บทที่ 2
วิธีการวิจัย

1. ระเบียบวิธีวิจัย

1. การศึกษาปฏิกิริยาการเกิด ion-pair complex ระหว่างยากับสีย้อม

ขั้นตอนแรก เป็นการศึกษาและรวบรวมข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับคุณสมบัติของปฏิกิริยาการเกิดคู่ไอออนระหว่างตัวยา chlorpheniramine กับ methyl orange เพื่อใช้ในการออกแบบโปรโตคอลของกระบวนการสกัดและตรวจวัดสีในลำดับต่อไป เหตุผลที่เลือกใช้ methyl orange เนื่องจากสีย้อมชนิดนี้จัดเป็น acidic dye ซึ่งสามารถให้ประจุลบและเกิด ion-pair complex กับตัวยา chlorpheniramine ซึ่งเป็น basic amine และอยู่ในรูปประจุบวกได้ นอกจากนี้สีย้อมชนิดนี้ยังมีราคาถูก หาซื้อได้และมีใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ ส่วนตัวทำละลายอินทรีย์ที่เลือกใช้ในการสกัดคือ *n*-butyl acetate เนื่องจากมีความปลอดภัยมากกว่าตัวทำละลายชนิดอื่นๆ ที่มักใช้ในการสกัดสาร เช่น chloroform และ carbon tetrachloride โดย *n*-butyl acetate นี้ไม่จัดเป็น "ozone-depleting solvent" และ "dangerous to the environment substance" ในขั้นตอนนี้ประเด็นที่ได้ทำการศึกษา ได้แก่

1.1 การศึกษาคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของ ion-pair complex

1.2 การหา pH ที่เหมาะสมในการเกิดคู่ไอออน

1.3 การหาปริมาณสารสัมพันธ์ (stoichiometry) หรืออัตราส่วนโดยโมล (molar ratio) ในการเกิด ion-pair complex ระหว่างยากับสีย้อม

2. การออกแบบและพัฒนากระบวนการสกัดและการตรวจวัดสี

2.1 การออกแบบโปรโตคอลวิธีวิเคราะห์และปรับปรุงปัจจัยที่เกี่ยวข้อง

สร้างโปรโตคอลต้นแบบของการวิเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการทำให้เกิด ion-pair complex การสกัด ion-pair complex ด้วย *n*-butyl acetate และการ back extraction ให้ ion-pair complex กลับไปอยู่ในวัฏภาคน้ำ แล้วปรับเลือกพารามิเตอร์หรือปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องให้เหมาะสม ได้แก่ ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์ ปริมาณของสีย้อมที่ใช้ จำนวนครั้งของการสกัด ปริมาณกรดในขั้นตอน back extraction เพื่อได้วิธีการที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสูงสุด ได้ผลการวิเคราะห์ถูกต้อง แม่นยำ ใช้สารเคมีน้อย ทำได้สะดวกและรวดเร็วที่สุด

2.2 การเปรียบเทียบและเลือกวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ทำการเปรียบเทียบวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง 3 วิธี ได้แก่ การใช้ nanodrop microvolume spectrophotometer, spectrophotometer แบบทั่วไปโดยใช้ micro-cuvette และการใช้ microplate reader

3. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

โดยทดสอบ linearity, หา limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), ความถูกต้อง (accuracy), ความแม่นยำ (precision) และความจำเพาะ (specificity)ของวิธีที่พัฒนาขึ้น ตามวิธีการของ ICH guideline [27]

4. การทดสอบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างจริงเปรียบเทียบกับวิธีที่ระบุไว้ในตำรายา USP 33

ทดลองวิเคราะห์ตัวอย่างยารูปแบบยาเม็ดและยาน้ำเชื่อม โดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานที่ระบุไว้ในตำรายา USP 33 แล้วทดสอบความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ที่ได้ด้วยสถิติ *t*-test นอกจากนี้ ยังได้ประเมินและเปรียบเทียบปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นในสเกลขนาดเล็กกับวิธีที่ระบุไว้ในตำรายา USP 33 ด้วย

