

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเป็นที่นิยมและได้รับการยอมรับเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน โดยมีการนำมาใช้ในรูปแบบต่าง ๆ ทั้งในลักษณะการใช้เป็นเครื่องดื่มชาชง ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ การใช้เป็นเครื่องสำอางนวดและอบตัวด้วยสมุนไพร ไปจนถึงการใช้เพื่อประโยชน์ทางยา การที่ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง อาจเป็นผลมาจากพื้นฐานความเชื่อที่ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติมีความปลอดภัย รวมทั้งกระแสความสนใจในการแพทย์ทางเลือกและความวิตกจากการใช้ยาแผนปัจจุบันซึ่งมักเป็นสารเคมีสังเคราะห์ประเภทต่าง ๆ การใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารซึ่งมาจากธรรมชาติจึงอาจช่วยลดความเสี่ยงอันตรายจากการใช้สารเคมีและผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้¹⁻²

จากกระแสความนิยมดังกล่าว จึงทำให้ตลาดผลิตภัณฑ์สมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจัดเป็นตลาดที่มีมูลค่าและการแข่งขันสูง³ ผู้ผลิตบางรายจึงมีการลักลอบปนปลอมยาแผนปัจจุบันลงในผลิตภัณฑ์ ทำให้มีประสิทธิภาพเป็นไปตามสรรพคุณได้ดีขึ้น และสามารถช่วยเพิ่มยอดขายการจำหน่าย ที่ผ่านมามีรายงานตรวจพบการปลอมปนยาแผนปัจจุบันกลุ่มต่าง ๆ ลงในผลิตภัณฑ์สมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ เช่น ยาต้านการอักเสบ ยาลดความอ้วน ยาต้านภาวะหย่อนสมรรถภาพทางเพศ และยาออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท เป็นต้น⁴⁻⁶ โดยในประเทศไทย การปนปลอมยาที่มีรายงานพบมากที่สุดคือ การปนปลอมสารสเตียรอยด์ ในยาแผนโบราณ⁷⁻⁸ นอกจากนี้ในช่วงปีที่ผ่านมา ยังมีการตรวจพบการลักลอบใส่ยาลดความอ้วนไซบูทรามิน (sibutramine) ลงในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อการควบคุมน้ำหนัก⁹ การปนปลอมยาแผนปัจจุบันลงในผลิตภัณฑ์สมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารทำให้ผู้บริโภคได้รับยาโดยไม่ทราบข้อมูลและไม่ได้อยู่ในการดูแลของแพทย์ ซึ่งทำให้เกิดผลข้างเคียงต่าง ๆ และอาจมีอันตรายรุนแรงถึงชีวิต ขึ้นกับชนิดของยา ปริมาณยาที่ได้รับ และสุขภาพของผู้บริโภค

การตรวจวิเคราะห์หายาปลอมปนในผลิตภัณฑ์สมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจึงมีความสำคัญเพื่อให้แน่ใจว่าผู้บริโภคได้รับผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและปราศจากการปนปลอม ในประเทศไทย ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เป็นหน่วยงานหลักในการดำเนินงานสำรวจยาแผนปัจจุบันปนปลอมในผลิตภัณฑ์สมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพรวมไปถึงยาแผนโบราณ โดยวิธีวิเคราะห์ที่มีรายงานการใช้ ได้แก่ วิธีที่แอลซี สำหรับนำมาใช้ในการตรวจหาการปนปลอมของยาแผนปัจจุบัน ได้แก่ เดกซาเมทาโซน (dexamethasone) เพรดนิโซโลน (prednisolone) ไดอะซีแพม (diazepam) ฟินิลบูตาโซน (phenylbutazone) และ คลอเฟนิรามีน (chlorpheniramine)¹⁰ นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงต่อคู่กับการวิเคราะห์ชนิดมวลโมเลกุลของสาร (LC-MS/MS) ในการตรวจวิเคราะห์การปนปลอมยาแผนปัจจุบันกลุ่มต่าง ๆ ได้ทั้งชนิดและปริมาณ⁸ สำหรับวิธีที่มีรายงานการนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์หาไซบูทรามินในผลิตภัณฑ์สมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ได้แก่ วิธีที่แอลซี¹¹ วิธี HPLC^{11,12} และวิธี LC-MS/MS⁸

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าวิธี HPLC และวิธี LC-MS/MS ที่มีรายงานการนำมาใช้ในการวิเคราะห์ไซบูทรามินในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารมีข้อดีคือความไวสูงและสามารถวิเคราะห์ด้วยได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน และวิธี LC-MS/MS ยังสามารถใช้ได้ดีในกรณีที่สารไม่แยกออกจากกัน⁸ แต่วิธีดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพง มีค่าใช้จ่ายสูงในการบำรุงดูแลรักษา ไม่สามารถจัดหาได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป และยังต้องอาศัยผู้ปฏิบัติที่มีความรู้ความชำนาญ นอกจากนี้แล้ว เนื่องจากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติมักมีองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลาย ซึ่งหากใช้วิธี HPLC หรือวิธี LC-MS/MS ต้องแน่ใจว่ามีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ดีพอเพื่อป้องกันการอุดตันคอลัมน์และรบกวนการวิเคราะห์ ในขณะที่การใช้วิธีที่แอลซี มีข้อได้เปรียบคือ เป็นวิธีที่ไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยาก

การใช้ที่แอลซียังคงเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์การปนปลอมของยาแผนปัจจุบันในผลิตภัณฑ์สมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ เนื่องจากเมื่อมีการใช้สภาวะการวิเคราะห์ที่ได้รับการพัฒนาอย่างเหมาะสมจะสามารถตรวจพบสารกลุ่มต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจน ที่แอลซียังเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากได้ในคราวเดียวกัน ค่าใช้จ่ายและความสิ้นเปลืองของตัวทำละลายที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) มีน้อยกว่าการใช้วิธี HPLC นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้วิธีที่แอลซีในการวิเคราะห์สารเชิงปริมาณ โดยมีรายงานถึงการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์เชิงภาพอย่างง่ายร่วมกับวิธีที่แอลซีในการวิเคราะห์สารเชิงปริมาณและเชิงปริมาณ¹³⁻¹⁶ ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพงในการวิเคราะห์หาปริมาณสารบนแผ่นที่แอลซีเมื่อเทียบกับการใช้วิธีที่แอลซีเดนสิโตเมตรี (TLC-densitometry)

อย่างไรก็ตาม แม้ว่ามียารายงานการใช้วิธีที่แอลซีในการตรวจหาสารไซบูทรามินในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ แต่วิธีที่มีรายงานอยู่นั้นไม่ได้มีการประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ¹¹ รวมทั้งค่า Rf ของไซบูทรามินที่ปรากฏมีค่าเข้าใกล้ 1 ซึ่งช่วงค่า Rf ของสารที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 0.2-0.8 นอกจากนี้ชนิดของที่แอลซีที่ใช้เป็นแบบชนิด HPTLC ซึ่งมีราคาสูงมากเมื่อเทียบกับการใช้แผ่นที่แอลซีแบบทั่วไป

การวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการพัฒนาวิธีการอย่างง่ายในการตรวจวิเคราะห์หาความอ้วนไซบูทรามินในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ เนื่องจากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโดยเฉพาะเพื่อการควบคุมน้ำหนักเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความนิยมสูง แต่กลับมียารายงานการตรวจพบการปนปลอมตัวดังกล่าวในผลิตภัณฑ์เหล่านี้มากขึ้นในปัจจุบัน โดยหากมีการบริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีการปนปลอมยาไซบูทรามินเป็นเวลานานอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ นอกจากนี้ เนื่องจากที่ผ่านมาไม่เคยมียารายงานเกี่ยวกับการใช้วิธีที่แอลซีร่วมกับการใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพในการตรวจและหาปริมาณของยาลดความอ้วนไซบูทรามินในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร วิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่มีรายงานมักต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพง ไม่เหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก ดังนั้น จึงควรที่จะมีการพัฒนาวิเคราะห์ที่มีความง่าย สะดวก ถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้ และใช้อุปกรณ์ที่มีราคาไม่แพงนัก เพื่อให้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบได้อย่างรวดเร็วในเบื้องต้น และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานคุ้มครองผู้บริโภคเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากที่มาจากการสุ่มตรวจ ช่วยลดค่าใช้จ่ายและได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบการปนปลอมยาแผนปัจจุบันในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพที่มีจำหน่ายอยู่ในท้องตลาดในประเทศไทยได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ในการตรวจและวิเคราะห์ปริมาณยาไซบูทรามินด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (ที่แอลซี) โดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพ
2. เพื่อประเมินวิธีวิเคราะห์ที่ได้รับการพัฒนาขึ้น
3. เพื่อนำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์การปนปลอมยาไซบูทรามินในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ (Method development) ในการตรวจและวิเคราะห์ปริมาณยาไซบูทรามินด้วยวิธีที่แอลซีโดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพ
 - 1.1 การพัฒนาสภาวะของวิธีที่แอลซีที่เหมาะสมในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของยาไซบูทรามิน
 - 1.2 การพัฒนาวิธีที่แอลซีเพื่อการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพ
2. การประเมินวิธีวิเคราะห์ที่ได้รับการพัฒนา (Method validation)
3. การประยุกต์ใช้วิธีที่ได้รับการพัฒนาขึ้นในการตรวจวิเคราะห์ยาไซบูทรามินในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 สารเคมีและวัสดุ เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1.1 สารเคมีและวัสดุ

สารมาตรฐานไซบูทรามิน ไฮโดรคลอไรด์ (sibutramine hydrochloride, SH) (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) และสารสังเคราะห์อื่น ๆ ที่เคยมีรายงานการใช้เพื่อควบคุมน้ำหนัก ได้แก่ เฟนเทอร์มิน (phentermine) เฟนฟูรามีน (fenfuramine) และ เมธแอมเฟตามีน (methamphetamine) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 ชลบุรี ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร จำนวน 20 ตัวอย่าง (บริษัทผู้ผลิตต่างกัน) ซื้อจากร้านค้าแผงลอยตามตลาดนัด ทางอินเทอร์เน็ตและร้านขายยา โดยเน้นการซื้อผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีสรรพคุณลดน้ำหนักโดยเฉพาะที่ไม่มีทะเบียนจากสำนักคณะกรรมการอาหารและยา

ตัวทำละลายทุกชนิดที่ใช้เป็น analytical grade เข้มจุดสารละลายใช้เข็มไมโครแคป (microcaps) ขนาด 2 ไมโครลิตร (Drummond Scientific Co.) แผ่นที่แอลซี ได้แก่ 1. แผ่น silica gel 60 F₂₅₄ TLC ชนิดอะลูมิเนียมและพลาสติก (Merck) 2. แผ่น silica gel 60 F₂₅₄ HPTLC ชนิดอะลูมิเนียม (Merck) และ 3. แผ่น Al₂O₃ TLC ชนิดอะลูมิเนียม (Merck)

2.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเลต (CAMAG UV-cabinet II) เครื่องจุดสารละลายตัวอย่างบนแผ่นที่แอลซี Nanomat 4 (Camag) เครื่องจุ่มแผ่นรุ่น Immersion 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) แทงค์บรรจุภาควัภาคเคลื่อนที่ (Camag) กล้องถ่ายภาพดิจิทัลรุ่น 960 IXY (Cannon) และ เครื่องสแกนเนอร์รุ่น SCAN Jet 3500C (Hewlett Packard) และ โปรแกรม Sorbfil TLC Videodensitometer (Sorbpolymer)

2.2 การศึกษาเบื้องต้นเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ไซบูทรามินเชิงปริมาณด้วยที่แอลซี

2.2.1 ภูมิภาคคงที่และภูมิภาคเคลื่อนที่

ชนิดของภูมิภาคคงที่ที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ แผ่นที่แอลซีชนิดอะลูมิเนียมและชนิดพลาสติกเคลือบด้วย silica gel 60 F₂₅₄ แผ่น HPTLC ชนิดอะลูมิเนียมเคลือบด้วย silica gel 60 F₂₅₄ และ แผ่นที่แอลซีชนิดอะลูมิเนียมเคลือบด้วย Al₂O₃ ภูมิภาคเคลื่อนที่ชนิดต่าง 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 μ L) 8. Toluene-MeOH-diethylamine (10 mL:0.25 mL:50 μ L) 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 μ L)
TLC Al ₂ O 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 μ L

2.2.2 วิธีการจุดสาร วิธีการตรวจวัดและการเก็บข้อมูลภาพ

ในการศึกษาเบื้องต้น วิธีการจุดสารทำการทดสอบโดยการใส่จุดสารเป็นวง (spot) หรือแถบ (band) ด้วยเข็มขนาด 2 และ 5 μ L สำหรับวิธีการตรวจวัดสารในการศึกษาเบื้องต้นทำการทดสอบโดยการดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 nm และการสเปรย์หรือจุ่มด้วยสารละลาย Dragendorff การเก็บข้อมูลภาพทำการศึกษาโดยการถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 nm และการสแกนเก็บข้อมูล

2.2.3 การศึกษาเพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้น

สารละลายของสารมาตรฐาน SH เตรียมที่ความเข้มข้น 0.5 mg/mL ในเมทานอล จาก stock solution ที่ความเข้มข้น 5 mg/mL นำมาจุดสารจำนวน 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 μ L โดยใช้เข็มไมโครแคปขนาด 2 μ L ลงบนแผ่นที่แอลซีชนิดพลาสติกเคลือบด้วย silica gel 60 F₂₅₄ โดยจุดเป็นแถบขนาด 0.5 cm แต่ละแถบห่างกัน 1 cm ห่างจากขอบล่าง 1.2 cm และขอบข้างอย่างน้อย 1.5 cm โดยการใช้เครื่อง Nanomat 4 ช่วยในการจุดสารละลายตัวอย่าง จากนั้นจึงนำแผ่นที่จุดสารแล้วใส่ลงในแท่งขนาด 10 x 20 cm ที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ toluene-hexane-diethylamine (9:1:0.3) ปริมาณ 41.2 mL โดยมีระยะทางในการพัฒนาแผ่นเท่ากับ 7.0 cm แผ่นที่พัฒนาเสร็จแล้วนำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยเทคนิคเชิงภาพและการใช้เครื่องเดนสิโตมิเตอร์ต่อไป

2.2.4 วิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธีที่แอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและเดนสิโตเมตรี

วิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธีที่แอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพ ทำโดยการเก็บข้อมูลภาพที่แอลซีที่พัฒนาเสร็จแล้วและจุ่มลงในสารละลาย Dragendorff โดยการใช้เครื่องจุ่มแผ่นรุ่น Immersion device (Camag) ด้วยความเร็ว 1 mm/sec และทิ้งไว้เป็นเวลา 6 วินาที เมื่อนำแผ่นขึ้นมาแล้วให้วางแผ่นภายใต้ตู้ดูดควันเป็นเวลา 5 นาที จุ่มซ้ำเพื่อให้สีเห็นชัดเจน ทิ้งไว้ 15 นาที ภายใต้ตู้ดูดควันก่อนนำไปสแกนเก็บข้อมูลภาพโดยการสแกนด้วยเครื่องสแกนเนอร์ 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 เพื่อตรวจวัดหาพื้นที่ของสารไซบูทรามินบนแผ่นที่แอลซี

สำหรับวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ ทำได้โดยนำแผ่นที่แอลซีที่พัฒนาเสร็จแล้วไปตรวจวัดโดยการสแกนด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ CAMAG TLC scanner II with CAMAG CATS 3.1 software ที่ absorbance mode ความยาวคลื่น 225 nm วัดพื้นที่ของแต่ละฟีกเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณต่อไป

