

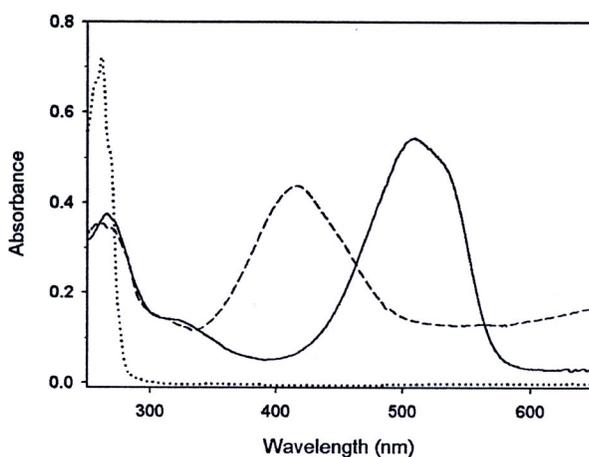
บทที่ 3

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

1. การศึกษาปฏิกิริยาการเกิด ion-pair complex ระหว่าง chlorpheniramine กับ methyl orange

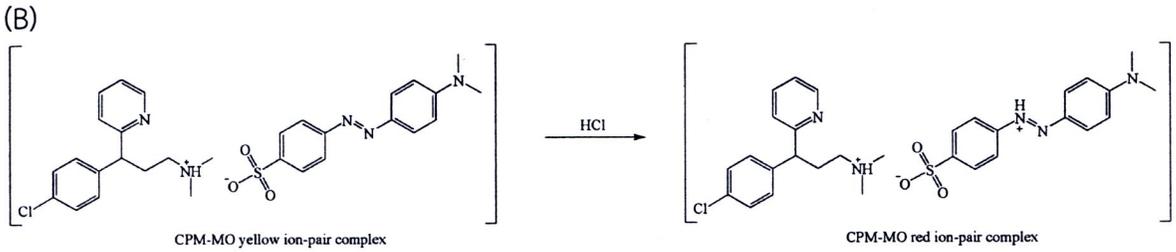
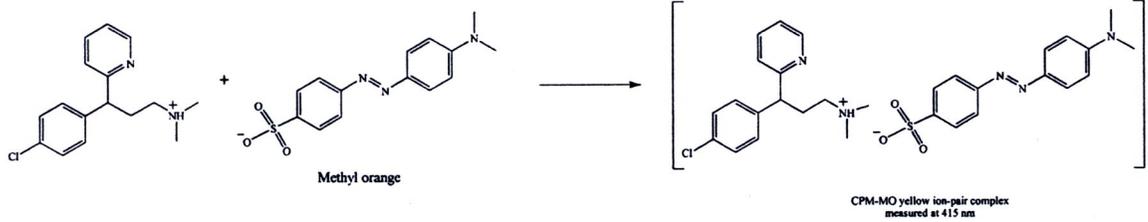
1.1 คุณสมบัติการดูดกลืนแสงของ ion-pair complex

จากการศึกษาพบว่า ion-pair complex ที่เกิดขึ้นระหว่าง chlorpheniramine กับ methyl orange ที่ pH 5 เมื่อถูกสกัดให้เข้ามาอยู่ในวัฏภาคของตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ *n*-butyl acetate มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 415 นาโนเมตร (รูปที่ 2) และปรากฏเป็นสารละลายที่มีสีเหลือง เมื่อเติมกรด 2 M HCl ลงไป จะเกิดการ protonation เข้าที่โครงสร้างของ methyl orange ทำให้ ion-pair complex มีประจุบวกและเปลี่ยนไปเป็นโมเลกุลที่มีขั้ว (รูปที่ 3) จึงถูกสกัดเข้าไปอยู่ในวัฏภาคน้ำ โดยมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 510 nm และปรากฏเป็นสารละลายที่มีสีแดง ดังนั้น ในการวิเคราะห์ chlorpheniramine maleate ในลำดับต่อไป จึงเลือกวัดค่าการดูดกลืนแสงของ ion-pair complex ที่ถูกสกัดให้มาอยู่ในวัฏภาคน้ำที่ความยาวคลื่น 510 nm ส่วนตัวยา chlorpheniramine maleate เองไม่มีการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 300 – 600 nm



รูปที่ 2 Absorption spectra ของ ion-pair complex ระหว่าง CPM กับ methyl orange ที่ถูกสกัดด้วย *n*-butyl acetate (- - -), เมื่อถูก protonated และสกัดให้อยู่ในชั้นน้ำ (—) และสารละลาย CPM ในน้ำ (.....)

