



การพัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณไซบูทรามินในกาแฟลดน้ำหนัก ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี
ของเหลวสมรรถนะสูง โดยมีตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอาร์เรย์ (HPLC-DAD)

Method Development for Quantitative Determination of Sibutramine
in Slimming Coffee by HPLC-DAD

สุชาดา บุญนิยม* และวรณันท์ เหล็กเพชร
Suchada Boonniyom* and Woranan Lekphet

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ อำเภอมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
Program Study of Science, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi,
Muang, Nonthaburi 11000, Thailand

*Corresponding author, e-mail: suchada.bo@rmutsb.ac.th

(Received: May 26, 2020; Revised: Oct 16, 2020; Accepted: May 31, 2021)

บทคัดย่อ

ไซบูทรามิน เป็นหนึ่งในสารต้องห้ามที่ไม่อนุญาตให้มีในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารลดน้ำหนัก สารนี้มีผลข้างเคียงต่อสุขภาพของผู้บริโภค เช่น ความเจ็บป่วยทางจิต และภาวะหัวใจล้มเหลว ดังนั้นวิธีที่ใช้ตรวจหาปริมาณไซบูทรามินจึงมีความสำคัญ ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยมีตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอาร์เรย์ (HPLC-DAD) สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณสารไซบูทรามินในกาแฟลดน้ำหนัก สภาวะการแยกสาร ประกอบด้วยคอลัมน์ C18 และใช้สารละลายแอมโมเนียมแอซิเตท ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ และอะซิโตนไทรล์เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยมีระบบการแยกชนิดปรับสัดส่วนตามเวลา ด้วยอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ความยาวคลื่นที่ตรวจวัด 230 นาโนเมตร จากผลการวิจัยพบว่า เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 10 นาที ค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.5 - 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.998 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถอ่านค่าได้อย่างถูกต้อง (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.1 และ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าความเที่ยงอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นสามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไซบูทรามินในตัวอย่างกาแฟลดน้ำหนัก โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืน มากกว่า 84% ที่ระดับความเข้มข้นที่ศึกษา

คำสำคัญ : ไซบูทรามิน โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง กาแฟลดน้ำหนัก

Abstract

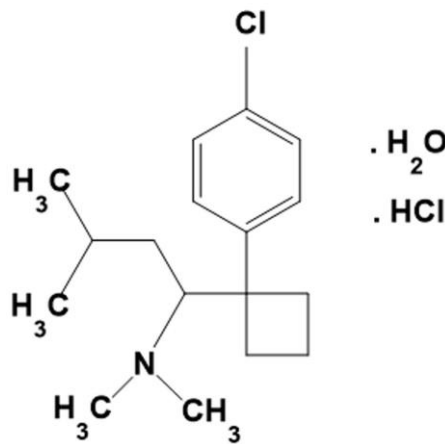
Sibutramine is one of prohibited substances that is not allowed to contain in dietary supplements for weight loss. It can cause severe side effects in consumer health including mental illness and cardiovascular failure. Therefore, the screening method for sibutramine analysis is crucial. In this research, high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) was developed for determination of sibutramine in slimming coffee. Chromatographic condition consisted of C18 column with gradient elution using 0.025 M ammonium acetate and acetonitrile as the mobile phase with flow rate 0.5 mL/min. The detection wavelength was 230 nm. The obtained results showed that the total time for analysis was 10 min. The linearity was in the range of 0.5 - 50 µg/mL with a coefficient of determination 0.998. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were 0.1 and 0.5 µg/mL, respectively. The precision was within the acceptable range. The method has been applied successfully to determine sibutramine in slimming coffee with mean recoveries more than 84% at spiking concentrations.

Keywords: Sibutramine, HPLC, Slimming coffee

บทนำ

สุขภาพร่างกายที่สมบูรณ์แข็งแรง จะส่งผลดีต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ ด้วยเหตุนี้ปัญหาสุขภาพและโรคภัยจึงเป็นสิ่งที่มนุษย์ควรให้ความตระหนัก ในปัจจุบันโรคอ้วนหรือน้ำหนักตัวเกิน จัดเป็นโรคหนึ่งที่ทำให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพที่พบได้ทุกเพศ ทุกวัย โดยทางองค์การอนามัยโลกได้ให้นิยาม โรคอ้วน คือ ภาวะที่ร่างกายมีการสะสมไขมันส่วนต่าง ๆ ของร่างกายเกินปกติ จนเป็นปัจจัยเสี่ยงทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ตามมา เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคข้อเสื่อม โรคเบาหวาน เป็นต้น ดังนั้นวิธีการป้องกันการเกิดโรคอ้วนและน้ำหนักเกิน คือ การลดน้ำหนัก ผ่านทางการควบคุมปริมาณอาหาร การปรับเปลี่ยนพฤติกรรมและการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ (World Health Organization, 2020, online) แต่อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวข้างต้นอาจไม่เป็นที่พึงประสงค์สำหรับบางคน เนื่องจากไม่ชอบออกกำลังกาย ไม่สามารถควบคุมตัวเองให้ปฏิบัติได้อย่างเคร่งครัด และใช้เวลานานกว่าจะเห็นผลลัพธ์ ทำให้หลายคนเลือกที่จะใช้ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารมาเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการแก้ปัญหาการลดน้ำหนัก

ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารลดน้ำหนัก ได้รับความสนใจและเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวางเนื่องจากสามารถหาซื้อได้ง่ายตามท้องตลาดและตามสื่อออนไลน์ต่าง ๆ ซึ่งจะพบเห็นในหลายลักษณะ เช่น ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในรูปแคปซูล ผงบุงกาแฟ ชาสมุนไพรต่าง ๆ ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะไม่เป็นอันตรายเลยหากมีส่วนประกอบที่มาจากธรรมชาติทั้งหมด (Cebi *et al.*, 2017, pp. 517-526) แต่ในปัจจุบันกลับพบว่าผู้ผลิตรายต้องการที่จะเพิ่มยอดขายให้กับสินค้าของตนเอง โดยดึงดูดผู้บริโภคให้เห็นถึงประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการลดน้ำหนักอันเห็นผลที่รวดเร็ว โดยได้กล่อมปาลอมปนกลุ่มยาลดน้ำหนักลงในผลิตภัณฑ์ ซึ่งยาที่ปาลอมปนนี้อาจส่งผลข้างเคียงและอาจเกิดอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ จากสถานการณ์ที่ผ่านมาพบว่า มีการลักลอบใส่สารปาลอมปนไซบูทรามินในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารลดน้ำหนักประเภทต่าง ๆ รวมถึงกาแฟซึ่งจัดเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่คนส่วนใหญ่คุ้นเคยและนิยมดื่ม โดยมักโฆษณาชวนเชื่อว่าผลิตภัณฑ์กาแฟนี้ช่วยในเรื่องการเผาผลาญพลังงาน โดยผู้บริโภคไม่ทราบถึงความเสี่ยงของยาชนิดนี้ ที่ทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยจนถึงการเสียชีวิตตามมา (Morris & Nguyen, 2018, online)



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของไซบูทรามิน ไฮโดรคลอไรด์ โมโนไฮเดรต

ไซบูทรามิน (Sibutramine) เป็นยาต้านอาการซึมเศร้าที่มีฤทธิ์ลดความอยากอาหารได้ มักจะอยู่ในรูปของเกลือไฮโดรคลอไรด์ โมโนไฮเดรต ยานี้มีสูตรโครงสร้าง แสดงดังภาพที่ 1 ซึ่งมีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกับสารแอมเฟตามีน กลไกการออกฤทธิ์ของยาไซบูทรามิน คือ ยับยั้งการเก็บกักของสารสื่อประสาทซีโรโทนิน (Serotonin) และนอร์อีพิเนฟริน (Norepinephrine) ที่สมองส่วนไฮโปธาลามัส (Hypothalamic area) ส่งผลให้ความอยากรับประทานอาหารลดน้อยลงและอิ่มเร็วขึ้น รวมทั้งสามารถกระตุ้นกระบวนการเผาผลาญของร่างกายได้มากขึ้น (An *et al.*, 2013, pp. 7-12) โดยค่าปริมาณไซบูทรามินที่แนะนำให้ใช้ได้โดยทั่วไป คือ 10 - 15 มิลลิกรัมต่อวัน (Arterburn *et al.*, 2004, pp. 994-1003) แต่อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันยานี้ถูกถอนออกจากตลาดในยุโรป สหรัฐอเมริกา และอีกหลายประเทศ รวมถึงประเทศไทย เนื่องจากยานี้นี้จะส่งผลข้างเคียง คือ มีอาการประสาทหลอน นอนไม่หลับ เบื่ออาหาร จนถึงภาวะหัวใจล้มเหลว ถึงแม้ว่าไซบูทรามินจะถูก

เพิกถอนออกจากท้องตลาด แต่ยังคงพบว่าผลิตภัณฑ์เสริมอาหารยังมีการปลอมปนยาชนิดนี้อยู่ เนื่องจากผู้บริโภคยังคงสามารถซื้อผลิตภัณฑ์ที่ปลอมปนยาชนิดนี้ได้จากตลาดมืดหรือร้านทางอินเทอร์เน็ต

จากปัญหาดังกล่าวข้างต้น จึงมีความจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และน่าเชื่อถือเพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณไซบูทรามินในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารกาแฟลดน้ำหนัก เพื่อช่วยสร้างความเชื่อมั่นและไว้วางใจให้แก่ประชาชนผู้บริโภค จากรายงานที่ผ่านมา ได้มีการวิเคราะห์หาปริมาณไซบูทรามินด้วยวิธีต่าง ๆ ดังนี้ วิธีทางโครมาโทกราฟี ได้แก่ ลิกวิดโครมาโทกราฟี เช่น โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC-DAD) (Hammadi & Almardini, 2014, pp. 171-174) และโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงพิเศษ (UHPLC) (Rebiere *et al.*, 2012, pp. 161-171) รวมถึงแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) (Popescu & Radu, 2015, pp. 221-230) วิธีทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ ฟลูออโรเมตริกอินฟราเรด สเปกโทรสโกปี (FTIR) และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR) (Cebi *et al.*, 2017, pp. 517-526; De Carvalho *et al.*, 2011, pp. 6-12; Csupor *et al.*, 2013, pp. 15-18) รวมทั้งวิธีทางเคมีไฟฟ้า ได้แก่ ดิฟเฟอร์เรนเชียลพัลส์โวลแทมเมตริก (Carvalho *et al.*, 2012, pp. 988-992) ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อจำกัดที่แตกต่างกันในด้านเวลา ค่าใช้จ่าย ปริมาณที่ตรวจวัดได้ และความซับซ้อนของเครื่องมือทดสอบ อย่างไรก็ตาม เทคนิคที่ได้รับความสนใจและน่าเชื่อถือคือ เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี โดยนิยมใช้ตัวตรวจวัดแบบยูวีและแมสสเปกโตรมิเตอร์ ด้วยข้อดีที่ว่าเทคนิคนี้มีความไวสูง และสามารถวิเคราะห์สารที่สนใจได้หลายตัวในเวลาเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตาม เครื่องตรวจวัดชนิดแมสสเปกโตรมิเตอร์มีราคาที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวตรวจวัดชนิดยูวี ผู้ทดลองต้องมีทักษะความชำนาญสูง และส่วนใหญ่ต้องใช้สารมาตรฐานภายใน (Internal standard) จากข้อจำกัดดังกล่าวในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ตัวตรวจวัดชนิดยูวี สำหรับคอลัมน์ที่ใช้แยกสารจากงานวิจัยที่ผ่านมานิยมใช้คอลัมน์ที่มีความยาว 25 cm มีผลทำให้เวลาในการวิเคราะห์นาน และใช้ปริมาณของสารละลายเฟสเคลื่อนที่จำนวนมากซึ่งก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Yu *et al.*, 2010, pp. 452-461; Hammadi & Almardini, 2014, pp. 171-174) ดังนั้น ในการวิจัยนี้ผู้วิจัยได้เลือกใช้คอลัมน์ที่มีความยาว 5 cm มาใช้ในการแยกสารและตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดยูวีชนิดไดโอดอาร์เรย์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมและประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไซบูทรามินด้วยเทคนิค HPLC-DAD และนำวิธีที่พัฒนาได้มาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไซบูทรามินในตัวอย่างกาแฟลดน้ำหนักที่วางขายอยู่ตามท้องตลาด