2.3 การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

2.3.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีที่แอลซีที่ได้รับการพัฒนาขึ้น ทำโดยการวิเคราะห์สารมาตรฐานและสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารควบคู่กันไป บันทึกข้อมูลภาพโครมาโทแกรมที่ได้ เปรียบเทียบค่า Rf ของไซบูทรามินในสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่า Rf ของสารมาตรฐาน SH กับสารสังเคราะห์อื่น ๆ ที่เคยมีรายงานการใช้เพื่อควบคุมน้ำหนัก ได้แก่ เฟนเทอร์มิน เฟนฟูรามีน และ เมธแอมเฟตามีน โดยใช้วัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นดังแสดงในข้อ 2.2.3 (แผ่นที่แอลซีชนิดพลาสติกเคลือบด้วย silica gel 60 F₂₅₄ และ toluene-hexane-diethylamine (9:1:0.3) ตามลำดับ) และวิธีการตรวจวัดดังแสดงในข้อ 2.2.4

การทดสอบ peak purity ของสารทำโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ เปรียบเทียบค่า Rf และสเปกตรัมของไซบูทรามินในสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานที่สามตำแหน่ง ได้แก่ ที่ตำแหน่งเริ่มของฟีก (peak start, S) ตำแหน่งยอดของฟีก (peak apex, M) และที่ตำแหน่งจบของฟีก (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 ด้วยเข็มไมโครแคปขนาด 2 µL บนแผ่นที่แอลซี และทำการวิเคราะห์โดยใช้สภาวะดังแสดงในข้อ 2.2.3 และ 2.2.4 นำแผ่นที่พัฒนาเสร็จแล้วไปวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยการใช้เครื่องเดนสิโตมิเตอร์และเทคนิคเชิงภาพ เพื่อวัดพื้นที่ของฟีก SH ที่แต่ละความเข้มข้น แล้วนำมาทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น โดยสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่กับปริมาณ (µg/spot) ของสารมาตรฐาน คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, R²) 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 ($Y = mX + C$, $Y =$ พื้นที่ใต้พีค, $X = \mu\text{g/spot}$, $m =$ ค่าความชันของกราฟ (slope) และ $C =$ จุดตัดของกราฟที่แกน Y (Y-intercept)) ระหว่างพื้นที่กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 $\mu\text{g/spot}$ โดยค่า LOD และ LOQ ของวิธีการวิเคราะห์สามารถคำนวณได้จากสูตร $\text{LOD} = (3 \times \text{SD})/m$ และ $\text{LOQ} = (3 \times \text{SD})/m$ 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 $\mu\text{g/spot}$ เมื่อทำการจุดสารละลายที่จำนวน 6 μL)

วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างเทียบกับสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐานดังข้างต้น โดยจุดสารละลายจำนวนอย่างละ 6 μL สลับกับสารละลายมาตรฐาน SH ที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 $\mu\text{g/spot}$ 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)

$$\% \text{ recovery} = [(B - A)/C] \times 100$$

$B =$ ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ในสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐาน ($\mu\text{g/spot}$)

$A =$ ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ในสารละลายตัวอย่าง ($\mu\text{g/spot}$)

$C =$ ปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงในสารละลายตัวอย่าง ($\mu\text{g/spot}$)

$$\% \text{ RSD} = (\text{SD} \times 100)/\text{mean}$$

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 $\mu\text{g/spot}$ ด้วยวิธีที่แอลซีตามสภาวะดังข้างต้น และวิเคราะห์หาปริมาณของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นดังกล่าวด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์และเทคนิคเชิงภาพ ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ และให้ทำการวิเคราะห์ซ้ำในวันต่อมาเพื่อหา Intermediate precision (inter-day precision) คำนวณหาค่า % accuracy และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (ในรูปร้อยละ) (percentage relative standard deviation, %RSD) จาก

$$\% \text{ accuracy} = [A/B] \times 100$$

$A =$ ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ในสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น ($\mu\text{g/spot}$)

$B =$ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่นำมาวิเคราะห์ ($\mu\text{g/spot}$)

$$\% \text{ RSD} = (\text{SD} \times 100)/\text{mean}$$

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 ระยะเวลาที่พัฒนาแผ่นเสร็จกับเวลาที่บันทึกข้อมูลภาพหรือการสแกนภาพ (+ 15 นาที) โดยทำการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3 µg/spot โดยการใช้เครื่องเดนสิโตมิเตอร์และเทคนิคเชิงภาพ และวัดพื้นที่ใต้พีคของสารที่ความเข้มข้นดังกล่าว ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำที่แต่ละสภาวะการปรับเปลี่ยน คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (ในรูปร้อยละ) (percentage relative standard deviation, %RSD) ของพื้นที่เพื่อดูความทนทานของวิธี

2.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธีที่แอลซีที่ได้รับการพัฒนา

2.4.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

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

2.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไซบูทรามินในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีการปนเปื้อน

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

2.4.3 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธีที่แอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิโตเมตรี

นำค่าเฉลี่ยของปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้จากวิธีที่แอลซีโดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพกับวิธีที่แอลซีเดนสิโตเมตรี มาทำการเปรียบเทียบ โดยใช้สถิติแบบ paired *t*-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและวิจารณ์ผล

3.1 ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ไซบูทรามินด้วยวิธีที่แอลซี

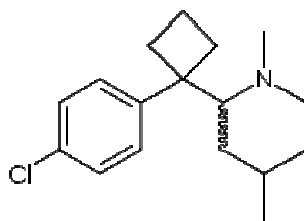
3.1.1 ชนิดของวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่

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 โดยการใช่วัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดต่าง 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 กระจายตัวรบกวนการวิเคราะห์ปรากฏบนแผ่นพลาสติกเมื่อเทียบการใช้แผ่นชนิดอะลูมิเนียม

สำหรับผลการศึกษาเพื่อพัฒนาปรับเปลี่ยนวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดต่าง ๆ พบว่า

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



sibutramine

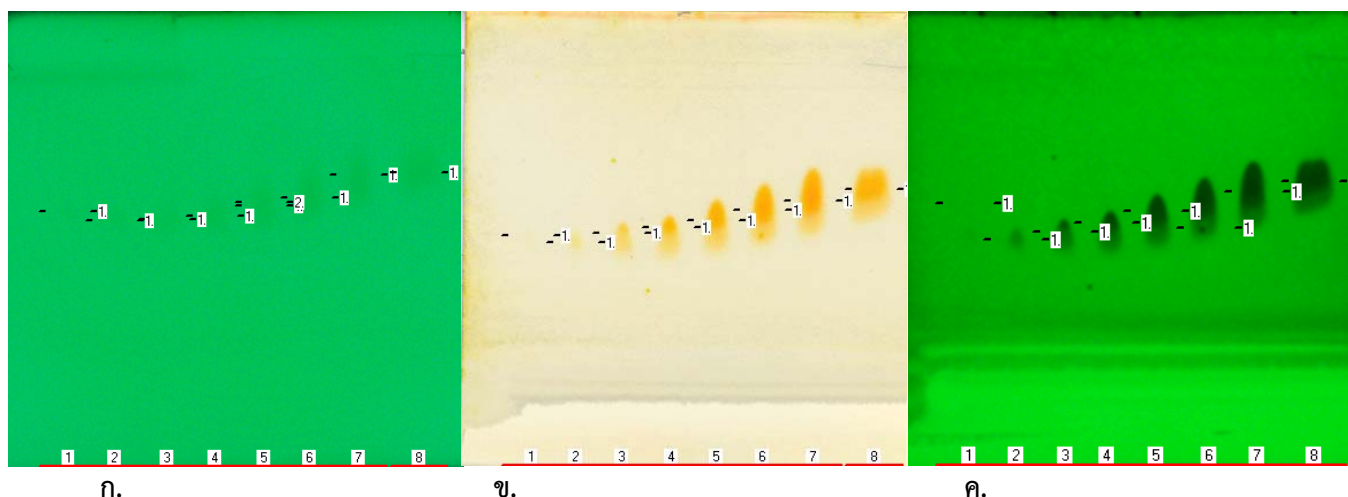
- ควรมี diethylamine เป็นส่วนผสมในปริมาณเล็กน้อย เพื่อช่วยลดการเกิดลักษณะวงแบบหางลาก (tailing) ของจุดสารบนแผ่นที่แอลซี เนื่องจากสารไซบูทรามินมีคุณสมบัติเป็นด่าง การมี diethylamine ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นด่างใช้เป็นส่วนผสมในวัฏภาคคงที่อาจช่วยลดการแตกตัวของโครงสร้างยา ลดการจับกันระหว่างโครงสร้างของยาที่แตกตัวกับ silica gel 60 บนแผ่นที่แอลซี ทำให้ช่วยลดการเกิดลักษณะวงแบบหางลากลงได้
- เมื่อใช้ n-hexane หรือ cyclohexane เป็นส่วนประกอบหลักในการผสมกับ diethylamine แม้ว่าจุดของสารที่ได้ปรากฏมีลักษณะกลมแคบ ไม่มีหางลากยาว แต่มักพบค่า R_f ของสารไซบูทรามินที่ได้จากการพัฒนาแผ่นในแต่ละครั้งค่อนข้างแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากตัวทำละลายเหล่านี้มีการระเหยค่อนข้างเร็ว ทำให้สัดส่วนของตัวทำละลายที่ใช้ในวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เตรียมขึ้นในแต่ละครั้งอาจเปลี่ยนแปลงไปจากสัดส่วนที่ต้องการ ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของสารบนแผ่นที่แอลซี อย่างไรก็ตาม หากใช้เฉพาะ 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 ที่ได้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมไม่สูงเกินไป

เนื่องจากสารไซบูทรามินมีโครโมฟอร์ในโครงสร้างที่สามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตได้ ดังนั้น เมื่อทำการตรวจวัดภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 nm จึงพบจุดของสารปรากฏเป็นจุดที่บ่งแสงบนพื้นหลังสีเขียวย 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 และลักษณะจุดไซบูทรามินโดยการใช้วัสดุภาคคงที่และวัสดุภาคเคลื่อนที่ชนิดต่าง ๆ

วัสดุภาคคงที่	วัสดุภาคเคลื่อนที่	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 μ L)	0.64 (วงกลมออกรียาวบ้าง)
	8. Toluene-MeOH-diethylamine (10:0.25:50 μ L)	0.68 (วงกลมออกรียาว)
	9. Toluene-diethylamine (10:0.25)	0.64 (วงกลมมี front-tail เล็กน้อย)
	10. Cyclohexane-diethylamine (9:1)	0.64 (วงกลมมี front-tail เล็กน้อย)
	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 μ L)	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 μ L



ก.

ข.

ค.

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

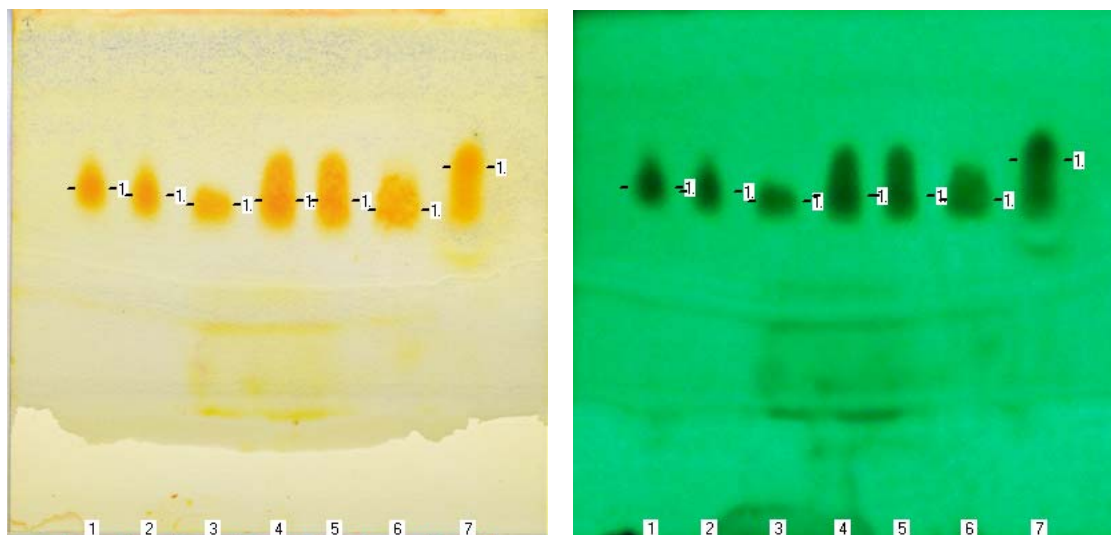
วิธีการ	ผลการทดลอง
1. ส่องได้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 nm	จุดที่บ่งแสงจาง ๆ บนพื้นหลังเขียว LOD (ด้วยตา) ~ 1000-2000 ng
2. ส่องได้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 nm	ไม่พบจุดใดปรากฏ
3. จุ่มแผ่นลงในสารละลาย Dragendorff	จุดสีส้มบนพื้นสีนวล LOD (ด้วยตา) ~ 500-1000 ng
4. จุ่มแผ่นลงในสารละลาย Dragendorff และตามด้วยการส่องได้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 nm	จุดที่บ่งแสงบนพื้นหลังเขียว 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) ให้ลักษณะเป็นวงหรือแถบแคบไม่เป็นทางลากยาวมากเท่ากับ การจุดสารด้วยเข็มขนาด 5 µL (track 4-7) และในเบื้องต้นเมื่อทำการวิเคราะห์ขนาดของสารแต่ละแถวด้วย โปรแกรม Sorbfil TLC Videodensitometer ซึ่งมีความไวค่อนข้างสูงในการวิเคราะห์จุดสารและมีความง่ายและ สะดวกในการใช้งาน สามารถทำการวัดได้ทั้งค่าความสูงและพื้นที่ใต้กราฟของสารในแต่ละแถวได้ พบว่าพื้นที่ของ จุดสารด้วยการใช้เข็มขนาด 2 และ 5 µL มีค่าต่างกันประมาณเท่าตัว ในขณะที่ค่าความสูงของพีคของสารที่จุด ขนาด 5 µL มีค่ามากกว่าจุดขนาด 2 µL ไม่มากนัก ดังนั้น เนื่องจากการจุดสารด้วยเข็มขนาด 2 µL ให้ลักษณะวง ของสารที่วิเคราะห์ได้ดีกว่า ในการศึกษาขั้นต่อไปจึงเลือกจุดสารด้วยการใช้เข็มขนาด 2 µL (ตารางที่ 3.3)

ที่ปริมาณสารเท่ากัน เมื่อพิจารณาวิธีการตรวจวัดสารพบว่าการใช้ Dragendorff และการสแกนเก็บ ข้อมูลภาพเพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ พบว่าค่าพื้นที่ที่วัดได้มีค่าสูงกว่าการถ่ายภาพได้แสงอัลตราไวโอเล็ต แสดงว่าวิธีมี

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

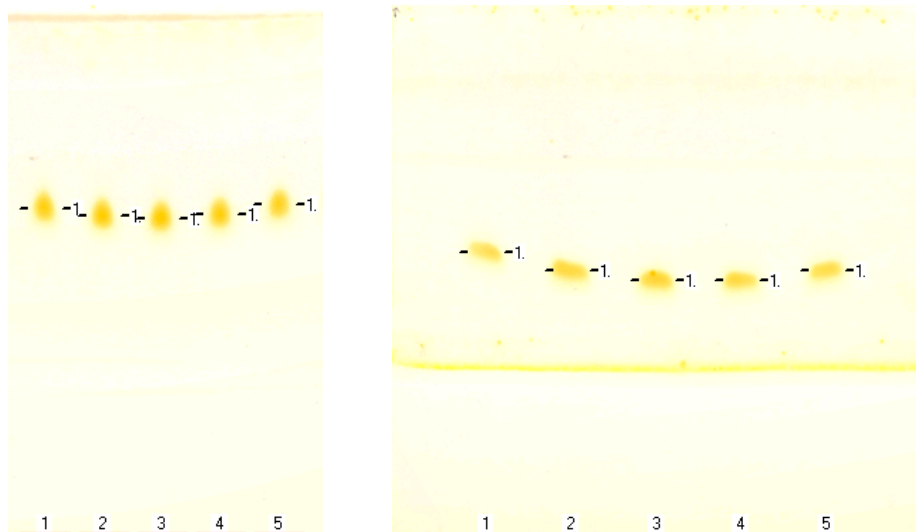
รูปที่ 3.2 แผ่นที่แอลซีที่ได้จากการจุดสารเป็นวงและเป็นแถบ (Track 1-6: standard SH 5 mg/mL; Track 1: Spot 2 μ L; Track 2: Spot 2 μ L; Track 3: Apply as a band (0.5 cm width) 2 μ L; Track 4: Spot 5 μ L; Track 5: Spot 5 μ L; Track 6: Apply as a band (0.5 cm width) 5 μ L; Track 7: Reduce[®] 5 mg/mL Spot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

ตารางที่ 3.3 ขนาดพื้นที่และความสูงของสารในแต่ละแถบบนแผ่นที่แอลซีในรูปที่ 3.2

Track Number		Dragendorff + scan		Dragendorff + UV 254	
		A	H	A	H
2	$\mu\text{L}/\text{spot}$	1	156658	4791	135397
		2	157748	4712	132209
		3	161659	6283	125943
5	$\mu\text{L}/\text{spot}$	4	300676	6174	232198
		5	276412	5385	238371
		6	269188	7060	212790
		7	309327	5187	279613

A = peak area; H = peak height

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



ก.