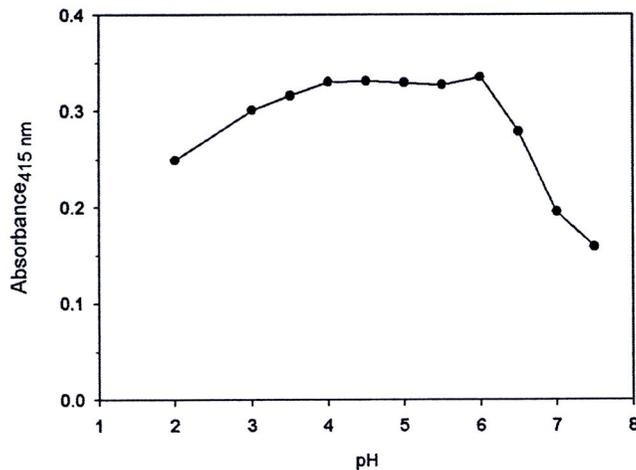
(A)



รูปที่ 3 ปฏิกิริยาการเกิด ion-pair complex ระหว่าง CPM กับ methyl orange ที่ pH 5.0 (A) และเมื่อถูก protonated ในขั้นตอนการเติม hydrochloric acid เพื่อ back extraction (B)

1.2 pH ที่เหมาะสมในการเกิด ion-pair complex

ศึกษาโดยเตรียมปฏิกิริยาการเกิด ion-pair complex ที่ pH ต่างๆ แล้วตรวจวัดความเข้มของสีหลังจากสกัดด้วย *n*-butyl acetate ที่ความยาวคลื่น 415 nm จากนั้น plot กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH กับ ค่าการดูดกลืนแสง พบว่า ในช่วง pH 4 – 6 มีการเกิดคู่ออนไดต์ที่ดีที่สุดโดยพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นในช่วงนั้น (รูปที่ 4) ดังนั้น จึงได้เลือก pH 5.0 เป็นสภาวะสำหรับทำปฏิกิริยาต่อไปตลอดการทดลอง

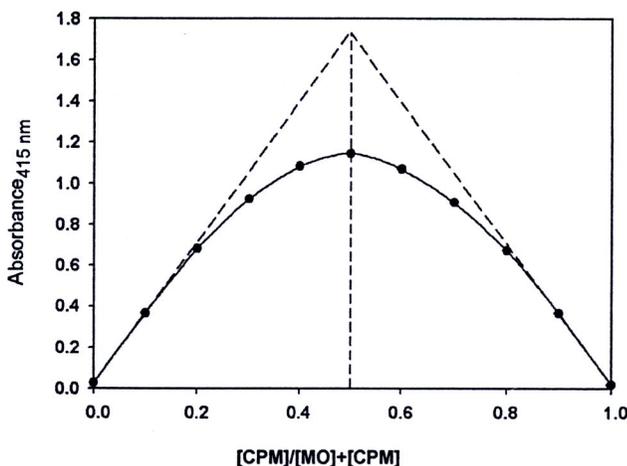


รูปที่ 4 การเกิด ion-pair complex ระหว่าง CPM กับ methyl orange ที่ pH ต่างๆ



1.3 ปริมาณสารสัมพันธ์ของปฏิกิริยาการเกิด ion-pair complex

ได้ทดลอง vary อัตราส่วนโดยโมลระหว่าง CPM กับ methyl orange ในปฏิกิริยาการเกิด ion-pair complex ที่ pH 5.0 ตามวิธี Job's method of continuous variation พบว่าอัตราส่วนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด คือ 0.5 โดยโมล (รูปที่ 5) ซึ่งแสดงว่า CPM กับ methyl orange ทำปฏิกิริยากัน 1:1 โดยโมล ในการเกิดคู่ออน



