



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีตรวจและวิเคราะห์หาปริมาณยาลดความอ้วนไซบูทรามินปลอมปน
ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (ทีแอลซี)

โดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์เชิงภาพ

Development of Detection and Quantification of Adulterated
Anorectic Sibutramine in Dietary Supplements by
TLC-Image Analysis Method

คณะผู้วิจัย

1. ปนัดดา พัฒนาคิน
2. อุทัย โสธนะพันธุ์
3. ทศมาพร สุขวัฒนาสินธิ์ และ
4. จริญญา แซ่แพ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีตรวจและวิเคราะห์หาปริมาณยาลดความอ้วนไซบูทรามินปลอมปน
ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (ทีแอลซี)

โดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์เชิงภาพ

Development of Detection and Quantification of Adulterated
Anorectic Sibutramine in Dietary Supplements by
TLC-Image Analysis Method

คณะผู้วิจัย



1. ปณัฏดา พัฒนาคิน
2. อุทัย โสธนะพันธ์
3. ทศมาพร สุขวัฒนาสินธิ์ และ
4. จริยา แซ่แพ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง

การพัฒนาวิธีตรวจและวิเคราะห์หาปริมาณยาลดความอ้วนไซบูทรามินปลอมปนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (ทีแอลซี) โดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์เชิงภาพ

Development of Detection and Quantification of Adulterated Anorectic
Sibutramine in Dietary Supplements by TLC-Image Analysis Method

คณะผู้วิจัย

1. ปนัดดา พัฒนาศิน
2. อุทัย ไสธนะพันธุ์
3. ทสมพร สุขวัฒนาสินธุ์ และ
4. จริยา แซ่แพ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการวิจัย เรื่อง การพัฒนาวิธีตรวจและวิเคราะห์หาปริมาณยาลดความอ้วนไซบูทรามินปลอมปนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (ทีแอลซี) โดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์เชิงภาพ
Development of Detection and Quantification of Adulterated Anorectic Sibutramine in Dietary Supplements by TLC-Image Analysis Method

190766

บทคัดย่อ วิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (ทีแอลซี) โดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพได้รับการพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจหาและวิเคราะห์ปริมาณไซบูทรามินไฮโดรคลอไรด์ (sibutramine hydrochloride (SH)) ที่ปลอมปนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้อย่างง่ายและรวดเร็ว โดยใช้แผ่นทีแอลซีชนิด silica gel 60 F₂₅₄ TLC plate เป็นวัฏภาคคงที่ และ toluene-*n*-hexane-diethylamine (9:1:0.3, v/v/v) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และใช้สารละลาย Dragendorff ในการตรวจพบสาร แผ่นทีแอลซีที่พัฒนาเสร็จแล้วนำมาทำการวิเคราะห์เชิงภาพเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ SH จากการศึกษพบว่าข้อมูลของการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นมีความสัมพันธ์เป็นแบบ polynomial regression ที่ดีในช่วงความเข้มข้น 1-6 ไมโครกรัมต่อจุด ชีตจำกัดการตรวจวัดและชีตจำกัดการวิเคราะห์หาปริมาณมีค่าเท่ากับ 190 และ 634 นาโนกรัมต่อจุด วิธีที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมีความถูกต้อง แม่นยำ ทนทาน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาสาร SH ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและผลิตภัณฑ์สมุนไพร และทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณเฉลี่ยของสาร SH ในตัวอย่างที่มีการปลอมปนด้วยวิธีทีแอลซีโดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพกับวิธีทีแอลซีเดนสิโตเมตรี

190766

Abstract A simple thin layer chromatographic (TLC)-image analysis method was developed for rapid detection and quantitation of sibutramine hydrochloride (SH) adulterated in dietary supplements. Chromatographic separation of SH was achieved on a silica gel 60 F₂₅₄ TLC plate, using toluene-*n*-hexane-diethylamine (9:1:0.3, v/v/v) as the mobile phase and Dragendorff reagent as a spot detection. Image analysis of the scanned TLC plate was performed to quantify the amount of SH. The polynomial regression data for the calibration plots showed good linear relationship in the concentration range of 1-6 µg/spot. The limits of detection and quantitation were 190 and 634 ng/spot, respectively. The method gave satisfactory precision, accuracy, robustness and was applied for determination of SH in dietary supplements and herbal products. The mean contents of SH in adulterated samples determined by the TLC-image analysis and TLC-densitometry were also compared.

