จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนงบประมาณแผ่นดิน

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การตรวจสอบเภสัชภัณฑ์โดยใช้ฟลูโอเรสคามีน

Detection of Pharmaceutical Products using Fluorescamine

โดย

สุนิพนธ์ ภุมมางกูร
ราณี สุรกาญจน์กุล
ลาวัลย์ ศรีพงษ์

ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2532

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนงบประมาณแผ่นดิน ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้
ขอขอบคุณภาควิชาเภสัชเคมี ที่ให้ความสนับสนุนการวิจัยนี้ตลอดมา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานผลการวิจัยเรื่อง : การตรวจสอบเภสัชภัณฑ์ โดยใช้ฟลูโอเรสคามีน
คณะผู้วิจัย : สุนิพนธ์ ภุมมางกูร
ราณี สุรกาญจน์กุล
ลาวัลย์ ศรีพงษ์
ปีที่วิจัย : 2532

บทคัดย่อ

การใช้ fluorescamine เป็น spraying reagent พ่นบน plate ที่เคลือบด้วย silica gel GF 254 สามารถใช้ตรวจสอบยาที่มีหมู่ฟังก์ชัน $-NH_2$, $-\overset{|}{N}H$, และ $-\overset{|}{\underset{|}{N}}-$ ได้ พบว่ายาที่เป็น primary amine จะเกิด fluorescence กับ fluorescamine แต่ยาที่เป็น secondary amine จะเกิด quenching ส่วนที่เป็น tertiary amine หรือ quarternary amine จะไม่เกิดอะไรกับ fluorescamine โดยอาศัยผลการทดลองอันนี้จะทำให้สามารถแบ่งยาเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 เป็นยาที่เกิด fluorescence กับ fluorescamine กลุ่มที่ 2 เกิด quenching และกลุ่มที่ 3 ไม่เกิด fluorescence หรือ quenching กับ fluorescamine โดยอาศัยการแบ่งยาเป็นสามกลุ่มและการใช้ข้อมูลจาก Rf value ใน 3 solvent systems การใช้ไอของไอโอดีน ทำให้สามารถตรวจสอบหรือพิสูจน์เอกลักษณ์ของยาได้

Research Title : Detection of Pharmaceutical Products using Fluorescamine

Researcher : Sunibhond Pummangura
Ranee Surakarnkul
Lawan Sriphong

Year : 1989

Abstract

The drugs which contains amino functional groups such as $-NH_2$, $-\overset{|}{N}H$ and $-\overset{|}{N}-$ can be differentiated by using fluorescamine solution as spraying reagent on silica gel GF-254 thin layer chromatographic plate. Only primary amine drugs, aliphatic or aromatic amine, give a fluorescence, while secondary and tertiary even though quarternary amine drugs give a quenching and nothing with fluorescamine spraying reagent respectively. With these categories, the drugs can be devide into three groups. First, the drug fluorescence with fluorescamine, second, the drugs which give quenching with fluorescamine and third, the drug which have no quenching or non-fluorescence with fluorescamine. Including, such as Rf value of three solvent systems and iodine vapour, about 60 pharmaceutical products can be detected or identified.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญเรื่อง

หน้า

รายงานผลการวิจัย 1
กิตติกรรมประกาศ 2
บทคัดย่อภาษาไทย 3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ 4
สารบัญเรื่อง 5
สารบัญตาราง 6
บทที่ 1 บทนำ 7
บทที่ 2 วิธีดำเนินการทดลอง 10
บทที่ 3 ผลการทดลอง 28
บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 40
บรรณานุกรม 50

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 รายชื่อยาที่ใช้ทำการทดลอง 10
2 ผลการทดลองของยา 60 ตัว 30
3 ชนิดของยาที่เกิด fluorescence เมื่อทำปฏิกิริยากับ fluorescamine 40
4 แสดงค่า R_f การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้แสง UV และการเกิดสีกับไอโอดีนของสารกลุ่มที่ 1 42
5 ชนิดของยาที่เกิด quenching (spot สีม่วง) กับ fluorescamine 43
6 แสดงค่า R_f การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้แสง UV และการเกิดสีกับไอโอดีนของสารกลุ่มที่ 2 44
7 ชนิดของยาที่ไม่เกิด fluorescence เมื่อทำปฏิกิริยากับ fluorescamine 45
8 แสดงค่า R_f การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้แสง UV และการเกิดสีกับไอโอดีนของสารกลุ่มที่ 3 47

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

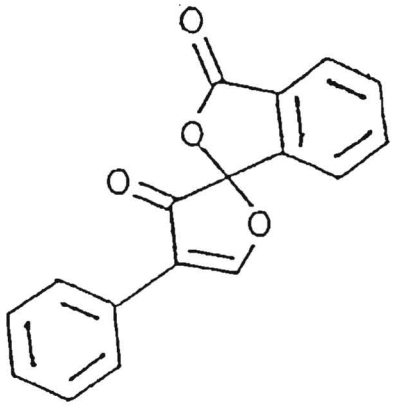
บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันมียาหลายชนิดที่ผลิตจำหน่ายในประเทศไทย ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันจนบางทีไม่สามารถจะแยกออกได้ว่าเป็นยาอะไร ซึ่งทำให้มีความเข้าใจสับสนจนบางครั้งอาจก่อให้เกิดอันตรายกับผู้ใช้ยาได้ การพิสูจน์เอกลักษณ์ของยานั้นมีหลายวิธี ซึ่งบางวิธีต้องอาศัยเครื่องมือที่พิสดาร บางวิธีก็ใช้การทดสอบง่าย ๆ โดยวิธีทางเคมีหรือกายภาพ อย่างไรก็ตามในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของยาจะต้องใช้มากกว่า 2 วิธี หรือหลาย ๆ วิธีเพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นให้มากขึ้น

การดำเนินการวิจัยครั้งนี้เป็นการเพิ่มวิธีการตรวจสอบเภสัชภัณฑ์โดยการใช้ Fluorescamine แม้จะใช้ Fluorescamine ก็ตาม แต่ก็ต้องใช้วิธีอื่นร่วมด้วยในการพิสูจน์เอกลักษณ์นั้น ๆ เช่นการวัดค่า Refractive index, การเกิดปฏิกิริยากับแสงอุลตรา-ไวโอเลต และอื่น ๆ เป็นต้น

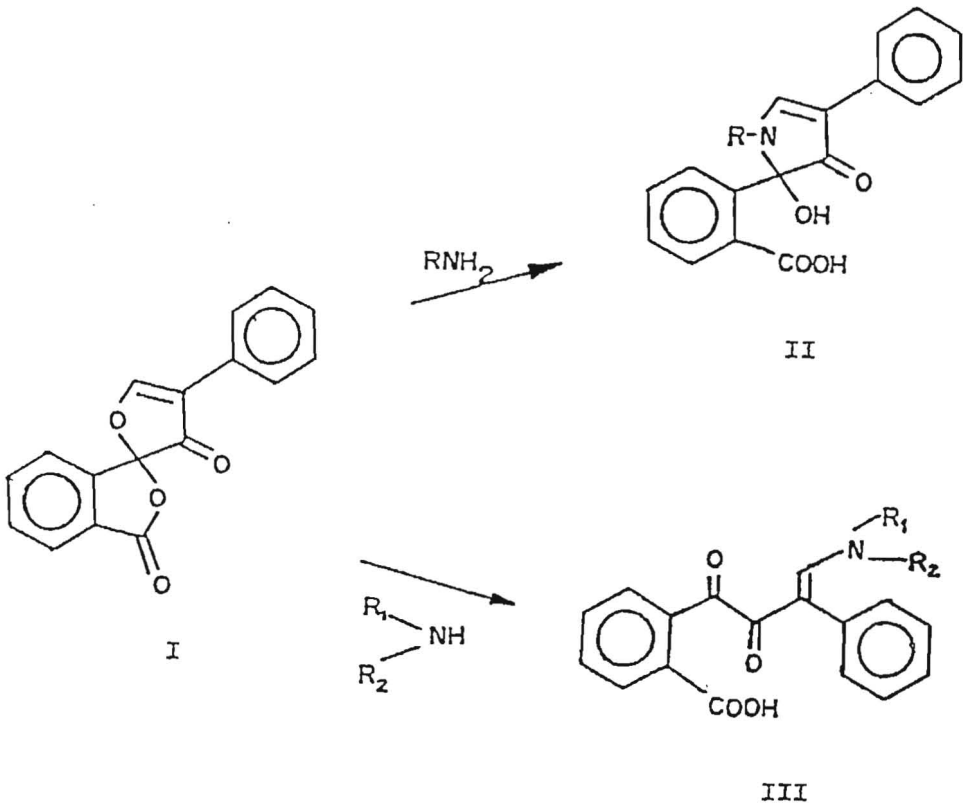
Fluorescamine มีชื่อทางเคมีว่า 4-phenylspiro [furan-2-(3H), 1'phthalan]-3,3'-dione เป็นผงสีเหลืองอ่อน จุดหลอมเหลว 154-155 องศา-เซลเซียส ไม่ละลายน้ำ, แต่ละลายในอะซีโตนและไดอ๊อกเซน