รูปที่ 5 Plot แสดงการเกิด ion-pair complex ระหว่าง CPM กับ methyl orange ที่อัตราส่วนโดยโมลต่างๆ โดยวิธี Job's method of continuous variation

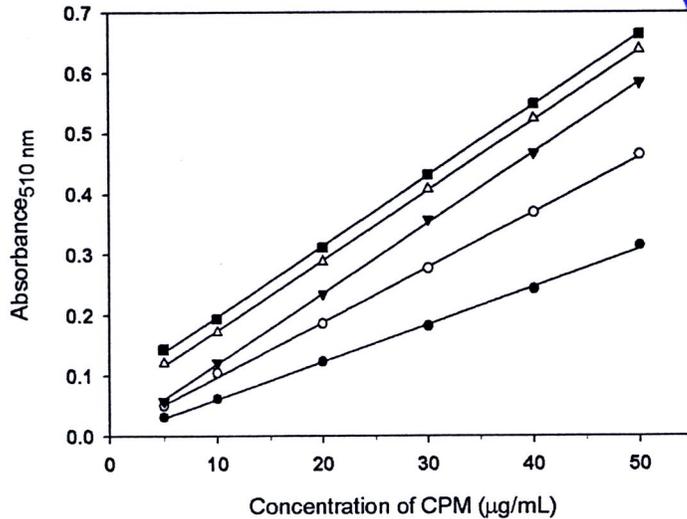
2. การออกแบบและพัฒนาวิธีสกัดในสเกลขนาดเล็ก

2.1 การสร้างโปรโตคอลของการวิเคราะห์และการปรับเลือกปัจจัย

ได้สร้างโปรโตคอลของการวิเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการทำให้เกิด ion-pair complex การสกัด ion-pair complex ด้วย *n*-butyl acetate การ back extraction ให้ ion-pair complex กลับไปอยู่ในชั้น hydrochloric acid และการตรวจวัดความเข้มข้นของสีด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วปรับเลือกสภาวะหรือปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องให้เหมาะสม เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการสกัด ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำ ใช้สารเคมีน้อยที่สุด ทำได้สะดวก มีขั้นตอนน้อย และรวดเร็วที่สุด ผลที่ได้เป็นดังนี้

2.1.1 ปริมาณที่เหมาะสมของสีย้อม methyl orange

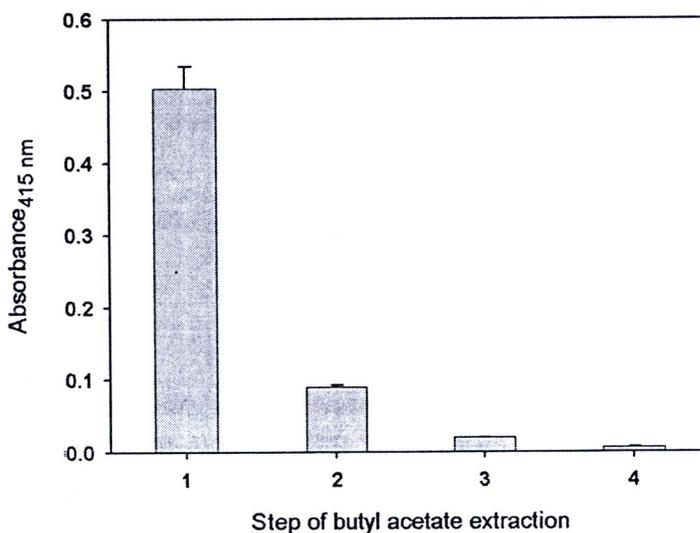
ศึกษาโดยทำการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ CPM กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 nm จากปฏิกิริยาซึ่งใช้สารละลาย methyl orange ที่มีความเข้มข้นคงที่ 0.6 mg/mL ในบัฟเฟอร์ pH 5.0 ปริมาตรต่างๆ ซึ่งพบว่า การใช้สารละลาย methyl orange ปริมาตร 50 μ L ให้กราฟที่มีความชันสูงกว่าการใช้สารละลาย methyl orange ปริมาตร 10 และ 25 μ L ซึ่งแสดงถึงความไว (sensitivity) ของวิธีที่ดีกว่า แต่เมื่อเพิ่มปริมาตรสารละลาย methyl orange เป็น 100 และ 150 μ L ไม่ทำให้ sensitivity เพิ่มขึ้นตามไปด้วย (รูปที่ 6) ดังนั้นเพื่อให้การวิเคราะห์มี sensitivity ที่ดี และในขณะเดียวกันสามารถประหยัดสารและลดต้นทุนของการวิเคราะห์ จึงเลือกใช้สารละลาย methyl orange ที่มีความเข้มข้น 0.6 mg/mL ในปริมาตร 50 μ L สำหรับทำปฏิกิริยากับ CPM ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 6 กราฟมาตรฐานที่ได้จากปฏิกิริยาการเกิด ion-pair complex โดยใช้สารละลาย methyl orange ที่มีความเข้มข้น 0.6 mg/mL ในปริมาตร 10 (●), 25 (○), 50 (▼), 100 (△) และ 150 (■) µL