วิธีดำเนินการวิจัย

1) เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ คือ เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, Switzerland) เครื่องวัดค่า pH (Mettler Toledo, Switzerland) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany) เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Nuve, Belgium) เครื่องแก้ว แผ่นกรองชนิดไนลอน ขนาดรู 0.2 μm เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm และ 47 mm ใช้สำหรับกรองสารละลายมาตรฐาน ตัวอย่าง และตัวทำละลายเคลื่อนที่ สำหรับเครื่อง HPLC เป็นรุ่น Ultimate 3000 HPLC ของบริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา ประกอบด้วยปั๊มความดันสูงสำหรับตัวทำละลาย (Pump) ระบบฉีดสารอัตโนมัติ (Autosampler) อุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ (Thermostat column compartment) ตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอาร์เรย์ (Diode array detector; DAD) และคอมพิวเตอร์ประมวลผล คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ Acclaim RSLC C18 ขนาด 2.1 x 50 mm อนุภาคขนาด 2.2 μm มีเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย 0.025 M แอมโมเนียมแอสซิเตท (pH = 5) : อะซิโตนไทรล 95:5 (v/v) ใช้ระบบปรับสัดส่วนตามระยะเวลา (Gradient elution) แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการศึกษา

เวลา (นาที)	0.025 M แอมโมเนียมแอสซิเตท (A, %)	อะซิโตนไทรล (B, %)
0.0 - 2.0	95	5
2.1 - 8.0	50	50
8.1 - 10.0	50	50

2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานไซบูทรามิน ความเข้มข้น $100.0 \mu\text{g/ml}$ (Stock standard solution) เตรียมได้จากการชั่งไซบูทรามิน ไฮโดรคลอไรด์ โมโนไฮเดรต 0.010 กรัม ละลายในเมทานอล ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมนเมทานอลจนถึงขีดปริมาตร จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ด้วยเมทานอล กรองผ่านแผ่นกรองในลอนขนาด $0.2 \mu\text{m}$ ก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

3) การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างกาแฟ 0.20 กรัม ละลายในน้ำร้อน 20 มิลลิลิตร คนจนสารตัวอย่างละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเทใส่หลอดดูดจากนั้นศึกษาเปรียบเทียบการสกัดไซบูทรามินออกจากตัวอย่างกาแฟระหว่างวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย และวิธีการตกตะกอนร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย ทำได้โดยนำกาแฟ 20 มิลลิลิตร มาสกัดด้วยสารละลายผสมเมทานอลและน้ำ ($70:30$, v/v) 15 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที เจือจางสารด้วยเมทานอลในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วทำการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ตามด้วยแผ่นกรองในลอนขนาด $0.2 \mu\text{m}$ ส่วนวิธีการตกตะกอนร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยนำกาแฟ 20 มิลลิลิตร มาเติมนสารละลาย 0.1 M โพแทสเซียมเพอร์โรสยาไนต์ และสารละลาย 0.25 M ซิงค์ซัลเฟต อย่างละ 2 มิลลิลิตร (Qi et al., 2009, pp. 414-418) ตั้งบนอ่างน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติมนเมทานอลลงไป 10 มิลลิลิตร นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเก็บชั้นส่วนใส เติมนเมทานอล 10 มิลลิลิตร ลงไปในตะกอน เขย่าและปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ทั้งหมดถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เติมนเมทานอลจนถึงขีดปริมาตร จากนั้นกรองสารละลายผ่านแผ่นกรองในลอนขนาด $0.2 \mu\text{m}$ ก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

4) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์

อัตราการใช้ของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

นำสารละลายมาตรฐานไซบูทรามินความเข้มข้น $50.0 \mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร โดยทำการศึกษาอัตราการใช้ในช่วง $0.10 - 0.70$ มิลลิลิตรต่อนาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งอัตราการใช้

การทดสอบความเป็นเส้นตรง

นำสารละลายมาตรฐานไซบูทรามินความเข้มข้น $0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0$ และ $50.0 \mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ทำการสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับพื้นที่ใต้พีค และคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination: R^2)

การศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถอ่านค่าได้อย่างถูกต้อง (LOQ)

นำสภาวะที่เหมาะสมมาหาค่า LOD และ LOQ โดยทำการเจือจางสารละลายมาตรฐาน และฉีดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ การหาค่า LOD และ LOQ พิจารณาจากความเข้มข้นที่ให้อัตราส่วนระหว่างสัญญาณของสารที่วัดได้และสัญญาณรบกวน (S/N) เท่ากับ 3 และ 10 ตามลำดับ

การศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

นำสารละลายมาตรฐานไซบูทรามิน ความเข้มข้น $1.0, 5.0$ และ $20.0 \mu\text{g/ml}$ ฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อคำนวณหาค่าความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน ในรูปของร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) และความเข้มข้น $20.0 \mu\text{g/ml}$ ในการหาค่าความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ระหว่างวัน โดยแสดงค่าในรูปของร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

การศึกษาร้อยละการกลับคืน

เติมนสารมาตรฐานไซบูทรามินลงในตัวอย่างให้มีความเข้มข้น $2.0, 5.0$ และ $20.0 \mu\text{g/ml}$ จากนั้นนำมาผ่านการเตรียมตัวอย่างดังขั้นตอนข้างต้น จากนั้นฉีดเข้าเครื่อง HPLC ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม นำค่าที่ได้จากการทดลองไป

เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานหาความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง และคำนวณหาค่าร้อยละการกลับคืน (Percent recovery)