ข.

วัสดุภาคคงที่ 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 $\mu\text{L}/\text{spot}$)

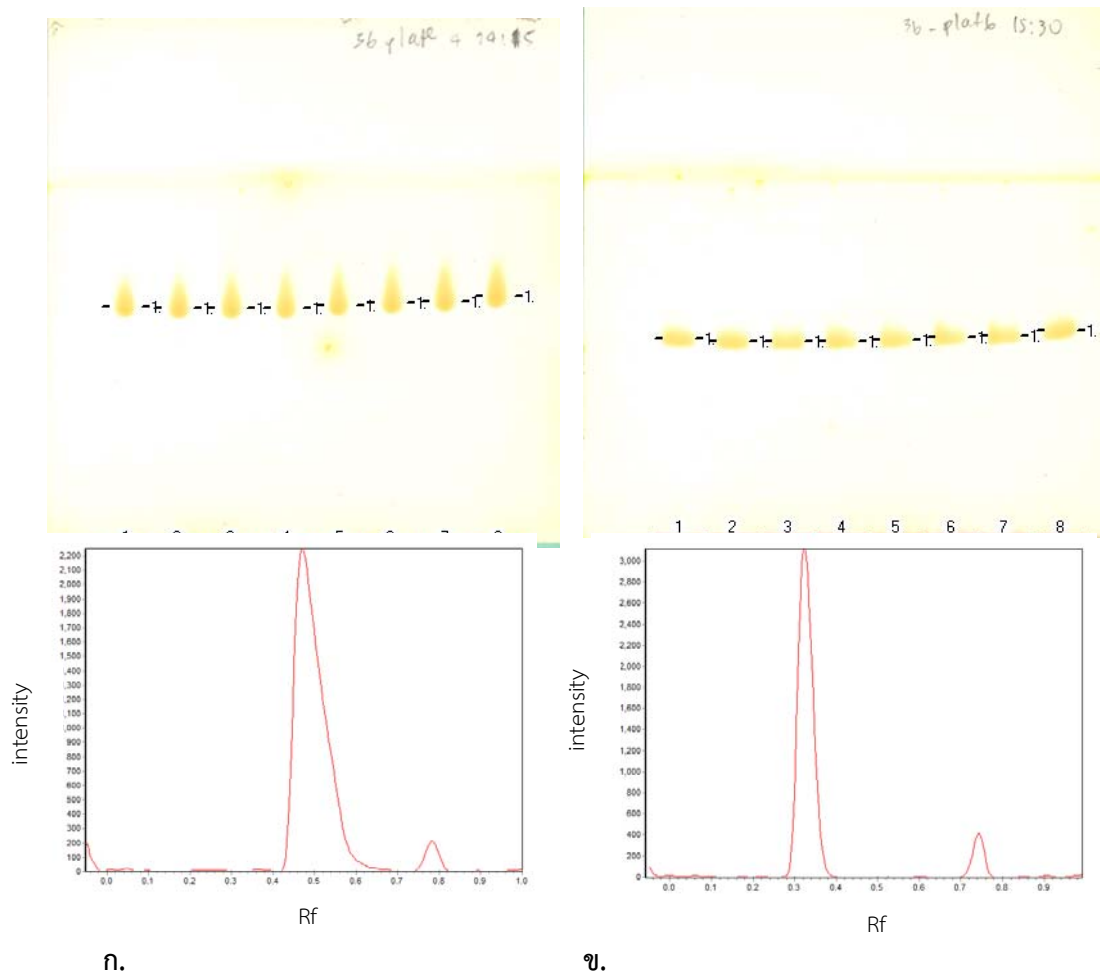
ตารางที่ 3.4 ขนาดพื้นที่และความสูงของสารในแต่ละแถบบนแผ่นที่แอลซีในรูปที่ 3.3

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) ทั้งนี้เนื่องจากแท่งที่ใส่วัฏภาคเคลื่อนที่ยังไม่อิ่มตัวก่อนการใช้งาน ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปเพื่อการพัฒนาและประเมินวิธีวิเคราะห์ จึงได้ทำการทดสอบโดยใส่กระดาษกรอง (saturation pad) ภายในแท่งเพื่อช่วยให้แท่งอิ่มตัวได้เร็วขึ้น

จากผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าเมื่อใช้แท่งที่มีการอิ่มตัวดี แผ่นที่พัฒนาเสร็จแล้วปรากฏเป็นแนวโค้งลดลง ดังแสดงในรูปที่ 3.4 โดยภาพรวม พบว่าค่า %RPD ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธีการจุดสารแบบเป็นแถบมีค่าดีกว่าการจุดสารแบบเป็นวง (ตารางที่ 3.5) นอกจากนี้รูปร่างฟีกที่ได้จากการจุดสารเป็นแถบมีลักษณะเป็นหางลากยาวน้อยกว่าการจุดสารเป็นวง (รูปที่ 3.4 ล่าง) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกวิธีการจุดสารแบบเป็นแถบ



วัสดุภาคคงที่ แผ่น TLC ชนิด silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 10 x 10 cm วัสดุภาคเคลื่อนที่ 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) โดยพีคที่ได้จากการจุดสารเป็นแถบมีลักษณะแคบเป็นทางลากยาวน้อยกว่าการจุดสารเป็นวง

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 ให้ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นทั้งแบบพหุคูณเมียร์ที่ดีที่สุด (ค่า $R^2 = 0.9985$)

ดังนั้นในการศึกษาเพื่อประเมินความถูกต้องของวิธีจึงเลือกใช้ช่วงความเข้มข้น 1-6 µg/spot ในการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นแบบพหุคูณเมียร์ระหว่างพื้นที่และความเข้มข้น 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)						
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	ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในรูปแบบ กากาโอ แคปซูลและอื่น ๆ
วิธีการเตรียมสารละลายตัวอย่าง	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารขนาดสำหรับรับประทาน

ต่อครั้ง ใส่ลงพลาสติกและเติม MeOH จำนวน 20 mL ตามด้วยการโซนิเคต (sonicate) เป็นเวลา 15 นาที สารละลายส่วนใสนำมาใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วยทีแอลซี ยกเว้นสารตัวอย่าง S10 และ S19 ให้นำสารละลายที่เตรียมได้จากข้างต้นมาเจือจางเท่าตัวด้วย MeOH ก่อนนำไปวิเคราะห์

วิธีกาณคังที่

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

วิธีกาณเคลื่อนที่

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 โดยการใช้เครื่อง Nanomat 4 (Camag, Switzerland) ช่วยในการจุดสารละลายตัวอย่าง

วิธีการพัฒนา

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

ระยะทางในการพัฒนาแผ่นห่างจากจุดสารเริ่มต้น 7.0 cm แผ่นที่พัฒนาเสร็จทั้งให้แห้งประมาณ 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

สแกนแผ่นทีแอลซีที่ต้องการเก็บข้อมูลภาพด้วยเครื่องสแกนรุ่น 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

วิธีการวิเคราะห์โดยเดนมิตเตอร์

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

3.2 ผลการประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

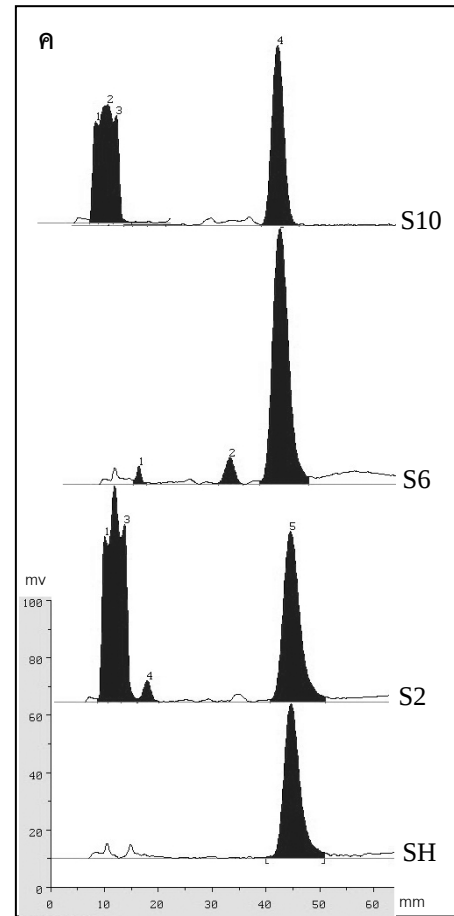
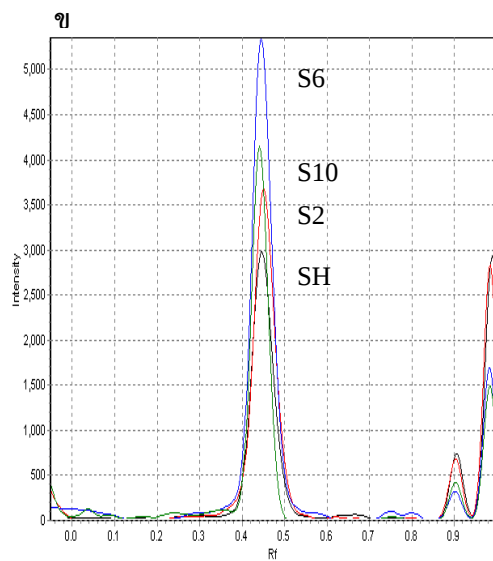
3.2.1 ความจำเพาะเจาะจง (selectivity)

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

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

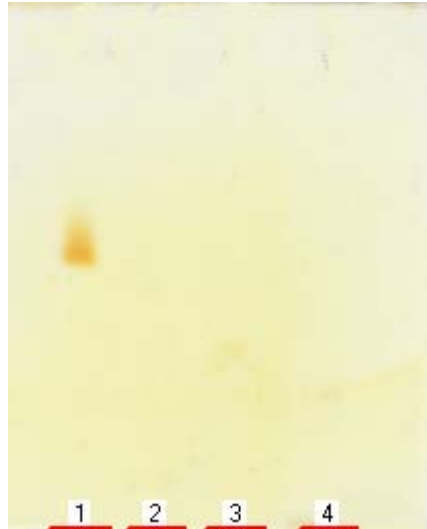
นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์เปรียบเทียบค่า Rf และสเปกตรัมของไซบูทรามินในสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน พบว่ามีค่า Rf เท่ากัน (รูปที่ 3.5 ค) สเปกตรัมของสารตัวอย่างมีลักษณะเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน (รูปที่ 3.7) ค่า peak purity ของไซบูทรามินในสารตัวอย่างมีค่าเท่ากับ $r(S, M) = 0.9993$ และ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

ก



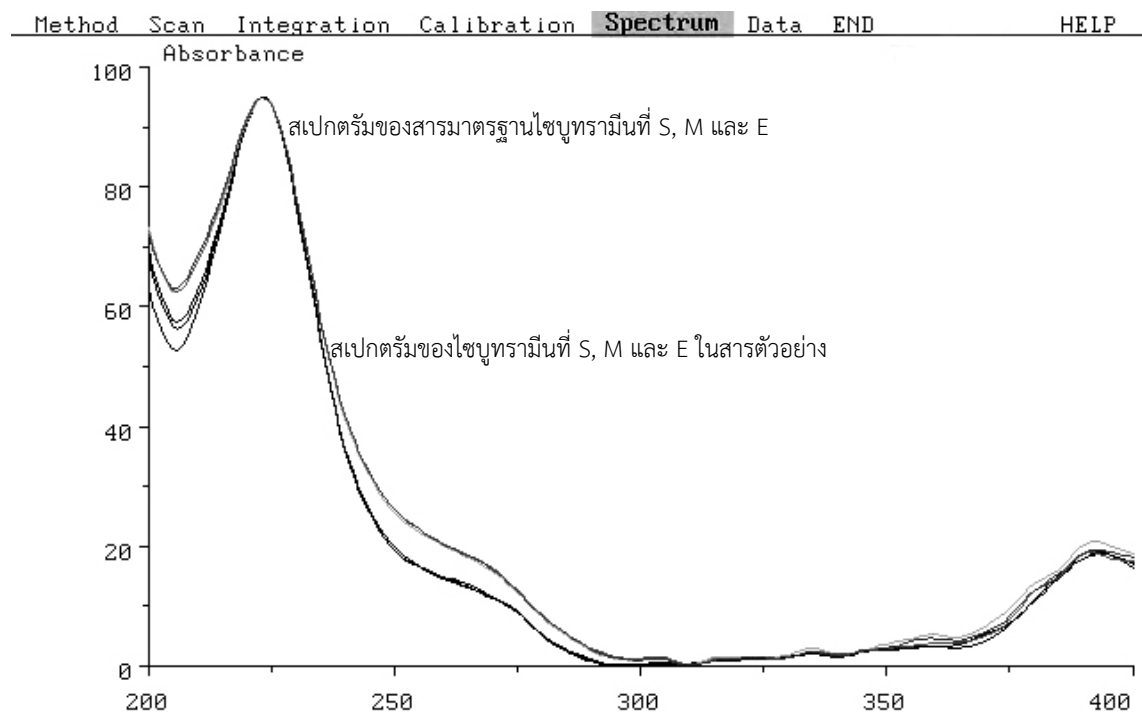
วัฏภาคคงที่ แผ่น TLC ชนิด silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 10 x 20 cm วัฏภาคเคลื่อนที่ toluene-hexane-diethylamine (9:1:0.3)

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) ที่ได้รับการวิเคราะห์โดยวิธีที่แอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและเดนสิโตเมตรี ตามลำดับ



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

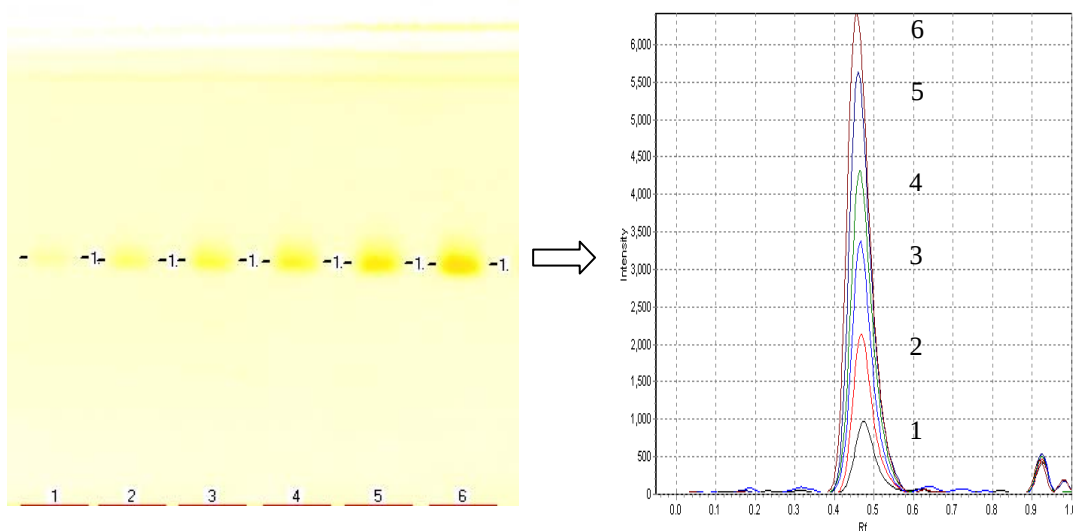
รูปที่ 3.6 รูปที่แอลซีของสารมาตรฐานไซบูทรามิน (track 1) สารสังเคราะห์เฟนเทอร์มิน (track 2) เฟนฟูรามิน (track 3) และเมธแอมเฟตามีน (track 4) ที่ 10 µg/spot