2.1.2 จำนวนครั้งในการสกัดคู่ออนด้วย *n*-butyl acetate

ทดลองสกัด ion-pair complex ด้วย *n*-butyl acetate ครั้งละ 250 µL 4 ครั้ง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ได้ในแต่ละครั้งที่ความยาวคลื่น 415 nm ได้กราฟดังรูปที่ 7 เมื่อคำนวณประสิทธิภาพในการสกัดแต่ละครั้งของการสกัดซ้ำ พบว่า การสกัดซ้ำ 2 ครั้ง (แล้วนำสารสกัดมารวมกัน) ให้ประสิทธิภาพการสกัดมากกว่า 95% ซึ่งเป็นระดับที่น่าพอใจ (ตารางที่ 3) การสกัดครั้งที่ 3 ขึ้นไป ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพได้อีกเพียงเล็กน้อย แต่เพิ่มขึ้นตอน เวลา และการใช้สารเคมี ดังนั้น จึงเลือกการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง ด้วย *n*-butyl acetate ครั้งละ 250 µL เป็นโปรโตคอลมาตรฐานต่อไป



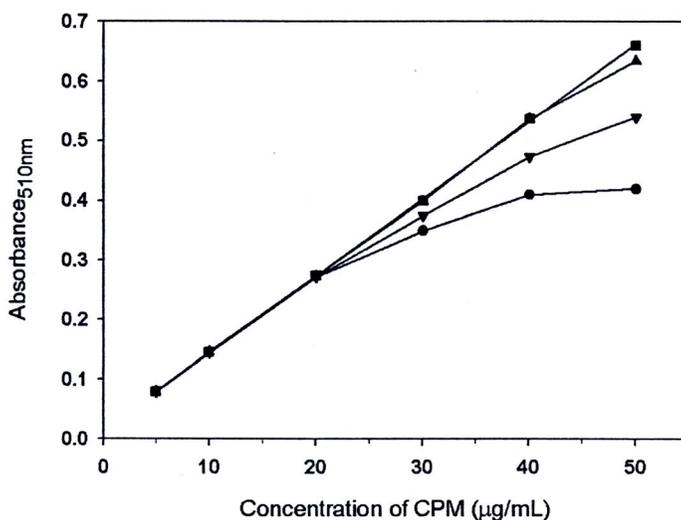
รูปที่ 7 ค่าการดูดกลืนแสงของ ion-pair complex ใน *n*-butyl acetate ที่ได้จากการสกัดซ้ำในแต่ละครั้ง

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพในการสกัดซ้ำด้วย *n*-butyl acetate

	Number of extraction		
	1	2	3
% extraction efficiency	81	96	99

2.1.3 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ hydrochloric acid ในการทำ back extraction