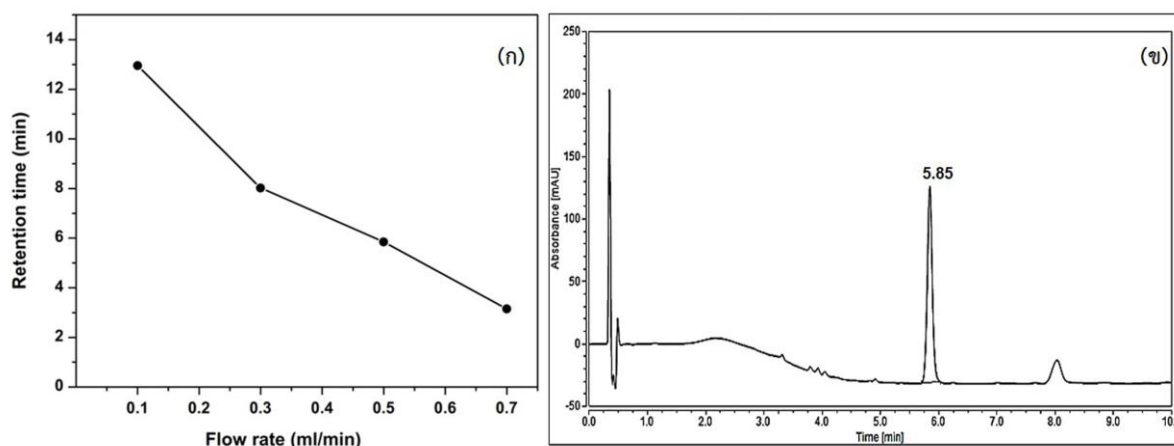
5) การวิเคราะห์หาไซบูทรามินในตัวอย่างกาแฟ

ในการวิเคราะห์ที่ใช้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดกาแฟที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดทั่วไปในเขตจังหวัดนนทบุรี จำนวน 5 ตัวอย่าง (5 ยี่ห้อ) มาผ่านการเตรียมตัวอย่าง จากนั้นฉีดเข้าเครื่อง HPLC ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้จากการทดลองไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของสารที่มีในตัวอย่าง

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

1) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์

ผลของอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต่อเวลาของสารที่สนใจเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมีเฟสเคลื่อนที่ ประกอบด้วย 0.025 M แอมโมเนียมแอสซิเตท (pH = 5) และอะซิโตนไตรล์ อัตราส่วน 95:5 โดยปริมาตร และใช้คอลัมน์มีความยาวเพียง 5 cm ภาพที่ 2 (ก) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่และคาร์เท็นซันไทม์ เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานไซบูทรามิน ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร พบว่า อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เพิ่มขึ้นมีผลให้สารเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น ทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์สารที่สั้นลง ที่อัตราการไหล 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที สารเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้เร็วที่สุด อย่างไรก็ตามในระหว่างที่วิเคราะห์พบว่าความดันภายในคอลัมน์เพิ่มสูงขึ้นอย่างมากเนื่องจากภายในคอลัมน์บรรจุด้วยอนุภาคขนาดเล็กทำให้มีช่องว่างภายในคอลัมน์น้อย เมื่อเพิ่มอัตราการไหล จึงทำให้ความดันสูงขึ้นระหว่างที่เฟสเคลื่อนที่ไหลผ่าน หากใช้คอลัมน์เป็นระยะเวลานานความดันที่มากจะมีผลในการทำลายเฟสอยู่ภายในคอลัมน์ให้เกิดความเสียหายและลดอายุการใช้งานของคอลัมน์ลง ดังนั้น จึงเลือกใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งให้คาร์เท็นซันไทม์ 5.85 นาที และให้พิกที่มีความเหมาะสม แสดงดังภาพที่ 2 (ข) ดังนั้น จากการศึกษาหาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม ทำให้ได้สภาวะการทดสอบทางโครมาโทกราฟี สรุปดังแสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 2 (ก) การศึกษาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่มีต่อคาร์เท็นซันไทม์ (ข) โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานไซบูทรามิน ความเข้มข้น 50.0 $\mu\text{g/ml}$ ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

ประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือเพียงใด สามารถพิจารณาได้จากพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้อง แสดงดังตารางที่ 3 พบว่า เมื่อนำสารละลายมาตรฐานไซบูทรามิน ที่ความเข้มข้น 0.5 - 50.0 $\mu\text{g/ml}$ มาวิเคราะห์เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับพื้นที่ใต้พีก พบว่าได้ค่าสมการเส้นตรงคือ $y = 0.3064x - 0.1407$ และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.998 จะเห็นได้ว่ากราฟมาตรฐานมีความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ได้ทำการศึกษา

ตารางที่ 2 สรุปสภาวะการทดสอบทางโครมาโทกราฟีที่ใช้ในการหาปริมาณไซบูทรามีน

พารามิเตอร์	สภาวะการทดสอบ
คอลัมน์	C18 (2.1 x 50 mm, 2.2 μ m)
สารละลายเฟสเคลื่อนที่ (ปรับสัดส่วนตามระยะเวลา)	A: 0.025 M แอมโมเนียมแอซิเตท (pH = 5), B: อะซิโตไนไตรล์
อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่	0.5 มิลลิลิตรต่อนาที
ความยาวคลื่นที่ตรวจวัด	230 นาโนเมตร
ปริมาณสารที่ฉีด	5 ไมโครลิตร
อุณหภูมิคอลัมน์	50 องศาเซลเซียส
เวลาที่ใช้ในการทดสอบ	10 นาที

ตารางที่ 3 พารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์

พารามิเตอร์	ผลที่ได้จากการศึกษา
ความเป็นเส้นตรง	$y = 0.3064x - 0.1407$ ($R^2 = 0.998$)
ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD)	0.1 μ g/ml
ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถอ่านค่าได้อย่างถูกต้อง (LOQ)	0.5 μ g/ml
ความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (Within-day precision) (n = 7)	%RSD = 4.70 (ความเข้มข้น 1.0 μ g/ml) %RSD = 2.25 (ความเข้มข้น 5.0 μ g/ml) %RSD = 1.58 (ความเข้มข้น 20.0 μ g/ml)
ความเที่ยงระหว่างวัน (Between-day precision) (n = 7, 5 days)	%RSD = 3.27 (ความเข้มข้น 20.0 μ g/ml)
ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนของสาร	84.74 $\pm$ 3.93 (ความเข้มข้น 2.0 μ g/ml) 97.73 $\pm$ 2.59 (ความเข้มข้น 5.0 μ g/ml) 95.78 $\pm$ 2.37 (ความเข้มข้น 20.0 μ g/ml)
(% Mean recovery, $\pm$ SD) n = 5	