รูปที่ 3.7 สเปกตรัมของสารไซบูทรามินในสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดสกีโทมิเตอร์

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 $\mu\text{g}/\text{spot}$ โดยมีค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นทั้งแบบโพสิทีฟและเนกาทีฟ (ค่า $R^2 = 0.9985$)



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

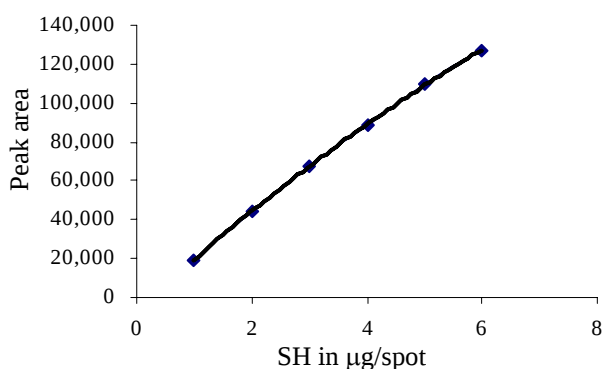
รูปที่ 3.8 สารมาตรฐานไซบูทรามินในช่วงความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 $\mu\text{g}/\text{spot}$ และที่แอลซีโครมาโทแกรม ที่ได้รับการจากวิเคราะห์โดยเทคนิคเชิงภาพ

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)

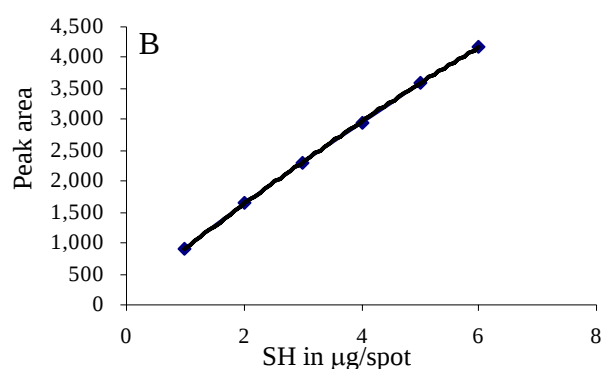
	TLC Image analysis	Densitometric analysis
A	-814.3 ± 975.8	-17.5 ± 8.3
B	27265.2 ± 3912.4	774.3 ± 139.3
C	-6994.8 ± 2852.3	149.5 ± 39.1
R ²	0.9987 ± 0.0008	0.9994 ± 0.0003
LOD (ng/spot)	190	103
LOQ (ng/spot)	634	344

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)

ความถูกต้องของวิธีที่แอลซีที่พัฒนาขึ้น อาศัยการศึกษาแบบ recovery studies ตารางที่ 3.8 แสดงค่า % recovery โดยพบว่าค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่แอลซีแอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิโตเมตริอยู่ระหว่างร้อยละ 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 (%)	Recovery (%)	Average recovery (%)
1000	106.57 $\pm$ 1.99		106.92 $\pm$ 1.73	
2000	96.86 $\pm$ 1.78	101.05 $\pm$ 4.54	95.95 $\pm$ 1.13	100.34 $\pm$ 5.16
3000	99.71 $\pm$ 0.88		98.14 $\pm$ 1.02	

3.2.5 ความแม่นยำ (precision)

การทดสอบความแม่นยำของวิธีที่แอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิโตเมตริ 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

จากการศึกษาพบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของพื้นที่ที่วัดได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่แอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิโตเมตริ 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 ($\mu\text{g/spot}$)	Amount detected ($\mu\text{g/spot}$)	%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 ($\mu\text{g/spot}$)	Amount detected ($\mu\text{g/spot}$)	%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

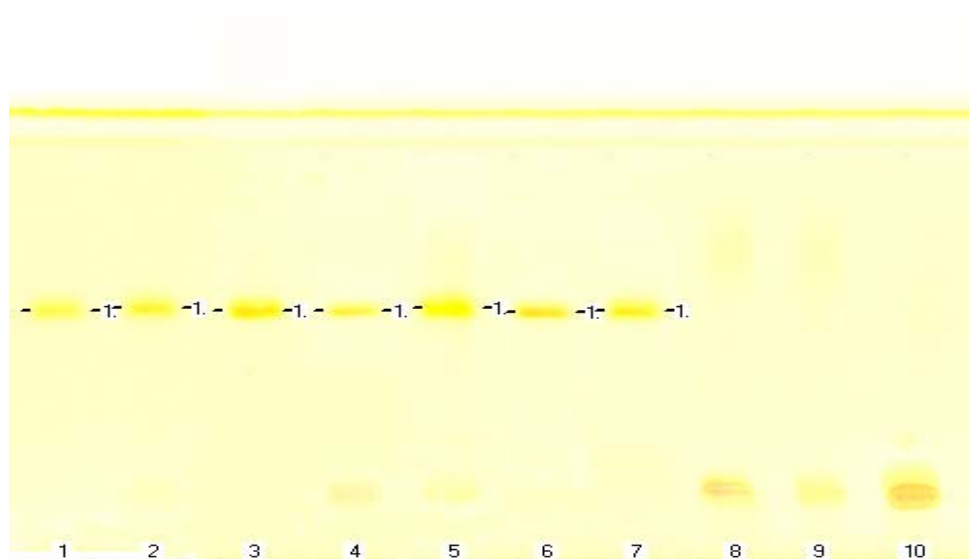
ตารางที่ 3.10 Robustness studies

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

วิธีที่แอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิตีเมตรีนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจและวิเคราะห์หาปริมาณสารไซบูทรามินในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่อ้างว่ามีส่วนผสมเฉพาะสารจากธรรมชาติ 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) พบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณไซบูทรามินที่วิเคราะห์ได้โดยวิธีที่แอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิตีเมตรี 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

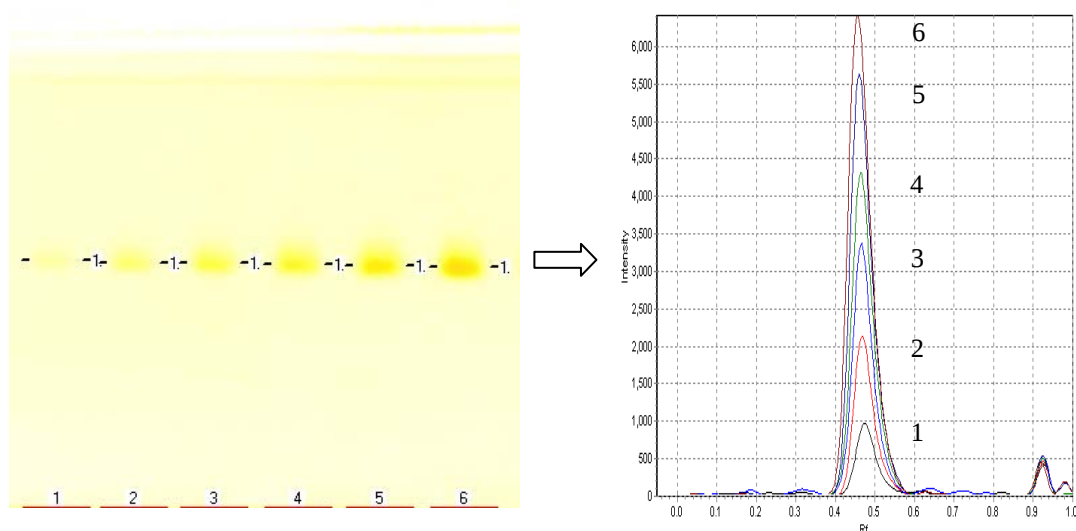
ตารางที่ 3.12 ผลการทดสอบทางสถิติแบบจับคู่ (Paired *t*-test) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณสารไซบูทรามินในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจำนวน 6 ตัวอย่าง (S2, S6, S7, S9, S10 และ S19) ที่วิเคราะห์ได้โดยวิธีที่แอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพและวิธีเดนสิโตเมตรี

t-Test: Paired Two Sample for Means		
	<i>SH amount analyzed by TLC-Image analysis</i>	<i>SH amount analyzed by TLC-densitometric analysis</i>
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	

บทที่ 4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ

วิธีวิเคราะห์ไซบูทรามินด้วยที่แอลซีโดยเทคนิคเชิงภาพได้รับการพัฒนาขึ้น โดยใช้แผ่นที่แอลซีชนิด silica gel 60 F₂₅₄ ชนิดพลาสติกเป็นวัสดุภาชนะที่ และ toluene-hexane-diethylamine (9:1:0.3, v/v/v) เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ และตรวจวัดด้วยสารละลาย Dragendorff ร่วมกับการใช้เทคนิคเชิงภาพเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารไซบูทรามินในผลิตภัณฑ์ที่มีการปลอมปน

การวิเคราะห์ข้อมูลภาพของแผ่นที่แอลซีอาศัยโปรแกรม Sorbfil TLC Videodensitometer software เพื่อตรวจวัดพื้นที่ใต้พีกของสารไซบูทรามิน ทำได้โดยการสร้างโครมาโทแกรมของแต่ละแถบบนแผ่นที่แอลซีจากค่าความเบี่ยงเบนของความเข้มของแถบต่าง ๆ ในแต่ละแถวจากความเข้มของพื้นหลัง โดยค่าความเบี่ยงเบนของความเข้มดังกล่าวสัมพันธ์กับปริมาณสารในแต่ละจุด ดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 การวิเคราะห์เชิงภาพของแผ่นที่แอลซีโดย Sorbfil TLC Videodensitometer software (tracks 1-6 คือ สารมาตรฐานไซบูทรามินที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 $\mu\text{g}/\text{spot}$ ตามลำดับ)

การประเมินความถูกต้องของวิธีที่แอลซีที่ได้รับการพัฒนาขึ้นเป็นไปตาม ICH (the International Conference on Harmonization) guidelines โดยมีความจำเพาะเจาะจงในการแยกสารไซบูทรามินออกจากสารอื่น ๆ ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารเสริม ค่า peak purity ของไซบูทรามินมีค่าเท่ากับ $r(S, M) = 0.9993$ และ $r(M, E) = 0.9999$

การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างพื้นที่กับปริมาณสารในช่วงความเข้มข้น 1-6 ไมโครกรัมต่อจุด มีความสัมพันธ์เป็นแบบ polynomial regression ที่ดีโดยแสดงค่า R^2 มากกว่า 0.99 ชัดจำกัดการตรวจวัดและชัดเจนจำกัดการวิเคราะห์หาปริมาณของไซบูทรามินด้วยวิธีที่แอลซีโดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพในการศึกษานี้มีค่าเท่ากับ 190 และ 634 นาโนกรัมต่อจุด

ความถูกต้องของวิธีที่แอลซีที่ได้รับการพัฒนาขึ้นแสดงโดยค่า % recovery ของสารมาตรฐานที่เติมลงในสารละลายตัวอย่างจำนวนสามความเข้มข้น (ตารางที่ 3.8) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 106.6, 96.86 และ 99.71 โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ในรูปร้อยละ (%RSD) เท่ากับ 1.99, 1.78 และ 0.88 ตามลำดับ ความแม่นยำของ

วิธีการวิเคราะห์แสดงโดยค่า% RSD ที่ได้จากการศึกษา repeatability (intra-day precision) และ intermediate precision (inter-day precision) ซึ่งค่า % RSD ที่ได้ทั้งหมดมีค่าน้อยกว่าร้อยละ 2 แสดงถึงความแม่นยำของวิธี (ตารางที่ 3.9) นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความทนทานโดยค่า %RSD ของการวัดพื้นที่ของพีคที่ได้จากการพัฒนาแผ่นภายใต้การปรับเปลี่ยนสภาวะต่าง ๆ มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 2 (ตารางที่ 3.10)

วิธีที่แอลซีโดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพที่ได้รับการพัฒนาขึ้น ยังได้นำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจำนวน 20 ตัวอย่างจากผู้ผลิตที่แตกต่างกัน โดยเน้นการเลือกเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารรูปแบบต่าง ๆ ที่มีสรรพคุณเพื่อการลดน้ำหนัก ไม่มีทะเบียนอย. ขายตรงตามตลาดนัดหรือทางอินเทอร์เน็ตจากการวิเคราะห์พบว่าผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจำนวนถึง 6 ตัวอย่าง ซึ่งมีทั้งแบบชนิดกาแฟปรุงสำเร็จ ชนิดเม็ด แคปซูลและเม็ดเจล ที่พบการปนปลอมสารไซบูทรามินลงในผลิตภัณฑ์ โดยปริมาณที่วิเคราะห์ได้อยู่ในช่วงตั้งแต่ 6.7 ถึง 23.6 มิลลิกรัมต่อขนาดรับประทานหนึ่งหน่วย (ตารางที่ 3.11)

ค่าเฉลี่ยของปริมาณสารไซบูทรามินที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธีที่แอลซีโดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพและที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ ให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้น วิธีที่แอลซีโดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพที่ได้รับการพัฒนาขึ้นนี้จึงอาจสามารถนำมาใช้แทนวิธีที่แอลซีที่ใช้เครื่องเดนสิโตมิเตอร์ ซึ่งมีราคาสูงกว่ามาก

โดยสรุป วิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นในงานวิจัยครั้งนี้ สามารถนำมาใช้ในการตรวจและวิเคราะห์หาปริมาณยาลดความอ้วนไซบูทรามินที่ปลอมปนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร วิธีการวิเคราะห์มีความจำเพาะ ถูกต้อง แม่นยำ และทนทาน ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารไซบูทรามินที่ได้โดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพและวิธีที่แอลซีเดนสิโตมิเตอร์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกเหนือจากความถูกต้องแม่นยำของวิธีแล้ว วิธีที่แอลซีโดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์เชิงภาพที่พัฒนาขึ้นยังมีขั้นตอนการวิเคราะห์ง่าย สะดวก การเตรียมตัวอย่างไม่ซับซ้อนและใช้อุปกรณ์ที่จัดหาได้ง่าย สามารถจัดทำได้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กที่มีการลงทุนไม่มาก เหมาะสำหรับกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมากและยังสามารถนำมาวิเคราะห์เพื่อทราบถึงปริมาณสารไซบูทรามินที่มีการลักลอบใส่ลงในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อการควบคุมน้ำหนักว่ามีมากน้อยเพียงใด การที่ผู้บริโภคได้รับสารโดยไม่ทราบปริมาณและข้อมูลอาจทำให้มีอันตรายรุนแรงถึงชีวิต วิธีวิเคราะห์ที่ได้จึงมีประโยชน์สำหรับงานคุ้มครองผู้บริโภคเพื่อใช้ในการสุ่มตรวจและได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับการปนปลอมยาแผนปัจจุบันในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพที่มีจำหน่ายอยู่ในท้องตลาดในประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

