

1-1-1997

Detection of Pharmaceutical Products using Fluorescamine(การตรวจสอบเภสัชภัณฑ์โดยใช้ฟลูออเรสคามีน)

Lawan Sriphong

Ranee Surakarnkul

Sunibhond Pummangura

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/tjps>

 Part of the [Pharmacology Commons](#)

Recommended Citation

Sriphong, Lawan; Surakarnkul, Ranee; and Pummangura, Sunibhond (1997) "Detection of Pharmaceutical Products using Fluorescamine(การตรวจสอบเภสัชภัณฑ์โดยใช้ฟลูออเรสคามีน)," *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*: Vol. 21: Iss. 1, Article 6.

Available at: <https://digital.car.chula.ac.th/tjps/vol21/iss1/6>

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

การตรวจสอบเภสัชภัณฑ์โดยใช้ฟลูออเรสคามีน

ลาวัลย์ ศรีพงษ์¹ ภาณี สุรกาญจน์กุล² สุนิพนธ์ ภูมมางกูร³

¹ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม 73000

² กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี 11000

³ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

บทคัดย่อ: การใช้ fluorescamine เป็น spraying reagent พ่นบน plate ที่เคลือบด้วย silica gel GF-254 สามารถใช้ตรวจสอบยาที่มีหมู่ฟังก์ชัน $-NH_2$, $-NH-$, $-N-$ พบว่ายาที่เป็น primary amine จะเกิด fluorescence กับ fluorescamine แต่ยาที่เป็น secondary amine จะเกิด quenching ส่วนที่เป็น tertiary amine หรือ quaternary amine จะไม่เกิดอะไรกับ fluorescamine โดยอาศัยผลการทดลองอันนี้ทำให้สามารถแบ่งยาเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นยาที่เกิด fluorescence กับ fluorescamine กลุ่มที่ 2 เกิด quenching และกลุ่มที่ 3 ไม่เกิด fluorescence หรือ quenching กับ fluorescamine โดยอาศัยการแบ่งยาเป็นสามกลุ่ม และการใช้ข้อมูลจาก Rf value ใน 3 solvent systems การใช้ไอของไอโอดีน ทำให้สามารถตรวจสอบหรือพิสูจน์เอกลักษณ์ของยาได้

กุญแจคำ: ฟลูออเรสคามีน, การพิสูจน์เอกลักษณ์ของยา

บทนำ

Fluorescamine มีชื่อทางเคมีว่า 4-phenylspiro [furan-2-(3H), 1'phthalan]-3, 3'-dione ชื่อทางการค้าโดยบริษัท Roche คือ Fluram สารนี้ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาเป็นครั้งแรกโดยคณะของ Weigle et-al (1-2) ได้มีการนำ fluorescamine มาทำปฏิกิริยากับสารพวก functional primary amine จะให้ fluorescence compound ซึ่งหลักการนี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารได้ เช่น หาปริมาณของ amino acid (3-5), peptides, proteins (6-7) เป็นต้น

การดำเนินการวิจัยครั้งนี้เป็นการเพิ่มวิธีการตรวจสอบเภสัชภัณฑ์โดยการใช้ fluorescamine แม้จะใช้ fluorescamine ก็ตาม แต่ก็ต้องใช้วิธีอื่นร่วมด้วยในการพิสูจน์เอกลักษณ์นั้น ๆ เช่น การวัดค่าดัชนีหักเห การเกิดปฏิกิริยากับแสงอุลตราไวโอเล็ต และอื่น ๆ เป็นต้น

การทดลอง

วัสดุ

1. ตัวอย่างยา 60 ชนิดในหลายลักษณะ คือ ผง ยาเม็ด ยาเม็ด และแคปซูล
2. Silica gel 60 GF-254 plates ขนาด 20x20 ซม.
3. Chromatographic tank
4. Long and short wavelenght UV detector (350 และ 254 nm.)
5. Iodine tank
6. Spraying reagent (0.02% fluorescamine solution in acetone)