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยจำนวนเงิน 50,000 บาท (ห้าหมื่นบาทถ้วน) พร้อมทั้งขอขอบพระคุณ ภญ.สลักจิต ชุติพงษ์วิเวท ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 ชลบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์สารมาตรฐานไซบูทรามินเพื่อใช้ในการศึกษา และขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำปฏิบัติการให้เป็นไปโดยความสะดวก

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
1.3 ขอบเขตของการศึกษา	2
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	3
2.1 สารเคมีและวัสดุ เครื่องมือและอุปกรณ์	3
2.1.1 สารเคมีและวัสดุ	3
2.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	3
2.2 การศึกษาเบื้องต้นเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ไซบูทรามินเชิงปริมาณด้วยทีแอลซี	3
2.2.1 ภูมิภาคคงที่และภูมิภาคเคลื่อนที่	3
2.2.2 วิธีการจุดสาร วิธีการตรวจวัดและการเก็บข้อมูลภาพ	4
2.2.3 การศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้น	4
2.2.4 วิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธีทีแอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและเดนสิโตเมตรี	5
2.3 การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	5
2.3.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity)	5
2.3.2 การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นและช่วงการวิเคราะห์ (linearity range)	5
2.3.3 การทดสอบขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณ (limit of detection และ limit of quantitation)	6
2.3.4 การทดสอบความถูกต้อง (accuracy)	6
2.3.5 การทดสอบความแม่นยำ (precision)	6
2.3.6 การศึกษาความทนทาน (robustness)	7
2.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธีทีแอลซีที่ได้รับการพัฒนา	7
2.4.1 การเก็บตัวอย่างและการเตรียมสารละลายตัวอย่าง	7
2.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไซบูทรามินในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีการปนเปื้อน	7
2.4.3 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธีทีแอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิโตเมตรี	7
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและวิจารณ์ผล	8
3.1 ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ไซบูทรามินด้วยวิธีทีแอลซี	8
3.1.1 ชนิดของภูมิภาคคงที่และภูมิภาคเคลื่อนที่	8
3.1.2 วิธีการจุดสาร วิธีการตรวจวัดและการเก็บข้อมูลภาพ	10
3.1.3 ผลการศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้น	15
3.1.4 วิธีวิเคราะห์ไซบูทรามินด้วยวิธีทีแอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและเดนสิโตเมตรี	16
3.2 ผลการประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	18
3.2.1 ความจำเพาะเจาะจง (selectivity)	18
3.2.2 ความสัมพันธ์เชิงเส้นและช่วงการวิเคราะห์ (linearity range)	21
3.2.3 ขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณ (limit of detection และ limit of	22

quantitation)	
3.2.4 ความถูกต้อง (accuracy)	23
3.2.5 ความแม่นยำ (precision)	23
3.2.6 ความทนทาน (robustness)	23
3.3 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร	25
บทที่ 4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	28
บทที่ 5 เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	
ก. out put จากโครงการวิจัย	32
ข. ภาคผนวก I และ II	37
ค. ประวัตินักวิจัย (ทีมวิจัย)	40