ตารางที่ 4 การหาปริมาณไซบูทรามีนในตัวอย่างด้วยวิธีต่าง ๆ

วิธีวิเคราะห์	ชนิดตัวอย่าง	ผลที่ได้จากการศึกษา	เอกสารอ้างอิง
Voltammetry	เครื่องดื่มชูกำลัง ชาเขียว	LOD = 0.4 μ g/ml LOQ = 1.4 μ g/ml	Carvalho <i>et al.</i> , 2012, pp. 988-992
LC-ESI-MS/MS	ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารลดน้ำหนัก ชนิดแคปซูล ชนิดกาแฟ	LOD = 1 ng/ml LOQ = 5 ng/ml	Krivohlavek <i>et al.</i> , 2016, pp. 222-228
HPLC-DAD	ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารลดน้ำหนัก ชนิดแคปซูล ชนิดกาแฟ	LOD = 0.5 μ g/ml LOQ = 1.5 μ g/ml	Hammadi <i>et al.</i> , 2014, pp. 171-174
วิธีที่พัฒนาขึ้น	ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารลดน้ำหนัก ชนิดกาแฟ	LOD = 0.1 μ g/ml LOQ = 0.5 μ g/ml	-

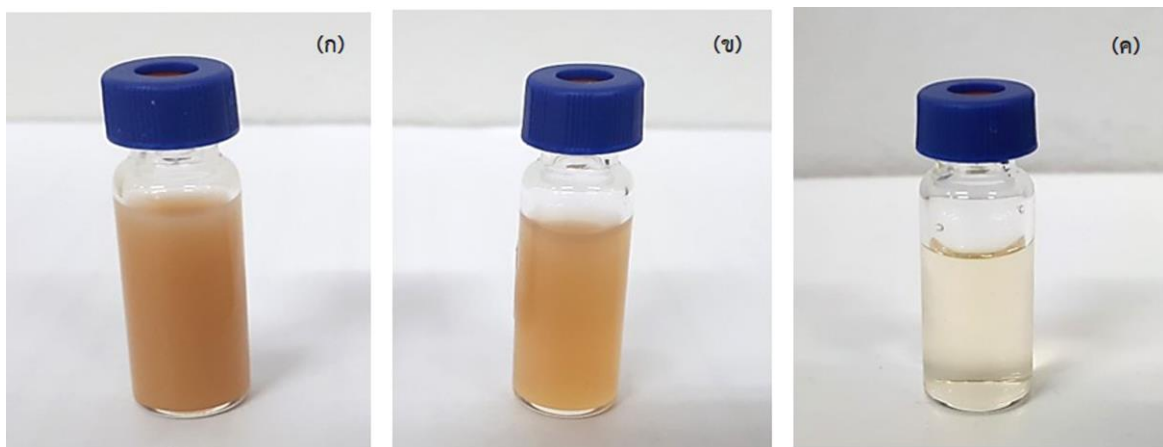
สำหรับการศึกษาค่า LOD และ LOQ โดยพิจารณาจากความเข้มข้นที่ให้อัตราส่วนระหว่างสัญญาณของสารและสัญญาณรบกวน (S/N) เท่ากับ 3 และ 10 พบว่า LOD และ LOQ ที่สามารถวิเคราะห์ได้ มีค่าเท่ากับ 0.1 และ 0.5 μ g/ml ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่า LOD และ LOQ ที่ได้จากวิธีต่าง ๆ ในตารางที่ 4 จะพบว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นมีความสามารถในการวิเคราะห์สารได้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำได้ดีกว่าวิธีวิเคราะห์ของ Carvalho *et al.* ซึ่งเป็นวิธีทางเคมีไฟฟ้าที่มีความเร็วแต่มีข้อจำกัดในด้านของ selectivity หากการเตรียมสารตัวอย่างมีความบริสุทธิ์ไม่มากพอ ขั้วไฟฟ้าที่ใช้ทดสอบอาจหาปริมาณสารได้คลาดเคลื่อน สำหรับการทดสอบของ Krivohlavek *et al.* ด้วยวิธี LC-ESI-MS/MS ให้ค่า LOD และ LOQ ที่ต่ำกว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น แต่วิธีนี้ต้องใช้สารมาตรฐานภายในร่วมในการทดสอบ ทำให้ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ค่อนข้างสูง เครื่องมือมีความซับซ้อน รวมทั้งผู้ทดลองจะต้องมีทักษะในการใช้เครื่องเป็นอย่างมาก และเมื่อเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีของ

Hammadi *et al.* ซึ่งวิเคราะห์ด้วย HPLC-DAD ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารประเภทเดียวกัน พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดได้ในระดับความเข้มข้นที่ LOD และ LOQ ต่ำกว่า และใช้เวลาในการทดสอบน้อยกว่าเพียง 10 นาที ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า

