดลอง
1. ส่องได้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 nm	จุดทึบแสงจาง ๆ บนพื้นหลังเขียว LOD (ด้วยตา) ~ 1000-2000 ng
2. ส่องได้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 nm	ไม่พบจุดใดปรากฏ
3. จุ่มแผ่นลงในสารละลาย Dragendorff	จุดสีส้มบนพื้นสีนวล LOD (ด้วยตา) ~ 500-1000 ng
4. จุ่มแผ่นลงในสารละลาย Dragendorff และตามด้วยการส่องได้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 nm	จุดทึบแสงบนพื้นหลังเขียว LOD (ด้วยตา) ~ 500-1000 ng

3.1.2 วิธีการจุดสาร วิธีการตรวจวัดและการเก็บข้อมูลภาพ

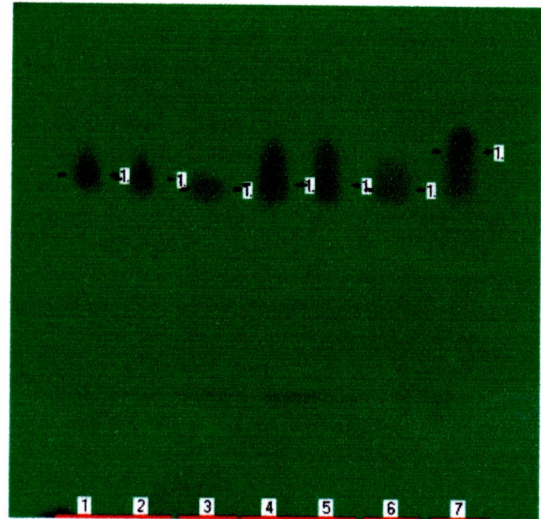
จากผลการศึกษาเบื้องต้น ดังแสดงในรูปที่ 3.2 พบว่าการใช้เข็มขนาด 2 µL ในการจุดสารเป็นวง (spot) (track 1 และ 2) หรือเป็นแถบ (band) (track 3) ให้ลักษณะเป็นวงหรือแถบแคบไม่เป็นทางลากยาวมากเท่ากับการจุดสารด้วยเข็มขนาด 5 µL (track 4-7) และในเบื้องต้นเมื่อทำการวิเคราะห์ขนาดของสารแต่ละแถวด้วยโปรแกรม Sorbfil TLC Videodensitometer ซึ่งมีความไวค่อนข้างสูงในการวิเคราะห์จุดสารและมีความง่ายและสะดวกในการใช้งาน สามารถทำการวัดได้ทั้งค่าความสูงและพื้นที่ใต้กราฟของสารในแต่ละแถวได้ พบว่าพื้นที่ของจุดสารด้วยการใช้เข็มขนาด 2 และ 5 µL มีค่าต่างกันประมาณเท่าตัว ในขณะที่ค่าความสูงของพิกของสารที่จุดขนาด 5 µL มีค่ามากกว่าจุดขนาด 2 µL ไม่มากนัก ดังนั้น เนื่องจากการจุดสารด้วยเข็มขนาด 2 µL ให้ลักษณะวงของสารที่วิเคราะห์ได้ดีกว่า ในการศึกษาขั้นต่อไปจึงเลือกจุดสารด้วยการใช้เข็มขนาด 2 µL (ตารางที่ 3.3)

ที่ปริมาณสารเท่ากัน เมื่อพิจารณาวิธีการตรวจวัดสารพบว่าการใช้ Dragendorff และการสแกนเก็บข้อมูลภาพเพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ พบว่าค่าพื้นที่ที่วัดได้มีค่าสูงกว่าการถ่ายภาพได้แสงอัลตราไวโอเล็ต แสดงว่าวิธีมี

ความไวสูงกว่าในการตรวจวัด (ตารางที่ 3.3) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบความยากง่ายในเบื้องต้น พบว่าการถ่ายภาพได้แสงอัลตราไวโอเลตค่อนข้างยุ่งยากกว่า เนื่องจากระดับการคุณภาพของกล้อง การจับภาพและยังต้องใช้อุปกรณ์เครื่องส่องแสงอัลตราไวโอเลต ในขณะที่การจุ่มแผ่นลงในสารละลาย Dragendorff และการสแกนภาพ เก็บพบว่าขั้นตอนง่ายกว่าและให้ข้อมูลภาพที่มีคุณภาพดี ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจึงเลือกใช้วิธีการตรวจพบสาร และเก็บข้อมูลภาพโดยใช้ Dragendorff และการสแกน



ก.



ข.

วัสดุภาควงที่ แผ่น TLC ชนิด silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 10 x 10 cm
 วัสดุภาควงที่ toluene-hexane-diethylamine (9:1:0.3)

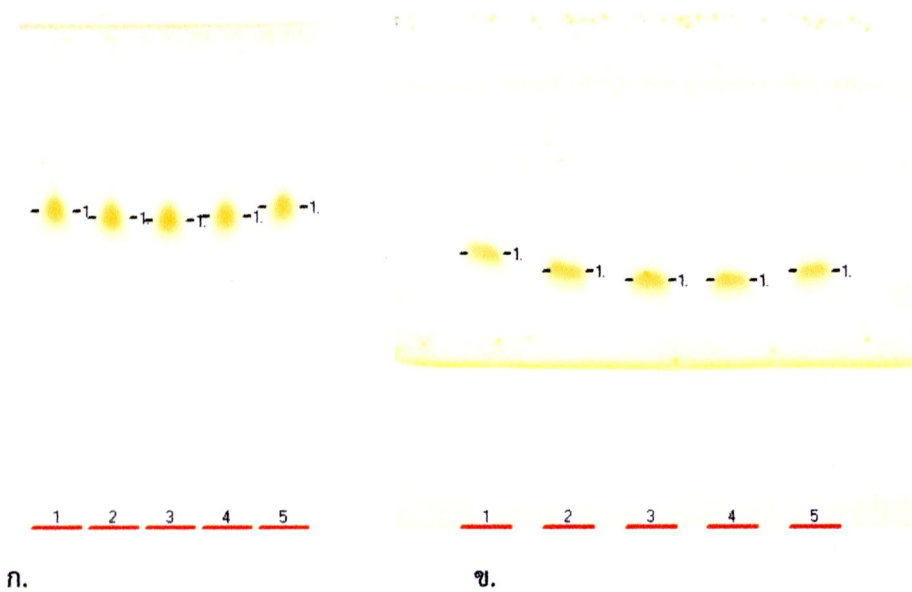
รูปที่ 3.2 แผ่นที่แอลซีที่ได้จากการจุดสารเป็นวงและเป็นแถบ (Track 1-6: standard SH 5 mg/mL; Track 1: Spot 2 μ L; Track 2: Spot 2 μ L; Track 3: Apply as a band (0.5 cm width) 2 μ L; Track 4: Spot 5 μ L; Track 5: Spot 5 μ L; Track 6: Apply as a band (0.5 cm width) 5 μ L; Track 7: Reduce[®] 5 mg/mL Spot 5 μ L) ก. แผ่นที่พัฒนาเสร็จแล้วจุ่มลงใน Dragendorff solution ข. แผ่นที่พัฒนาเสร็จแล้วจุ่มลงใน Dragendorff solution และตามด้วยการส่องแผ่นได้แสง UV ที่ 254 nm