วิธีการทดลอง

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำยาตัวอย่างมาละลาย หรือสกัดในตัวทำละลายที่เหมาะสม และเตรียมเป็นสารละลายให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.1-1.0% น้ำหนักต่อปริมาตร

การทดสอบโดย TLC

นำสารละลายตัวอย่างมา spot บน TLC plate ขนาด 20x20 ซม. จำนวน 3 แผ่น ระยะห่างแต่ละตัวอย่าง 2 ซม. นำไป develop ใน solvent system 3 system ดังนี้คือ

system I. MeOH : NH₃ (100 : 1.5)

system II. CHCl₃ : MeOH (90 : 10)

system III. Ethylacetate

แต่ละแผ่นจะ develop จน solvent front สูงประมาณ 15 ซม. นำไปทำให้แห้ง แล้วตรวจสอบตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. Visual detection ดูด้วยตาเปล่าว่าเห็น spot หรือไม่
2. UV detection ดูการเรืองแสงภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตความยาวคลื่นสั้น (254 nm.) และยาว (350 nm.)
3. Detection with 0.02% fluorescamine โดยการสเปรย์ plate ด้วย 0.02% fluorescamine solution แล้วดู

สีที่เห็นด้วยตาเปล่า แล้วนำไปดูการเรืองแสงภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ความยาวคลื่นสั้นและยาว

4. Iodine location นำ plate ไปใส่ iodine tank แล้วดูการเกิดสีที่เหลืองเข้มจนถึงน้ำตาลกับ spot

5. การวัดค่า Rf value

ผลการทดลอง วิเคราะห์และสรุปผล

ยาทั้ง 60 ชนิด สามารถแยกเป็นสามกลุ่ม คือ สารกลุ่มที่ 1 เป็นสารที่เกิด fluorescence กับ fluorescamine (ดังตารางที่ 1) สารกลุ่มที่ 2 เป็นสารที่เกิด quenching กับ fluorescamine (ดังตารางที่ 2) สารกลุ่มที่ 3 เป็นสารที่ไม่เกิด fluorescence กับ fluorescamine และไม่เกิด quenching ภายใต้ UV เมื่อสเปรย์ด้วย fluorescamine (ดังตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 ชนิดของสารที่เกิด fluorescence กับ fluorescamine

สาร หมายเลข	ชื่อยา	Rf value			Visual	UV delection	Fluorescamine detection	Iodine
		I	II	III				
1	Aminobenzoic acid	0.83	0.20	0.20	+	s	f	+
3	Ampicillin	0.00	0.00	0.00	-	s, l	f	+
4	Benzocaine	0.83	0.89	0.92	-	s	f	+
18	Dapsone	0.75	0.64	0.69	+	s	f	+
25	Folic acid	0.00	0.00	0.02	-	l	f	-
31	Isoniazid	0.69	0.32	0.05	-	s	f	+
35	Metoclopramide	0.61	0.12	0.00	-	s	f	+
43	Phenylpropanolamine	0.65	0.17	0.00	-	s	f	-
49	Quinine sulphate	0.63	0.33	0.00	-	s, l	f	+
50	Riboflavin	0.44	0.23	0.32	+	l	f	+
51	Salicylamide	0.87	0.61	0.89	-	s	f	+
52	Sulfacetamide sodium	0.85	0.29	0.35	+	s	f	+
53	Sulfadoxine	0.87	0.75	0.82	-	s	f	-
54	Sulfaguanidine	0.78	0.11	0.17	-	s	f	+
55	Sulfamethoxazole	0.00	0.48	0.86	-	s	f	+
56	Thlamine HCl	0.00	0.00	0.00	-	s	f	+
57	Trimethoprim	0.82	0.30	0.02	-	s	f	+
58	Tocainide	0.77	0.31	0.02	-	s	f	+

(ผล + คือ ตรวจสอบได้ และ ผล - คือ ตรวจสอบไม่ได้)

(ผล s คือ ตรวจสอบได้โดย UV detector ที่ 254 nm. และผล l คือตรวจสอบได้โดย UV detector ที่ 350 nm.)