ชื่อทางการค้า โดยบริษัท Roche คือ Fluram สาร Fluorescamine นี้ได้ถูกสังเคราะขึ้นมาเป็นครั้งแรกโดยคณะของ Weigele et-al (1-2) ได้มีการนำ Fluorescamine มาทำปฏิกิริยาให้เกิด fluorescence โดยทำปฏิกิกิริยากับพวก functional primary amine จะให้ fluorescence compound ซึ่งสามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารได้ เช่น หาปริมาณของ amino acid (3-4), Peptides, Proteins (5-6) เป็นต้น

การใช้ Fluorescamine ได้กระจายตัวออกไปอย่างกว้างขวางเพื่อช่วยทำการวิจัยในทางเคมี ชีวเคมี และทางเภสัชภัณฑ์ เป็นต้นว่าการใช้ศึกษา Chirality ของ amino acid โดยการทำปฏิกิริยา condensation กับ amino acid นั้น (7) การนำ Fluorescamine มาทำปฏิกิริยากับ Levodopa หรืออนุพันธ์และได้สารที่มี fluorescence วัดปริมาณ fluorescence ที่เกิดขึ้นแล้ว นำมาคำนวณหาปริมาณของ Levodopa หรืออนุพันธ์ของสารนี้ได้ และโดยวิธีเดียวกันนี้ก็สามารถหาปริมาณของ 3-methoxy-4-hydroxyphenylalanine (8) และใช้วิธี spectrofluorometry ในการหาปริมาณของสารพวก aromatic หรือ aliphatic ที่มี amino group โดยให้ amino group นี้ทำปฏิกิริยากับ Fluorescamine (9) การวิเคราะห์สารผสมของ procainamide, sulfadiazine และสามารถหา primary aliphatic amine โดยใช้ Fluorescamine (10) การวิเคราะห์ Dopamine, Norepinephrine และ O-methyl metabolites products ของสารนี้ (11) การวิเคราะห์ยา Phenelzine (12) การวิเคราะห์ Cephalexin และเกลือ lysine ของสารนี้ (13) เป็นต้น สารทั้งหมดที่กล่าวมาแล้ว สามารถวิเคราะห์ปริมาณโดยใช้ Fluorescamine ทำปฏิกิริยากับ primary amine ของสารนั้น

ปฏิกิริยาของ fluorescamine (I) กับสารพวก primary amines และ Secondary amines จะได้ fluorescent pyrrolinones (II) และ nonfluorescent aminoenones (III) ตามลำดับ (4)



ผลที่ได้จากปฏิกิริยาพบว่า ถ้านำมาตรวจภายใต้แสง UV พบว่าสาร pyrrolinones จะเรืองแสง ให้สี yellow green ส่วน aminoenones จะเกิด quenching เป็น spot ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะใช้ fluorescamine ตรวจสอบเภสัชภัณฑ์ ซึ่งส่วนมากเป็น nitrogen compound นอกจากนี้ถึงแม้ว่าเภสัชภัณฑ์นั้นจะมี amino group ก็ไม่แน่นอนเสมอไปว่าจะเกิด fluorescent pyrrolinones ทั้งนี้เพราะปฏิกิริยาเคมีที่เกิดเป็น nucleophilic addition สภาพของสภาวะการทดลองโครงสร้างโมเลกุลของสารอาจจะมีผลป้องกันการเกิด fluorescent pyrrolinones ซึ่งอาจจะนำมาใช้เป็นข้อมูลในการตรวจเภสัชภัณฑ์ต่อไป

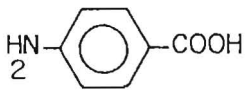
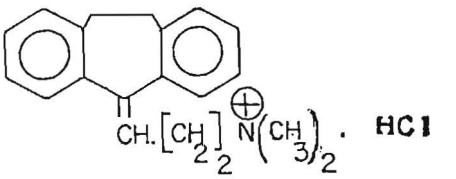
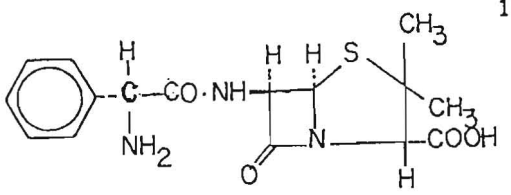
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

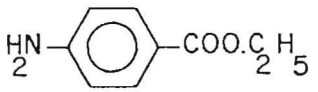
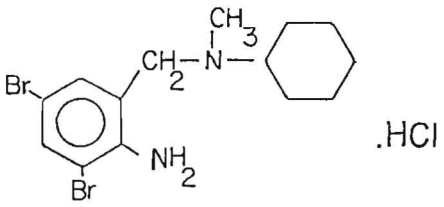
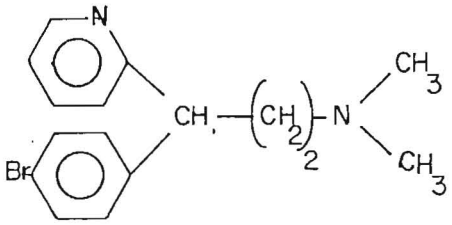
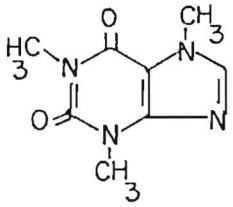
บทที่ 2

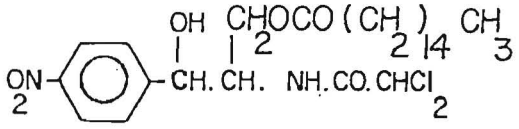
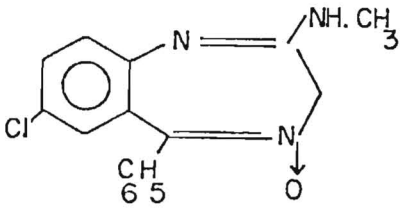
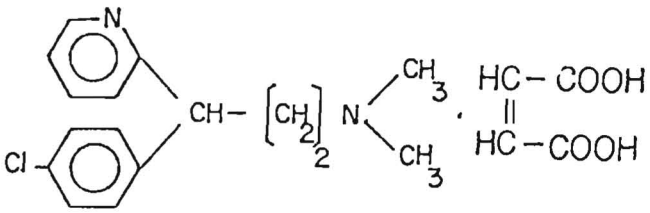
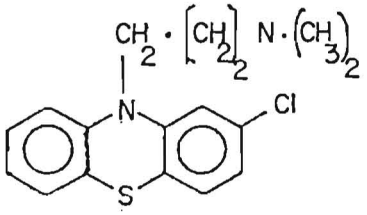
วิธีดำเนินการทดลอง

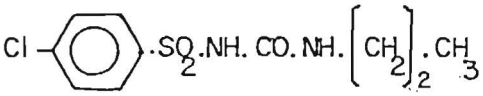
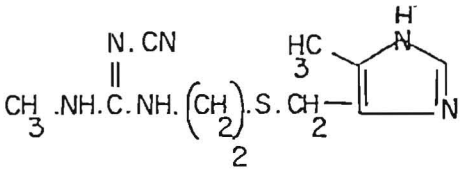
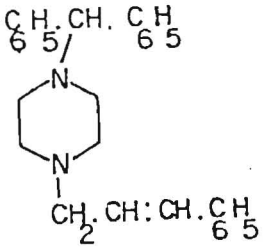
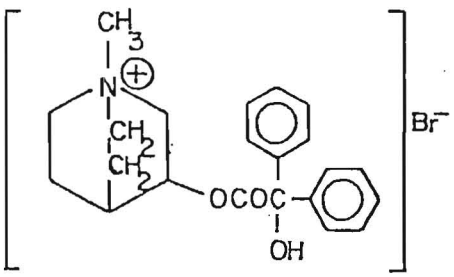
1. **ตัวยาที่ใช้ในการทดลอง** ใช้ตัวอย่างยาทั้งหมด 60 ชนิด ในหลายลักษณะ คือผงยาเดี่ยว, ผงยาที่อยู่ในยาเม็ด และพวกแคปซูล ซึ่งทุกชนิดต้องละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม แต่ละตัวยาจะมีการกำหนด functional group ว่าเป็น primary (1°),$-NH_2$, secondary (2°),$-\overset{|}{N}H-$, tertiary (3°),$-\overset{|}{N}-$, และ quarternary (4°),$-\overset{|}{\overset{|}{N}}\overset{\oplus}{-}$, amino functional groups ตัวยาที่ทำการทดลองเรียงตามตัวอักษรดังนี้

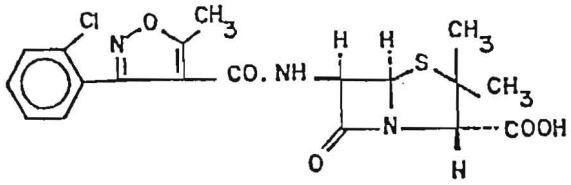
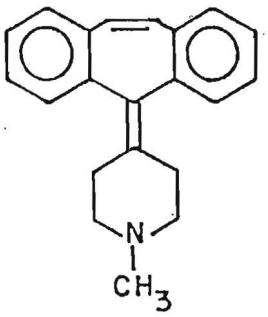
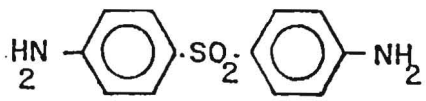
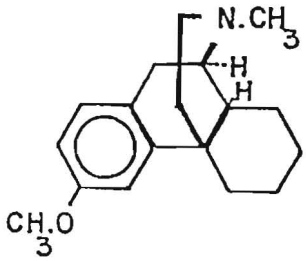
ตารางที่ 1 รายชื่อยาที่ใช้ทำการทดลอง