ตารางที่ 3.3 ขนาดพื้นที่และความสูงของสารในแต่ละแถวบนแผ่นที่แอลซีในรูปที่ 3.2

Track Number		Dragendorff + scan		Dragendorff + UV 254	
		A	H	A	H
2	1	156658	4791	135397	3191
	2	157748	4712	132209	4245
	3	161659	6283	125943	4208
5	4	300676	6174	232198	3882
	5	276412	5385	238371	3601
	6	269188	7060	212790	3825
	7	309327	5187	279613	441

A = peak area; H = peak height

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากข้อมูลในรูปที่ 3.2 และตารางที่ 3.3 เกี่ยวกับวิธีการจุดสารว่าควรจุดเป็นแบบวงหรือเป็นแบบแถบยังไม่เพียงพอที่ทำให้สรุปได้ว่าวิธีการใดน่าจะให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีกว่ากัน ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจึงทำการทดสอบในเบื้องต้นเพื่อดูค่า %RPD ของค่าความสูงและค่าพื้นที่ของสารที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธีการจุดสารแบบเป็นวงและแบบเป็นแถบ ดังแสดงในตารางที่ 3.4



วัสดุภาควงที่ แผ่น TLC ชนิด silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 10 x 10 cm วัสดุภาคเคลื่อนที่ toluene-hexane-diethylamine (9:1:0.3)

รูปที่ 3.3 ก. แผ่นที่แอลซีแสดงสารมาตรฐาน SH โดยการจุดเป็นวง และ ข. การจุดเป็นแถบ (Track 1-5: standard SH 2 mg/mL ที่ 2 μ L/spot)

ตารางที่ 3.4 ขนาดพื้นที่และความสูงของสารในแต่ละแถบบนแผ่นที่แอลซีในรูปที่ 3.3

Track Number	SPOT		BAND	
	A	H	A	H
1	60428	3115	48821	3191
2	65771	3398	64210	4245
3	67460	3550	64090	4208
4	61543	3193	56903	3882
5	57961	2948	54258	3601
AVE	62633	3241	57656	3825
STD	3906	237	6605	441
%RPD	6.24	7.30	11.46	11.53



A = peak area; H = peak height

อย่างไรก็ตามลักษณะของแผ่นที่พัฒนาได้ยังไม่ดีเท่าที่ควร แนวของสารที่ปรากฏออกเป็นแนวโค้งยิ้ม (smiley) (รูปที่ 3.3) ค่า %RPD ที่ได้ยังจัดว่าค่อนข้างสูง (ตารางที่ 3.4) ทั้งนี้อาจเนื่องจากแท่งค์ที่ใส่ไว้ภาวเคลื่อนที่ยังไม่อึดตัวดีก่อนการใช้งาน ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปเพื่อการพัฒนาและประเมินวิธีวิเคราะห์ จึงได้ทำการทดสอบโดยใส่กระดาษกรอง (saturation pad) ภายในแท่งค์เพื่อช่วยให้แท่งค์อึดตัวได้เร็วขึ้น

จากผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าเมื่อใช้แท่งค์ที่มีการอึดตัวดี แผ่นที่พัฒนาเสร็จแล้วปรากฏเป็นแนวโค้งลดลง ดังแสดงในรูปที่ 3.4 โดยภาพรวม พบว่าค่า %RPD ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธีการจุดสารแบบเป็นแถบมีค่าดีกว่าการจุดสารแบบเป็นวง (ตารางที่ 3.5) นอกจากนี้รูปร่างพิกที่ได้จากการจุดสารเป็นแถบมีลักษณะเป็นหางลากยาวน้อยกว่าการจุดสารเป็นวง (รูปที่ 3.4 ล่าง) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกวิธีการจุดสารแบบเป็นแถบ