(ผล f คือ ตรวจสอบได้โดยการเรืองแสงหลังจากสเปรย์ด้วย 0.02% fluorescamine)

ตารางที่ 2 ชนิดของสารที่เกิด quenching กับ fluorescamine

สาร หมายเลข	ชื่อยา	Rf value			Visual	UV delection	Fluorescamine detection	Iodine
		I	II	III				
5	Bromhexine	0.85	0.95	0.90	-	-	q	+
9	Chlordiazepoxide	0.76	0.31	0.11	-	s	q	-
13	Cimetidine	0.82	0.20	0.00	-	-	q	+
16	Cloxacillin	0.79	0.13	0.03	-	s	q	+
24	Ephedrine HCl	0.48	0.23	0.00	-	s	q	+
26	Furazolidine	0.85	0.31	0.00	-	-	q	-
29	Hydrochlorothiazide	0.86	0.20	0.74	-	s	q	-
32	Mefenamic acid	0.83	0.34	0.22	+	s	q	+
36	Metoprolol	0.56	0.06	0.00	-	l	q	+
39	Nitrofurantoin	0.81	0.60	0.14	-	l	q	+
46	Propranolol	0.39	0.61	0.00	+	-	q	+
47	Psuedoephedrine	0.42	0.09	0.00	-	s	q	+

(ผล + คือ ตรวจสอบได้ และ ผล - คือ ตรวจสอบไม่ได้)

(ผล s คือ ตรวจสอบได้โดย UV detector ที่ 254 nm. และผล l คือตรวจสอบได้โดย UV detector ที่ 350 nm.)

(ผล q คือ ตรวจสอบได้โดยเกิดการ quenching หลังจากสเปรย์ด้วย 0.02% fluorescamine)

เมื่อพิจารณาสูตรโครงสร้างของสารกลุ่มที่ 1 จะพบว่าเกือบทุกตัวมี primary amino group ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ fluorescamine ได้ fluorescence chromophore (pyrrolinones) ยกเว้น quinine sulfate (สารหมายเลข 49) และ riboflavin (สารหมายเลข 50) สารทั้งสองตัวนี้ไม่มี primary amino group แต่ก็เกิด fluorescence ทั้งนี้ก็เพราะว่าสารนี้มีสูตรโครงสร้างที่ให้ fluorescence ในตัวเองอยู่แล้ว

ดังนั้นถ้าจะพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารกลุ่มที่ 1 นี้ ข้อมูลอื่นเช่น การทำปฏิกิริยากับไอของไอโอดีน ค่า Rf value และการที่จะสามารถมองเห็น spot ด้วยตาเปล่า หรือการดูภายใต้แสง UV ทั้งสองความยาวคลื่นก็น่าจะให้ความแตกต่างได้ เช่น sulfaguanidine (สารหมายเลข 54) กับ sulfamethoxazole (สารหมายเลข 55) ทั้งสองชนิดให้ fluorescence กับ fluorescamine การเกิดสีกับไอของไอโอดีน และตรวจสอบภายใต้แสง UV ความยาวคลื่นสั้น แต่สารทั้งสองชนิดนี้มีข้อแตกต่างที่เด่นชัดคือ Rf value ในทั้งสาม system ของ solvent ที่ใช้ จึงสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ และอีกตัวอย่างคือ

metoclopramide (สารหมายเลข 35) และ phenylpropranolamine (สารหมายเลข 43) ทั้งสองชนิดมี fluorescence กับ fluorescamine ค่า Rf value ก็ใกล้เคียงกัน แต่จะมีข้อแตกต่างในการทำปฏิกิริยากับไอของไอโอดีน ซึ่งมีเพียง metoclopramide ที่เกิดปฏิกิริยากับไอโอดีน เป็นต้น

เมื่อพิจารณาสูตรโครงสร้างของสารกับการเกิด quenching เป็น spot สีม่วง จะพบว่าสารเหล่านี้มี secondary amine ในโครงสร้าง ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ fluorescamine ได้สาร nonfluorescence aminoenones แต่จากการทดลอง bromhexine (สารหมายเลข 5) และ furazolidine (สารหมายเลข 26) สารทั้งสองตัวนี้ไม่มี (-NH-) แต่ยังเกิด spot สีม่วงเข้มภายใต้แสง UV ได้ การพิสูจน์เอกลักษณ์ของกลุ่มนี้ ก็ให้หลักความแตกต่างของ Rf value การทำปฏิกิริยากับไอของไอโอดีนการเกิดสีหรือมองเห็นด้วยตาเปล่าด้วยเช่นเดียวกัน