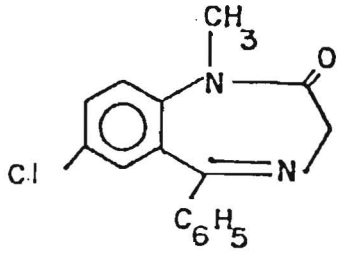
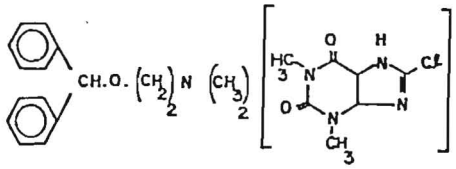
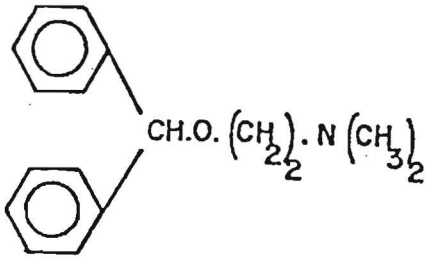
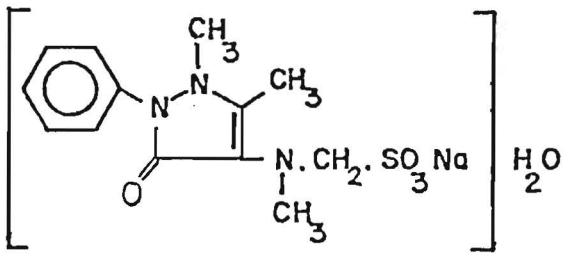
ลำดับที่	ชื่อยา	สูตรโครงสร้าง	amino functional groups	การละลาย
1	p-Aminobenzoic acid		1°	Ethanol (1:8)
2	Amitriptyline HCl		4°	Chloroform (1:8)
3	Ampicillin		1°	H_2O (1:170)

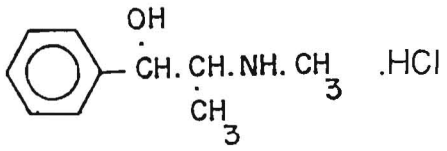
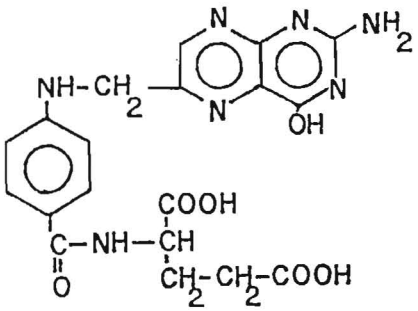
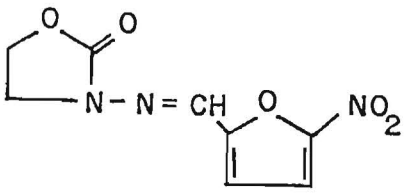
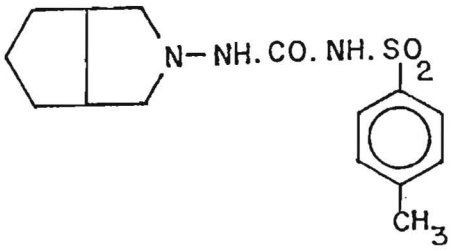
ลำดับที่	ชื่อยา	สูตรโครงสร้าง	amino functional groups	การละลาย
4	Benzocaine		1°	Ethanol (1:8) Chloroform (1:2)
5	Bromhexine HCl		1°, 3°	Ethanol (1:100) Chloroform (1:300)
6	Brompheniramine		3°	H_2O (1:5) Ethanol (1:15) Chloroform (1:15)
7	Caffeine		3°	Ethanol (1:130) Chloroform (1:7)

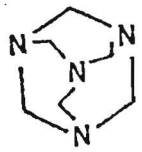
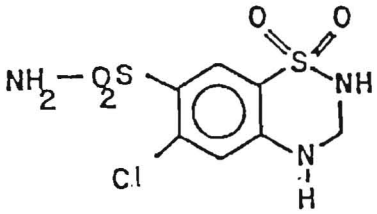
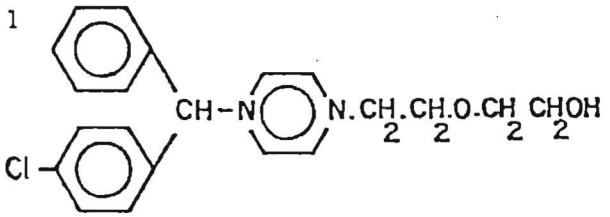
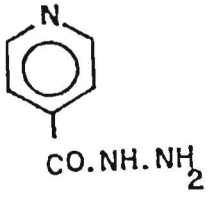
ลำดับที่	ชื่อยา	สูตรโครงสร้าง	amino functional groups	การละลาย
8	Chloramphenicol palmitate		2°	Ethanol (1:25)
9	Chlordiazepoxide		2°, 3°	Ethanol (1:50)
10	Chlorpheniramine Maleate		3°	Ethanol (1:10)
11	Chlorpromazine		3°	Ethanol (1:1.4) Chloroform (1:1)

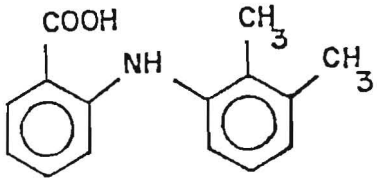
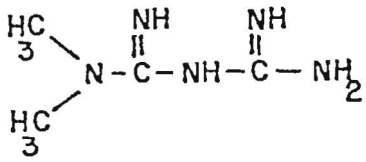
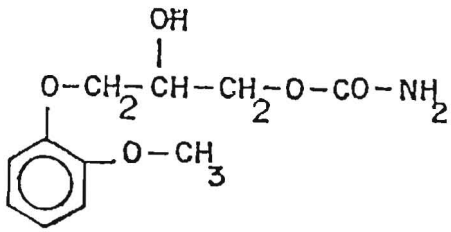
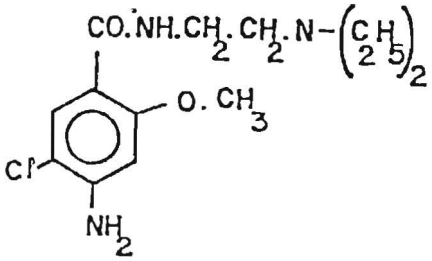
ลำดับที่	ชื่อยา	สูตรโครงสร้าง	amino functional groups	การละลาย
12	Chlorpropamide		2°	Ethanol (1:12) Chloroform (1:9)
13	Cimetidine		2°, 3°	H_2O (1:88)
14	Cinnarizine		3°	dilute HCl
15	Clidinium Bromide		4°	H_2O, ethanol

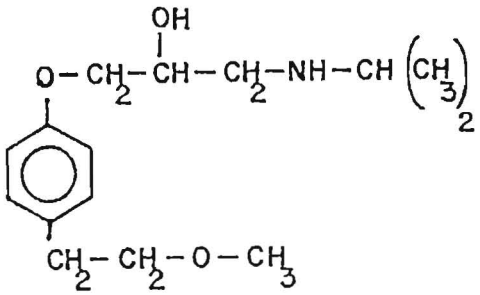
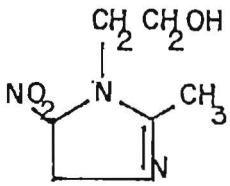
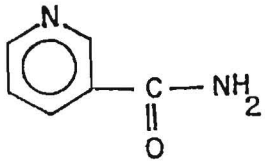
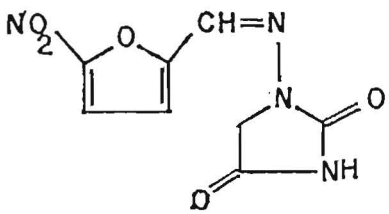
ลำดับที่	ชื่อยา	สูตรโครงสร้าง	amino functional groups	การละลาย
16	Cloxacillin		2°, 3°	H_2O (1:2.5 Ethanol (1:30) Chloroform (1:50)
17	Cyproheptadine		3°	H_2O (1:275) Ethanol (1:35) Chloroform (1:16)
18	Dapsone		1°	Ethanol (1:36)
19	Dextromethorphan		3°	H_2O (1:65) Ethanol (1:10)

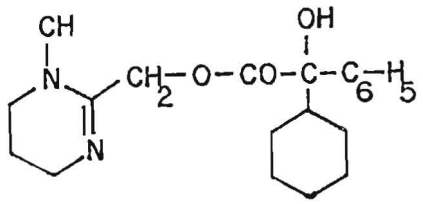
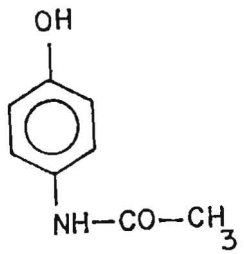
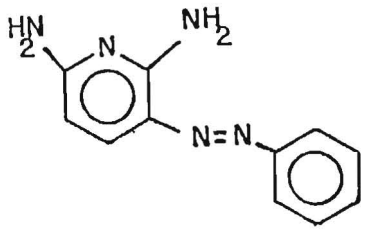
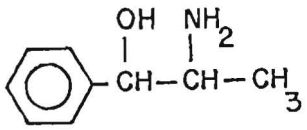
ลำดับที่	ชื่อยา	สูตรโครงสร้าง	amino functional groups	การละลาย
20	Diazepam		3°	Ethanol (1:25) Chloroform (1:2)
21	Dimenhydrinate (Diphenhydramine theocate)		2°, 3°	Ethanol (1:2) Chloroform (1:2)
22	Diphenhydramine		3°	H_2O (1:95) Ethanol (1:2) Chloroform (1:2)
23	Dipyrone		3°	H_2O (1:1.5) Ethanol (1:30)