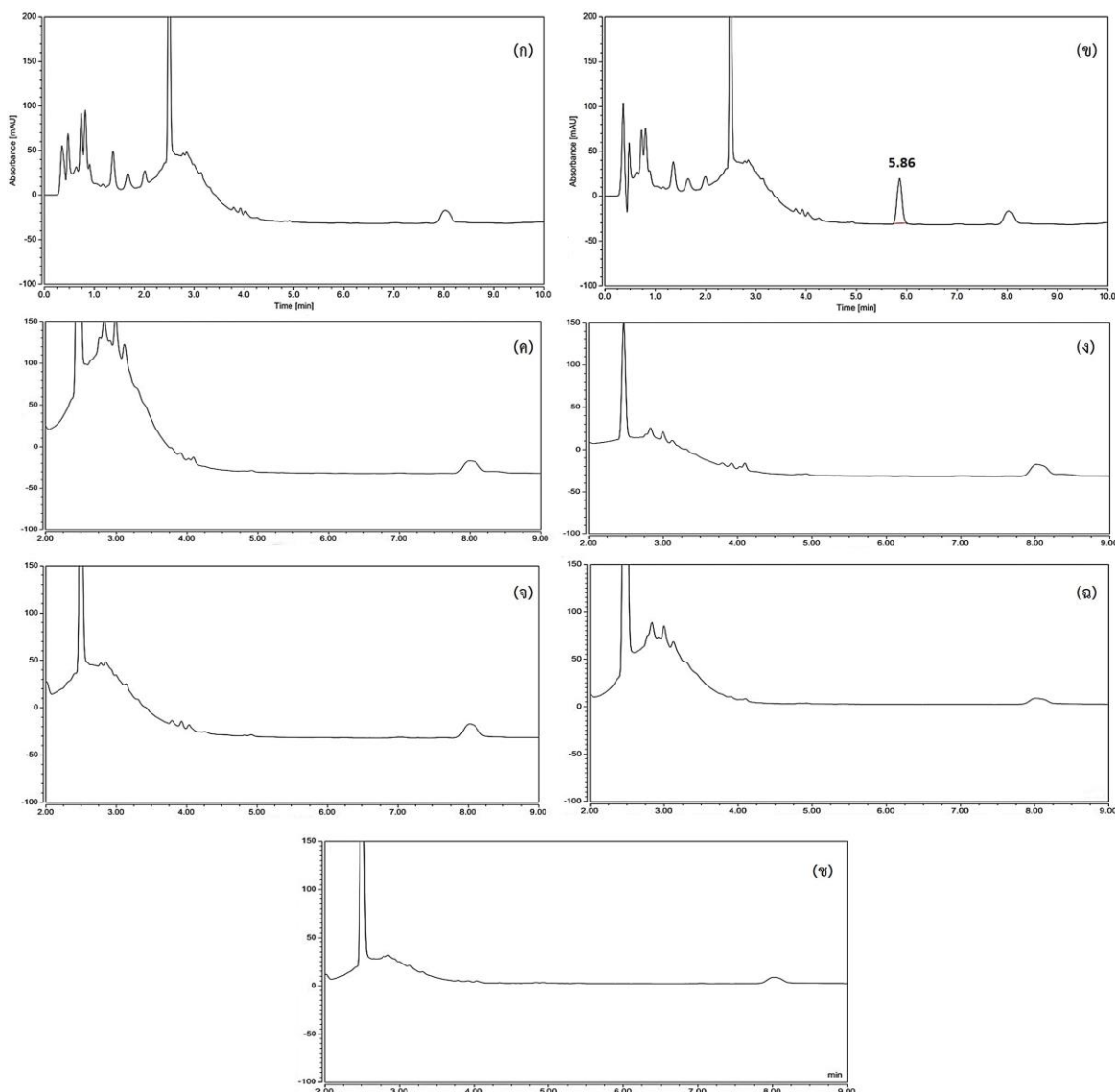
ความเที่ยง (Precision) เป็นการศึกษาเพื่อดูว่าภายใต้สภาวะที่กำหนดวิธีวิเคราะห์ให้ผลการทดลองมีค่าใกล้เคียงกันเพียงใด ซึ่งพิจารณาจากค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) พบว่า ความเที่ยงภายในวันเดียวกัน ที่ 3 ระดับความเข้มข้น และความเที่ยงระหว่างวัน ที่ 1 ระดับความเข้มข้น มีค่าน้อยกว่า 4.70% ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ สอดคล้องกับเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC (AOAC, 2013, pp. 1-32) ดังนั้นการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-DAD ให้ความเที่ยงที่ยอมรับได้ สำหรับค่าความแม่นยำ (Accuracy) จะศึกษาหาประสิทธิภาพของวิธีที่มีต่อสารไซบูทรามินในตัวอย่างกาแฟ โดยพิจารณาจากค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืน (% Mean recovery) ในการวิเคราะห์ได้เติมสารไซบูทรามินที่ทราบความเข้มข้นลงไป ในตัวอย่างกาแฟ จำนวน 3 ระดับ คือ 2.0, 5.0 และ 20.0 $\mu\text{g/ml}$ แล้วคำนวณความเข้มข้นที่ได้หลังการวิเคราะห์ ซึ่งพบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนของสารอยู่ในช่วงค่าที่ยอมรับได้ทุกระดับความเข้มข้นที่ศึกษา (AOAC, 2013, pp. 1-32) เมื่อทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยพิจารณาได้จากพารามิเตอร์ต่าง ๆ ข้างต้น จะเห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความน่าเชื่อถือและเหมาะสม สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณไซบูทรามินในตัวอย่างกาแฟได้อย่างถูกต้อง