ในสารกลุ่มที่ 3 มีสารที่มี -NH₂ group อยู่ 4 ตัวคือ Metformin (สารหมายเลข 33) Methocarbamol (สารหมายเลข 34) Nicotinamide (สารหมายเลข 38)

ตารางที่ 3 ชนิดของสารที่เกิดไม่เกิดทั้ง fluorescence และ quenching กับ fluorescamine

สาร หมายเลข	ชื่อยา	Rf value			Visual	UV delection	Fluorescamine detection	Iodine
		I	II	III				
2	Amitriptyline	0.71	0.62	0.00	-	-	n	+
6	Bromophenilamine	0.51	0.21	0.19	-	-	n	+
7	Caffeine	0.72	0.87	0.54	-	s	n	-
8	Chloramphenicol palmitate	0.80	0.88	0.12	-	s	n	-
10	Chlorphenilamine maleate	0.50	0.19	0.00	-	s	n	-
11	Chlorpromazine	0.61	0.11	0.03	-	s	n	-
12	Chlorpropamide	0.73	0.63	0.08	-	s	n	+
14	Cinnarizine	0.00	0.90	0.82	+	-	n	+
15	Clidinium bromide	0.00	0.00	0.11	-	-	n	-
17	Cyproheptadine	0.63	0.62	0.63	+	-	n	+
19	Dextromethorphan	0.82	0.48	0.04	-	-	n	+
20	Diazepam	0.82	0.90	0.79	-	s	n	-
21	Dimenhydrinate	0.86	0.77	0.12	-	s	n	+
22	Diphenhydramine	0.63	0.56	0.03	-	s	n	+
23	Dipyron	0.85	0.05	0.00	-	-	n	+
27	Glicazide	0.81	0.84	0.22	-	s	n	+
28	Hexamine	0.79	0.19	0.09	-	-	n	+
30	Hydroxyzine HCl	0.84	0.85	0.00	-	s	n	+
33	Metformin	0.05	0.80	0.00	+	-	n	-
34	Methocarbamol	0.86	0.43	0.52	-	s	n	-
37	Metronidazole	0.79	0.64	0.18	-	s	n	-
38	Nicotinamide	0.75	0.40	0.11	-	s	n	-
40	Oxyphencyclimine	0.00	0.26	0.00	-	s	n	-
41	Paracetamol	0.83	0.50	0.58	-	s	n	+
42	Phenazopyridine	0.84	0.82	0.71	+	l	n	+
44	Piroxicam	0.96	0.77	0.37	-	s	n	+
45	Probenecid	0.85	0.29	0.11	-	s	n	+
48	Pyridoxine HCl	0.83	0.16	0.04	-	s	n	+
49	Quinine sulfate	0.60	0.27	0.07	-	s	n	+
60	Saccharin sodium	0.89	0.03	0.03	-	s	n	-

(ผล + คือ ตรวจพบได้ และ ผล - คือ ตรวจพบไม่ได้)

(ผล s คือ ตรวจพบได้โดย UV detector ที่ 254 nm. และผล l คือตรวจพบได้โดย UV detector ที่ 350 nm.)