ลำดับที่	ชื่อยา	สูตรโครงสร้าง	amino functional groups	การละลาย
24	Ephredrine HCl		2°	H_2O (1:3) Ethanol (1:14)
25	Folic acid		1°, 2°, 3°	dilute alkali or carbonate
26	Furazolidone		3°	H_2O, Ethanol
27	Gliclazide		2°, 3°	Ethanol

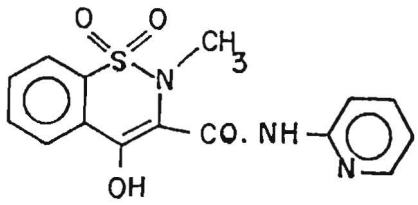
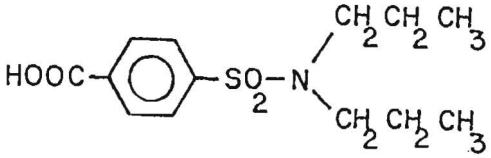
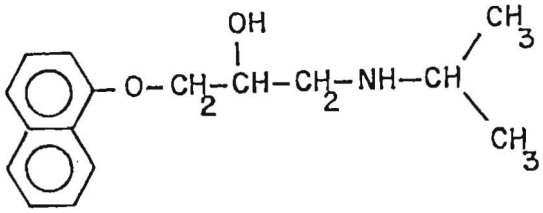
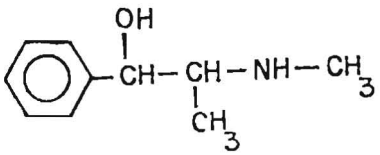
ลำดับที่	ชื่อยา	สูตรโครงสร้าง	amino functional groups	การละลาย
28	Hexamine		3°	H_2O (1:1.5) Ethanol (1:8) Chloroform (1:12)
29	Hydrochloro-thiazide		1°, 2° 2°	Ethanol (1:200) Acetone (1:20)
30	Hydroxyzine HCl	 . HCl	3°	H_2O (1:1) Ethanol (1:4.5)
31	Isoniazid		1°, 2°	H_2O (1:8) Ethanol (1:45) Chloroform (1:1000)

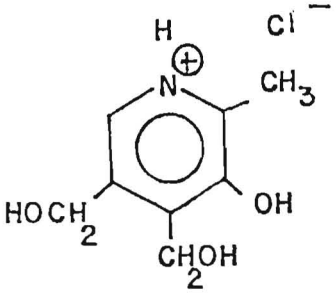
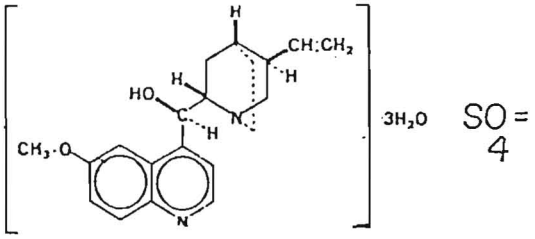
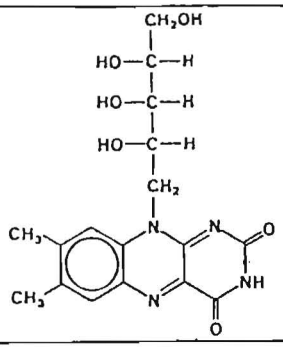
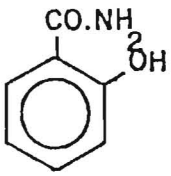
ลำดับที่	ชื่อยา	สูตรโครงสร้าง	amino functional groups	การละลาย
32	Mefenamic acid		2°	Ethanol (1:185) Chloroform (1:150)
33	Metformin		1°, 2°, 3°	H_2O (1:2) Ethanol (1:100)
34	Methocarbamol		1°	H_2O (1:40)
35	Metoclopramide		1°, 2°, 3°	H_2O (1:0.7) Ethanol (1:3) Chloroform (1:55)

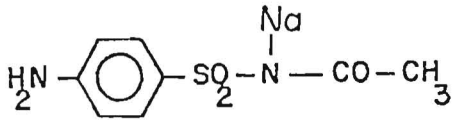
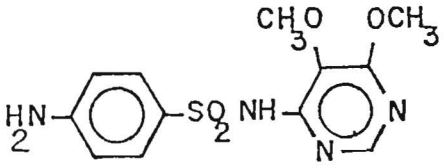
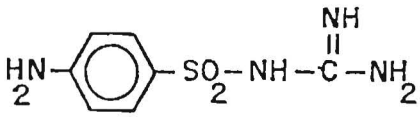
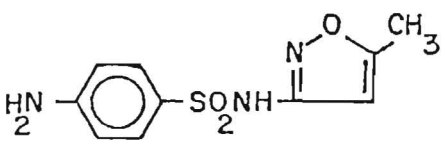
ลำดับที่	ชื่อยา	สูตรโครงสร้าง	amino functional groups	การละลาย
36	Metoprolol		2°	H_2O, Ethanol, Chloroform
37	Metronidazole		3°	H_2O (1:100 Ethanol (1:200)
38	Nicotinamide		1°,3°	H_2O (1:1) Ethanol (1:1.5)
39	Nitrofurantoin		2°, 3°	Acetone (1:200) Dimethyl-formamide (1:16)

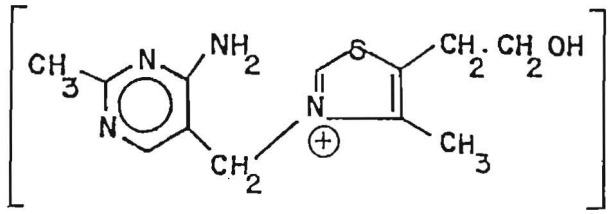
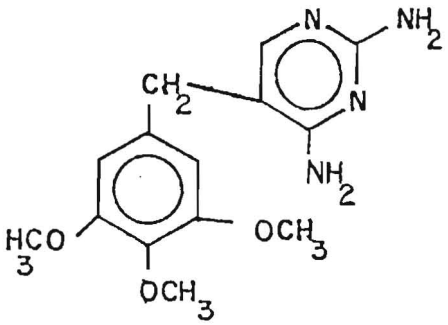
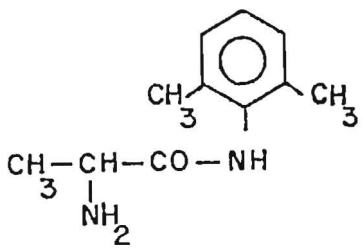
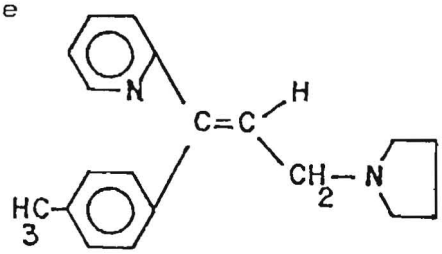
ลำดับที่	ชื่อยา	สูตรโครงสร้าง	amino functional groups	การละลาย
40	Oxyphencyclimine		3°	H_2O (1:100 Ethanol (1:75) Chloroform (1:500)
41	Paracetamol		2°	H_2O (1:70) Ethanol (1:10)
42	Phenazopyridine		1°	H_2O (1:300 Ethanol 1:60)
43	Phenyl-propanolamine		1°	H_2O (1:2.5) Ethanol (1:9)

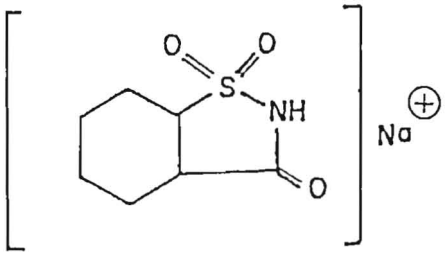
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับที่	ชื่อยา	สูตรโครงสร้าง	amino functional groups	การละลาย
44	Piroxicam		2°, 3°	
45	Probenecid		3°	Ethanol (1:25) Acetone (1;12)
46	Propranolol		2°	Ethanol (1:20)
47	Pseudoephedrine		2°	Ethanol (1:4) Chloroform (1:60)

ลำดับที่	ชื่อยา	สูตรโครงสร้าง	amino functional groups	การละลาย
48	Pyridoxine HCl		3°, 4°	H_2O (1:5) Ethanol (1:115)
49	Quinine Sulphate		3°	H_2O (1:810) Ethanol (1:95)
50	Riboflavin		2°, 3°	dilute alkali
51	Salicylamide		1°	Ethanol

ลำดับที่	ชื่อยา	สูตรโครงสร้าง	amino functional groups	การละลาย
52	Sulfacetamide Sodium		1°, 2°	H_2O (1:1.5)
53	Sulfadoxine		1°, 2°, 3°	Ethanol
54	Sulfaguanidine		1°, 2°	H_2O (1:1000) Ethanol (1:250)
55	Sulfamethoxazole		1°, 2°, 3°	Ethanol

ลำดับที่	ชื่อยา	สูตรโครงสร้าง	amino functional groups	การละลาย
56	Thiamine HCl		1°, 3°	Ethanol (1:100)
57	Trimethoprim		1°, 3°	H_2O (1:2500) Ethanol (1:300) Chloroform (1:55)
58	Tocainide		1°, 2°	H_2O only
59	Triprolidine		3°	H_2O (1:2) Ethanol (1:1.5)

ลำดับที่	ชื่อยา	สูตรโครงสร้าง	amino functional groups	การละลาย
60	Saccharin Sodium		2°	H_2O (1:1.5) Ethanol (1:50)

2. เคมีภัณฑ์และวัสดุที่ใช้ในการทดลอง

2.1 เคมีภัณฑ์

Methanol (analytical grade) (Merck)

Chloroform (analytical grade) (Merck)

Ammonium hydroxide (37%) (BDH)

Ethyl acetate (Merck)

Ethanol absolute (Merck)

Sodium hydroxide

Iodine crystal

Fluorescamine (4-Pheneyspino [furan-2(3H) 1'-phthalan)-3, 3'-dione 1, Fluram(R) (Roche)

Silica gel 60 GF 254 (Merck)

2.2 วัสดุ

Glass plates ขนาด 20 x 20 ซม.