เนื่องจากการตรวจวัดสีด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี จะทำหลังจากเติมกรดไปทำให้ ion-pair complex เกิดประจุขึ้น แล้ว back extract กลับมาอยู่ในชั้นน้ำ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสีในหยดของสารละลายที่มีปริมาตรน้อยๆ และลดการสัมผัสตัวทำละลายอินทรีย์โดยผู้ปฏิบัติงาน จึงได้ทดลองเติมสารละลาย HCl ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ในปริมาตรคงที่ 20 μ L ในการสร้างกราฟมาตรฐาน พบว่าการใช้ 2 M HCl ให้เส้นกราฟที่มีความเป็นเส้นตรงสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ HCl ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า (0.25, 0.5 และ 1 M) ทั้งนี้เนื่องจากกรดที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 2 M มีความแรงไม่เพียงพอในการ protonate ion-pair complex ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อมียาหรือ ion-pair complex ในปริมาณที่มากขึ้น (รูปที่ 8) ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกใช้ 2 M HCl ปริมาตร 20 μ L ในการทำ back extraction ให้สีกลับมาอยู่ในวัฏภาคน้ำ

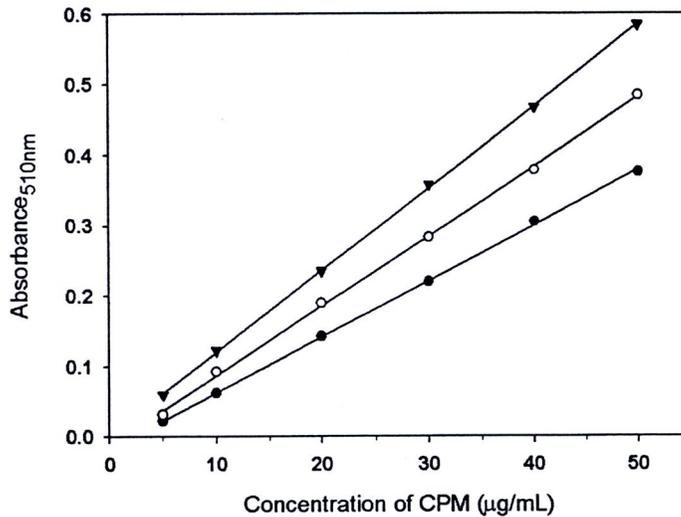


รูปที่ 8 กราฟมาตรฐาน เมื่อใช้ HCl ที่มีความเข้มข้น 0.25 (●), 0.5 (▼), 1 (▲) และ 2 (■) ปริมาตรใน 20 μ L ในการทำ back extraction

2.2 การเลือกวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง 3 วิธี ได้แก่ การวัดด้วย microplate reader (ใช้ sample 100 μ L ในการวัด), micro-cuvette (ใช้ sample 150 μ L ในการวัด) และ NanoVue[®] Plus ซึ่งเป็น spectrophotometer ชนิดที่ใช้ปริมาตรสารตัวอย่างในการวัดเพียง 3-5 μ L และไม่ต้องใช้ cuvette พบว่า ทุกวิธีการวัดให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงดีมาก (ให้ค่า r^2 อยู่ระหว่าง 0.9992 - 0.9998) แม้ว่าจะมีความแตกต่างของความชันบ้าง (รูปที่ 9) แสดงว่า ผู้ปฏิบัติงานสามารถเลือกใช้วิธีการวัดการดูดกลืนแสงวิธีใดก็ได้ตามความ

เอื้ออำนวยของเครื่องมือที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ เลือกใช้การวัดด้วย NanoVue[®] Plus spectrophotometer เนื่องจากใช้ปริมาตรสารตัวอย่างน้อย จึงประหยัดกรด HCl ที่ต้องใช้ในการทำ back extraction และยังสามารถวัดได้สะดวก รวดเร็ว (drop-and-measure)