2. อุปกรณ์ในการวิจัย

2.1 เครื่องมือ

- NanoVue® Plus cuvetteless spectrophotometer (GE Healthcare, UK) ซึ่งตั้งค่า optical path length ที่ 0.5 mm
- Agilent spectrophotometer ชนิดไดโอดอาร์เรย์ รุ่น 8453E
- Microplate reader (Packard Bioscience Company)
- Micropipettes และ Lo-retention tips ของ Eppendorf (Hamburg, Germany)
- Microfuge-16 (Beckman Coulter)
- VX100 vortex mixer (Labnet)

2.2 สารเคมี

สารมาตรฐาน chlorpheniramine maleate (ความบริสุทธิ์ 99.8%) ซื้อจากบริษัท Sigma ส่วนสารเคมีอื่นๆ ซื้อจากบริษัท Merck (Germany)

ตัวอย่างยาซื้อจากร้านขายยาในประเทศไทย 2 รูปแบบ ได้แก่ ยาเม็ด chlorpheniramine maleate ประกอบด้วยตัวยา 4 mg ต่อเม็ด และยาน้ำเชื่อม chlorpheniramine maleate ประกอบด้วยตัวยา 2 mg/mL

3. ขั้นตอนวิธีการดำเนินการ

3.1 การศึกษาปฏิกิริยาการเกิด ion-pair complex ระหว่างยากับสีย้อม

3.1.1 การศึกษาคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของ ion-pair complex

ทำโดยสแกนหา absorption spectrum ของ ion-pair complex ระหว่าง chlorpheniramine กับ methyl orange เมื่อถูกสกัดให้มาอยู่ใน *n*-butyl acetate และเมื่อถูก back extract ด้วย 2 M hydrochloric acid ให้กลับมาอยู่ในวัฏภาคน้ำ เพื่อใช้เลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวัดค่าการดูดกลืนแสงต่อไป

3.1.2การหา pH ที่เหมาะสมในการเกิดคู่ไอออน

ทดลองโดยเตรียมปฏิกิริยาการเกิด ion-pair complex ระหว่าง chlorpheniramine กับ methyl orange ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH ต่างๆ ในช่วง pH 2 – 7.5 ดังต่อไปนี้

- pH 2 ทำใน KCl-HCl buffer
- pH 3 - 4 ทำใน potassium hydrogen phthalate-HCl buffer
- pH 4.5 - 5 ทำใน potassium hydrogen phthalate-NaOH buffer
- pH 6 - 7.5 ทำใน potassium hydrogen phosphate-NaOH buffer

จากนั้นสกัดคู่ไอออนด้วย *n*-butyl acetate แล้ววัดความเข้มของสีจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm แล้ว plot กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH กับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

3.1.3 การหาปริมาณสารสัมพันธ์ในการเกิด ion-pair complex ระหว่างยากับสีย้อม

หาปริมาณสารสัมพันธ์ในการเกิด ion-pair complex โดยการ vary อัตราส่วนโดยโมลระหว่าง chlorpheniramine กับ methyl orange ในปฏิกิริยาการเกิดคู่ไอออน ที่ pH 5.0 ตามวิธี Job's method of continuous variation แล้วสร้างกราฟเพื่อหาอัตราส่วนโดยโมล (แกน X) ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) สูงสุด [28] ซึ่งจะแสดงอัตราส่วนโดยโมลระหว่าง chlorpheniramine กับ methyl orange ที่เกิดปฏิกิริยากันสมมูลย์พอดี

3.2 การออกแบบและพัฒนาวิธีสกัดในสเกลขนาดเล็ก

3.2.1 ขั้นตอนการสกัดในสเกลขนาดเล็ก

การวิเคราะห์ปริมาณ chlorpheniramine maleate โดยวิธีวิธีสกัดในสเกลขนาดเล็ก ทำโดยใช้ไมโครปิเปตในการตวงปริมาตรและถ่ายเทสารละลายหรือของเหลวอย่างถูกต้องและแม่นยำ มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมชุดสำหรับสารละลายมาตรฐาน และสารละลายของสารตัวอย่าง และแบลงค์ (reagent blank) โดยเติมสารต่าง ๆ ลงใน microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 mL ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาตรของสารต่างๆ ที่เติมลงในหลอดแต่ละหลอด สำหรับเตรียมเป็นชุดสารละลายมาตรฐาน สารละลายของสารตัวอย่าง และแบลงค์