2) การวิเคราะห์หาไซบูทรามินในตัวอย่างกาแฟ

การวิเคราะห์หาไซบูทรามินในตัวอย่างกาแฟ ขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างมาก คือ ขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่าง เนื่องจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดกาแฟที่มีขายตามท้องตลาด ส่วนใหญ่เป็นกาแฟปรุงสำเร็จชนิดผง ซึ่งอาจจะมีทั้งสารสกัดสมุนไพร และครีมเทียมผสมอยู่เพื่อดึงดูดใจผู้บริโภคว่ากาแฟอุดมไปด้วยสารบำรุงร่างกายและมีรสชาติที่กลมกล่อม น่ารับประทานมากขึ้น ซึ่งองค์ประกอบของสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่าง สามารถทำให้ลดน้อยลงได้หากมีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม เมื่อทำการเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างระหว่างวิธีการสกัดด้วยเมทานอลและน้ำ (70:30, v/v) และวิธีการตกตะกอนร่วมกับการสกัดด้วยเมทานอล ผลการวิจัยที่ได้แสดงดังภาพที่ 3 พบว่า การสกัดไซบูทรามินออกจากตัวอย่างกาแฟด้วยเมทานอลและน้ำ (70:30, v/v) แล้วทำการกรอง เมื่อพิจารณาลักษณะทางกายภาพของสารละลายที่ได้เป็นสีน้ำตาลอ่อนที่ยังขุ่นเล็กน้อย จึงไม่เหมาะสมที่จะฉีดเข้าเครื่อง HPLC เนื่องจากสารไม่พึงประสงค์ (Matrix) ในตัวอย่างอาจทำให้คอลัมน์และระบบอุดตัน รวมถึงอาจบ่งสัญญาณของสารที่สนใจทำให้ผลการทดลองไม่น่าเชื่อถือ ซึ่งวิธีนี้เหมาะกับวิธีการสกัดสารตัวอย่างที่เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดแคปซูลมากกว่าเพราะไม่มีส่วนของโปรตีนและไขมันมารบกวน (Yu *et al.*, 2010, pp. 452-461) ส่วนวิธีการตกตะกอนร่วมกับการสกัดด้วยเมทานอล เมื่อเติมสาร 0.1 M โพแทสเซียมเพอร์ไอโอดีด และสาร 0.25 M ซิงค์ซัลเฟต ลงไปในตัวอย่างจะเกิดตะกอนสีน้ำตาลแดงที่แยกกับส่วนใส จะเห็นว่าสารเหล่านี้สามารถตกตะกอนโปรตีนและไขมันได้ดี (Zygler *et al.*, 2009, pp. 1082-1102) แล้วทำการสกัดต่อด้วยเมทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ไซบูทรามินสามารถละลายได้ดี แยกตะกอนสีน้ำตาลแดงทิ้งและนำส่วนใสมากรองอีกครั้ง จะได้สารละลายตัวอย่างกาแฟที่มีลักษณะใสมากขึ้น ซึ่งมีความเหมาะสมที่จะฉีดเข้าเครื่อง HPLC



ภาพที่ 3 ลักษณะของสารตัวอย่างกาแฟ (ก) ก่อนการทดลอง (ข) หลังสกัดด้วยเมทานอลและน้ำ (70:30, v/v)
(ค) หลังการตกตะกอนร่วมกับการสกัดด้วยเมทานอล



ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC-DAD (ก) สารตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐานไซบูทรามีน (Sample blank) (ข) สารตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานไซบูทรามีน (Spiked sample) ที่ระดับความเข้มข้น 20.0 $\mu\text{g/ml}$ (ค) ตัวอย่างกาแฟ หมายเลข 1 (ง) ตัวอย่างกาแฟ หมายเลข 2 (จ) ตัวอย่างกาแฟ หมายเลข 3 (ฉ) ตัวอย่างกาแฟ หมายเลข 4 และ (ช) ตัวอย่างกาแฟ หมายเลข 5

ภาพที่ 4 (ก-ข) เมื่อพิจารณาโครมาโทแกรมของสารตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารมาตรฐาน (Sample blank) เปรียบเทียบกับสารตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐานลงไป (Spiked sample) จะพบว่าที่ตำแหน่งรีเทนชันใหม่ 5.85 นาที ไม่พบพีกสารอื่นรบกวน ซึ่งถือว่าการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการตกตะกอนร่วมกับการสกัดด้วยเมทานอลมีความเหมาะสมกับตัวอย่างกาแฟปรุงสำเร็จชนิดผง รวมถึงทำได้ง่าย ประหยัดเวลา สามารถลดขั้นตอนและค่าใช้จ่ายในการทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid phase extraction; SPE) ได้ เมื่อได้วิธีการเตรียมสารตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพ และหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สาร ด้วยเทคนิค HPLC-DAD นำไปสู่การประยุกต์ใช้ตรวจหาการปลอมปนไซบูทรามีนในผลิตภัณฑ์กาแฟลดน้ำหนักจากร้านค้าในเขตจังหวัดนนทบุรี จำนวน 5 ตัวอย่าง (5 ยี่ห้อ) จากผลการทดลอง พบว่า ตรวจไม่พบไซบูทรามีนในทุกตัวอย่างที่ทดสอบ ดังจะเห็นจาก ภาพที่ 4 (ค)-(จ) แสดงโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างกาแฟหมายเลข 1 ถึง หมายเลข 5 ซึ่งสารตัวอย่างกาแฟทั้ง 5 ยี่ห้อ จะแสดงผลการทดลองที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน คือ ที่ตำแหน่งรีเทนชันใหม่ 5.85 นาที ไม่ปรากฏพีกของสารไซบูทรามีน และเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานซึ่งเป็นที่ยอมรับและมีความน่าเชื่อถือจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นั่นคือวิธี In-house method SOP

No. 20 02 235 by LC-MS/MS โดยมีค่าเกณฑ์การวัดขั้นต่ำสุด (Cut-off value) เท่ากับ 50 mg/kg หรือ 50 ppm ซึ่งค่านี้เป็นค่าที่ทางกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ใช้ในการรายงานผลว่าตรวจพบหรือไม่พบสารไซบูทรามินตามเกณฑ์ที่กำหนด หากเกินเกณฑ์นี้จะต้องแจ้งผลการทดสอบของผลิตภัณฑ์ที่ตรวจพบแก่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาต่อไป เมื่อเปรียบเทียบจากตารางที่ 5 พบว่า ค่าที่รายงานมีความสอดคล้องกับวิธีที่พัฒนาขึ้นคือ ไม่พบไซบูทรามินในทุกตัวอย่างที่ทดสอบ แสดงถึงวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีประสิทธิภาพเพียงพอในการใช้ประยุกต์ในการตรวจสอบตัวอย่างผลิตภัณฑ์ชนิดกาแฟ นอกจากนี้วิธีที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ใช้ในการตรวจหาสารเป็นการตรวจหาสารในเชิงคุณภาพ แต่วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการหาสารในเชิงปริมาณได้ถึงระดับความเข้มข้น 0.5 ppm รวมทั้งเครื่องมือวิเคราะห์สามารถใช้งานได้ง่ายกว่า

ตารางที่ 5 ปริมาณไซบูทรามินในตัวอย่างกาแฟ โดยเปรียบเทียบระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐาน LC-MS/MS

กาแฟหมายเลข	วิธีที่พัฒนาขึ้น	LC-MS/MS ^b
1	nd ^a	nd
2	nd	nd
3	nd	nd
4	nd	nd
5	nd	nd