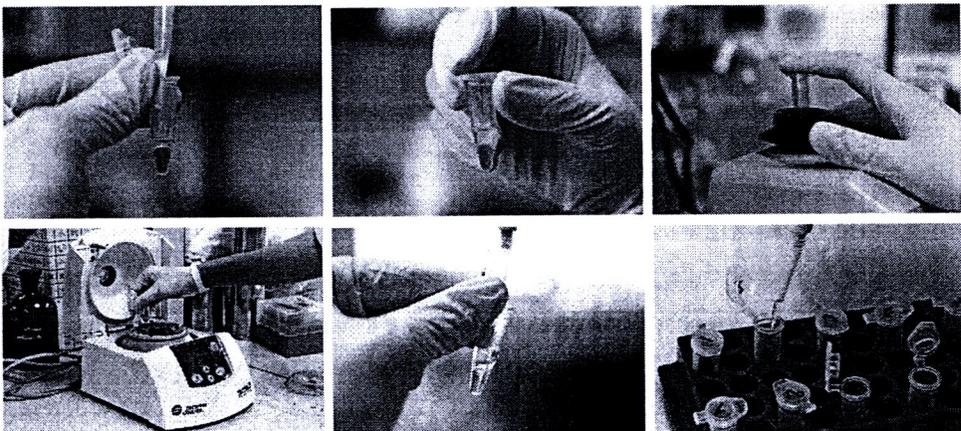


รูปที่ 9 กราฟมาตรฐานที่สร้างจากการวัดค่าการดูดกลืนแสง 3 วิธี ได้แก่ microplate reader (●), micro-cuvette (○) และ NanoVue[®] Plus spectrophotometer (▼)

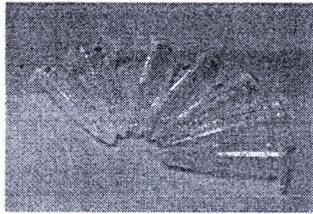
2.3 โพรโตคอลมาตรฐานในการวิเคราะห์

จากข้อมูลข้างต้นทั้งหมด สามารถนำไปใช้สร้างโพรโตคอลมาตรฐานในการวิเคราะห์ ดังนี้

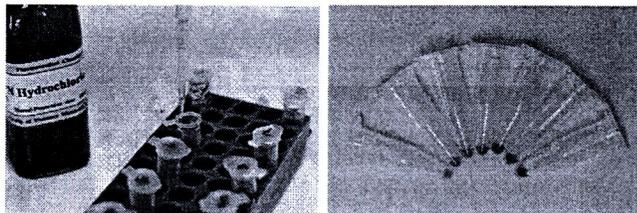
1. บีบสารละลาย standard CPM (0 (blank), 5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/mL) หรือ sample solution (มีความเข้มข้นของ CPM ประมาณ 20 µg/mL) ลงใน microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 mL
2. เติม 0.6 mg/mL methyl orange ใน 50 mM potassium hydrogen phthalate/sodium hydroxide buffer pH 5.0 ปริมาตร 50 µL ลงในแต่ละหลอด แล้ว vortex นาน 1 นาที
3. สกัครอบแรกด้วย *n*-butyl acetate 250 µL โดย vortex นาน 2 นาที แล้ว centrifuge ที่ 12,000 rpm นาน 1 นาที เพื่อให้แยกชั้น จากนั้นใช้ micropipette ดูดชั้น *n*-butyl acetate ด้านบนปริมาตร 230 µL เก็บใส่หลอดอันใหม่ สารละลายที่ได้จะมีสีเหลืองส้ม



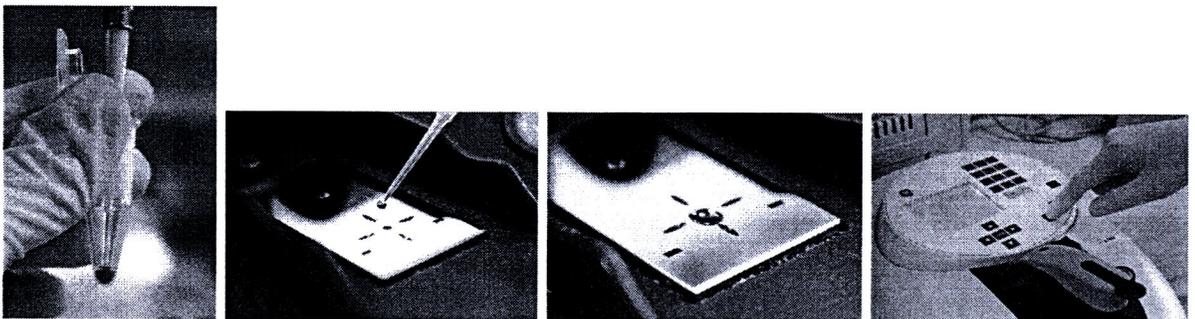
- สกัดซ้ำด้วย *n*-butyl acetate 250 μ L โดย vortex นาน 2 นาที แล้ว centrifuge ที่ 12,000 rpm นาน 1 นาที จากนั้นใช้ micropipette ดูดชั้น *n*-butyl acetate ปริมาตร 250 μ L รวมกับสารสกัดที่ได้ในข้อ 3