หลอด	ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน 50 µg/mL CPM (µL)	ปริมาตรสารละลายตัวอย่างเข้มข้นประมาณ 20 µg/mL CPM (µL)	ปริมาตรน้ำ (µL)	ปริมาตร 0.6 mg/mL methyl orange ใน 50 mM buffer pH 5 (µL)
Blank	0	0	100	50
Standard 5 µg/mL CPM	10	0	90	50
Standard 10 µg/mL CPM	20	0	80	50
Standard 20 µg/mL CPM	40	0	60	50
Standard 30 µg/mL CPM	60	0	40	50
Standard 40 µg/mL CPM	80	0	20	50
Standard 50 µg/mL CPM	100	0	0	50
Sample solution	0	100	0	50

2. หลังจากเติมสารต่างๆ แล้ว vortex สารละลายเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างคู่ไอออน

3. เติม *n*-butyl acetate ปริมาตร 250 ไมโครลิตรลงในทุกหลอด จากนั้น vortex นาน 2 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 1 นาที เพื่อแยกชั้นระหว่างสองวัฏภาค

4. ใช้ไมโครปิเปตดูดของเหลวชั้นบน (*n*-butyl acetate) ให้ได้ปริมาตร 230 ไมโครลิตร ถ่ายเก็บไว้ในหลอดอันใหม่

5. เติม *n*-butyl acetate ปริมาตร 250 ไมโครลิตรลงในหลอดเดิมเพื่อสกัดซ้ำอีกครั้ง จากนั้น vortex นาน 2 นาที เพื่อสกัดคู่ไอออนที่ยังคงเหลืออยู่ในวัฏภาคน้ำ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 1 นาที เพื่อแยกชั้นระหว่างสองวัฏภาค

6. ใช้ไมโครปิเปตดูดของเหลวชั้นบน (*n*-butyl acetate) ให้ได้ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ถ่ายเก็บรวมเข้ากับ fraction ที่ได้จากขั้นตอนในข้อ 4

7. เติม 2 M hydrochloric acid ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน fraction รวมที่ดูดแยกออกมาได้

8. vortex นาน 2 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 1 นาที จะสังเกตเห็นหยดของเหลวขนาดเล็กสีแดงแยกชั้นอยู่ที่ก้นหลอด

9. ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายสีแดงดังกล่าวประมาณ 3-5 ไมโครลิตร มาหยดลงบนส่วน pedestral ของเครื่อง Nanovue® Plus spectrophotometer เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) โดยวัดเทียบกับแบลค์ที่ได้จากการนำชุด reagent blank มาปรับค่าการดูดกลืนแสงให้เป็นศูนย์ (set zero) ตั้งค่าความยาวคลื่นในการวิเคราะห์ที่ 510 nm และตั้งระยะทางที่แสงผ่านสารตัวอย่าง (path length) ที่ 0.5 มิลลิเมตร

10. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากชุดสารละลายมาตรฐานไปสร้างกราฟมาตรฐาน โดยที่แกน X คือ ความเข้มข้นของ chlorpheniramine maleate (µg/mL) และแกน Y คือค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 nm แล้วหาความสัมพันธ์ Y = mX + b จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากชุดสารละลายตัวอย่างไปแทนค่าลงในสมการเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของ chlorpheniramine maleate ในตัวอย่างต่อไป

3.2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง

สารละลายมาตรฐาน chlorpheniramine maleate และสารละลายตัวอย่างถูกเตรียมขึ้นโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย stock ของสารละลายมาตรฐานเตรียมจากสารมาตรฐาน chlorpheniramine maleate ให้ได้ความเข้มข้นอย่างถูกต้อง 50 µg/mL เพื่อนำไปใช้เตรียมปฏิกิริยาตามตารางที่ 2

สารละลายตัวอย่างที่เตรียมมาจากตัวอย่างยาเม็ด เตรียมโดยชั่งน้ำหนักยาเม็ด 20 เม็ด เพื่อหาน้ำหนักเฉลี่ยต่อหนึ่งเม็ด จากนั้นบดเม็ดยาและผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งชั่งผงยาที่ได้ให้มีปริมาณตัวยา chlorpheniramine maleate อย่างถูกต้องประมาณ 4 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL เติมน้ำแล้วนำฟลาสค์ไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ผงยาแตกตัวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 100 มิลลิลิตร นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนส่วนที่ไม่ละลายน้ำ แล้วแยกเก็บส่วนใสไปเจือจางต่อด้วยน้ำ จนได้สารละลาย stock ซึ่งมีความเข้มข้นของ chlorpheniramine maleate ประมาณ 20 µg/mL เพื่อนำไปใช้เตรียมปฏิกิริยาตามตารางที่ 2

ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นยาน้ำเชื่อม ทำการเตรียมสารละลายตัวอย่างโดยปิเปตยาน้ำอย่างถูกต้องแล้วนำไปเจือจางด้วยน้ำให้ได้สารละลาย stock ซึ่งมีความเข้มข้นของ chlorpheniramine maleate ประมาณ 20 µg/mL เพื่อนำไปใช้เตรียมปฏิกิริยาตามตารางที่ 2

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ - 7 ส.ค. 2555
เลขทะเบียน 190901
เลขเรียกหนังสือ

3.2.3 การปรับปรุงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์

เพื่อให้ได้วิธีการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสูงสุด ให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้อง แม่นยำ ใช้สารเคมีน้อย ทำได้สะดวก และรวดเร็ว จึงได้ศึกษาและปรับเลือกปัจจัยต่างๆ ให้เหมาะสม ปัจจัยที่ทำการศึกษา ได้แก่ ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์ ปริมาณของสีย้อมที่ใช้ จำนวนครั้งของการสกัด ปริมาณกรดในขั้นตอน back extraction การศึกษาในขั้นตอนนี้ทำโดย vary ปัจจัยที่ต้องการศึกษาในระดับต่างๆ โดยควบคุมปัจจัยอื่นๆ ให้คงที่

นอกจากนี้ แม้ว่าในงานวิจัยนี้จะเลือกใช้ drop-and-measure microvolume spectrophotometer ซึ่งสะดวกและรวดเร็วในการวัด แต่ก็ได้ศึกษาการวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ spectrophotometer แบบอื่นๆ ด้วย ได้แก่ spectrophotometer แบบทั่วไป โดยใช้ร่วมกับ micro-cuvette และการใช้ microplate reader เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในกรณีที่ห้องปฏิบัติการไม่สามารถจัดหา drop-and-measure microvolume spectrophotometer ได้

3.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

3.3.1 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (linearity), LOD และ LOQ

ทำการศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (Y) ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตรของสารละลายสีแดงหลังจากถูก back extract ให้กลับมาอยู่ในชั้นน้ำกับความเข้มข้นของ chlorpheniramine maleate เริ่มต้น (X) ในช่วง 5 – 50 μg/mL โดยสร้างสมการ linear regression Y= mX+ b เมื่อ m คือความชันของเส้นกราฟ และ b คือจุดตัดแกน Y และหาค่า coefficient of correlation (r^2) เพื่อประเมินความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง หากค่า r^2 มากกว่า 0.9990 ถือว่าวิธีวิเคราะห์ให้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงดีมาก

ส่วนค่า LOD และ LOQ คำนวณได้จาก 3.3S/b และ 10S/b ตามลำดับ เมื่อ S หมายถึง ค่า standard deviation ของค่า b ที่ได้จาก regression equation

3.3.2 การประเมินความถูกต้อง (accuracy)

ศึกษาโดยวิธีเติมสารมาตรฐานในปริมาณที่ทราบแน่นอนลงในเมตริกซ์ของตัวอย่าง (standard addition) ในทางปฏิบัติทำโดยเตรียมสารละลายตัวอย่างจากยาเม็ดหรือยาน้ำเชื่อมให้มีความเข้มข้นของ chlorpheniramine maleate ประมาณ 20 μg/mL แล้ววิเคราะห์หาความเข้มข้นของตัวยาที่แท้จริงเริ่มต้น จากนั้นเติม (spike) สารมาตรฐาน chlorpheniramine maleate อย่างถูกต้องแม่นยำลงไปในสารละลายตัวอย่างดังกล่าวให้มีความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 15, 20 และ 25 μg/mL แล้ววิเคราะห์หาปริมาณ chlorpheniramine maleate ส่วนที่เติมลงไป เพื่อนำไปคำนวณค่า % recovery จากสูตร

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ CPM ส่วนที่เติมลงไปที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ความเข้มข้นของ CPM ที่เติมลงไป}} \times 100$$