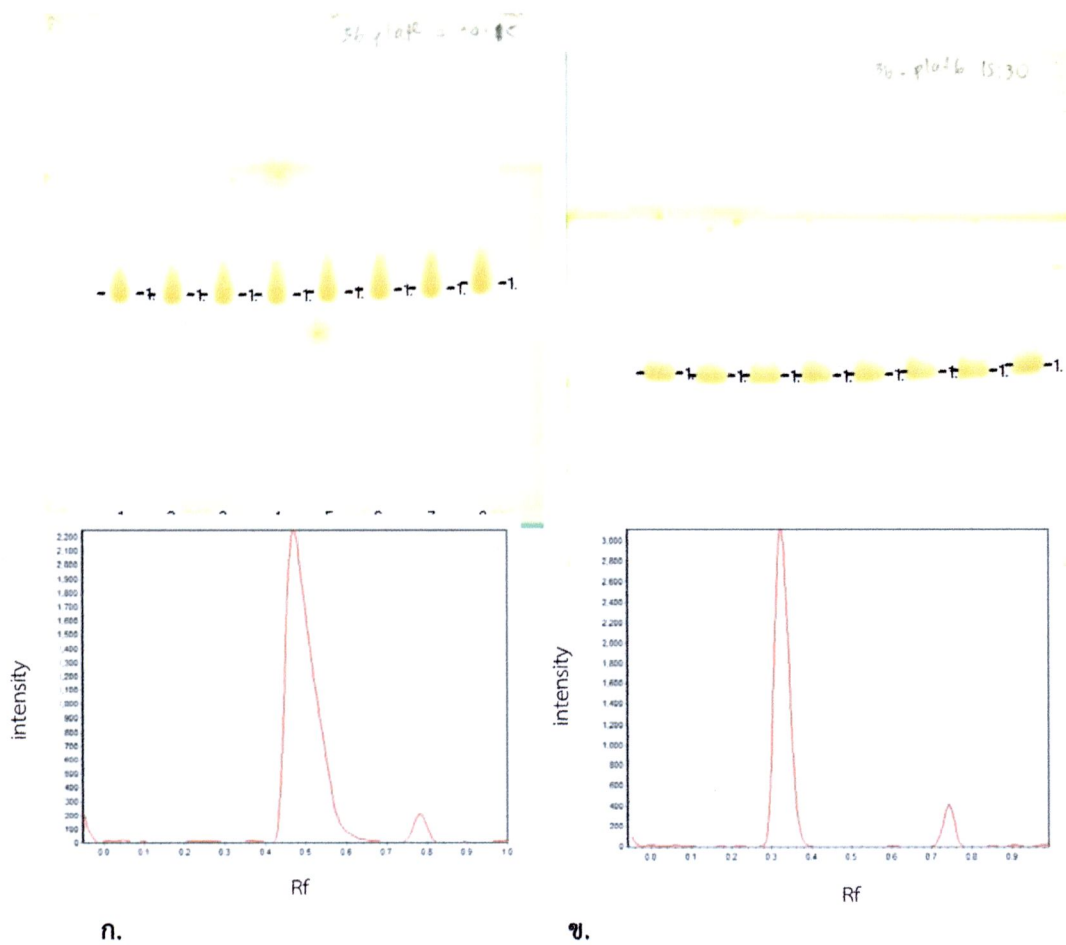
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ห้องสมุดงานวิจัย

วันที่ 22 พ.ย. 2565

เลขทะเบียน 190766

เลขเรียกหนังสือ



วัสดุภาควงที่ แผ่น TLC ชนิด silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 10 x 10 cm วัสดุภาควงที่ toluene-hexane-diethylamine (9:1:0.3)

รูปที่ 3.4 ก. แผ่นที่แอลซีแสดงสารมาตรฐาน SH โดยการจุดเป็นวง และ ข. การจุดเป็นแถบ (Track 1-8: standard SH 2 mg/mL ที่ 2 μ L/spot) โดยที่พีคที่ได้จากการจุดสารเป็นแถบมีลักษณะแคบเป็นทางลากยาวน้อยกว่าการจุดสารเป็นวง

ตารางที่ 3.5 ขนาดพื้นที่และความสูงของสารในแต่ละแถบบนแผ่นที่แอลซีในรูปที่ 3.4

Track Number	SPOT		BAND	
	A	H	A	H
1	46350	2283	39950	3114
2	48921	2301	39944	3126
3	51473	2257	39378	2985
4	49691	2125	39365	2884
5	53260	2199	38382	2815
6	53549	2250	38494	2833
7	56913	2333	39417	2976
8	55959	2357	42349	3035
AVE	52015	2263	39660	2971
STD	3602	75	1231	119
%RPD	6.92	3.30	3.10	4.02

A = peak area; H = peak height

3.1.3 ผลการศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้น

ผลการศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1 µg/spot เนื่องจากที่ความเข้มข้นนี้เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถเก็บข้อมูลภาพของสารได้โดยการสแกน จากผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่ากราฟระหว่างพื้นที่และความเข้มข้นให้ค่าความสัมพันธ์ที่ดีกว่ากราฟระหว่างค่าความสูงและความเข้มข้น (ตารางที่ 3.6) โดยกราฟระหว่างพื้นที่และความเข้มข้นในช่วงความเข้มข้น 1-6 µg/spot ให้ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นทั้งแบบโพลีโนเมียลดีที่สุด (ค่า $R^2 = 0.9985$)

ดังนั้นในการศึกษาเพื่อประเมินความถูกต้องของวิธีจึงเลือกใช้ช่วงความเข้มข้น 1-6 µg/spot ในการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นแบบโพลีโนเมียลระหว่างพื้นที่และความเข้มข้น เพื่อใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์เชิงภาพด้วยโปรแกรม Sorbfil TLC Videodensitometer และเปรียบเทียบกับผลการประเมินที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยการใช้เครื่องเดนสิโตมิเตอร์โดยการวัดในโหมดแอบซอร์เบ้นซ์ (absorbance mode) ที่ความยาวคลื่น 225 nm เนื่องจากเป็นความยาวคลื่นที่พบว่าสารมีการดูดกลืนแสงสูงสุด

ตารางที่ 3.6 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างขนาดของจุดสาร (พื้นที่ หรือ ความสูง) กับความเข้มข้น

Analytical technique	Concentration (µg/spot)		Linear regression (y = ax + b)			
			a	b	R ²	
TLC-image analysis	1-5	A and C	34441	-20384	0.9973	
		H and C	1441.2	162.2	0.9799	
	1-6	A and C	34684	-20951	0.9984	
		H and C	1356.7	359.33	0.9819	
	2-6	A and C	35037	-22594	0.9975	
		H and C	1209.1	1048.2	0.9942	
Polynomial regression (y = ax ² + bx + c)						
			a	b	c	R ²
TLC-image analysis	1-5	A and C	311.93	32570	-18200	0.9974
		H and C	-100	2041.2	-537.8	0.9865
	1-6	A and C	269.02	32801	-18440	0.9985
		H and C	-90.304	1988.8	-483.5	0.9912
	2-6	A and C	130.5	33992	20767	0.9975
		H and C	5.2143	1167.4	1121.2	0.9942

A = peak area; H = peak height

3.1.4 วิธีวิเคราะห์ไซบูทรามินด้วยวิธีที่แอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและเดนสิโตเมตรี

จากผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวข้างต้น สามารถสรุปรายละเอียดของวิธีการวิเคราะห์สารไซบูทรามินด้วยวิธีที่แอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและเดนสิโตเมตรี ได้ดังนี้