Chromatographic tank

Chromatographic spreader

Long and Short wavelength UV detector (350 & 254 nm.)

Spraying bottle

3. **วิธีทำการทดลอง**

3.1 การเตรียม plates

ผสม Silica gel GF 254 ปริมาณ 30 กรัมด้วยน้ำ 60 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเทลงบน plate ขนาด 20 x 20 ซม. ลากให้มีความหนา 250 ไมโครเมตร ทิ้งให้แห้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส

3.2 การเตรียม Solvent system

สารตัวทำละลายต่าง ๆ ตามอัตราส่วนให้เข้ากัน และให้มีปริมาตร 150 มิลลิลิตร ใส่ใน Chromatographic tanks ทิ้งให้อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายเป็นเวลา 30-60 นาที solvent system ที่ใช้มี 3 ระบบ คือ

Solvent system I = MeOH : NH_3 (100 : 1.5)

Solvent system II = $CHCl_3$: MeOH (90 : 10)

Solvent system III = Ethylacetate

3.3 การเตรียมสารทำ spot

3.3.1 จากตัวยาเดี่ยว

เลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม (โดยดูจากตารางที่ 1) นำมาละลายสารที่ใช้ในการทดลอง โดยให้มีความเข้มข้นประมาณ0.1-1.0% น้ำหนัก/ปริมาตร

3.3.2 จาก dosage form

3.3.2.1 จากยาเม็ด

บดเม็ดยาให้ละเอียด แบ่งผงยามาให้มีปริมาณตัวยาประมาณ 2-10 มิลลิกรัม แล้วละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม กรอง และนำไปทำให้มีความเข้มข้น 0.1 - 1.0% น้ำหนัก/ปริมาตร

3.3.2.2 จากแคปซูล

แบ่งผงยาในแคปซูลให้มีปริมาณตัวยา 2-10 มิลลิกรัม แล้วละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม กรอง และนำไปทำให้มีความเข้มข้น 0.1 - 1.0% น้ำหนัก/ปริมาตร

4. **การเตรียม spraying reagents**

4.1 การเตรียม 0.02% fluorescamine solution

ชั่ง fluorescamine ประมาณ 20 มิลลิกรัม ละลายด้วย acetone ปรับปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

4.2 การเตรียม Iodine Tank

ใส่ผลึก Iodine จำนวนหนึ่งลงใน chromatographic tank แล้วทิ้งให้ไอของ Iodine อิ่มตัว

5. **การทดลอง**

5.1 การ spot

spot sample จากขอบล่างของขอบ plate เป็นระยะ 2 ซม แต่ละ spot ห่างกัน 2 ซม. ปริมาตรของ sample ที่ใช้ spot ประมาณ 1-10 ไมโครลิตรและมีเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 4 มม. ทำ spot ให้แห้งด้วยลมร้อน

5.2 การ developing ของ plates

ใส่ plate ที่ทำการ spot sample เรียบร้อยแล้วลงใน chromatographic tank ที่เตรียมไว้ ทิ้งให้ solvent เคลื่อนตัวผ่าน plate ไปจนได้ระยะทาง 15 ซม. จึงนำ plate ออกจาก chromatographic tank

5.3 การตรวจสอบ

เมื่อนำ plate ออกจาก chromatographic tank แล้วทิ้งให้ plate แห้งในอากาศ จึงนำไปตรวจสอบตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

5.3.1 Visual detection โดยดูว่าสามารถเห็น spot ด้วยตาเปล่าได้หรือไม่

5.3.2 UV detection เป็นขั้นตอนต่อมาโดยดูการเรืองแสงภายใต้ UV light in short wavelength (254 nm) และ long wavelength (350 nm)

5.3.3 Detection with 0.02% fluorescamine โดยการ spray plate ด้วย 0.02% fluorescamine solution แล้วดูการเกิดสีที่เห็นด้วยด้วยตาเปล่า แล้วนำไปดูการเรืองแสงภายใต้ UV light ทั้งที่ short และ long wavelength

5.3.4 Iodine Location โดยการนำ plate ใส่ลงใน Iodine Tank แล้วดูการเกิดสีที่เหลืองเข้มจนถึงน้ำตาลเข้มกับ spot

5.3.5 การวัดค่า Rf valve และคำนวณโดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$Rf = \frac{\text{Distance the substance travels from the origin}}{\text{Distance the solvent front travels from the origin}}$$

บทที่ 3

ผลการทดลอง

ยาทั้ง 60 ชนิดซึ่งจะเป็นตัวยาเดี่ยว ๆ หรืออยู่ในรูปยาเม็ด, ยาแค็ปซูล จะถูกนำมาละลายหรือสกัดในตัวทำละลายที่เหมาะสม และเตรียมเป็นสารละลายให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.1-1.0% w/v นำไป spot บน TLC plate ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร จำนวน 3 แผ่น ระยะห่างแต่ละตัวอย่างประมาณ 2 เซนติเมตร และนำไป develope ใน solvent system 3 system ดังนี้คือ

Solvent system I ประกอบด้วย MeOH:NH_3 (100:1.5)
Solvent system II ประกอบด้วย $CHCl_3$: MeOH (90:10)
Solvent system III ประกอบด้วย Ethylacetate

แต่ละ plate จะ develope จน solvent front สูงประมาณ 15 เซนติเมตร นำ plate ไปทำให้แห้ง แล้วตรวจสอบผลการทดลองดังนี้คือ

1. **ดูด้วยตาเปล่า** ถ้าสามารถเห็นได้จะให้เครื่องหมาย (+) แต่ถ้าไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าจะใช้เครื่องหมาย (-) จะใช้คำว่า VF เมื่อไม่สามารถเห็นด้วยตาเปล่า แต่เมื่อ spray ด้วย Fluorescamine กลับเห็นได้ด้วยตาเปล่า

2. **ตรวจสอบด้วย UV** นำ plate ที่ผ่านจากการตรวจสอบจากข้อ 1 มาดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 350 nm. ตามลำดับ ถ้ามองเห็นภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นใดใช้เครื่องหมาย (+) ถ้าไม่สามารถมองเห็นภายใต้แสง UV ก็ใช้เครื่องหมาย (-)

3. **Fluorescamine spraying** นำ plate ที่ได้จากการตรวจสอบในข้อ 1 และ 2 มา spray ด้วย 0.02% Fluorescamine in acetone และนำไปดูภายใต้แสง UV อีกครั้งหนึ่งว่ามีการ fluorescence หรือไม่ถ้าหากเกิด fluorescence จะได้สี bright yellow green ซึ่งใช้เครื่องหมาย (**) แสดง ถ้าหากไม่เกิด fluorescence ใช้เครื่องหมาย (-) นอกจากนี้ยังดูการเกิด quenching

ซึ่งถ้าเกิดจะได้ spot สีม่วงเข้มเด่นกว่า background ซึ่งจะให้เครื่องหมาย (Q)

4. Iodine vapour (I_2) นำ plate ที่ได้จากการตรวจสอบในข้อ 1,2,3 ไปใส่ใน Iodine Tank ประมาณ 5-10 นาที ดู spot ที่เกิดสีกับ Iodine หรือไม่ ถ้าเกิดใช้เครื่องหมาย (+) ถ้าไม่เกิดใช้เครื่องหมาย (-)

5. Rf measurements วัดค่า Rf ของแต่ละ spots ที่เกิดขึ้น ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดลองของยา 60 ตัว

No.	Solvent System	Visual	UV detect		0.02% Fluorescamine		Iodine location	R_f value
			254	350	254	350		
1	I	-	+	-	-	**	-	0.83
	II	VF	+	-	-	**	+	0.20
	III	VF	+	-	-	**	+	0.20
2	I	-	+	-	-	-	+	0.71
	II	-	+	-	-	-	+	0.62
	III	-	+	-	-	-	+	0.00
3	I	-	+	+	-	**	+	0.00
	II	-	+	+	-	**	+	0.00
	III	-	+	+	-	**	+	0.00
4	I	-	+	-	-	**	+	0.83
	II	-	+	-	-	**	+	0.89
	III	-	+	-	-	**	+	0.92
5	I	-	-	-	-	Q	+	0.85
	II	-	-	-	-	Q	+	0.95
	III	-	-	-	-	Q	+	0.90
6	I	-	+	-	-	-	+	0.51
	II	-	+	-	-	-	+	0.21
	III	-	+	-	-	-	+	0.19