หากค่า % recovery อยู่ในช่วง 98 – 102 % ถือว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องดี

3.3.3 การประเมินความแม่นยำ (precision)

ทำการศึกษาใน 2 ลักษณะ แบบที่ 1 ศึกษา intra-day precision หรือ repeatability โดยทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน chlorpheniramine maleate ที่มีความเข้มข้น 20 μg/mL 6 ซ้ำ ภายในวันเดียวกัน คำนวณค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ และ % relative standard deviation (RSD) ค่า % RSD ที่ได้ต้องไม่เกิน 2.0 จึงจะถือว่ามี repeatability ที่ดี

แบบที่ 2 ศึกษา intermediate precision (inter-day precision) ทำโดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน chlorpheniramine maleate ที่มีความเข้มข้น 20 µg/mL โดยวิเคราะห์ต่างวันกัน เป็นเวลา 3 วัน (แต่ละวัน วิเคราะห์ 6 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ยของวันนั้นๆ) คำนวณค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้จากทั้ง 3 วัน และ % RSD ซึ่งต้องไม่เกิน 2.0

3.3.3 การประเมินความจำเพาะ (specificity)

ตรวจสอบว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นไม่ถูกรบกวนจากสารปรุงแต่งในตำรับยาเม็ดและยาน้ำเชื่อม โดยเตรียมสารละลาย chlorpheniramine maleate ที่มีเข้มข้นประมาณ 20 µg/mL แล้ววิเคราะห์หาความเข้มข้นของตัวยาแท้จริงเริ่มต้น จากนั้นเติม (spike) สารปรุงแต่งในปริมาณที่มักใช้จริงในตำรับยาเม็ดหรือยาน้ำเชื่อมไปในสารละลายดังกล่าว สารปรุงแต่งที่ศึกษา ได้แก่ methyl paraben, propyl paraben, citric acid, sodium benzolate, saccharin sodium, sucrose, magnesium stearate, lactose และ talc ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ chlorpheniramine maleate ซ้ำอีกครั้ง เพื่อนำไปคำนวณค่า % recovery จากสูตร

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ CPM ที่วิเคราะห์ได้หลังเติมสารปรุงแต่ง}}{\text{ความเข้มข้นของ CPM ที่วิเคราะห์ได้ก่อนเติมสารปรุงแต่ง}} \times 100$$

หากค่า % recovery อยู่ในช่วง 98 – 102 % ถือว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะต่อตัวยา chlorpheniramine maleate และไม่ถูกรบกวนจากสารปรุงแต่งต่างๆ ที่อาจอยู่ร่วมกับตัวอย่าง

3.4 การทดสอบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างจริงเปรียบเทียบกับวิธีที่ระบุไว้ในตำรายา USP 33

ทดลองวิเคราะห์ตัวอย่างยาในรูปแบบยาเม็ดและยาน้ำที่มีขายในท้องตลาด โดยใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐานที่ระบุไว้ในตำรายา USP 33 แล้วทดสอบความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากทั้งสองวิธีด้วยสถิติ *t*-test โดยตั้งระดับความเชื่อมั่นไว้ที่ 95%

การวิเคราะห์ปริมาณยาในยาเม็ด chlorpheniramine maleate ตาม USP 33 ทำโดยวิธีการภายใต้หัวข้อ Salts of organic nitrogenous bases ซึ่งอาศัยหลักการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ hexane โดยนำชุด Assay preparation และ Standard preparation ไปผ่านกระบวนการสกัดแล้วนำสารสกัดในชั้นกรดครั้งสุดท้ายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 nm เพื่อนำไปคำนวณปริมาณยาในตัวอย่างจากสูตร $C(A_U / A_S)$

การวิเคราะห์ปริมาณยาในยาน้ำ ทำโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ hexane และ chloroformโดยนำชุด Assay preparation และ Standard preparation ไปผ่านกระบวนการสกัดแล้วนำสารสกัดในชั้นกรดครั้งสุดท้ายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 nm เพื่อนำไปคำนวณปริมาณยาในตัวอย่างจากสูตร $C(A_U / A_S)$

นอกจากการประเมินและเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์แล้ว ยังได้เปรียบเทียบปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นในสเกลขนาดเล็กกับวิธีที่ระบุไว้ในตำรายา USP 33 ด้วย