วิธีการเตรียมสาร

สารมาตรฐาน	สารมาตรฐานไซบูทรามิน ไฮโดรคลอไรด์ (SH)
ตัวทำละลาย	MeOH
สารละลายมาตรฐาน	0.5 mg/mL
สารตัวอย่าง	ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในรูปขี้ กาแฟ แคปซูลและอื่น ๆ
วิธีการเตรียมสารละลายตัวอย่าง	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารขนาดสำหรับรับประทาน

ต่อครั้ง ใส่ลงฟลาสค์และเติม MeOH จำนวน 20 mL ตามด้วยการโซนิเคต (sonicate) เป็นเวลา 15 นาที สารละลายส่วนใสนำมาใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วยทีแอลซี ยกเว้นสารตัวอย่าง S10 และ S19ให้นำสารละลายที่เตรียมได้จากข้างต้นมาเจือจางเท่าตัวด้วย MeOH ก่อนนำไปวิเคราะห์

วิธภาคคงที่

แผ่น TLC ชนิดพลาสติกเคลือบด้วย silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Germany) ขนาด 10 x 10 cm หรือ 10 x 20 cm

วิธภาคเคลื่อนที่

Toluene-hexane-diethylamine, 9:1:0.3

วิธีการจุดสารตัวอย่าง

จุดด้วยมือโดยใช้เข็มขนาด 2 µL (Drummond scientific, USA) ปริมาณ 2-12 µL จุดเป็นแถบขนาด 0.5 cm แต่ละแถบห่างกัน 1 cm ห่างจากขอบล่าง 1.2 cm และขอบข้างอย่างน้อย 1.5 cm โดยใช้เครื่อง Nanomat 4 (Camag, Switzerland) ช่วยในการจุดสารละลายตัวอย่าง

วิธีการพัฒนา

จุ่มแผ่นที่จุดสารแล้วลงในแทงค์ขนาด 10 x 20 cm ที่มีวิธภาคเคลื่อนที่ Toluene-hexane-diethylamine (9:1:0.3) ในสัดส่วน 36:4:1.2 ไว้ในแทงค์แล้วประมาณ 30 นาที โดยมีการใส่กระดาษกรองในแทงค์เพื่อช่วยในการอ้อมตัวปิดฝาให้สนิทในระหว่างการพัฒนาแผ่น

ระยะทางในการพัฒนาแผ่นห่างจากจุดสารเริ่มต้น 7.0 cm แผ่นที่พัฒนาเสร็จทิ้งให้แห้งประมาณ 10 นาทีภายใต้ตู้ดูดควัน

วิธีการวิเคราะห์โดยเทคนิคเชิงภาพ

จุ่มแผ่นที่พัฒนาเสร็จแล้วลงในสารละลาย Dragendorff โดยการใช้เครื่องจุ่มแผ่นรุ่น Immersion device (Camag, Switzerland) ด้วยความเร็ว 1 mm/sec และทิ้งไว้เป็นเวลา 6 วินาที เมื่อนำแผ่นขึ้นมาแล้วให้วางแผ่นภายใต้ตู้ดูดควันเป็นเวลา 5 นาที จุ่มซ้ำเพื่อให้สีเห็นชัดขึ้น ทิ้งไว้ 15 นาที ภายใต้ตู้ดูดควัน ก่อนนำไปสแกนเก็บข้อมูลภาพ

วิธีการเก็บข้อมูลภาพ

สแกนแผ่นที่แอลซีที่ต้องการเก็บข้อมูลภาพด้วยเครื่องสแกนรุ่น SCAN Jet 3500C (Hewlett Packard) ในรูป JPEG file ที่ความละเอียด (resolution) 200

วิธีการประเมินผล

ข้อมูลภาพขนาด 10 x 10 cm หรือ 10 x 20 cm ที่ค่าความละเอียด (resolution) 40 pixels/cm นำมาประเมินผลโดยใช้โปรแกรม Sorbfil TLC Videodensitometer โดยตั้งค่าพารามิเตอร์ของขนาดแต่ละแถวเพื่อใช้สำหรับการประเมินผลโดยใช้ default settings

วิธีการวิเคราะห์โดยเดนสิโตเมตรี

นำแผ่นที่พัฒนาเสร็จแล้วไปตรวจวัดโดยการสแกนด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ CAMAG TLC scanner II with CAMAG CATS 3.1 software ที่ absorbance mode ความยาวคลื่น 225 nm

3.2 ผลการประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

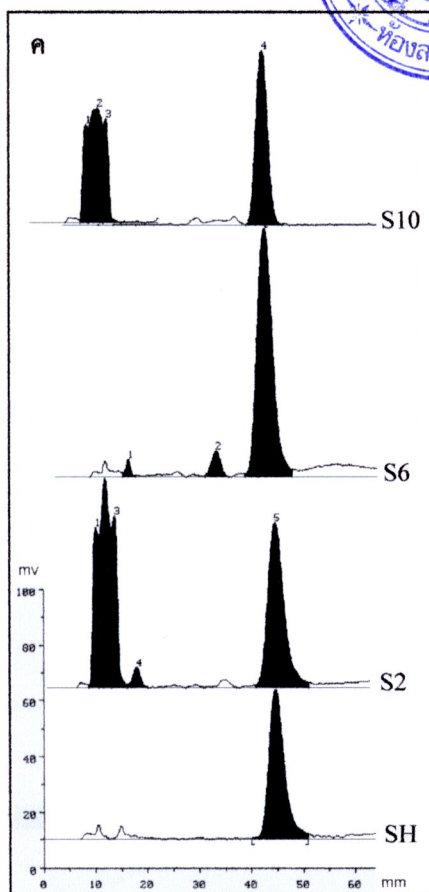
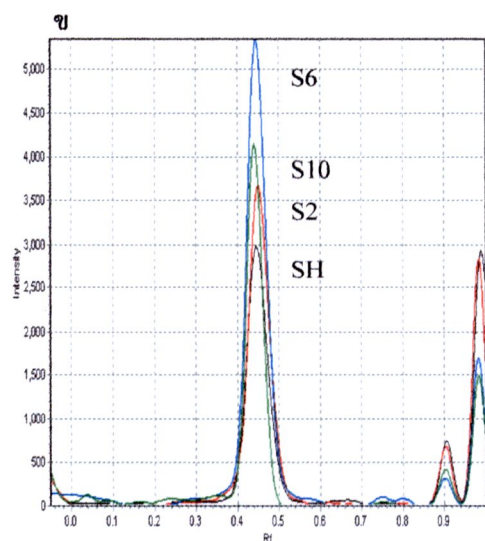
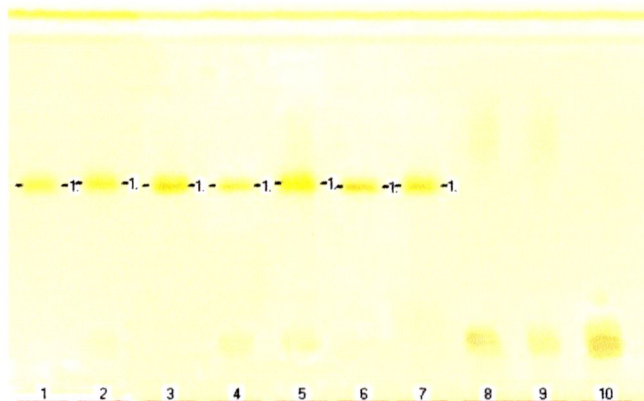
3.2.1 ความจำเพาะเจาะจง (selectivity)