1. Yuan, R. and Lin, Y. (2000) Traditional Chinese medicine: an approach to scientific proof and clinical validation. *Pharmacology & Therapeutics* 86(2): 191-198.
2. Miller, G.M. and Stripp, R. (2007) A study of western pharmaceuticals contained with samples of Chinese herbal/ patent medicines collected from New York City's Chinatown. *Legal Medicine* 9: 258-264.
3. มนต์ชัย ศิริบำรุงวงศ์ (2551) ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพและสมุนไพร ใช้อย่างไรจึงเกิดประโยชน์ www.doctor.or.th/node/7141 เข้าถึงข้อมูลวันที่ 7 กันยายน 2553.
4. Ernst, E. (2002) Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review. *Journal of Internal Medicine* 252: 107-113.
5. Jung, J., Clausen, M. and Weinmann, W. (2006) Anorectic sibutramine detected in a Chinese herbal drug for weight loss. *Forensic Science International* 161: 221-222.
6. Yuk, S. (2010) Combating illegal foods and drugs containing unauthorized substances. www.tulli.fi/en/secc/material/2ndJune2010/02.06.10_OpeningPlenary_04_Yuk.pdf accessed on September 10, 2010.
7. Putiyanan, S. and Winijkul, D., (2008) Screening for undeclared synthetic drugs in traditional Thai medicines for healthy life style. *Chiang Mai University Journal of Natural Science* 7(1): 47-58.
8. นิทรา เนื่องจำนงค์, นิภา สุวรรณกิจ และวรุฒ พรหมพิทยารัตน์ (2551) การตรวจวิเคราะห์การปนปลอมยาแผนปัจจุบันในยาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงต่อการวิเคราะห์ชนิดมวลโมเลกุลของสาร *วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน* 4(2): 93-103.
9. อย. เผยผลตรวจผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร 6 รายการ สุดอันตราย ลักลอบใส่ยาควบคุมพิเศษ “ไซบูทรามิน” (2553) <http://elib.fda.moph.go.th/library/default.asp?page2=detail&ngid=18&page=2> เข้าถึงข้อมูลวันที่ 17 กันยายน 2553.
10. ศุภลักษณ์ พริ้งเพราษะ, อมรพรรณ อุ้นชัย, ฤทธา บวรณ และบรรลือ สังข์ทอง (2546) การปนปลอมยาแผนปัจจุบันในยาแผนโบราณ www.dmsc.moph.go.th/webroot/khonkaen/Education/ya/%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%9B%E0%B8%99%E0%B8%9B%E0%B8%A5%E0%B8%AD%E0%B8%A1%E0%B8%A2%E0%B8%B2%E0%B9%81%E0%B8%9C%E0%B8%99%E0%B8%9B%E0%B8%B1%E0%B8%88%E0%B8%88%E0%B8%B8%E0%B8%9A%E0%B8%B1%E0%B8%99%E0%B9%83%E0%B8%99%E0%B8%A2%E0%B8%B2%E0%B9%81%E0%B8%9C%E0%B8%99%E0%B9%82%E0%B8%9A%E0%B8%A3%E0%B8%B2%E0%B8%93-46.doc เข้าถึงข้อมูลวันที่ 17 กันยายน 2553.
11. Kanan, S., Abu-Yousef, I.A., Gunasekar, C., Abdo, N. and Narasimhan, S. (2009) Detection and quantification of synthetic drugs in herbal slimming formula. *European Journal of Scientific Research* 34 (3): 348-357.
12. Jung J., Clausen M. and Weinmann, W. (2006) Anorectic sibutramine detected in a Chinese herbal drug for weight loss. *Forensic Science International* 161: 221-222.

13. Hung, T.T.N., Dinh, C.P. and Duc, C.H., (2001) Combination of thin layer chromatography with personal computer for determination of some derivatives of artemisinin. *Proceeding in Pharma Indochina II*, 20-23 October, Hanoi-Vietnam, pp. 61-64.
14. Phattanawasin, P., Sriphong, L. and Sotanaphun, U. (2009) Validated TLC-image analysis method for simultaneous quantification of curcuminoids in *Curcuma longa*. *Chromatographia* 69 (3): 397-400.
15. Mustoe, S. P. and McCrossen S. D. (2001) A comparison between slit densitometry and videodensitometry for quantitation in thin layer chromatography. *Chromatographia Supplement* 53: 474-477.
16. Johnsson, R., Traff, G., Sunden, M., and Ellervik, U. (2007) Evaluation of quantitative thin layer chromatography using staining reagents. *Journal of Chromatography A* 1164: 298-305.
17. Ansari, M. J., Ahmad, S., Kohli, K., Ali, J. and Khar, R. K. (2005) Stability-indicating HPTLC determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 39: 132-138.

ภาคผนวก

ก. out put จากโครงการวิจัย: ตีพิมพ์ในวารสาร Forensic Science International (5-year impact factor 2.263)



Quantitative determination of sibutramine in adulterated herbal slimming formulations by TLC-image analysis method

Panadda Phattanawasin^{a,*}, Uthai Sotanaphun^a, Tasamaporn Sukwattanasinit^a, Jariya Akkarawarathorn^b, Sarunyaporn Kitchaiya^b

^a Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand

^b Regional Medical Sciences Center 3 (Chonburi), Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Chonburi, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 September 2011
Received in revised form 13 November 2011
Accepted 12 December 2011
Available online xxx

Keywords:

Sibutramine
Herbal slimming formulations
TLC-image analysis
TLC-densitometry

ABSTRACT

A simple thin layer chromatographic (TLC)-image analysis method was developed for rapid determination and quantitation of sibutramine hydrochloride (SH) adulterated in herbal slimming products. 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 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 specificity, precision, accuracy, robustness and was applied for determination of SH in herbal formulations. The contents of SH in adulterated samples determined by the TLC-image analysis and TLC-densitometry were also compared.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Overweight and obesity have been recognized as one of the serious worldwide problems leading to the search for a number of weight-loss medicines and especially the use of alternative treatments based on herbal formulations. The demand for slimming formulations and dietary supplements originated from purely natural substances is prominently increasing due to the belief that these natural products have been regarded as being harmless and do not cause harmful side effects as synthetic chemical drugs [1,2].

From the increasing popularity all over the world, the market share of herbal slimming products has been highly competitive. As a result, some manufacturers committed illegal adulterations of synthetic anorexics in order to improve the efficacy of their products for weight loss. Sibutramine hydrochloride (SH) has been one of the most commonly adulterated anorexic drugs found in herbal slimming formulations [3–6]. In many countries including Thailand, SH was withdrawn from the market due to an associated risk of serious cardiovascular events such as nonfatal heart attack

and nonfatal stroke [7]. Without adequate quality control, those taking herbal slimming formulations with the presence of undeclared sibutramine may be suffered from several unpredictable implications ranging from headache, vertigo, numbness to serious cardiovascular effects, depending on the amount of drug consumed [8,9]. In order to protect consumer risks, a simple, rapid and low-cost method for screening and quantitative analysis of the adulterated sibutramine in numerous brands of herbal slimming products available in the market is of importance for local authorities related to public health control and surveillance.

Several methods including HPLC [5,8,10], LC-MS/MS [11,12], capillary electrophoresis [13] and infrared spectroscopy [14] for identification and quantitative determination of SH in pharmaceutical formulations and herbal products have been reported. Even though the major advantages of these methods have been claimed for their being highly sensitive and specific, the analytical instruments are quite costly and expertise is usually required. Unlike those, the use of simple and inexpensive TLC method can overcome these drawbacks and being more accessible to many local authorities and small laboratories. Furthermore, based on a combination with simple computer technology and image analysis software, TLC-image analysis method has been developed and applied for quantitative assay with good accuracy and precision [15].

Therefore, the aim of this study was to develop an economic, accurate, reproducible and convenient TLC-image analysis method for rapid determination and quantitative analysis of illegal

* Corresponding author at: Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand.
Tel.: +66 89 787 6710; fax: +66 34 255 801.
E-mail addresses: ypanadda@su.ac.th, p.phattanawasin@yahoo.com (P. Phattanawasin).

adulterant, sibutramine, in herbal slimming formulations. The proposed method was validated in compliance with ICH guidelines and compared with the TLC-densitometry.

2. Materials and methods

2.1. Standards and samples

Standard sibutramine hydrochloride (SH), phentermine, fenfuramine and methamphetamine (purity > 99%) were obtained from Regional Medical Sciences Center 3, Chonburi, Thailand. Twenty products of herbal slimming formulations were purchased from local vendors, drugstores and via Internet. All reagents and chemicals were analytical grade.

2.2. Preparation of standard and sample solution

A working standard solution of SH (0.5 mg mL^{-1}) was prepared from a stock solution (5.0 mg mL^{-1}) in methanol. For preparation of sample solutions, S1–S20, the weighed content of one single dose (one cachet or one capsule) of each herbal formulation was placed in an Erlenmeyer flask and sonicated with 20 mL MeOH for 15 min. S10 and S19 solutions were further diluted twofold since they were highly adulterated with SH. All sample solutions were used for TLC assay.

2.3. Chromatographic conditions

TLC analysis was performed on TLC silica gel 60 F₂₅₄ plastic plates ($20 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ with $250 \mu\text{m}$ thickness, Merck, Germany). A standard or sample solution was applied as a 5 mm band onto a TLC plate using a TLC sampler Nanomat 4 (Camag, Switzerland) and a 2 μL capillary tube (Camag, Switzerland). The distance between each band was 1.0 cm. The plate was developed to a distance of 7.0 cm in a TLC chamber previously saturated with toluene-*n*-hexane-diethylamine (9:1:0.3, v/v/v) for 30 min.

2.4. TLC-image analysis method

For the determination of SH by TLC-image analysis method, the developed TLC plate under the chromatographic condition as above was air-dried at room temperature, then, dipped into Dragendorff reagent for 6 s using Immersion Device 3 (Camag, Switzerland). After 5 min, the plate was dipped again in the reagent for another 6 s to enhance the color and dried for 10 min before scanning by a digital scanner (Hewlett Packard SCAN Jet 3500C) at a resolution of 200 dpi. The color image of the plate was saved as a joint photographic experts group (JPEG) file. The JPEG image was resized and cropped according to the plate dimension at $20 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ and saved at a resolution of 40 pixels cm^{-1} for image analysis of SH content by Sorbfil TLC Videodensitometer software (Sorb polymer, Russia).

The image file was opened with the software. Equal width of each track line was set and the evaluation of the chosen track to measure peak area was performed by Process Track command using for each line method option at the values of width and height at 3 and 30, respectively, and noise filtering at 7. The software evaluated a SH band in each track on a TLC image on the assumption that the size and the intensity of a band (in relation to the plate background intensity) depended on the quantity of a substance in the band. A chromatogram was constructed on the deviation of track intensity from background intensity. R_f and peak area of SH were determined.

2.5. TLC-densitometric method

For TLC-densitometric analysis, the air-dried TLC plate developed under the chromatographic condition as above was scanned by using a Camag TLC scanner II with Camag CATS 3.1 software in the absorbance mode at 225 nm. The slit dimension was $5 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$ and the scanning speed was 4 mm/s.

2.6. Method validation

The specificity of the TLC methods was determined by comparing an R_f value of SH in a sample with that of standard SH and in relation to interferences from other components in herbal formulations. A TLC analysis of SH and synthetic compounds, e.g., phentermine, fenfuramine, and methamphetamine, was performed. The peak purity of SH was also determined by TLC-densitometry. The spectra at three different regions of the sibutramine peak, i.e., peak start (S), peak apex (M) and peak end (E) were compared.

For calibration curve, different aliquots (2–12 μL) of standard solutions at 0.5 mg mL^{-1} were applied on TLC plates using the Nanomat 4 with a 2 μL capillary tube to give the concentrations of 1, 2, 3, 4, 5 and 6 $\mu\text{g/spot}$ of SH. The plate was subjected to the TLC-image analysis and TLC-densitometric methods as described above. The calibration curve was constructed between peak area and drug concentration in $\mu\text{g/spot}$ and the calibration data were subjected to least-squares regression analysis.

In order to determine limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ), the linear regression data constructed from the lower concentration range (1, 2 and

3 $\mu\text{g/spot}$) was used [16]. The LOD and LOQ were determined from the formulae 3 SD/S and 10 SD/S where SD was the standard deviation (SD) of the intercept and S corresponded to the mean value of the slope.

The repeatability (intra-day precision) and the intermediate precision were performed by determining the amount of standard SH at three different concentration levels (2, 3 and 4 $\mu\text{g/spot}$) in triplicate. The intermediate precision was determined on two consecutive days. The relative standard deviation (RSD) values for repeatability and intermediate precision were calculated.

Robustness of the TLC methods was studied by introducing small changes in the mobile phase compositions, e.g., 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) and by varying the time from spotting to chromatography and from chromatography to scanning or image capturing for 15 min. A concentration of 3.0 $\mu\text{g/spot}$ was employed. Each variation was performed in triplicate. The RSD values of the peak areas were calculated for all variations.

The accuracy was performed in term of recovery studies using a standard addition method. A sample spiked with known amount of standard SH to give the additional concentrations of 1, 2 and 3 $\mu\text{g/spot}$ was analyzed by the proposed methods. The experiment was conducted in triplicate. A mean percent recovery was calculated.

2.7. Analysis of SH in herbal slimming samples

A 6 μL of each sample solution was spotted on TLC plates and analyzed by the methods described above. The amount of adulterated SH in the samples was analyzed by the TLC-image analysis and TLC-densitometry. Each sample was analyzed in triplicate. The results obtained were expressed as mean of SH content (mg per one single dose).

2.8. Statistical analysis

The mean values of SH contents in one single dose assayed by the TLC-image analysis and TLC-densitometric methods were tested by paired *t*-test at 95% confidence level.

3. Results and discussion

3.1. Method optimization and method validation

The chromatographic condition for determination of adulterated SH in herbal products was attempted on the most common used silica gel 60 F₂₅₄ TLC plates. Among various mobile phases, the solvent system consisting of toluene-*n*-hexane-diethylamine (9:1:0.3, v/v/v) gave a narrow band of SH at an R_f value of 0.46 ± 0.02 but weakly detected under UV at 254 nm. The intensity of spot detection was enhanced by dipping the plate in Dragendorff reagent. The orange-colored band corresponding to SH was clearly observed and well separated from other components in the samples. The specificity of the TLC method was ensured by comparing an R_f value of SH in the samples with that of standard SH. A TLC analysis of SH compared with synthetic compounds, e.g., phentermine, fenfuramine, and methamphetamine was also performed. The data showed that, the tertiary amine SH produced the strongest positive orange color whereas the other synthetic compounds, belonging to a group of primary and secondary amines, were weakly or not detectable with Dragendorff reagent and none of the compounds were detected at the same R_f value as SH (Fig. 1).

Furthermore, no other interferences in the samples were observed at the R_f value of SH. There were no any orange-colored bands corresponding to the R_f value of SH found in the non-adulterated samples, suggesting that other compounds found in the herbal samples did not interfere with the identification (Fig. 2). Peak purity of SH in each adulterated sample was also assessed from TLC-densitometry by comparing spectra at the start (S), apex (M) and the end (E) of the peak obtained from the band, i.e., $r(S, M) > 0.999$ and $r(M, E) > 0.999$.

The digital images of scanned TLC plates were analyzed by Sorbfil TLC Videodensitometer (Fig. 3). The calibration curves between peak area and concentration were obtained from TLC-image analysis and TLC-densitometric method. The polynomial regression data showed good linear relationship over the concentration range of 1–6 $\mu\text{g/spot}$ from both methods

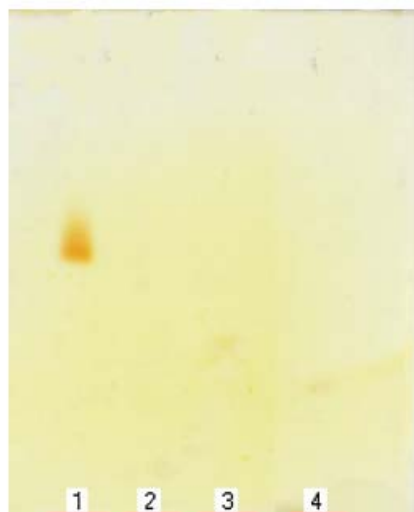


Fig. 1. A TLC of SH (track 1) and synthetic compounds, phentermine (track 2), fenfuramine (track 3) and methamphetamine (track 4) at 10 µg/spot.