หมายเหตุ: ^and หมายถึง ไม่สามารถตรวจพบสารด้วยวิธีที่ทำการทดลองในงานวิจัย

^bIn-house method SOP No. 20 02 235 by LC-MS/MS จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
โดยมีค่าเกณฑ์การวัดขั้นต่ำสุด (Cut-off value) เท่ากับ 50 mg/kg หรือ 50 ppm

สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงวิธีการเตรียมตัวอย่าง สภาวะที่เหมาะสมและประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ สำหรับใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไซบูทรามินในผลิตภัณฑ์กาแฟลดน้ำหนัก ด้วยเทคนิค HPLC-DAD โดยในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง การเติมสารช่วยตกตะกอนโพแทสเซียมเพอร์โรไซด์และซิงค์ซัลเฟตลงไปในตัวอย่างจะช่วยแก้ปัญหาความขุ่นของสารละลาย โดยสารเหล่านี้จะตกตะกอนโปรตีน ไขมัน และสารรบกวนอื่น ๆ ในตัวอย่างกาแฟร่วมกับการสกัดด้วยเมทานอล ทำให้สารละลายมีลักษณะใส ซึ่งถือว่าวิธีการเตรียมตัวอย่างดังกล่าวทำได้ง่าย ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการสกัดสาร สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการวิเคราะห์ พบว่าเฟสเคลื่อนที่เป็นสารผสมระหว่าง 0.025 M แอมโมเนียมแอสซิเตท (pH = 5) และอะซิโตนไนโตรส มีอัตราการไหล เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร นอกจากนี้ คอลัมน์ที่ใช้แยกสารมีขนาดสั้นทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมด 10 นาที รวมทั้งเป็นการลดปริมาณการใช้เฟสเคลื่อนที่ทำให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม สำหรับประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ พบว่ากราฟมาตรฐานของไซบูทรามินมีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.5 - 50.0 $\mu\text{g/ml}$ และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.998 ความเที่ยงภายในวันเดียวกัน และความเที่ยงระหว่างวัน มีค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) น้อยกว่า 4.70% ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนที่ 3 ระดับความเข้มข้น มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 84.74 - 97.73% วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความรวดเร็ว ให้ความเที่ยงและความถูกต้องที่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานพบว่าให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่า ดังนั้นจึงเหมาะสมอย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไซบูทรามินในผลิตภัณฑ์กาแฟลดน้ำหนัก เพื่อเป็นแนวทางในการสำรวจและให้ความรู้ด้านความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินกองทุนส่งเสริมงานวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ประจำปีงบประมาณ 2561 และได้รับการสนับสนุนด้านเครื่องมือต่าง ๆ จากสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ



เอกสารอ้างอิง

- An, H., Sohn, H. & Chung, S. (2013). Phentermine, sibutramine and affective disorders. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 11(1), 7-12.
- AOAC. (2013). Appendix K: Guidelines for dietary supplements and botanicals. *AOAC Official Methods of Analysis*, 1-32.
- Arterburn, D. E., Crane, P. K. & Veenstra, D. L. (2004). The efficacy and safety of sibutramine for weight loss: a systematic review. *Archives of internal medicine*, 164(9), 994-1003.
- Carvalho, J. M., Da Silva, A. R., Da Cunha, A. L. M. C., Aucélio, R. Q., Alberti, A. L. M. & Leandro, K. C. (2012). Voltammetric determination of sibutramine in beverages and in pharmaceutical formulations. *Química Nova*, 35(5), 988-992.
- Cebi, N., Yilmaz, M. T. & Sagdic, O. (2017). A rapid ATR-FTIR spectroscopic method for detection of sibutramine adulteration in tea and coffee based on hierarchical cluster and principal component analyses. *Food Chemistry*, 229, 517-526.
- Csupor, D., Boros, K., Dankó, B., Veres, K., Szendrei, K. & Hohmann, J. (2013). Rapid identification of sibutramine in dietary supplements using a stepwise approach. *Pharmazie*, 68(1), 15-18.
- De Carvalho, L. M., Martini, M., Moreira, A. P. L., De Lima, A. P. S., Correia, D., Falcão, T., et al. (2011). Presence of synthetic pharmaceuticals as adulterants in slimming phytotherapeutic formulations and their analytical determination. *Forensic Science International*, 204(1), 6-12.
- Hammadi, R. & Almardini, M. A. (2014). A fully validated HPLC-UV method for quantitative and qualitative determination of six adulterant drugs in natural slimming dietary supplements. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 29(1), 171-174.
- Krivohlavek, A., Žuntar, I., Ivešić, M., Andačić, I. M., Šikić, S. & Vrebčević, M. (2016). Sibutramine in slimming food supplements on the Croatian market determined by validated high-pressure liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method. *Journal of Food and Nutrition Research*, 55(3), 222-228.
- Morris, J. & Nguyen, S. (2018). *Thai police ramp up action on fake slimming products as four Thai women die* [Online]. Retrieved April 25, 2019, from: <https://www.thaia Examiner.com/thai-news-foreigners/2018/06/01/>.
- Popescu, A. M. & Radu, G. L. (2015). Detection of adulterants by FTIR and GC-MS in herbal slimming food supplements. *UPB Scientific Bulletin, Series B*, 77(4), 221-230.
- Qi, P., Hong, H., Liang, X. & Liu, D. (2009). Assessment of benzoic acid levels in milk in China. *Food control*, 20(4), 414-418.
- Rebiere, H., Guinot, P., Civade, C., Bonnet, P. A. & Nicolas, A. (2012). Detection of hazardous weight-loss substances in adulterated slimming formulations using ultra-high-pressure liquid chromatography with diode-array detection. *Food Additive and Contaminants*, 29(2), 161-171.
- World Health Organization. (2020). *Obesity and overweight* [Online]. Retrieved April 16, 2020, from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
- Yu, Z., Wei, Q., Fan, Q. & Wan, C. (2010). A simple and convenient method for simultaneous determination of four major species of illegal additives in slimming health food. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33(4), 452-461.
- Zygler, A., Wasik, A. & Namiesnik, J. (2009). Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(9), 1082-1102.