จากการศึกษาพบว่า วิธีที่แอลซีที่ได้รับการพัฒนาขึ้นโดยใช้แผ่นชนิด silica gel 60 F₂₅₄ เป็นวัฏภาคคงที่ และ toluene-hexane-diethylamine (9:1:0.3) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ มีความจำเพาะเจาะจงในการแยกสารไซบูทรามิน ค่า R_f ของสารไซบูทรามินในสารตัวอย่างมีค่าเท่ากับสารมาตรฐาน (R_f = 0.46 ± 0.02) โดยปรากฏเป็นแถบที่บดแสงค่อนข้างจางภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร แต่สามารถเห็นเป็นแถบสีส้มได้ชัดเจนขึ้นเมื่อตรวจสอบด้วยสารละลาย Dragendorff และแยกออกจากสารอื่น ๆ ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดต่าง ๆ ได้ (รูปที่ 3.5 ก) รวมทั้งยังปรากฏที่ค่า R_f ต่างจากสารสังเคราะห์อื่น ๆ ที่เคยมีรายงานการใช้เพื่อควบคุมน้ำหนัก (รูปที่ 3.6)

สารไซบูทรามินซึ่งจัดเป็นสารในกลุ่มเอมีนแบบตติยภูมิ ปรากฏเป็นจุดสีส้มชัดเจน ในขณะที่สารสังเคราะห์ชนิดอื่นจัดอยู่ในกลุ่มเอมีนแบบปฐมภูมิ (primary amine) หรือทุติยภูมิ (secondary amines) ซึ่งมักปรากฏสีส้มค่อนข้างจางหรืออาจไม่สามารถตรวจสอบได้โดยการใช้สารละลาย Dragendorff

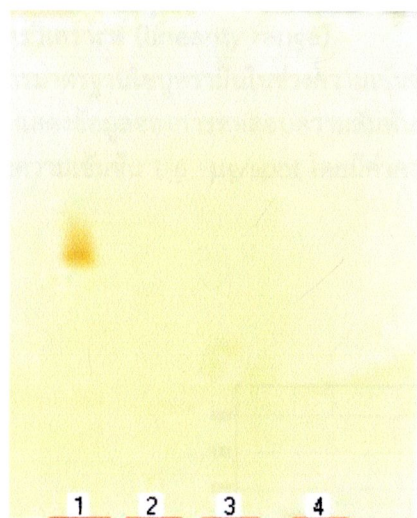
นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์เปรียบเทียบค่า R_f และสเปกตรัมของไซบูทรามินในสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน พบว่ามีค่า R_f เท่ากัน (รูปที่ 3.5 ค) สเปกตรัมของสารตัวอย่างมีลักษณะเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน (รูปที่ 3.7) ค่า peak purity ของไซบูทรามินในสารตัวอย่างมีค่าเท่ากับ $r(S, M) = 0.9993$ และ $r(M, E) = 0.9999$ เมื่อเปรียบเทียบสเปกตรัมที่ตำแหน่งต่าง ๆ ได้แก่ ที่ตำแหน่งเริ่มของพีค (peak start, S) ตำแหน่งยอดของพีค (peak apex, M) และที่ตำแหน่งจบของพีค (peak end, E) ของสาร (รูปที่ 3.7)

ก



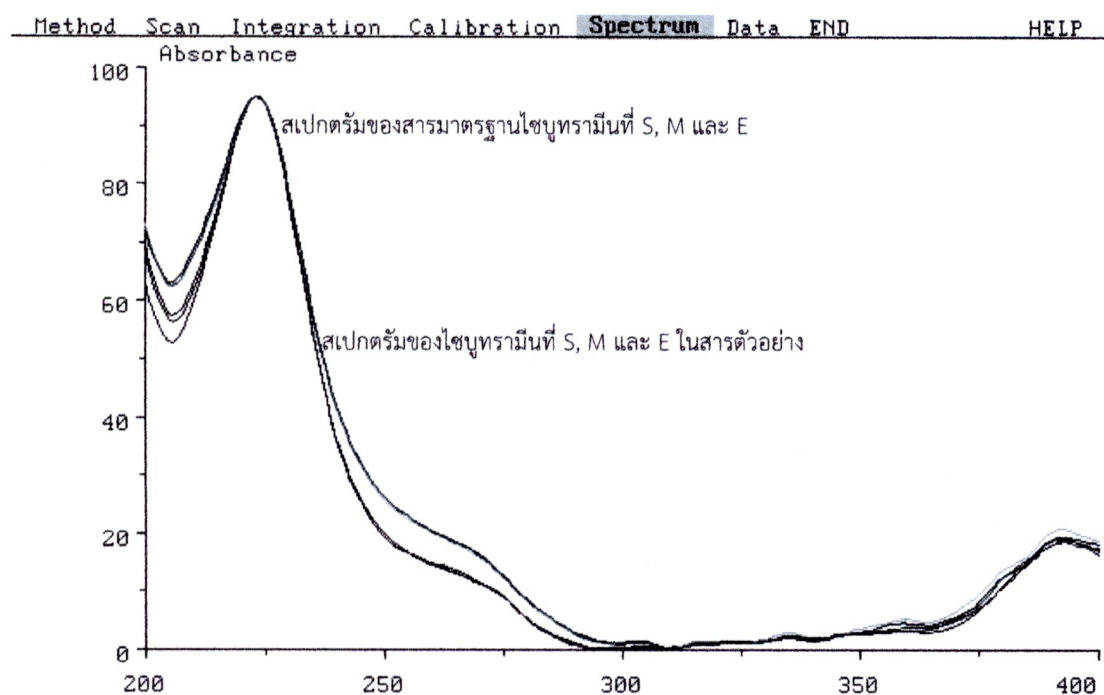
วัสดุภาควงที่ แผ่น TLC ชนิด silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 10 x 20 cm วัสดุภาควงที่ toluene-hexane-diethylamine (9:1:0.3)