($R^2 > 0.9990$) (Fig. 4). The LOD and LOQ values obtained from TLC image analysis and TLC densitometry were at 190 and 634 ng/spot and at 103 and 344 ng/spot, respectively.

The precisions of both TLC methods were found to be satisfactory as the RSD values determined by repeatability and intermediate precision studies were all less than 2% as shown in Table 1. The TLC-image analysis and TLC-densitometric methods showed RSDs of peak areas calculated from robustness studies for all variations were less than 1.90% and 1.61%, respectively (Table 2).

The accuracy of the methods was determined from the recovery studies by spiking a sample with three different concentrations of standard SH. Mean recoveries obtained from TLC-image analysis and TLC-densitometric methods ranged from 96.86 to 106.57% and from 95.95 to 106.92%, respectively (Table 3).

3.2. Analysis of herbal slimming formulations

The TLC-image analysis and TLC-densitometric methods were applied for detection and quantification of SH in twenty herbal slimming formulations which were claimed to contain only natural ingredients obtained from a variety of herbs, for example, aloe vera, garcinia cambogia, lotus root, konjac and cinnamon. Six formulations, S2, S6, S7, S9, S10, S19, from twenty products were shown to be adulterated with SH. The presence of SH peak was clearly observed in the TLC chromatograms of the adulterated samples (Fig. 2). The contents of adulterated SH were shown in Table 4. A paired *t*-test suggested that there were no significant

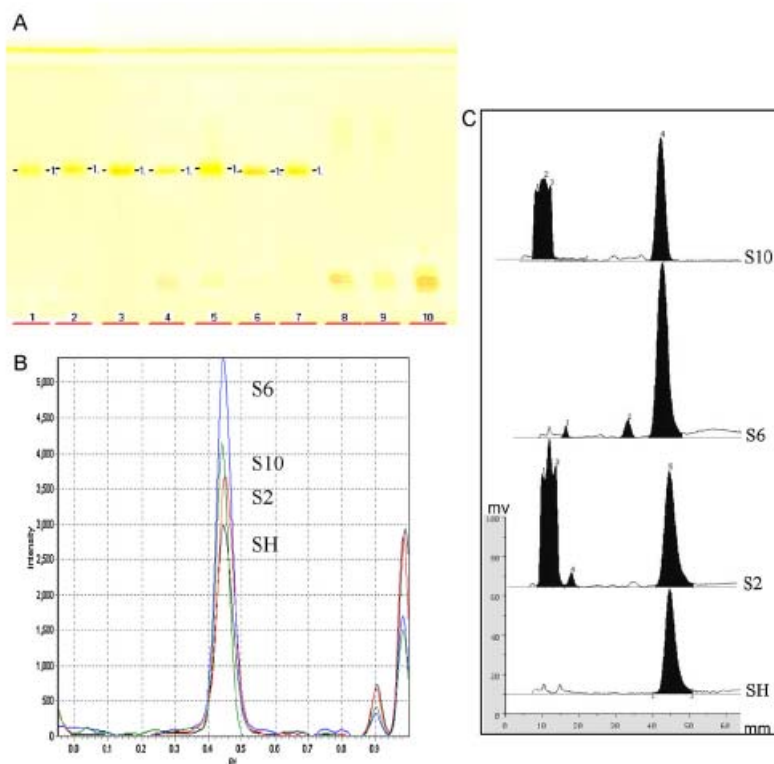


Fig. 2. (A) TLC image of standard SH (track 1), adulterated slimming formulations (tracks 2–7: S2, S6, S7, S9, S10 and S19) and SH-free samples (tracks 8–10: S14, S15 and S16). (B) TLC chromatogram of standard SH, slimming coffee (S2), slimming gel (S6) and slimming capsule (S10) obtained from TLC-image analysis and (C) from TLC-densitometry.

Please cite this article in press as: P. Phattanawasin, et al., Quantitative determination of sibutramine in adulterated herbal slimming formulations by TLC-image analysis method, Forensic Sci. Int. (2012), doi:10.1016/j.forsciint.2011.12.004

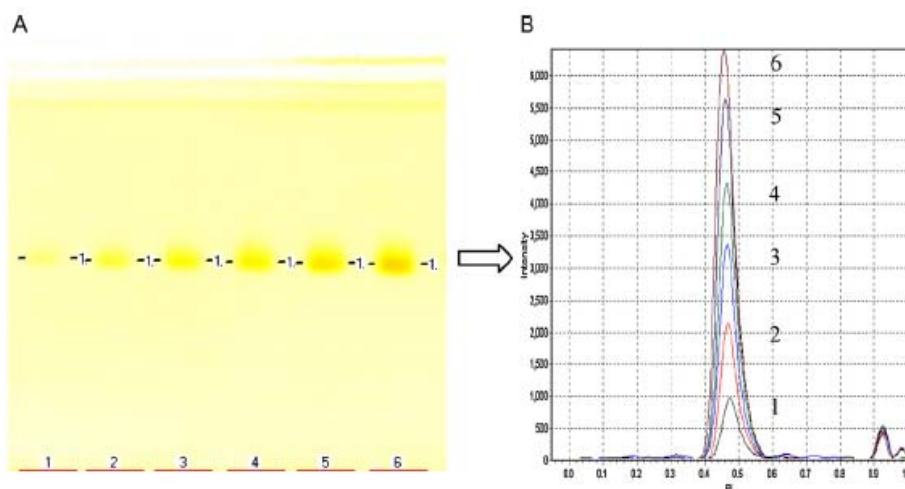


Fig. 3. TLC chromatogram obtained by Sorbfil TLC Videodensitometer software. (Tracks 1–6: standard SH at 1–6 $\mu\text{g}/\text{spot}$, respectively.)

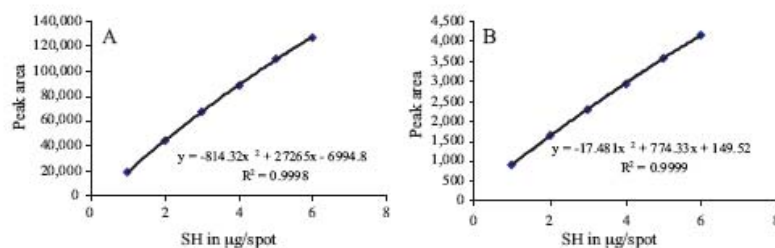


Fig. 4. Calibration graphs between peak area and concentration from (A) TLC-image analysis and (B) TLC-densitometric methods ($n = 6$).

Table 1
Intraday and interday precision study.

SH concentration (ng/spot)	TLC-image analysis		TLC-densitometry	
	Intraday precision ^a	Interday precision ^a	Intraday precision ^a	Interday precision ^a
2000	1.59	1.75	1.28	1.05
3000	1.08	1.19	0.51	0.50
4000	1.82	1.26	1.51	1.04

^a Relative standard deviation (% RSD, $n = 3$).

Table 2
Robustness study.

Parameter	TLC-image analysis RSD	TLC-densitometry 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

Table 3
Recovery study.

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

Please cite this article in press as: P. Phattanawasin, et al., Quantitative determination of sibutramine in adulterated herbal slimming formulations by TLC-image analysis method, Forensic Sci. Int. (2012), doi:10.1016/j.forsciint.2011.12.004

Table 4

The mean content of SH (mg/unit) in the herbal slimming products analyzed by TLC-image analysis and TLC-densitometry.

Samples (characteristics)	TLC-image analysis		TLC-densitometry	
	Amount (mg/unit)	% RSD	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.

differences ($P > 0.05$) between the contents of SH determined by TLC-image analysis and TLC-densitometry, suggesting that the proposed TLC-image analysis method can be used as an alternative to TLC-densitometry for quantification of SH in the complex matrix samples.

4. Conclusions

This is the first report of the validated TLC-image analysis method using a common computer technology for detection and quantitation of sibutramine as an illicit additive in so-called purely natural slimming preparations. Statistical analysis indicated that the amount of SH content determined by the TLC-image analysis and TLC-densitometric methods was comparable and varied from 6 to 24 mg per one single dosage. For those being unaware of taking the adulterated herbal products, serious cardiovascular effects may be developed depending on the amount of drug consumed and overused. The proposed TLC-image analysis method could therefore be useful and affordable to local authorities and small laboratories due to its simplicity, low operating cost and uses of inexpensive and general instruments to conduct surveillance programs for rapid detection and content determination of undeclared SH to ensure the safety of herbal slimming products.

Acknowledgements

The authors are thankful to Faculty of Pharmacy, Silpakom University for financial support of the project and Dr. Salakchit Chutipongvivate, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health for kindly providing the standard compounds.

References

- [1] R. Yuan, L. Yuan, Traditional Chinese medicine: an approach to scientific proof and clinical validation, *Pharmacol. Ther.* 86 (2000) 191–198.
- [2] G.M. Miller, R. Stripp, A study of western pharmaceuticals contained with samples of Chinese herbal/patent medicines collected from New York City's Chinatown, *Leg. Med.* 9 (2007) 258–264.
- [3] L.M. Carvalho, M. Martini, A.P.L. Moreira, A.P. Lima, C. Correia, T. Falcao, S.C. Garcia, A.V. Bairos, P.C. Nascimento, D. Bohrer, Presence of synthetic pharmaceuticals as adulterants in slimming phytotherapeutic formulations and their analytical determination, *Forensic Sci. Int.* 204 (2011) 6–12.
- [4] K. Lai, Y. Liu, M. Tseng, Y. Lin, J. Lin, Isolation and identification of a sibutramine analogue in a healthy food for weight loss, *J. Food Drug Anal.* 15 (2007) 20–24.
- [5] S. Kanan, I.A. Abu-Yousef, C. Gunasekar, N. Abdo, S. Narasimhan, Detection and quantification of synthetic drugs in herbal slimming formula, *Eur. J. Sci. Res.* 34 (2009) 348–357.
- [6] D. Muller, W. Weinmann, M. Hermanns-Clausen, Chinese slimming capsules containing sibutramine over the Internet – a case series, *Dtsch. Arztebl. Int.* 106 (2009) 218–222.
- [7] W.P.T. James, I.D. Caterson, W. Coutinho, N. Finer, L.F.V. Gaal, A.P. Maggioni, C. Torp-Pedersen, A.M. Sharma, G.M. Shepherd, R.A. Rode, C.L. Renz, Effect of sibutramine on cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects, *N. Engl. J. Med.* 363 (2010) 905–917.
- [8] J. Jung, M. Hermanns-Clausen, W. Weinmann, Anorectic sibutramine detected in a Chinese herbal drug for weight loss, *Forensic Sci. Int.* 161 (2006) 221–222.
- [9] Y.P. Yuen, C.K. Lai, W.T. Poon, S.W. Ng, A.Y.W. Chan, T.W.L. Mak, Adulteration of over-the-counter slimming products with pharmaceutical analogues – an emerging threat, *Hong Kong Med. J.* 13 (2007) 216–220.
- [10] T. Radhakrishna, C.L. Narayana, R.D. Sreenivas, K. Vyas, G.P. Reddy, LC method for the determination of assay and purity of sibutramine hydrochloride and its enantiomers by chiral chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22 (2000) 627–639.
- [11] M.J. Bogusz, H. Hassan, E. Al-Enazi, Z. Ibrahim, M. Al-Tufail, Application of LC-ESI-MS-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 554–564.
- [12] L. Ding, X. Hao, X. Huang, S. Zhang, Simultaneous determination of sibutramine and its N-desmethyl metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: method and clinical applications, *Anal. Chim. Acta* 492 (2003) 241–248.
- [13] L.M. Carvalho, M. Martini, A.P. Moreira, S.C. Garcia, P.C. Nascimento, D. Bohrer, Determination of synthetic pharmaceuticals in phytotherapeutics by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection (CZE-C4D), *Microchem. J.* 96 (2010) 114–119.
- [14] L. Feng, S. Li, J. Le, G. Chen, Y. Cao, Y. Qi, Y. Chai, Y. Wu, A new method for testing synthetic drugs adulterated in herbal medicines based on infrared spectroscopy, *Anal. Chim. Acta* 589 (2007) 200–207.
- [15] M. Prosek, I. Vovk, Basic principles of optical quantification in TLC, in: J. Sherma, B. Fried (Eds.), *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 2003, pp. 277–306.
- [16] M.J. Ansari, S. Ahmad, K. Kohli, J. Ali, R.K. Khar, Stability-indicating HPLC determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 132–138.

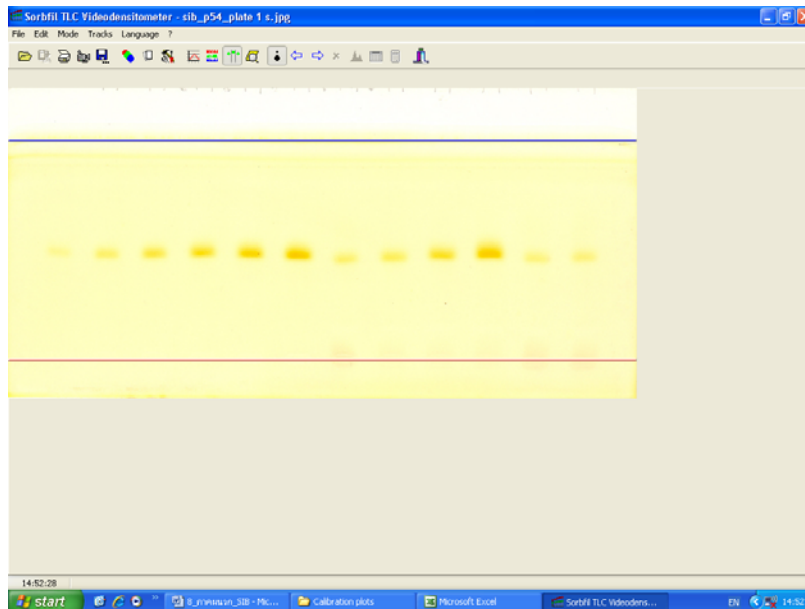
Please cite this article in press as: P. Phattanawasin, et al., Quantitative determination of sibutramine in adulterated herbal slimming formulations by TLC-image analysis method, *Forensic Sci. Int.* (2012), doi:10.1016/j.forsciint.2011.12.004

ข. ภาคผนวก I พารามิเตอร์สำหรับการสแกนแผ่น TLC ด้วยเครื่องเดสก์ท็อป CAMAG TLC scanner II with CAMAG CATS 3.1 software

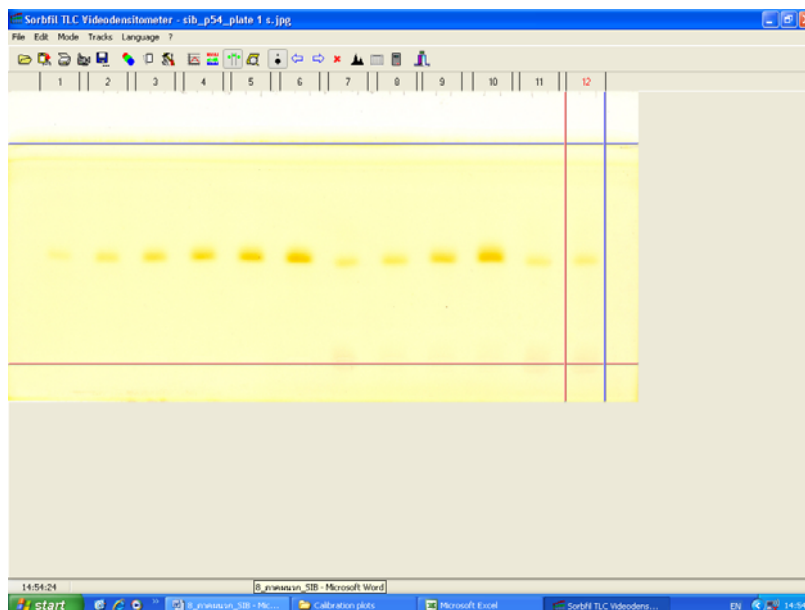
Start position X	ใส่ค่าที่เหมาะสมเพื่อเริ่มการสแกนในแกน X โดยต้องเป็นตำแหน่งที่ไม่มีจุดของสาร
Start position Y	7 mm
Y-position for 0 adjustment	7 mm
Application of Y	12.0 mm
End of track	82.0 mm
Distance between tracks	15.0 mm
Number of tracks	ใส่จำนวน track ที่ต้องการวิเคราะห์
Position of solvent front	82 mm
Scanning speed	4
Lamp	deuterium
Wavelength	225 nm
Sensitivity	automatic
Span	20
Sens/span optimization	no
Offset	30%
Absorbance/fluorescence	absorbance
Reflectance/transmittance	reflectance
0 adjustment for each track	no
Monochromator bandwidth	10
Slit width	6
Slit length	5
Optics	macro