ตารางที่ 2 ผลการทดลอง (ต่อ)

No.	Solvent System	Visual	UV detect		0.02% Fluorescamine		Iodine location	R_f value
			254	350	254	350		
7	I	-	+	-	-	-	-	0.72
	II	-	+	-	-	-	-	0.87
	III	-	+	-	-	-	-	0.54
8	I	-	+	-	-	-	-	0.80
	II	-	+	-	-	-	-	0.88
	III	-	+	-	-	-	-	0.12
9	I	-	+	-	-	Q	-	0.76
	II	-	+	-	-	Q	-	0.31
	III	-	+	-	-	Q	-	0.11
10	I	-	+	-	-	-	-	0.50
	II	-	+	-	-	-	-	0.19
	III	-	+	-	-	-	-	0.00
11	I	-	+	-	-	-	-	0.61
	II	-	+	-	-	-	-	0.11
	III	-	+	-	-	-	-	0.03
12	I	-	+	-	-	-	+	0.73
	II	-	+	-	-	-	+	0.63
	III	-	+	-	-	Q	+	0.08

ตารางที่ 2 ผลการทดลอง (ต่อ)

No.	Solvent System	Visual	UV detect		0.02% Fluorescamine		Iodine location	R_f value
			254	350	254	350		
13	I	-	-	-	-	Q	+	0.82
	II	-	-	-	-	Q	+	0.20
	III	-	-	-	-	Q	+	0.00
14	I	+	-	-	-	-	+	0.00
	II	+	-	-	-	-	+	0.90
	III	+	-	-	-	-	+	0.11
15	I	-	-	-	-	-	-	0.00
	II	-	-	-	-	-	-	0.00
	III	-	-	-	-	-	-	0.11
16	I	-	+	-	-	Q	+	0.79
	II	-	+	-	-	-	+	0.13
	III	-	+	-	-	-	+	0.03
17	I	+	-	-	-	-	+	0.63
	II	+	-	-	-	-	+	0.13
	III	+	-	-	-	-	+	0.03
18	I	VF	+	-	-	**	+	0.75
	II	VF	+	-	-	**	+	0.64
	III	VF	+	-	-	**	+	0.69

ตารางที่ 2 ผลการทดลอง (ต่อ)

No.	Solvent System	Visual	UV detect		0.02% Fluorescamine		Iodine location	R_f value
			254	350	254	350		
19	I	-	-	-	-	-	+	0.82
	II	-	-	-	-	-	+	0.48
	III	-	-	-	-	-	+	0.04
20	I	-	+	-	-	-	-	0.82
	II	-	+	-	-	-	-	0.90
	III	-	+	-	-	-	-	0.79
21	I	-	+	-	-	-	+	0.86
	II	-	+	-	-	-	+	0.77
	III	-	+	-	-	-	+	0.22
22	I	-	+	-	-	-	+	0.63
	II	-	+	-	-	-	+	0.56
	III	-	+	-	-	-	+	0.03
23	I	-	-	-	-	-	+	0.85
	II	-	-	-	-	-	+	0.56
	III	-	-	-	-	-	+	0.00
24	I	-	+	-	-	Q	+	0.48
	II	-	+	-	-	Q	+	0.23
	III	-	+	-	-	Q	+	0.00

ตารางที่ 2 ผลการทดลอง (ต่อ)

No.	Solvent System	Visual	UV detect		0.02% Fluorescamine		Iodine location	R_f value
			254	350	254	350		
25	I	-	-	+	-	**	+	0.00
	II	-	-	+	-	**	+	0.00
	III	-	-	+	-	**	+	0.02
26	I	-	-	-	-	Q	-	0.85
	II	-	-	-	-	Q	-	0.31
	III	-	-	-	-	Q	-	0.00
27	I	-	+	-	-	-	+	0.81
	II	-	+	-	-	-	+	0.84
	III	-	+	-	-	-	+	0.22
28	I	-	-	-	-	-	+	0.79
	II	-	-	-	-	-	+	0.19
	III	-	-	-	-	-	+	0.09
29	I	-	+	-	-	Q	-	0.86
	II	-	+	-	-	Q	-	0.20
	III	-	+	-	-	Q	-	0.74
30	I	-	+	-	-	-	+	0.84
	II	-	+	-	-	-	+	0.85
	III	-	+	-	-	-	+	0.00

ตารางที่ 2 ผลการทดลอง (ต่อ)

No.	Solvent System	Visual	UV detect		0.02% Fluorescamine		Iodine location	R_f value
			254	350	254	350		
31	I	-	+	-	**	-	+	0.69
	II	-	+	-	**	-	+	0.32
	III	-	+	-	**	-	+	0.05
32	I	VF	+	-	-	Q	+	0.83
	II	VF	+	-	-	Q	+	0.34
	III	VF	+	-	-	Q	+	0.22
33	I	-	+	-	-	-	-	0.05
	II	-	+	-	-	-	-	0.86
	III	-	+	-	-	-	-	0.00
34	I	-	+	-	-	-	-	0.86
	II	-	+	-	-	-	-	0.43
	III	-	+	-	-	-	-	0.52
35	I	-	+	-	-	**	+	0.61
	II	-	+	-	-	**	+	0.12
	III	-	+	-	-	**	+	0.00
36	I	-	-	-	-	Q	+	0.56
	II	-	-	-	-	Q	+	0.06
	III	-	-	-	-	Q	+	0.00

051680

ตารางที่ 2 ผลการทดลอง (ต่อ)

No.	Solvent System	Visual	UV detect		0.02% Fluorescamine		Iodine location	R_f value
			254	350	254	350		
37	I	-	+	-	-	-	-	0.79
	II	-	+	-	-	-	-	0.64
	III	-	+	-	-	-	-	0.18
38	I	-	+	-	-	-	-	0.75
	II	-	+	-	-	-	-	0.40
	III	-	+	-	-	-	-	0.11
39	I	-	-	+	Q	-	-	0.81
	II	-	-	+	Q	-	-	0.60
	III	-	-	+	Q	-	-	0.14
40	I	-	+	-	-	-	+	0.00
	II	-	+	-	-	-	+	0.26
	III	-	+	-	-	-	+	0.00
41	I	-	+	-	-	-	+	0.83
	II	-	+	+	-	-	+	0.50
	III	-	+	-	-	-	+	0.58
42	I	+	-	-	-	-	+	0.84
	II	+	-	-	-	-	+	0.82
	III	+	-	-	-	-	+	0.71

ตารางที่ 2 ผลการทดลอง (ต่อ)

No.	Solvent System	Visual	UV detect		0.02% Fluorescamine		Iodine location	R_f value
			254	350	254	350		
43	I	-	+	-	-	**	-	0.65
	II	-	+	-	-	**	-	0.17
	III	-	+	-	-	**	-	0.00
44	I	-	+	-	-	-	+	0.96
	II	-	+	-	-	-	+	0.77
	III	-	+	-	-	-	+	0.37
45	I	-	+	-	-	-	+	0.85
	II	-	+	-	-	-	+	0.29
	III	-	+	-	-	-	+	0.11
46	I	VF	-	-	-	Q	+	0.39
	II	VF	-	-	-	Q	+	0.61
	III	VF	-	-	-	Q	+	0.00
47	I	-	+	-	-	Q	+	0.42
	II	-	+	+	-	Q	+	0.09
	III	-	+	-	-	Q	+	0.00
48	I	-	+	-	-	-	-	0.83
	II	-	+	-	-	-	-	0.16
	III	-	+	-	-	-	-	0.04

ตารางที่ 2 ผลการทดลอง (ต่อ)

No.	Solvent System	Visual	UV detect		0.02% Fluorescamine		Iodine location	R_f value
			254	350	254	350		
49	I	-	+	+	-	**	+	0.63
	II	-	+	+	-	**	+	0.33
	III	-	+	+	-	**	+	0.00
50	I	-	-	+	-	**	+	0.44
	II	-	-	+	-	**	+	0.23
	III	-	-	+	-	**	+	0.32
51	I	-	+	-	-	**	+	0.87
	II	-	+	-	-	**	+	0.61
	III	-	+	-	-	**	+	0.89
52	I	VF	+	-	-	-	+	0.85
	II	VF	+	-	-	**	+	0.29
	III	VF	+	-	-	**	+	0.35
53	I	-	+	-	-	**	-	0.87
	II	-	+	+	-	**	-	0.75
	III	-	+	-	-	**	-	0.82
54	I	-	+	-	-	**	+	0.78
	II	-	+	-	-	**	+	0.11
	III	-	+	-	-	**	+	0.17

ตารางที่ 2 ผลการทดลอง (ต่อ)

No.	Solvent System	Visual	UV detect		0.02% Fluorescamine		Iodine location	R_f value
			254	350	254	350		
55	I	-	+	-	-	**	+	0.00
	II	-	+	-	-	**	+	0.48
	III	-	+	-	-	**	+	0.86
56	I	-	+	-	-	**	+	0.00
	II	-	+	-	-	**	+	0.00
	III	-	+	-	-	**	+	0.00
57	I	-	+	-	-	**	+	0.82
	II	-	+	-	-	**	+	0.30
	III	-	+	-	-	**	+	0.02
58	I	-	+	-	-	**	+	0.77
	II	-	+	-	-	**	+	0.31
	III	-	+	-	-	**	+	0.00
59	I	-	+	-	-	-	+	0.60
	II	-	+	+	-	-	+	0.37
	III	-	+	-	-	-	+	0.07
60	I	-	+	-	-	-	-	0.89
	II	-	+	-	-	-	-	0.03
	III	-	+	-	-	-	-	0.03