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ชนิดของภูมิภาคคงที่และภูมิภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ในการศึกษาเบื้องต้น	4
ตารางที่ 3.1 ค่า R_f และลักษณะจุดไซบูทรามินโดยใช้ภูมิภาคคงที่และภูมิภาคเคลื่อนที่ชนิดต่าง ๆ	9
ตารางที่ 3.2 วิธีการต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจพบไซบูทรามินบนแผ่นที่แอลซี	10
ตารางที่ 3.3 ขนาดพื้นที่และความสูงของสารในแต่ละแถวบนแผ่นที่แอลซีในรูปที่ 3.2	12
ตารางที่ 3.4 ขนาดพื้นที่และความสูงของสารในแต่ละแถวบนแผ่นที่แอลซีในรูปที่ 3.3	13
ตารางที่ 3.5 ขนาดพื้นที่และความสูงของสารในแต่ละแถวบนแผ่นที่แอลซีในรูปที่ 3.4	15
ตารางที่ 3.6 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างขนาดของจุดสาร (พื้นที่ หรือ ความสูง) กับความเข้มข้น	16
ตารางที่ 3.7 ข้อมูลความสัมพันธ์เชิงเส้นแบบโพลีโนเมียล	22
ตารางที่ 3.8 Recovery studies	23
ตารางที่ 3.9 Repeatability (Intra-day precision) และ Intermediate (Inter-day) precision	24
ตารางที่ 3.10 Robustness studies	24
ตารางที่ 3.11 ปริมาณสารไซบูทรามิน (mg/unit) ในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมชนิดต่าง ๆ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่แอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิโตเมตรี	26
ตารางที่ 3.12 ผลการทดสอบทางสถิติแบบจับคู่ (Paired t-test) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณไซบูทรามินในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจำนวน 6 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ได้โดยวิธีที่แอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิโตเมตรี	27

	หน้า
รูปที่ 3.1 แผ่นทีแอลซีแสดงสารไซบูทรามีนที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{g}/\text{spot}$ โดยการจุดเป็นวง	10
รูปที่ 3.2 แผ่นทีแอลซีที่ได้จากการจุดสารเป็นวงและเป็นแถบ	11
รูปที่ 3.3 ก. แผ่นทีแอลซีแสดงสารมาตรฐาน SH โดยการจุดเป็นวง และ ข. การจุดเป็นแถบ (Track 1-5: standard SH 2 mg/mL ที่ 2 $\mu\text{L}/\text{spot}$)	12
รูปที่ 3.4 ก. แผ่นทีแอลซีแสดงสารมาตรฐาน SH โดยการจุดเป็นวง และ ข. การจุดเป็นแถบ (Track 1-8: standard SH 2 mg/mL ที่ 2 $\mu\text{L}/\text{spot}$)	14
รูปที่ 3.5 รูปทีแอลซีแสดงการแยกสารไซบูทรามีนด้วยวิธีที่ได้รับการพัฒนา	19
รูปที่ 3.6 รูปทีแอลซีของสารมาตรฐานไซบูทรามีน สารสังเคราะห์เฟนเทอร์มิน เฟนฟูรามีนและเมธแอมเฟตามีนที่ 10 $\mu\text{g}/\text{spot}$	20
รูปที่ 3.7 สเปกตรัมของสารไซบูทรามีนในสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์	20
รูปที่ 3.8 สารมาตรฐานไซบูทรามีนในช่วงความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 $\mu\text{g}/\text{spot}$ และทีแอลซีโครมาโทแกรมที่ได้การจากวิเคราะห์โดยเทคนิคเชิงภาพ	21
รูปที่ 3.9 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างพื้นที่กับปริมาณ (ความเข้มข้น) ของสารมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 1-6 $\mu\text{g}/\text{spot}$	22
รูปที่ 3.10 ทีแอลซีของสารมาตรฐาน SH และตัวอย่างผลิตภัณฑ์ชนิดที่มีไซบูทรามีนปลอมปนและที่ไม่มีไซบูทรามีน	25
รูปที่ 4.1 การวิเคราะห์เชิงภาพของแผ่นทีแอลซีโดย Sorbfil TLC Videodensitometer software	28