ข. ภาคผนวก II ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลภาพด้วยโปรแกรม Sorbfil TLC Videodensitometer

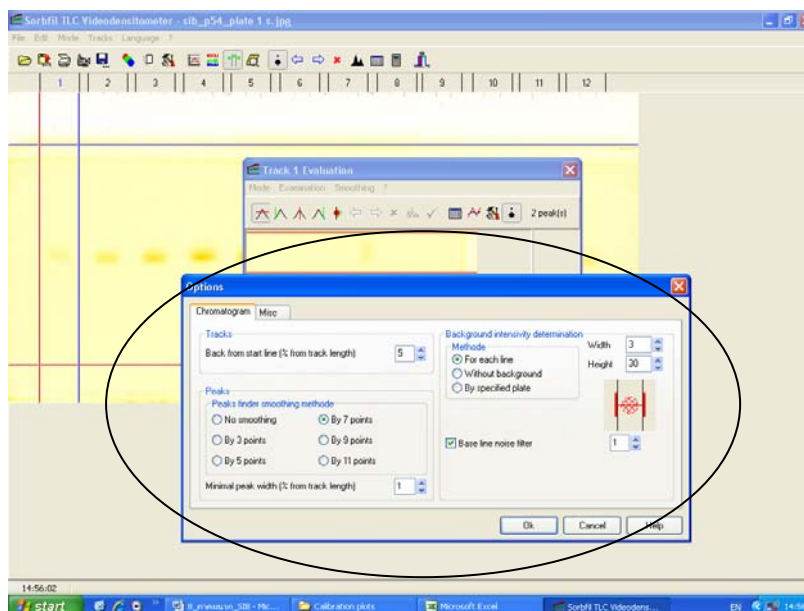
ก. เปิดโปรแกรม Sorbfil TLC Videodensitometer และเปิดไฟล์ภาพที่ต้องการวิเคราะห์ให้แสดงบนหน้าจอ



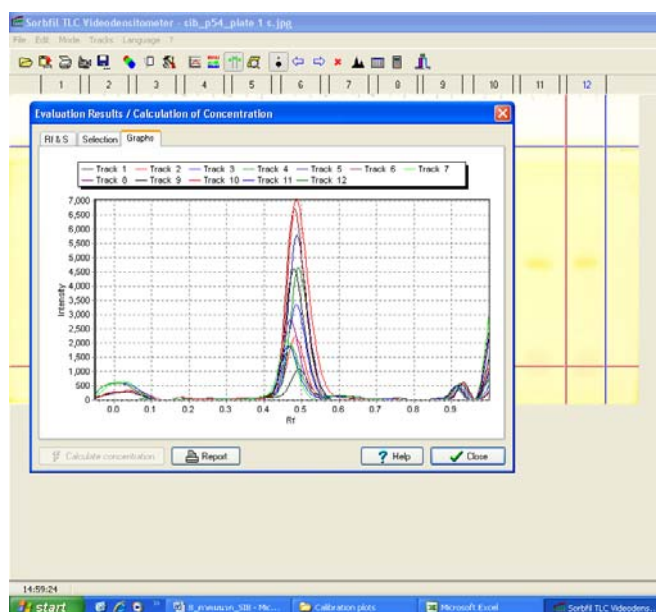
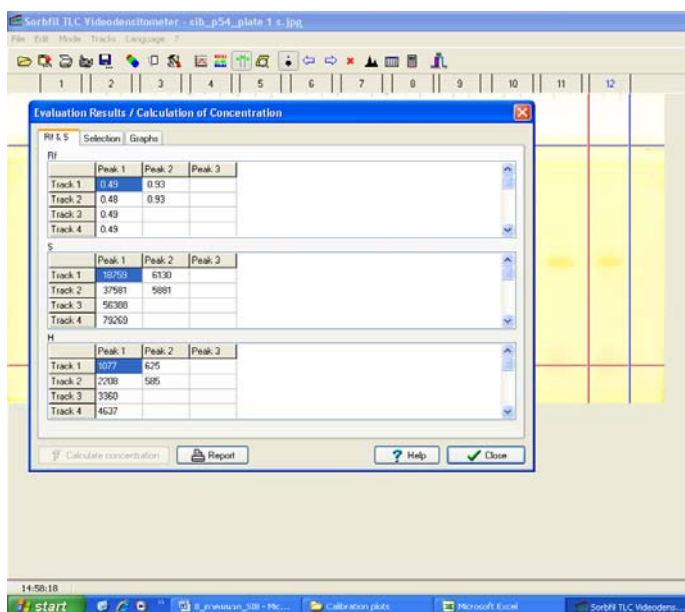
ข. ให้กำหนดเส้นเริ่ม (เส้นสีแดงแนวนอน) และเส้นฟรอนท์ (เส้นสีน้ำเงินแนวนอน) และกำหนดแถวที่ต้องการทำการประเมินผลโดยการเลือกโหมด Arrange track เพื่อระบุจำนวนแถวและขนาดความกว้างของแต่ละแถวให้เท่ากัน เส้นแสดงขอบแถวแต่ละแถวจะปรากฏขึ้นดังรูป



ค. เริ่มทำการประเมินผลจากแถวที่ 1 โดยกดเลือกคำสั่ง Process track จากเมนู Tracks เมื่อกดเลือกคำสั่งดังกล่าว หน้าจอจะแสดงหน้าต่างแสดงค่าผลการประเมินแถว โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ใน Options ดังที่วงไว้ในรูป (for each line method โดยตั้งค่า width และ height ที่ 3 และ 30 ตามลำดับ และค่า noise filtering ที่ 7)



ง. คลิก OK และ Next เพื่อทำการประเมินผลในแถวต่อ ๆ ไปจนหมด หน้าต่างแสดงผล ได้แก่ ค่า Rf พื้นที่ (S) และความสูง (H) ของพิกในแต่ละแถวจะปรากฏขึ้น นำค่าพื้นที่ที่ได้ไปใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณต่อไป หรือให้แสดงผลในรูปกราฟ



หมายเหตุ สามารถอ่านรายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับโปรแกรมได้ที่เว็บไซต์ www.sorbfil.com

รายงานการวิจัยเรื่อง การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ในการบ่งชี้ความคงสภาพและวิธีวิเคราะห์หาปริมาณของเซฟไตรอะโซนในยาฉีดด้วยวิธีรังคเลขผิวบาง ปนัตตา พัฒนาคิน อุทัย โสธนะพันธ์ ลาวัลย์ ศรีพงษ์ อินทรา กาญจนไพบูลย์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม พ.ศ. 2553

- ✓ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์
ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)

() ในประเทศ

✓ ต่างประเทศ Panadda Phattanawasin, Uthai Sotanaphun, Lawan Sriphong, and Intira Kanchanapaibool. (2011) Stability-indicating TLC-image analysis method for Quantification of Ceftriaxone Sodium in Pharmaceutical Dosage Forms. Journal of Planar Chromatography 24 (1): 30-34.

Panadda Phattanawasin, Uthai Sotanaphun, Lawan Sriphong, Inthira Kanchanaphibool and Nussara Piyapolrunroj (2011) A Comparison of Image Analysis Software for Quantitative TLC of Ceftriaxone Sodium. SUSTJ 5(1): 7-13.

เรื่องที่ 2

1. ชื่อเรื่อง การตรวจวัดปริมาณของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชันด้วยวิธีรังคเลขผิวบางโดยใช้เทคนิคเชิงภาพ
Quantitative determination of curcuminoids in *Curcuma longa* Linn by thin layer chromatography using Imaging technique

2. ลักษณะโครงการ / ผลงาน ☐ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ ☒ คณะบุคคล/กลุ่ม ☐ เป็นหัวหน้า ☒ เป็นผู้ร่วม

3. สาขาวิชา กลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเภสัชวิเคราะห์

4. จำนวนงบประมาณ 400,000 บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย ตั้งแต่ปี พ.ศ 2546 ถึงปี พ.ศ 2548

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

✓ ในประเทศ

☐ ภาครัฐ ☐ คณะวิชา ☒ มหาวิทยาลัย ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ)

☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ)

☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ)

6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว

☐ ยังไม่ได้เผยแพร่

✓ เผยแพร่แล้ว

รายงานการวิจัยเรื่อง การตรวจวัดปริมาณของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชันด้วยวิธีรังคเลขผิวบางโดยใช้เทคนิคเชิงภาพ ลาวัลย์ ศรีพงษ์ ปนัตตา พัฒนาคิน อุทัย โสธนะพันธ์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม พ.ศ. 2546

- ✓ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์
ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)

() ในประเทศ

✓ ต่างประเทศ Uthai Sotanaphun, Panadda Phattanawasin and Lawan Sriphong (2009) Application of Scion image software to the simultaneous determination of curcuminoids in turmeric (*Curcuma longa*). Phytochemical analysis 20(1): 19-23

Panadda Phattanawasin, Lawan Sriphong, and Uthai Sotanaphun (2009) Validated TLC Image Analysis Method for Simultaneous Quantification of Curcuminoids in *Curcuma longa*. Chromatographia 69 (3): 397-400

- ✓ ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน (โปรดระบุ ชื่อเรื่อง /

ชื่อผู้นำเสนอ / สถานที่จัด / วัน เดือน ปีที่นำเสนอ)

✓ ในประเทศ ปณิดดา พัฒนาคิน (2550) โครงการสัมมนาเรื่องความก้าวหน้าทางเภสัชเคมี 2: การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เภสัชภัณฑ์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร 23-24 ก.ค.

✓ ต่างประเทศ Lawan Sriphong, Panadda Phattanawasin, Uthai Sotanaphun (2006) A convenient TLC method for the quality control of turmeric. *Planta Medica* 72(11): 1056-1056; September

Lawan Sripong, Panadda Yaipakdee, Uthai Sotanaphun (2005) Curcuminoid fingerprint of *Curcuma longa* Linn. XVII International Botanical Congress, Austria Center Vienna, Vienna, Austria, 17-23 July

เรื่องที่ 3

1. ชื่อเรื่อง การจำแนกและหาโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ต้านวัชพืชจากรา *Aspergillus fischeri* TISTR 3272

Isolation and structure elucidation of herbicidal compounds from *Aspergillus fischeri* TISTR 3272.

2. ลักษณะโครงการ / ผลงาน ☐ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ ☒ คณะบุคคล/กลุ่ม ☒ เป็นหัวหน้า ☐ เป็นผู้ร่วม

3. สาขาวิชา กลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเภสัชวิเคราะห์

4. จำนวนงบประมาณ 150,000 บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย ตั้งแต่ปี พ.ศ 2548 ถึงปี พ.ศ 2550

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

✓ ในประเทศ

☐ ภาควิชา ☐ คณะวิชา ☒ มหาวิทยาลัย ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ)

☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ)

☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ)

6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว

☐ ยังไม่ได้เผยแพร่

✓ เผยแพร่แล้ว

รายงานการวิจัยเรื่อง การจำแนกและหาโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ต้านวัชพืชจากรา *Aspergillus fischeri* TISTR 3272 ปณิดดา พัฒนาคิน คณาภรณ์ พจนาคมน มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม พ.ศ. 2551

✓ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์ / ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)

☐ ในประเทศ

✓ ต่างประเทศ Panadda Phattanawasin, Kanawan Pojchanokom, Uthai Sotanaphun,

Nusara Piyapolrunroj, Siriporn Zungsontiporn (2007) Weed growth inhibitors from *Aspergillus fischeri* TISTR 3272. *Natural Product Research* 21(14): 1286-1291; December

☐ ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน (โปรดระบุ ชื่อเรื่อง / ชื่อผู้นำเสนอ / สถานที่จัด / วัน เดือน ปีที่นำเสนอ)

☐ ในประเทศ

☐ ต่างประเทศ

เรื่องที่ 4

- ชื่อเรื่อง การตรวจหาเดกซาเมทาโซนในยาลูกกลอนกึ่งปริมาณโดยวิธีรังเคลหิวบาง
Semiquantitative TLC determination of dexamethasone in herbal pills
- ลักษณะโครงการ / ผลงาน ☐ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ ☒ คณะบุคคล/กลุ่ม ☐ เป็นหัวหน้า ☒ เป็นผู้ร่วม
- สาขาวิชา กลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเภสัชวิเคราะห์
- จำนวนงบประมาณ 50,000 บาท
ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 ถึงปี พ.ศ. 2544
- ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน
☒ ในประเทศ
☐ ภาควิชา ☒ คณะวิชา ☐ มหาวิทยาลัย ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ)
☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ)
☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ)
- การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว
☐ ยังไม่ได้เผยแพร่
☒ เผยแพร่แล้ว
รายงานการวิจัยเรื่อง ลาวัลย์ ศรีพงษ์ ปนัดดา ไยภักดี สุรีย์ บุญเจริญ การตรวจหาเดกซาเมทาโซนในยา
ลูกกลอนกึ่งปริมาณโดยวิธีรังเคลหิวบาง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม พ.ศ. 2545
☐ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์
ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)
☐ ในประเทศ
☐ ต่างประเทศ
☒ ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน (โปรดระบุ ชื่อเรื่อง /
ชื่อผู้นำเสนอ / สถานที่จัด / วัน เดือน ปีที่นำเสนอ)
☒ ในประเทศ Panadda Yaipakdee, Suree Boon-Chareon, Lawan Sriphong (2004)
Quantitative TLC determination of dexamethasone using imaging analysis. The 20th FAPA Congress,
Bangkok, Thailand, 30 Nov-3 Dec
☐ ต่างประเทศ

เรื่องที่ 5

- ชื่อเรื่อง การทดสอบฤทธิ์ต้านวัชพืชของสารสกัดจากเชื้อรา
Herbicidal Activity Screening Test of Fungal Crude Extracts
- ลักษณะโครงการ / ผลงาน ☐ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ ☒ คณะบุคคล/กลุ่ม ☒ เป็นหัวหน้า ☐ เป็นผู้ร่วม
- สาขาวิชา กลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเภสัชวิเคราะห์
- จำนวนงบประมาณ 60,000 บาท
ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 ถึงปี พ.ศ. 2547
- ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน
☒ ในประเทศ
☐ ภาควิชา ☐ คณะวิชา ☒ มหาวิทยาลัย ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ)
☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ)

- ☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ)
6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว
- ☐ ยังไม่ได้เผยแพร่
- ☒ เผยแพร่แล้ว
- รายงานการวิจัยเรื่อง ปันดดา ไยภักดี คณาวรรณ พจนาคม การทดสอบฤทธิ์ต้านวัชพืชของสารสกัดจากเชื้อรา
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม พ.ศ. 2547
- ☒ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์
ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)
- ☒ ในประเทศ Panadda Phattanawasin, Kanawan Pochanakom, Nusara Piyapolrunroj,
Uthai Sotanaphun, Siriporn Zungsontiporn (2006) Screening of fungal extracts for weed germination and
growth inhibitory activity. *Silpakorn University International Journal* 6(1-2): 136-144
- ☐ ต่างประเทศ
- ☐ ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน (โปรดระบุ ชื่อเรื่อง /
ชื่อผู้นำเสนอ / สถานที่จัด / วัน เดือน ปีที่นำเสนอ)
- ☐ ในประเทศ
- ☐ ต่างประเทศ