- เติม 2 N hydrochloric acid ปริมาตร 20 μ L ด้วย micropipette แล้ว vortex นาน 1 นาที, centrifuge ที่ 12,000 rpm นาน 1 นาที จะปรากฏหยดสีแดงแยกชั้นอยู่ด้านล่าง



- ใช้ micropipette ดูดสารละลายสีแดงดังกล่าว ปริมาตร 3-5 μ L นำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วย Nanovue spectrophotometer ที่ 510 nm โดยใช้หลอดที่ใช้ น้ำ แทน CPM และสกัดมาด้วยวิธีการเดียวกัน เป็น blank เพื่อปรับค่าการดูดกลืนแสงให้เป็น 0 ก่อนวัดตัวอย่างอื่นๆ

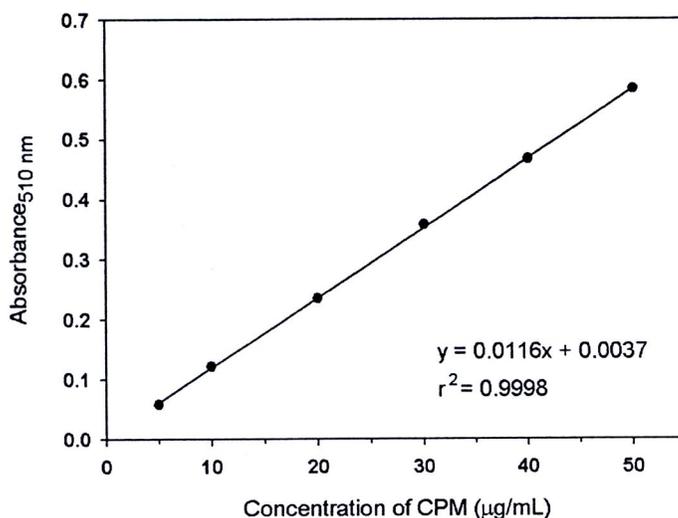


- สร้างกราฟมาตรฐาน แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างไปเทียบในสมการเชิงเส้น เพื่อคำนวณหาปริมาณยาในตัวอย่าง

3. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

3.1 ความเป็นเส้นตรง, LOD และ LOQ

พบว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (Y) ของสารละลายของ ion-pair complex สีแดงในชั้นน้ำกับความเข้มข้นของ chlorpheniramine maleate เริ่มต้น (X) ในช่วง 5 ถึง 50 μ g/mL ดีมาก โดยให้ค่า r^2 เท่ากับ 0.9998 (รูปที่ 10) ค่า LOD, LOQ เป็น 0.76 และ 2.32 μ g/mL ตามลำดับ ดังตารางที่ 4



รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ chlorpheniramine maleate ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น

ตารางที่ 4 ความเป็นเส้นตรง, LOD และ LOQ ของวิธีวิเคราะห์

Parameters	Proposed method
slope	0.011631233
Y-intercept	0.003693151
Equation	$A = 0.0116C + 0.0037$
r^2	0.9998
LOD (µg/mL)	0.76
LOQ (µg/mL)	2.32

3.2 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

จากการศึกษาโดยวิธี standard addition พบว่า % recovery ที่คำนวณได้ในทุกกรณี ไม่ว่าจะเมทริกซ์จะเป็นยาเม็ดหรือยาน้ำมีค่าอยู่ในช่วง 98 - 102% จึงถือว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องดี (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (n = 3)

Dosage form	CPM spiked	CPM recovered	% Recovery	% R.S.D.
	(µg/mL)	(µg/mL)		
CPM Syrup	15	15.07	100.47	1.23
	20	19.79	98.97	0.94
	25	24.77	99.07	1.14
CPM Tablet	15	15.06	100.37	0.94
	20	20.03	100.16	1.42
	25	25.15	100.60	1.13

3.3 ความแม่นยำ (precision) ของวิธีวิเคราะห์

พบว่า % R.S.D. ของผลการวิเคราะห์ เมื่อศึกษา intra-day precision และ inter-day precision มีค่าไม่เกิน 2.0% (ตารางที่ 6) จึงสรุปได้ว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำเป็นที่น่าพอใจ