VF = Visual with Fluorescamine

** = Fluorescence

+ = positive

- = negative

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการใช้ยา 60 ชนิด มาทำสอบ TLC โดยใช้ Solvent system 3 ชนิด นำ plate ที่ได้มาตรวจด้วยตาเปล่า ตรวจสอบภายใต้แสง UV ทั้งชนิดแสงที่มีความยาวคลื่น 250 nm. และ 360 nm.(short และ Long wavelength) ตรวจสอบโดยการ sprayed ด้วย Fluorescamine และดูภายใต้แสง UV ทั้งสองความยาวคลื่นตรวจสอบโดยการทำปฏิกิริยากับไอของไอโอดีน (Iodine chamber) จากนั้นจึงนำมาวัด R_f value ผลการทดลองทั้งหมด สามารถแยกเป็นสามกลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นสารที่เกิด fluorescence กับ fluorescamine ซึ่งได้แก่สารต่อไปนี้ (จำนวน 18 ชนิด) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงชนิดของยาที่เกิด fluorescence เมื่อทำปฏิกิริยากับ fluorescamine

ลำดับที่	ชื่อยา
1	Aminobenzoic acid
3	Ampicillin
4	Benzocaine
18	Dapsone
25	Folic acid
31	Isoniazid
35	Metoclopramide
43	Phenylpropanolamine
49	Quinine sulphate
50	Riboflavin
51	Salicylamide
52	Sulfacetamide sodium
53	Sulfadoxine

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ลำดับที่	ชื่อยา
54	Sulfaguanidine
55	Sulfamethoxazole
56	Thiamine HCl
57	Trimethoprim
58	Tocainide

เมื่อพิจารณาสูตรโครงสร้างของสารกลุ่มที่ 1 จะพบว่าเกือบทุกตัวมี primary amino group ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ fluorescamine ได้ fluorescence chromophore (pyrrolinones) ยกเว้น Quinine sulphate (สารหมายเลข 49) และ Riboflavin (สารหมายเลข 50) สารทั้งสองตัวนี้ไม่มี amino group ($-NH_2$) แต่ก็เกิด fluorescence ทั้งนี้ก็เพราะว่าสารนี้มีสูตรโครงสร้างที่ให้ fluorescence ในตัวเองแล้ว

ดังนั้นถ้าจะพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารในกลุ่มนี้ ข้อมูลอื่น เช่นการทำปฏิกิริยากับไอของไอโอดีน ค่า R_f value และการที่จะสามารถมองเห็น spot ด้วยตาเปล่าหรือการดูภายใต้แสง UV ทั้งสองความยาวคลื่นก็น่าจะให้ความแตกต่างได้ เช่น sulfaguanidine (สารหมายเลข 54) กับ sulfamethoxazole (สารหมายเลข 55) ทั้งสองชนิดให้ fluorescence กับ fluorescamine, การเกิดสีกับไอของไอโอดีน และ ตรวจสอบภายใต้แสง UV ความยาวคลื่นสั้น แต่สารสองชนิดนี้จะมีข้อแตกต่างที่เด่นชัดคือ R_F value ในทั้งสาม system ของ Solvent ที่ใช้ จึงสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ และอีกตัวอย่างคือ metoclopamide (สารหมายเลข 35) และ Phenylpropanolamine (สารหมายเลข 43) ทั้งสองชนิดมี fluorescence กับ fluorescamine, ค่า R_f value ก็ใกล้เคียงกัน แต่จะมีข้อแตกต่างในการทำปฏิกริยากับไอโอดีน ซึ่ง metoclapamide จะเกิดปฏิกิริยากับไอโอดีนเป็นต้น ข้อมูลต่าง ๆ เหล่านี้มีแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงค่า Rf, การตรวจสอบด้วยตาเปล่า และภายใต้แสง UV, และการเกิดสีกับไอโอดีนของสารกลุ่มที่ 1

ลำดับที่	Rf value			Visual	UV		Iodine Location
	Solvent system				Short wave	Long wave	
	1	2	3				
1	0.83	0.20	0.20	+	+	-	+
3	0.00	0.00	0.00	-	+	+	+
4	0.83	0.89	0.92	-	+	-	+
18	0.75	0.64	0.69	+	+	-	+
25	0.00	0.00	0.02	-	-	+	-
31	0.69	0.32	0.05	-	+	-	+
35	0.61	0.12	0.00	-	+	-	+
43	0.65	0.17	0.00	-	+	-	-
49	0.63	0.33	0.00	-	+	+	+
50	0.44	0.23	0.32	+	-	+	+
51	0.87	0.61	0.89	-	+	-	+
52	0.85	0.29	0.35	+	+	-	+
53	0.87	0.75	0.82	-	+	-	-
54	0.78	0.11	0.17	-	+	-	+
55	0.00	0.48	0.86	-	+	-	+
56	0.00	0.00	0.00	-	+	-	+
57	0.82	0.30	0.02	-	+	-	+
58	0.77	0.31	0.02	-	+	-	+

สารกลุ่ม 2 เป็นสารที่เกิด quenching (Spot สีม่วง) เมื่อ spray ด้วย fluorescamine แล้วดูภายใต้แสง UV สารกลุ่มนี้แสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ชนิดของยาที่เกิด quenching (spot สีม่วง) กับ fluorescamine

สารหมายเลข	ชื่อสาร
5	Bromhexine
9	Chlordiazepoxide
13	Cimetidine
16	Cloxacillin
24	Ephedrine HCl
26	Furazolidone
29	Hydrochlorothiazide
32	Mefenamic acid
36	Metoprolol
39	Nitrofurantoin
46	Propranolol
47	Pseudoephedrine

เมื่อพิจารณาสูตรโครงสร้างของสารประกอบกับรายการการเกิด quenching spot สีม่วง แสดงว่าสารเหล่านี้มี secondary amine ในโครงสร้าง ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ fluorescamine ได้สาร nonfluorescent aminoenones แต่จากการทดลอง Bromhexine (สารหมายเลข 5) และ Furazolidone (สารหมายเลข 26) สารทั้งสองตัวนี้ไม่มี (-NH-) แต่ยังเกิด spot สีม่วงเข้มภายใต้แสง UV ได้ เช่น เดียวกับการพิสูจน์เอกลักษณ์ของกลุ่มนี้ก็ใช้หลักความแตกต่างของ Rf Value, การทำปฏิกิริยากับไอของไอโอดีน การเกิดสีหรือมองเห็นด้วยตาเปล่า ดังแสดงในตารางที่ 6

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 แสดงค่า Rf, การตรวจสอบด้วยตาเปล่า และภายใต้แสง UV, และการเกิดสีกับไอโอดีนของสารกลุ่มที่ 2

ลำดับที่	Rf value			Visual	UV		Iodine Location
	Solvent system				Short wave	Long wave	
	1	2	3				
5	0.85	0.95	0.90	-	-	-	+
9	0.76	0.31	0.11	-	+	-	-
13	0.82	0.20	0.00	-	-	-	+
16	0.79	0.13	0.03	-	+	-	+
24	0.48	0.23	0.00	-	+	-	+
26	0.85	0.31	0.00	-	-	-	-
29	0.86	0.20	0.74	-	+	-	-
32	0.83	0.34	0.22	+	+	-	+
36	0.56	0.06	0.00	-	-	+	+
39	0.81	0.60	0.14	-	-	+	+
46	0.39	0.61	0.00	+	-	-	+
47	0.42	0.09	0.00	-	+	-	+

สารกลุ่ม 3 คือสารที่ไม่เกิด fluorescence กับ fluorescamine หรือเกิด quenching ภายใต้ UV เมื่อ sprayed ด้วย fluorescamine สารในกลุ่มนี้ได้แก่ สารดังต่อไปนี้

ตารางที่ 7 ชนิดของยาที่ไม่เกิด fluorescence กับ fluorescamine

ลำดับที่	ชื่อสาร
2	Amitriptyline
6	Bromphenilamine
7	Caffeine
8	Chloramphenicol palmitate
10	Chlorpheniramine maleate
11	Chlorpromazine
12	Chlorpropamide
14	Cinnarizine
15	Clidinium Bromide
17	Cyproheptadine
19	Dextromethorphan
20	Diazepam
21	Dimenhydrinate
22	Diphenhydramine
23	Dipyrone
27	Glicazide
28	Hexamine
30	Hydroxyzine HCl
33	Metformin
34	Methocarbamol
37	Metronidazole

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ลำดับที่	ชื่อสาร
38	Nicotinamide
40	Oxyphencyclimine
41	Paracetamol
42	Phenazopyridine
44	Piroxicam
45	Probenecid
48	Pyridoxine HCl
49	Quinine Sulphate
60	Saccharin Sodium