รูปที่ 3.5 รูปที่แอลซีแสดงการแยกสารไซบูทรามิน (track 1) ด้วยวิธีที่ได้รับการพัฒนา ก. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ชนิดที่มีไซบูทรามินปลอมปน (tracks 2-7: S2, S6, S7, S9, S10 and S19) และ ตัวอย่างชนิดแคปซูลที่ไม่มีไซบูทรามิน (tracks 8-10: S14, S15 and S16) ข.และ ค. ที่แอลซีโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานไซบูทรามิน (SH) กาแฟ (S2), อาหารเสริมแบบเม็ดเจล (S6) และแบบแคปซูล (S10) ที่ได้รับการจากวิเคราะห์โดยวิธีที่แอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและเดนสิโตเมตรี ตามลำดับ



วิฤภาคคงที่ แผ่น TLC ชนิด silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 10 x 10 cm วิฤภาคเคลื่อนที่ toluene-hexane-diethylamine (9:1:0.3)

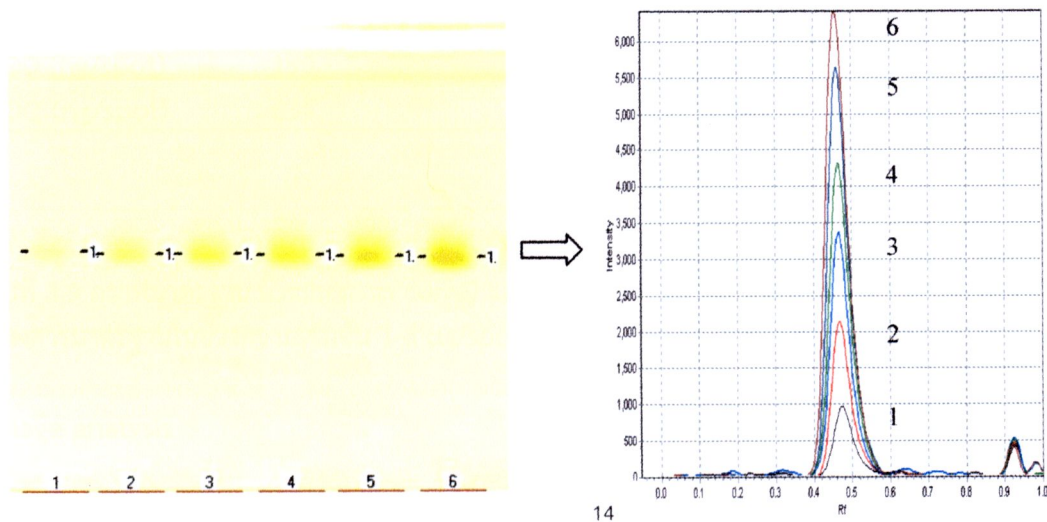
รูปที่ 3.6 รูปที่แอลซีของสารมาตรฐานไซบูทรามิน (track 1) สารสังเคราะห์เฟนเทอร์มิน (track 2) เฟนฟูรามิน (track 3) และเมธแอมเฟตามีน (track 4) ที่ 10 µg/spot



รูปที่ 3.7 สเปกตรัมของสารไซบูทรามินในสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดสโตมิเตอร์

3.2.2 ความสัมพันธ์เชิงเส้นและช่วงการวิเคราะห์ (linearity range)

รูปที่ 3.8 แสดงรูปที่แอลซีของสารมาตรฐานไซบูทรามินในช่วงความเข้มข้น 1-6 (1, 2, 3, 4, 5 และ 6) $\mu\text{g}/\text{spot}$ ตารางที่ 3.7 และรูปที่ 3.9 แสดงข้อมูลของการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างพื้นที่กับปริมาณ (ความเข้มข้น) ของสารมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 1-6 $\mu\text{g}/\text{spot}$ โดยมีค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นทั้งแบบโพสิโนเมียลที่ดี (ค่า $R^2 = 0.9985$)



วัสดุคองที่ แผ่น TLC ชนิด silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 10 x 10 cm วัสดุเคลื่อนที่ toluene-hexane-diethylamine (9:1:0.3)

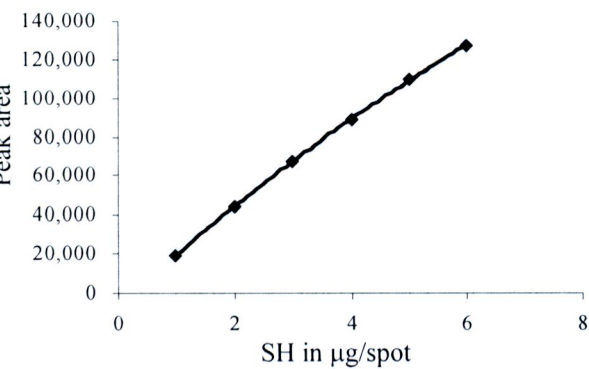
รูปที่ 3.8 สารมาตรฐานไซบูทรามินในช่วงความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 $\mu\text{g}/\text{spot}$ และที่แอลซีโครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิคเชิงภาพ

ตารางที่ 3.7 ข้อมูลความสัมพันธ์เชิงเส้นแบบพหุนาม (Y = AX² + BX + C) (Y = พื้นที่พิก, X = µg/spot) ที่ช่วงความเข้มข้น 1-6 µg/spot โดยการวิเคราะห์เชิงภาพด้วยโปรแกรม Sorbfil TLC Videodensitometer และเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ (n = 6)

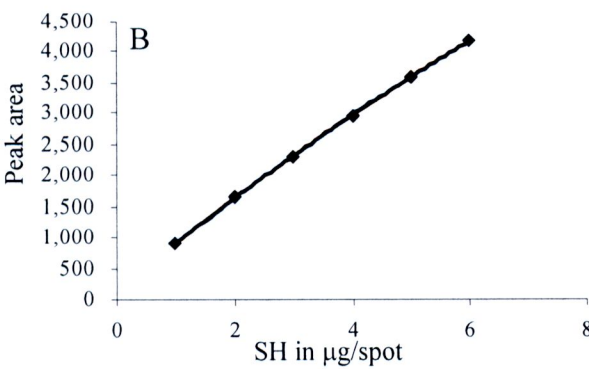
	TLC Image analysis	Densitometric analysis
A	-814.3 ± 975.8	-17.5 ± 8.3
B	27265.2 ± 3912.4	774.3 ± 139.3
C	-6994.8 ± 2852.3	149.5 ± 39.1
R ²	0.9987 ± 0.0008	0.9994 ± 0.0003
LOD (ng/spot)	190	103
LOQ (ng/spot)	634	344

รูปที่ 3.9 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างพื้นที่กับปริมาณ (ความเข้มข้น) ของสารมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 1-6 µg/spot

Image analysis



Densitometric analysis



3.2.3 ขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณ (limit of detection และ limit of quantitation)

ค่า LOD และ LOQ ของการวิเคราะห์คำนวณตามวิธีของ Ansari, M.J.¹⁷ ดังแสดงรายละเอียดในหัวข้อ 2.3.3 โดยพบว่า ค่า LOD และ LOQ ของการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องเดนสิโตมิเตอร์ซึ่งคำนวณได้จากเส้นกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ (Y) กับปริมาณ (X) ($Y = 708.33 (\pm 103.95) X + 198.73 (\pm 24.37)$, $R^2 = 0.9994 (\pm 0.0003)$) ได้เท่ากับ 103 และ 344 ng/spot ตามลำดับ และค่า LOD และ LOQ ของการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคเชิงภาพคำนวณจากเส้นกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ (Y) กับปริมาณ (X) ($Y = 23144.67 (\pm 2078.15) X - 3363.55 (\pm 1467.17)$, $R^2 = 0.9978 (\pm 0.0022)$) ได้เท่ากับ 190 และ 634 ng/spot ตามลำดับ (ตารางที่ 3.7)

3.2.4 ความถูกต้อง (accuracy)

ความถูกต้องของวิธีทีแอลซีที่พัฒนาขึ้น อาศัยการศึกษาแบบ recovery studies ตารางที่ 3.8 แสดงค่า % recovery โดยพบว่าค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีทีแอลซีแอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิโตเมตริอยู่ระหว่างร้อยละ 96.86 ถึง 106.57 และ ร้อยละ 95.95 ถึง 106.92 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.8 Recovery studies

SH amount added (ng/spot)	TLC-image analysis		TLC-densitometry	
	Recovery	Average	Recovery	Average
	(%)	recovery (%)	(%)	recovery (%)
1000	106.57 ± 1.99		106.92 ± 1.73	
2000	96.86 ± 1.78	101.05 ± 4.54	95.95 ± 1.13	100.34 ± 5.16
3000	99.71 ± 0.88		98.14 ± 1.02	

3.2.5 ความแม่นยำ (precision)

การทดสอบความแม่นยำของวิธีทีแอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิโตเมตริ ทำโดยการศึกษา repeatability (intra-day precision) และ intermediate precision (inter-day precision) โดยพบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ที่ได้มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 2 ดังแสดงในตารางที่ 3.9

3.2.6 ความทนทาน (robustness)

ความทนทาน (robustness) ของวิธีทำการศึกษาโดยการปรับเปลี่ยนสภาวะ ได้แก่ การปรับเปลี่ยนสัดส่วนขององค์ประกอบในวัฏภาคเคลื่อนที่ การปรับเปลี่ยนระยะเวลาระหว่างเวลาที่จุดสารกับเวลาที่เริ่มพัฒนาแผ่น และระหว่างเวลาที่พัฒนาแผ่นเสร็จกับเวลาที่บันทึกข้อมูลภาพหรือการสแกนภาพ

จากการศึกษาพบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของพื้นที่ที่วัดได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีทีแอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิโตเมตริ จากสภาวะต่างๆ ที่มีการปรับเปลี่ยนมีค่าน้อยกว่าร้อยละ 2 ดังแสดงในตารางที่ 3.10

ตารางที่ 3.9 Repeatability (Intra-day precision) และ Intermediate (Inter-day) precision (n = 3)

Image analysis (Sorbfil TLC Videodensitometer)				
	SH (µg/spot)	Amount detected (µg/spot)	%RSD	Accuracy (%)
Repeatability	2	2.03 ± 0.03	1.59	101.33
Day-1	3	2.96 ± 0.03	1.08	98.78
	4	3.97 ± 0.07	1.82	99.33
Repeatability	2	1.98 ± 0.02	1.01	99.00
Day-2	4	3.01 ± 0.02	0.51	100.44
	6	4.00 ± 0.02	0.52	100.08
Intermediate precision	2	2.00 ± 0.04	1.75	100.17
	4	2.99 ± 0.04	1.19	99.61
	6	3.99 ± 0.05	1.26	99.71
Densitometric analysis				
	SH (µg/spot)	Amount detected (µg/spot)	%RSD	Accuracy (%)
Repeatability	2	1.96 ± 0.03	1.28	98.17
Day-1	3	2.97 ± 0.02	0.51	98.99
	4	3.89 ± 0.06	1.51	97.13
Repeatability	2	1.98 ± 0.01	0.58	99.00
Day-2	3	2.95 ± 0.01	0.34	98.17
	4	3.92 ± 0.02	0.44	98.00
Intermediate precision	2	1.97 ± 0.02	1.05	98.67
	3	2.96 ± 0.01	0.50	98.61
	4	3.91 ± 0.04	1.04	97.71

