รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการวิจัย เรื่อง การพัฒนาวิธีตรวจและวิเคราะห์หาปริมาณยาลดความอ้วนไซบูทรามีนปลอมปนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (ทีแอลซี) โดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์เชิงภาพ

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

บทคัดย่อ วิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (ทีแอลซี) โดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพได้รับการพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจหาและวิเคราะห์ปริมาณไซบูทรามีนไฮโดรคลอไรด์ (sibutramine hydrochloride (SH)) ที่ปลอมปนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้อย่างง่ายและรวดเร็ว โดยใช้แผ่นทีแอลซีชนิด silica gel 60 F_{254} TLC plate เป็นวัฏภาคคงที่ และ toluene-*n*-hexane-diethylamine (9:1:0.3, *v/v/v*) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และใช้สารละลาย Dragendorff ในการตรวจพบสาร แผ่นทีแอลซีที่พัฒนาเสร็จแล้วนำมาทำการวิเคราะห์เชิงภาพเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ SH จากการศึกษาพบว่าข้อมูลของการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นมีความสัมพันธ์เป็นแบบ polynomial regression ที่ดีในช่วงความเข้มข้น 1-6 ไมโครกรัมต่อจุด ขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการวิเคราะห์หาปริมาณมีค่าเท่ากับ 190 และ 634 นาโนกรัมต่อจุด วิธีที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมีความถูกต้อง แม่นยำ ทนทาน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาสาร SH ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและผลิตภัณฑ์สมุนไพร และทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณเฉลี่ยของสาร SH ในตัวอย่างที่มีการปลอมปนด้วยวิธีทีแอลซีโดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพกับวิธีทีแอลซีเดนสิโตเมตรี

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 F_{254} 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.

กิตติกรรมประกาศ

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

สารบัญ

	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 การศึกษาเบื้องต้นเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ไซบูทรามีนเชิงปริมาณด้วยทีแอลซี	3
2.2.1 วัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่	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 การวิเคราะห์หาปริมาณไซบูทรามีนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีการปนเปื้อน	7
2.4.3 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธีทีแอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิโตเมตรี	7
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและวิจารณ์ผล	8
3.1 ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ไซบูทรามีนด้วยวิธีทีแอลซี	8
3.1.1 ชนิดของวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่	8
3.1.2 วิธีการจุดสาร วิธีการตรวจวัดและการเก็บข้อมูลภาพ	10
3.1.3 ผลการศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้น	15
3.1.4 วิธีวิเคราะห์ไซบูทรามีนด้วยวิธีทีแอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและเดนสิโตเมตรี	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

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ชนิดของวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ในการศึกษาเบื้องต้น 4

ตารางที่ 3.1 ค่า R_f และลักษณะจุดไซบูทรามีนโดยการใช้วัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดต่าง ๆ 9

ตารางที่ 3.2 วิธีการต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจพบไซบูทรามีนบนแผ่นทีแอลซี 10

ตารางที่ 3.3 ขนาดพื้นที่และความสูงของสารในแต่ละแถวบนแผ่นทีแอลซีในรูปที่ 3.2 12

ตารางที่ 3.4 ขนาดพื้นที่และความสูงของสารในแต่ละแถวบนแผ่นทีแอลซีในรูปที่ 3.3 13

ตารางที่ 3.5 ขนาดพื้นที่และความสูงของสารในแต่ละแถวบนแผ่นทีแอลซีในรูปที่ 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 ปริมาณสารไซบูทรามีน (mg/unit) ในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมชนิดต่าง ๆ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีทีแอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิโตเมตรี 26

ตารางที่ 3.12 ผลการทดสอบทางสถิติแบบจับคู่ (Paired *t*-test) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณไซบูทรามีนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจำนวน 6 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ได้โดยวิธีทีแอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิโตเมตรี 27

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 3.1 แผ่นทีแอลซีแสดงสารไซบูทรามีนที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 μg/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 μL/spot) 12

รูปที่ 3.4 ก. แผ่นทีแอลซีแสดงสารมาตรฐาน SH โดยการจุดเป็นวง และ ข. การจุดเป็นแถบ (Track 1-8: standard SH 2 mg/mL ที่ 2 μL/spot) 14

รูปที่ 3.5 รูปทีแอลซีแสดงการแยกสารไซบูทรามีนด้วยวิธีที่ได้รับการพัฒนา 19

รูปที่ 3.6 รูปทีแอลซีของสารมาตรฐานไซบูทรามีน สารสังเคราะห์เฟนเทอร์มีน เฟนฟูรามีนและเมธแอมเฟทามีนที่ 10 μg/spot 20

รูปที่ 3.7 สเปกตรัมของสารไซบูทรามีนในสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ 20

รูปที่ 3.8 สารมาตรฐานไซบูทรามีนในช่วงความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 μg/spot และทีแอลซีโครมาโทแกรมที่ได้การจากวิเคราะห์โดยเทคนิคเชิงภาพ 21

รูปที่ 3.9 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างพื้นที่กับปริมาณ (ความเข้มข้น) ของสารมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 1-6 μg/spot 22

รูปที่ 3.10 ทีแอลซีของสารมาตรฐาน SH และตัวอย่างผลิตภัณฑ์ชนิดที่มีไซบูทรามีนปลอมปนและที่ไม่มีไซบูทรามีน 25

รูปที่ 4.1 การวิเคราะห์เชิงภาพของแผ่นทีแอลซีโดย Sorbfil TLC Videodensitometer software 28