เรื่องที่ 6

1. ชื่อเรื่อง การตรวจหาเชื้อราที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพ
Screening for antimicrobial activity from fungal extracts
2. ลักษณะโครงการ / ผลงาน ☐ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ
☒ คณะบุคคล/กลุ่ม ☐ เป็นหัวหน้า ☒ เป็นผู้ร่วม
3. สาขาวิชา กลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเภสัชวิเคราะห์
4. จำนวนงบประมาณ 50,000 บาท
ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 ถึงปี พ.ศ. 2546
5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน
☒ ในประเทศ
☐ ภาควิชา ☒ คณะวิชา ☐ มหาวิทยาลัย ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ)
☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ)
- ☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ)
6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว
- ☐ ยังไม่ได้เผยแพร่
- ☒ เผยแพร่แล้ว
- รายงานการวิจัยเรื่อง การตรวจหาเชื้อราที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพ คณาวรรณ พจนาคม ปันดดา ไยภักดี คณะ
เภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม พ.ศ. 2545
- ☐ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์
ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)
- ☐ ในประเทศ
- ☐ ต่างประเทศ
- ☒ ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน (โปรดระบุ ชื่อเรื่อง /
ชื่อผู้นำเสนอ / สถานที่จัด / วัน เดือน ปีที่นำเสนอ)

✓ ในประเทศ Panadda Yaipakdee, Kanawan Pochanakom (2004) Screening for antimicrobial activity from fungal extracts. The sixth JSPS-NRCT Joint seminar, Bangkok, Thailand, December 2004

() ต่างประเทศ

เรื่องที่ 7

1. ชื่อเรื่อง การศึกษาการใช้เอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาฮาโลจีเนชันของสารฟลาโวนอยด์
Studies of Enzymatic Halogenation of Flavonoids

2. ลักษณะโครงการ / ผลงาน ✓ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ
○ คณะบุคคล/กลุ่ม □ เป็นหัวหน้า □ เป็นผู้ร่วม

3. สาขาวิชา กลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเภสัชวิเคราะห์

4. จำนวนงบประมาณ 200,000 บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 ถึงปี พ.ศ. 2544

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

✓ ในประเทศ

□ ภาควิชา □ คณะวิชา □ มหาวิทยาลัย □ อื่นๆ (โปรดระบุ)

✓ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ)

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

○ ต่างประเทศ (โปรดระบุ)

6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว

○ ยังไม่ได้เผยแพร่

✓ เผยแพร่แล้ว

รายงานการวิจัยเรื่อง ปันดดา ไยภักดี การศึกษาการใช้เอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาฮาโลจีเนชันของสารฟลาโวนอยด์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม พ.ศ. 2544

✓ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์
ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)

() ในประเทศ

✓ ต่างประเทศ Panadda Yaipakdee and Larry W. Robertson (2001) Enzymatic Halogenation of Flavanones and Flavones. *Phytochemistry* 57: 341-347

ประวัติผู้ร่วมวิจัยร่วม

1. ชื่อ - สกุล (นาย) อุทัย โสธนะพันธุ์

Mr. Uthai Sotanaphun

2. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

3. สถานที่ทำงาน

ภาควิชา เภสัชเวท คณะ เภสัชศาสตร์

โทรศัพท์ 034-255800

โทรสาร 034-255801

e-mail address uthai@email.pharm.su.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

- ปริญญาตรีสาขา เภสัชศาสตร์ สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีจบ 2530

- ปริญญาโทสาขา เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต (เภสัชพฤกษศาสตร์) สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีที่จบ 2533

- ปริญญาเอกสาขา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ)

สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีที่จบ 2540

7. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา

- ระดับปริญญาโท

ชื่อเรื่อง Phytochemical study of *Stychnos minor* Denst. stem

ปีที่ดำเนินการ 2532-2533

- ระดับปริญญาเอก

ชื่อเรื่อง Bioactive compounds from *Glyptopetalum sclerocarpum* stem bark

ปีที่ดำเนินการ 2536-2539

8. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา ตอบได้มากกว่า 1 ข้อ) โปรดระบุแขนงวิชา

และแนวเรื่องย่อยด้วย (ถ้ามี)

3.) สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช 3.14 เภสัชเวท

ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ทางด้านศิลปะและการออกแบบที่ดำเนินการเสร็จแล้ว

เรื่องที่ 1

- ชื่อเรื่อง สารต้านเชื้อไวรัสริมจากเปลือกผลตุมกาแดง
Chemical constituents with anti-herpetic activity from the pericarp of *Glyptopetalum sclerocarpum* Laws.

- ลักษณะโครงการ / ผลงาน ✓ คณะบุคคล/กลุ่ม ✓ เป็นหัวหน้า

- สาขาวิชาสาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช กลุ่มวิชาเภสัชเวท

- จำนวนงบประมาณ 400,000 บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 ถึงปี พ.ศ.2545

- ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

○ ในประเทศ

☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ) สกว

- การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว

✓ เผยแพร่แล้ว

✓ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์
ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)

✓ ต่างประเทศ

1. Uthai Sotanaphun, Vimolmas Lipipun, Panadda Yaipakdee, Rapeepol Bavovada (2005) New acidic-rearranged compounds from tingenone derivatives and their biological activity. *Pharmaceutical Biology* 43, 39-46

2. Uthai Sotanaphun, Vimolmas Lipipun, Rapeepol Bavovada (2004) Constituents of the pericarp of *Glyptopetalum sclerocarpum*. *Fitoterapia* 75, 606-608

✓ ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน (โปรดระบุ ชื่อเรื่อง / ชื่อผู้นำเสนอ / สถานที่จัด / วัน เดือน ปีที่นำเสนอ)

✓ ต่างประเทศ

1. Uthai Sotanaphun, Vimolmas Lipipun, Rapeepol Bavovada (20-23 Oct. 2001)
Phenolic-(9→8)-D:A-friedo-24-noroleananes : A new class of antiviral agents.
Pharma Indochina II. Hanoi, Vietnam

เรื่องที่ 2

1. ชื่อเรื่อง การตรวจวัดปริมาณของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชันด้วยวิธีรังสีเลเซอร์ โดยใช้นาฬิกา
Quantitative Determination of Curcuminoids in *Curcuma longa* Linn. by Thin Layer
Chromatography using Imaging Technique
2. ลักษณะโครงการ / ผลงาน ✓ คณะบุคคล/กลุ่ม ✓ เป็นผู้ร่วม
3. สาขาวิชา สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช กลุ่มวิชาเภสัชเวช
4. จำนวนงบประมาณ 400,000 บาท
ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ.2546 ถึงปี พ.ศ.2547
5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน
✓ ในประเทศ
✓ มหาวิทยาลัยศิลปากร สถาบันวิจัยและพัฒนา
6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว
○ ยังไม่ได้เผยแพร่
✓ เผยแพร่แล้ว
รายงานการวิจัยเรื่อง การตรวจวัดปริมาณของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชันด้วยวิธีรังสีเลเซอร์โดยใช้นาฬิกา
เทคนิคเชิงภาพ ลาวลีย์ ศรีพงษ์ ปันดดา พัฒนาคิน อุทัย ไสธนะพันธ์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม พ.ศ. 2546
✓ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์
ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)
○ ในประเทศ
✓ ต่างประเทศ Uthai Sotanaphun, Panadda Phattanawasin and Lawan Sriphong
(2009) Application of Scion image software to the simultaneous determination of curcuminoids in
turmeric (*Curcuma longa*). *Phytochemical analysis* 20(1): 19-23
Panadda Phattanawasin, Lawan Sriphong, and Uthai Sotanaphun (2009) Validated TLC
Image Analysis Method for Simultaneous Quantification of Curcuminoids in *Curcuma longa*.
Chromatographia 69 (3): 397-400
✓ ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน (โปรดระบุ ชื่อเรื่อง /
ชื่อผู้นำเสนอ / สถานที่จัด / วัน เดือน ปีที่นำเสนอ)
✓ ในประเทศ ปันดดา พัฒนาคิน (2550) *โครงการสัมมนาเรื่องความก้าวหน้าทางเภสัชเคมี 2: การ
พัฒนาวิธีวิเคราะห์เภสัชภัณฑ์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร* 23-24 ก.ค.
✓ ต่างประเทศ Lawan Sriphong, Panadda Phattanawasin, Uthai Sotanaphun (2006) A
convenient TLC method for the quality control of turmeric. *Planta Medica* 72(11): 1056-1056;
September
Lawan Sriphong, Panadda Yaipakdee, Uthai Sotanaphun (2005) Curcuminoid fingerprint
of *Curcuma longa* Linn. *XVII International Botanical Congress*, Austria Center Vienna, Vienna, Austria,
17-23 July

เรื่องที่ 3

1. ชื่อเรื่อง การพัฒนาชุดทดสอบเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน

Development of testkit for determination of curcuminoids in turmeric

2. ลักษณะโครงการ / ผลงาน ✓ คณะบุคคล/กลุ่ม ✓ เป็นหัวหน้า
3. สาขาวิชา สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช กลุ่มวิชาเภสัชเวช
4. จำนวนงบประมาณ 100,000 บาท
ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 ถึงปี พ.ศ.2548
5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน
✓ ในประเทศ
✓ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว
✓ เผยแพร่แล้ว
☐ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์
ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)
✓ ในประเทศ Uthai Sotaphun, Tawatchai Phaechemud, P. Dechwisissakul Rapid screening method for curcuminoid content in turmeric (*Curcuma longa* Linn.). *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal* (In press)

เรื่องที่ 4

1. ชื่อเรื่อง การศึกษาความรู้เกี่ยวกับสมุนไพรและระบบการแพทย์แผนไทยในการบำบัดรักษาเยสพิตดในประเทศไทย: ภาคกลาง
2. ลักษณะโครงการ / ผลงาน ✓ คณะบุคคล/กลุ่ม ✓ เป็นหัวหน้า
3. สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ กลุ่มวิชาสังคมศาสตร์การแพทย์
4. จำนวนงบประมาณ 40,000 บาท
ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548
5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน
✓ ในประเทศ
✓ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ) สำนักงานป้องกันและปราบปรามยาเสพติด
6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว
✓ เผยแพร่แล้ว
✓ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์
ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)
✓ ในประเทศ สุนทรี วิทยานารถไพศาล และคณะ. รายงานการศึกษาความรู้เกี่ยวกับสมุนไพรและระบบการแพทย์แผนไทยในการบำบัดรักษาเยสพิตดในประเทศไทย. สำนักงาน ปปส. กระทรวงยุติธรรม. 2549.
✓ ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน (โปรดระบุ ชื่อเรื่อง / ชื่อผู้นำเสนอ / สถานที่จัด / วัน เดือน ปีที่นำเสนอ)
✓ ในประเทศ สุนทรี วิทยานารถไพศาล และคณะ. สมุนไพรและการแพทย์แผนไทยในการบำบัดรักษาเยสพิตด. (4-6 กรกฎาคม 2548). การประชุมวิชาการระหว่างประเทศ (ไทย-จีน) เรื่องสมุนไพรกับการบำบัดรักษาเยสพิตด. กรุงเทพฯ.

เรื่องที่ 5

1. ชื่อเรื่อง มาตรฐานสมุนไพร กระเจี๊ยบแดง
Herbal standard of *Hibiscus sabdariffa* Linn.
2. ลักษณะโครงการ / ผลงาน ✓ คณะบุคคล/กลุ่ม ✓ เป็นหัวหน้า
3. สาขาวิชา สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช กลุ่มวิชาเภสัชเวช

4. จำนวนงบประมาณ 200,000 บาท
ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 ถึงปี พ.ศ.2549
5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน
 - ✓ ในประเทศ
 - ✓ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว
 - ✓ เผยแพร่แล้ว
 - ✓ ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน (โปรดระบุ ชื่อเรื่อง / ชื่อผู้นำเสนอ / สถานที่จัด / วัน เดือน ปีที่นำเสนอ)
 - ✓ ในประเทศ Tasamaporn Sukwattanasinit, Jankana Burana-osot, Uthai Sotanaphun (14-17 November 2005). Quantitative analysis of total anthocyanins in calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. The 2nd AASP symposium and APEM conference 2005: Regional cooperation in pharmacy education, research and services. Bangkok, Thailand, p.165

เรื่องที่ 6

1. ชื่อเรื่อง การผลิตเพคตินจากเปลือกผลส้มโอและการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยา (โครงการที่ 1: การพัฒนาการผลิตเพคตินจากเปลือกผลส้มโอ)
Production of pectin from pomelo peel and application in pharmaceutical industry
(Project 1: Development for the production of pectin from pomelo (*Citrus maxima*) peel)
2. ลักษณะโครงการ / ผลงาน ✓ คณะบุคคล/กลุ่ม ✓ เป็นหัวหน้า โครงการที่ 1
3. สาขาวิชา สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช กลุ่มวิชาเภสัชเวช
4. จำนวนงบประมาณ 846,600 บาท
ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ.2547 ถึงปี พ.ศ.2550
5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน
 - ✓ ในประเทศ
 - ✓ มหาวิทยาลัยศิลปากร สถาบันวิจัยและพัฒนา
6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว
 - ✓ เผยแพร่แล้ว
 - ✓ ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน (โปรดระบุ ชื่อเรื่อง / ชื่อผู้นำเสนอ / สถานที่จัด / วัน เดือน ปีที่นำเสนอ)
 - ✓ ในประเทศ Uthai Sotanaphun, Amornrat Chaidedgumjorn, Nuchanat Kitcharoen, Panida Asavapichayont, Malai Satiraphan, Pornsak Sriamornsak (14-15 December 2006). Effect of cultivar and post-harvesting period on yield and properties of pectins from pomelo. 23rd Annual research conference in pharmaceutical sciences & JSPS 1st medicinal chemistry seminar of Asia/Africa science platform program. Bangkok, Thailand. (Thai J. Pharm.Sci. 30 (suppl.), PN-29, 2006.)

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ – สกุล (นางสาว) ทสมพร สุขวัฒนาสินธิ์
Tasamaporn Sukwattanasinit
2. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน อาจารย์
3. สถานที่ทำงาน
ภาควิชา เภสัชเวช คณะ เภสัชศาสตร์

โทรศัพท์ 034-255-800 โทรสาร 034-255-801

e-mail address tasamaporn@su.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

- ปริญญาตรีสาขา เกษศาตร์ สถาบัน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีที่จบ พ.ศ. 2544
- ปริญญาโทสาขา -
- ปริญญาเอกสาขา เกษศาตร์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบัน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีที่จบ พ.ศ. 2552

5. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา (ชื่อเรื่อง/ปีทำการ ทักษะระดับปริญญาโทและปริญญาเอก)

- ระดับปริญญาเอก
ชื่อเรื่อง Application of Chemometrics for Quality Control of Hibiscus sabdariffa AL
ปีทำการ พ.ศ. 2541

8. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ

สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช แขนงวิชา เกษศาตร์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

ผลงานวิจัยที่ดำเนินการเสร็จแล้ว และผลงานวิจัยที่กำลังดำเนินการ -

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ – สกุล (นางสาว) จริญญา อัครวรันธร

Jarinya Akkarawarantorn

2. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน เกษศาตร์ชำนาญการ

3. สถานที่ทำงาน

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 ชลบุรี

โทรศัพท์. 034-255-800 โทรสาร 034-255-801

e-mail address nun018@hotmail.com

4. ประวัติการศึกษา

- ปริญญาตรีสาขา เกษศาตร์ สถาบัน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีที่จบ พ.ศ. 2544
- ปริญญาโทสาขา -
- ปริญญาเอกสาขา -

5. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ

สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช แขนงวิชา เกษศาตร์วิเคราะห์

ผลงานวิจัยที่ดำเนินการเสร็จแล้ว

จริญญา แซ่แพ และศรัณพร กิจไชยา. ความเสถียรการใช้สีห้ามใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางทาเปลือกตาและลิปสติกในเขต
ภาคตะวันออก วารสารอาหารและยา ฉบับที่ 1/2551 เดือนมกราคม-เมษายน 2551 หน้า 48-52

ผลงานวิจัยที่กำลังดำเนินการ -