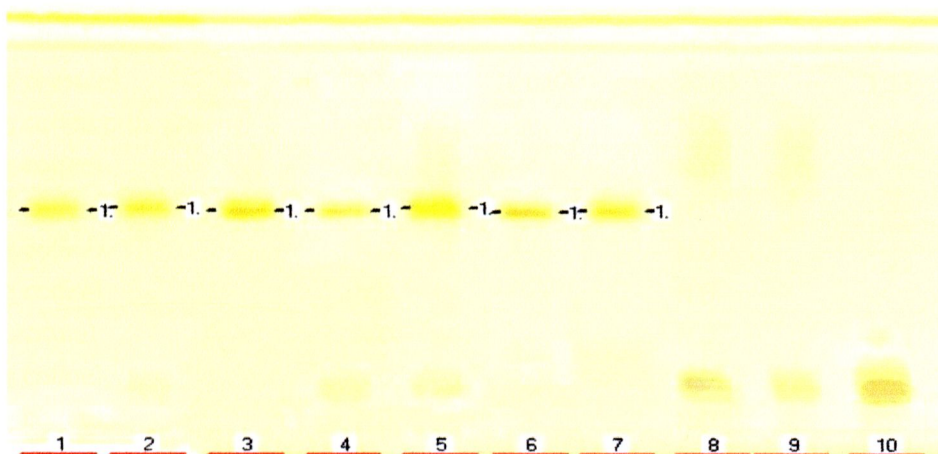
ตารางที่ 3.10 Robustness studies

Parameter	TLC-image analysis	TLC-densitometry
	RSD	RSD
Mobile phase composition		
toluene- <i>n</i> -hexane-diethylamine (9:1:0.3, v/v/v)	1.54	1.23
toluene- <i>n</i> -hexane-diethylamine (9.1:0.9:0.3, v/v/v)	1.13	0.23
toluene- <i>n</i> -hexane-diethylamine (8.9:1.1:0.3, v/v/v)	0.14	0.44
Time from spotting to chromatography (+15 min)	1.75	1.16
Time from chromatography to image capturing or densitometric scanning (+15 min)	1.90	1.61

3.3 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

วิธีที่แอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิโตเมตรีนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจและวิเคราะห์หาปริมาณสารไซบูทรามินในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่อ้างว่ามีส่วนผสมเฉพาะสารจากธรรมชาติ จำนวน 20 ตัวอย่าง จากผลการวิเคราะห์พบการปนเปื้อนของสารไซบูทรามินในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหารจำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ S2, S6, S7, S9, S10 และ S19 ซึ่งพบจุดสีส้มของสารไซบูทรามินปรากฏชัดเจนในตัวอย่างที่มีการปนปลอม (รูปที่ 3.9)

ตารางที่ 3.11 แสดงปริมาณของสารไซบูทรามินในตัวอย่างที่มีการปนปลอมโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่แอลซีที่ได้รับการพัฒนาขึ้น โดยจากผลการทดสอบทางสถิติแบบจับคู่ (Paired *t*-test) พบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณไซบูทรามินที่วิเคราะห์ได้โดยวิธีที่แอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิโตเมตรี ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 3.12)



รูปที่ 3.10 ที่แอลซีของสารมาตรฐาน SH (track 1) และ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ชนิดที่มีไซบูทรามินปลอมปน (tracks 2-7: S2, S6, S7, S9, S10 and S19) และ ตัวอย่างที่ไม่มีไซบูทรามิน (tracks 8-10: S14, S15 and S16)

ตารางที่ 3.11 ปริมาณสารไซบูทรามิน (mg/unit) ในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมชนิดต่าง ๆ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่แอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิโตเมตรี

Samples (characteristics)	TLC-image analysis		TLC-densitometry	
	SH amount (mg/unit)	% RSD	SH amount (mg/unit)	% RSD
S1 (dietary supplement (cachet))	N.D.	-	N.D.	-
S2 (slimming coffee)	11.85	3.03	12.27	2.65
S3 (slimming coffee)	N.D.	-	N.D.	-
S4 (slimming coffee)	N.D.	-	N.D.	-
S5 (slimming capsule)	N.D.	-	N.D.	-
S6 (slimming gel)	16.64	1.09	17.07	2.18
S7 (slimming coffee plus green tea)	6.75	0.68	6.82	3.05
S8 (dietary capsule)	N.D.	-	N.D.	-
S9 (slimming coffee)	16.36	1.49	16.36	0.28
S10 (slimming capsule)	19.98	0.87	20.63	1.13
S11 (slimming coffee plus ginseng)	N.D.	-	N.D.	-
S12 (slimming coffee)	N.D.	-	N.D.	-
S13 (slimming coffee)	N.D.	-	N.D.	-
S14 (slimming coffee)	N.D.	-	N.D.	-
S15 (slimming coffee)	N.D.	-	N.D.	-
S16 (dietary capsule)	N.D.	-	N.D.	-
S17 (slimming coffee)	N.D.	-	N.D.	-
S18 (slimming coffee)	N.D.	-	N.D.	-
S19 (slimming capsule)	23.57	1.18	24.16	0.52
S20 (slimming drink)	N.D.	-	N.D.	-

N.D. = not detected

ตารางที่ 3.12 ผลการทดสอบทางสถิติแบบจับคู่ (Paired t-test) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณสารไซบูทรามินในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจำนวน 6 ตัวอย่าง (S2, S6, S7, S9, S10 และ S19) ที่วิเคราะห์ได้โดยวิธีที่แอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิโตเมตรี

t-Test: Paired Two Sample for Means		
	SH amount analyzed by TLC-Image analysis	SH amount analyzed by TLC-densitometric analysis
Mean	15.85833333	16.21833333
Variance	35.26981667	37.43925667
Observations	6	6
Pearson Correlation	0.999456941	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	5	
t Stat	-3.289992926	
P(T<=t) one-tail	0.010856844	
t Critical one-tail	2.015048372	
P(T<=t) two-tail	0.021713689	
t Critical two-tail	2.570581835	