ตารางที่ 6 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (n = 3)

Parameter	Syrup		Tablet	
	Labeled amount (%)	R.S.D. (%)	Labeled amount (%)	R.S.D. (%)
Intra-day (n=6)	100.83	0.87	100.33	0.94
Inter-day (n=3)	100.39	0.46	100.43	0.16

3.4 ความจำเพาะ (specificity) ของวิธีวิเคราะห์

เมื่อตรวจสอบว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นไม่ถูกรบกวนจากสารปรุงแต่งโดยเติม (spike) สารปรุงแต่ง ในปริมาณที่มักใช้จริงในตำรับยาเม็ดและยาน้ำเชื่อมลงไป ในสารละลายยา chlorpheniramine maleate แล้วคำนวณค่า % recovery พบว่า วิธีวิเคราะห์ยังคงวิเคราะห์ปริมาณตัวยาได้อยู่ในช่วง 98 – 102 % เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วิเคราะห์ได้ก่อนมีสารรบกวน (ตารางที่ 7) จึงถือว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะต่อตัวยา chlorpheniramine maleate และไม่ถูกรบกวนจากสารปรุงแต่งต่างๆ ที่อาจอยู่ร่วมกับตัวอย่าง

ตารางที่ 7 ความจำเพาะวิธีวิเคราะห์เมื่อทดสอบร่วมกับสารปรุงแต่งต่างๆ (n = 3)

สารปรุงแต่ง	Concentration added ($\mu\text{g/mL}$)	% Recovery
Magesium sterate	6	99.8
Lactose	500	99.4
Talc	60	99.6
Methyl paraben	60	100.2
Propyl paraben	60	99.0
Citric acid	60	100.2
Sodium benzoate	60	100.0
Saccharin sodium	60	99.8
Sucrose	5000	99.8

4. การทดสอบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างจริงเปรียบเทียบกับวิธีที่ระบุไว้ในตำรายา USP 33

ได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเภสัชภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด 2 รูปแบบ ได้แก่ ยาเม็ด chlorpheniramine maleate ซึ่งประกอบด้วยตัวยา 4 mg ต่อเม็ด และยาน้ำเชื่อม chlorpheniramine maleate ซึ่งประกอบด้วยตัวยา 2 mg/mL โดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์ที่ระบุไว้ในตำรายา USP 33 พบว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณยาที่ได้ ซึ่งรายงานอยู่ในรูป % labeled amount จากสองวิธี ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ chlorpheniramine maleate ในตัวอย่างเภสัชภัณฑ์ ด้วยวิธีสกัดในสเกลขนาดเล็กที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานที่ระบุไว้ในตำรายา USP 33

ตัวอย่างเภสัชภัณฑ์	วิธี mini scale extraction	วิธี USP 33
CPM syrup		
Labeled amount (%)	100.66	101.81
R.S.D. (%)	1.20	0.48
CPM tablet		
Labeled amount (%)	101.35	100.76
R.S.D. (%)	1.22	1.66

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดต่อหนึ่งตัวอย่าง พบว่าวิธีตามตำรายา USP ซึ่งทำในสเกลขนาดใหญ่ ใช้ hexane หรือ chloroform ปริมาตรรวมทั้งสิ้น 120 มิลลิลิตรสำหรับตัวอย่างยาเม็ด และ 240 มิลลิลิตรสำหรับตัวอย่างยาน้ำ ในขณะที่วิธีสกัดในสเกลขนาดเล็กที่พัฒนาขึ้นนี้ ใช้ *n*-butyl acetate ซึ่งมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและผู้ปฏิบัติงานมากกว่า ในปริมาตรรวมเพียง 0.5 มิลลิลิตรเท่านั้น ซึ่งน้อยกว่าวิธีตามตำรายาประมาณ 200 – 400 เท่า จึงสรุปได้ว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ช่วยประหยัดสาร ลดต้นทุน และลดการเกิดของเสียจากตัวทำละลายอินทรีย์ รวมทั้งยังช่วยเพิ่มความปลอดภัยให้กับผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อมอีกด้วย