ในจำนวนนี้มีสารที่มี $-NH_2$ group อยู่ 4 ตัว คือ สารหมายเลข 33 (Metformin) สารหมายเลข 34 (Methocarbamol) สารหมายเลข 38 (Nicotinamide) สารหมายเลข 42 (Phenazopyridine) ซึ่งเมื่อพิจารณาสูตรโครงสร้างของสารทั้ง 4 ตัวนี้ พบว่า NH_2 group จะอยู่ในรูปของ Amide ($-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NH_2$) guanidine ($NH_2-\overset{NR}{\overset{\|}{C}}-NR_2$) หรือในรูปของ imine ($NH_2-\overset{NR}{\overset{\|}{C}}-R$) สารเหล่านี้มีผลทำให้ nucleophylicity ของ NH_2 ลดลง (ความเป็นด่างลดลง) ดังนั้นปฏิกิริยาระหว่าง NH_2 group กับ fluorescamine ก็จะลดลง การเกิด fluorescence chromophore ก็จะลดลงหรือไม่เกิด ในการทดลองตรวจสารเหล่านี้ พบว่าไม่เกิด fluorescence จึงน่าจะสรุปได้ว่าสูตรโครงสร้างของสารที่เป็น amide, guanidine และ imine group ไม่เกิด fluorescence กับ fluorescamine ถึงแม้สารเหล่านี้จะมี $-NH_2-$

ในจำนวนสารกลุ่มที่ 3 จะมีสารซึ่งไม่เกิด quenching กับ fluorescamine ได้แก่ Chloramphenicol (สารหมายเลข 8) Chlorpropramide (สารหมายเลข 12) Glicazide (สารหมายเลข 27) Paracetamol (สารหมายเลข 14) และ Saccharin (สารหมายเลข 60) ซึ่งสารเหล่านี้ไม่เกิด quenching กับ

fluorescamine ถึงแม้ว่าจะมี -NH group เมื่อพิจารณาสูตรโครงสร้างของสารเหล่านี้ พบว่า -NH group จะอยู่ในรูปของ secondary amide (-NH-C(=O)-) urea derivative (-NH-C(=O)-NH-) หรือ secondary sulfonyl group (-NH-S(=O)(=O)-) ปรากฏการณ์ที่ไม่เกิด quenching กับ fluorescamine ก็เช่นเดียวกันกับการไม่เกิด fluorescence กับ fluorescamine

ดังนั้นในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารในกลุ่มนี้ นอกจากจะใช้ fluorescamine แล้ว จึงจำเป็นต้องใช้ข้อมูลจาก Rf Value ใน solvent system ทั้งสาม system การเกิดปฏิกิริยากับ Iodine และการตรวจสอบภายใต้แสง UV อีกด้วย ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงค่า Rf, การตรวจสอบด้วยตาเปล่า และภายใต้แสง UV, และการเกิดสีกับไอโอดีนของสารกลุ่มที่ 3

ลำดับที่	Rf value			Visual	UV		Iodine Location
	Solvent system				Short wave	Long wave	
	1	2	3				
2	0.71	0.62	0.00	-	-	-	+
6	0.51	0.21	0.19	-	-	-	+
7	0.72	0.87	0.54	-	+	-	-
8	0.80	0.88	0.12	-	+	-	-
10	0.50	0.19	0.00	-	+	-	-
11	0.61	0.11	0.03	-	+	-	-
12	0.73	0.63	0.08	-	+	-	+
14	0.00	0.90	0.82	+	-	-	+
15	0.00	0.00	0.11	-	-	-	-
17	0.63	0.62	0.63	+	-	-	+

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ลำดับที่	Rf value			Visual	UV		Iodine Location
	Solvent system				Short wave	Long wave	
	1	2	3				
19	0.82	0.48	0.04	-	-	-	+
20	0.82	0.90	0.79	-	+	-	-
21	0.86	0.77	0.12	-	+	-	+
22	0.63	0.56	0.03	-	+	-	+
23	0.85	0.05	0.00	-	-	-	+
27	0.81	0.84	0.22	-	+	-	+
28	0.79	0.19	0.09	-	-	-	+
30	0.84	0.85	0.00	-	+	-	+
33	0.05	0.80	0.00	+	-	-	-
34	0.86	0.43	0.52	-	+	-	-
37	0.79	0.64	0.18	-	+	-	-
38	0.75	0.40	0.11	-	+	-	-
40	0.00	0.26	0.00	-	+	-	-
41	0.83	0.50	0.58	-	+	-	+
42	0.84	0.82	0.71	+	-	+	+
44	0.96	0.77	0.37	-	+	-	+
45	0.85	0.29	0.11	-	+	-	+
48	0.83	0.16	0.04	-	+	-	+
59	0.60	0.27	0.07	-	+	-	+
60	0.89	0.03	0.03	-	+	-	-

จากผลการทดลองทั้งหมดจึงพอสรุปได้ว่า ในการตรวจสอบเภสัชภัณฑ์ โดยการใช้ fluorescamine สามารถแบ่งเภสัชภัณฑ์ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มที่เกิด fluorescence ยาในกลุ่มนี้ สูตรโครงสร้าง จะมี primary amine group ($-NH_2$) ซึ่งจะเป็น aromatic หรือ aliphatic amine ก็ได้ แต่มีข้อยกเว้นบางตัวเช่น Salicylamide (สารหมายเลข 51) ไม่มี primary amine groups แต่มี primary amide groups ซึ่งปกติไม่ควรเกิด fluorescence กับ fluorescamine

2. กลุ่มที่เกิด quenching ยากลุ่มนี้สูตรโครงสร้างจะมี secondary amine group

3. กลุ่มที่ไม่เกิด fluorescence หรือ quenching กลุ่มนี้ สูตรโครงสร้างอาจมี tertiary หรือ quarternary amine group หรืออื่น ๆ

เนื่องจากการตรวจสอบเภสัชภัณฑ์ ต้องอาศัยวิธี TLC Chromatography ดังนั้นการใช้ Solvent system การวัด Rf Value และการตรวจภายใต้แสง UV และในบรรยากาศของไอโอดีนจึงสามารถใช้เป็นข้อมูลเพิ่มเติมในการตรวจสอบได้ด้วย

อย่างไรก็ตามการตรวจสอบด้วยวิธีนี้หรือใช้วิธีอื่น ๆ ก็ตามเพียงอย่างเดียว อาจจะให้ข้อมูลไม่พอเพียง ดังนั้นในการตรวจสอบสารบางชนิด จึงอาจจะต้องใช้หลายวิธี เพื่อความถูกต้อง

บรรณานุกรม

1. Weigele, M., DeBernardo, S.L., Tengi, J.P. and Leimgruber, W., "A Novel Reagent for the Fluorometric Assay of Prinmary Amines" J.Amer.Chem.Soc. 94(16), (1972) : 5927-5928.

2. Weigele, M., Tengi, J.P., De Bernado, S., Czajkowski, R. and Leimnguber, W., "Fluoreometric Reagents for Primary Amines", J.Org.Chem. 41(2), (1976) : 388-389.

3. Felix, A. M. and Terkelson, G., "Determination of Hydroxy-proline in fluorometric Amino Acid Analysis with Fluorescamine," Anal.Biochem. 56(2), 1973 : 610-615.

4. Stein, S., Ohlen, P., Stone, J., Dairman, W. and Udenfriend, S., "Amino Acid Analysis with Fluores-camine at the Picomole Level", Arch.Biochem Biophys. 155(1), (1973) : 203-212.

5. Udenfriend, S., Stein, S., Bohlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W. and Wegele, M., "Fluorescamine : A Reagent for Assay of Amino Acids, Peptides, Protein, and Primary Amines in the Picomole Range."Science 178, (1972) : 871-872.

6. Perrett, D., Webb, J.P.W, Silk, D. B. A. and Clark, M., "The Assay of Dipeptides Using Fluorescamine and Its Application to Determining Dipeptides Activity" Anal Biochem. 68(1), (1975) : 161-166.

7. Kovacs, K.L., Chiroptical Studies of Fluorescamine Labelled Amino Acid, Biochem.Biophys.Res.Commun. 86(4), (1979) : 995-1001.

8. Cheng, L.K., Levitt, M., and Fung H.L. "Fluorescence Reaction of Fluorescamine with Levodopa and Its Derivatives : Fluorescence Assay of 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylalnine in Levodopa Dosage Forms. J.Pharm. Sci. 64(5), 1975 : 839-841.

9. Siliva, J. A. F. and Strojny, N., "Spectrofluorometeric Determination of Pharmaceuticals Containing Aromatic or Aliphatic Primary Amino Groups as Their Fluorescamine (Fluram) Derivatives." Anal.Chem. 47(4), (1975) : 714-718.

10. Sterling, J. M. and Haney, W.G., "Spectrophotofluorometer Analysis of Procainamide and Sulfadiazine in Presence of Primary Aliphatic Amines Based on Reaction with Fluorescamine." J.Pharm.Sci. 63(9), (1974) : 1448-1450.

11. Imai, K., "Fluorimetric Assay of Dopamine, Norepinephrine, and Their-O-Methyl Metabolites by Using Fluorescamine." J.Chromatography. 105(1), (1975) : 135-140.

12. Caddy, B. and Stead, A.H., "Some Fluorescent Derivatives of the Drug Phenelzine." Analyst. 103, (1978) : 937-949.

13. Febregas, J.L. and Beneto, J.E., "Direct Spectroflurimetric Determination of the Free Amino Group of Cephalexine in its Lysine Salt." Analyst. 105, (1980) : 813-816.

14. Nakamura, H. and Tamura, Z., "Fluorometric Determination of Secandary Amines Based on Their Reaction with Fluorescamine." Anal.Chem. 52, (1980) : 2087-2092.