(ผล n คือ ไม่สามารถตรวจพบได้หลังจากสเปรย์ด้วย 0.02% fluorescamine)

Phenazopyridine (สารหมายเลข 42) ซึ่งเมื่อพิจารณาสูตรโครงสร้างของสารทั้ง 4 ตัวนี้ พบว่า

-NH₂ group จะอยู่ในรูป amide ($\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{NH}_2 \end{matrix}$)

guanidine ($\begin{matrix} \text{N} \\ \parallel \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{NR}_2 \end{matrix}$) หรือในรูป imine

($\begin{matrix} \text{N} \\ \parallel \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{R} \end{matrix}$) สารเหล่านี้มีผลทำให้ nucleophilicity ของ -NH₂ group ลดลง (ความเป็นด่างลดลง) ดังนั้นปฏิกิริยาระหว่าง -NH₂ group กับ fluorescamine ก็ลดลง การเกิด fluorescence chromophore ก็ลดลงหรือไม่เกิด

ในจำนวนสารกลุ่มที่ 3 จะมีสารซึ่งไม่เกิด quenching กับ fluorescamine ได้แก่ chloramphenicol (สารหมายเลข 8) chlorpropamide (สารหมายเลข 12) glicazide (สารหมายเลข 27) paracetamol (สารหมายเลข 14) และ saccharin (สารหมายเลข 60) ซึ่งสารเหล่านี้ไม่เกิด quenching กับ fluorescamine ถึงแม้จะมี -NH- group เมื่อพิจารณาสูตรโครงสร้างของสารเหล่านี้จะพบว่า -NH- group จะอยู่ในรูป secondary amide urea derivative หรือ secondary sulfonyl group ปฏิกิริยาการที่ไม่เกิด quenching กับ fluorescamine ก็เช่นเดียวกับการไม่เกิด fluorescense กับ fluorescamine

ดังนั้นในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเภสัชภัณฑ์ต่าง ๆ นอกจากจะใช้ fluorescamine แล้วจึงจำเป็นต้องใช้ข้อมูลจาก Rf value ใน solvent system ทั้งสาม system การเกิดปฏิกิริยากับไอโอดีน และการตรวจสอบภายใต้แสง UV อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนงบประมาณแผ่นดิน ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. M. Weigele, S.L. De Bernardo, J.P. Tenggi and W. Leimgruber. A Novel Reagent for the Fluorometric Assay of Primary Amines. *J. Amer. Chem. Soc.* 94: 5927-5928 (1972).
2. M. Weigele, J.P. Tenggi, S. De Bernado, R. Czejkowski and W., Leimgruber. Fluorometric Reagents for Primary Amines. *J. Org. Chem.* 41 : 388-389 (1976).
3. A.M. Felix and G. Terkelson. Determination of Hydroxyproline in Fluorometric Amino Acid Analysis with Fluorescamine. *Anal. Biochem.* 56: 610-615 (1973).
4. S. Stein, P. Ohlen, J. Stone, W. Dairman, and S. Udenfriend. Amino Acid Analysis with Fluorescamine at the Picomole Level. *Arch. Biochem. Biophys.* 155: 203-212 (1973).
5. K.L. Kovacs. Chiroptical Studies of Fluorescamine Labelled Amino Acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86: 995-1001 (1979).
6. S. Udenfriend, S. Stein, P. Bohlen, W. Dairman, W. Leimgruber, and M. Weigele. Fluorescamine : A Reagent for Assay of Amino-Acids, Peptides, Protein, and Primary Amines in the Picomole Range. *Science.* 178: 871-872 (1972).
7. D. Perrett, J.P.W. Webb, D.B.A. Silk, and M. Clark. The Assay of Dipeptides Using Fluorescamine and Its Application to Determining Dipeptides Activity. *Anal. Biochem.* 68: 161-166 (1975).

Detection of Pharmaceutical Products using Fluorescamine

Lawan Sriphong¹, Ranee Surakarnkul², and Sunibhond Pummangura³

¹ Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakornpathom 73000, Thailand

² Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Non-thaburi 11000, Thailand

³ Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

ABSTRACT: The drug which contains amino functional groups such as $-NH_2$ -, $-NH$ - and $-N$ - can be differentiated by using fluorescamine solution as spraying reagent on silica gel GF-254 thin layer chromatographic plate. Only primary amine drugs, aliphatic amine, give a fluorescence, while secondary and tertiary even though quarternary amine drugs give a quenching and nothing with fluorescamine spraying reagent respectively. With this categories, the drugs can be divided 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 R_f value of three solvent systems and iodine vapour, about 60 pharmaceutical products can be detected or identified.

KEY WORDS: fluorescamine, identification test, thin-layer chromatography