

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

วัสดุและสารเคมี

1. สารมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต 99.74% (Lot.No. 0000010514 Siam Bheasach Co.,Ltd. Bangkok Thailand)
2. สารมาตรฐานเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ 99.46% (Lot.No. 0000008428 Siam Bheasach Co.,Ltd. Bangkok Thailand)
3. Nasotapp tablets® (เฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ 10 มิลลิกรัม, บรอมเฟนิรามีนมาลีเอต 4 มิลลิกรัม lot. 12A047)
4. Absolute ethanol (Merck)
5. Methanol (Merck)
6. Acetone (Merck)
7. Deionized water
8. HPTLC plates silica gel 60 F₂₅₄ (Merck K Ga A)

เครื่องมือ

1. Infrared spectrophotometer (Perkin Elmer : Spectrum100)
2. UV-VIS spectrophotometer JASCO V630
3. CAMAG TLC Scanner 3
4. CAMAG Linomat 5
5. TLC chamber
6. Ultrasonic bath

วิธีดำเนินการวิจัย

ก. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยวิธีอัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี

1. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์

1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (standard stock solution)

ชั่งสารมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ อย่างละ 0.2000 กรัม ในขวดวัดปริมาตร(volumetric flask) 200 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำ

1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต

เตรียมสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น โดยนำไปเจือจางด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้น 20, 30, 40, 50, และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงและหาค่า λ_{\max} โดยตั้งค่าพารามิเตอร์(parameters) ดังนี้

Wavelength	200-300 nm
Scan speed	200 nm/min
Respond time	medium
Bandwidth	1.5 nm
Derivative	1 st , 2 nd Savitzky-Golay algorithm
Data point	15

1.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์

เตรียมสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น โดยนำไปเจือจางด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้น 40, 50, 60, 80, 100, 110 และ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงและหาค่า λ_{\max}

2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

2.1 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

นำสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตในช่วงความเข้มข้น 20 ถึง 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ในช่วงความเข้มข้น 40 ถึง 120 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ λ_{\max} หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น และหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)

2.2 ความแม่นยำ (Accuracy)

ทดสอบโดยวิธีการเติมสารมาตรฐาน(standard addition) โดยผสมสารละลายตัวอย่างยากับสารละลายมาตรฐานผสมบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต และเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นของยาผสมบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและ เฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ 80, 100, 120 เปอร์เซ็นต์ที่ระบุบนฉลาก ระดับละ 3 ซ้ำ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืน (% recovery)

2.3 ความเที่ยง (Precision)

ทำการทดสอบความทวนซ้ำได้ (Repeatability) โดยการคำนวณ % Relative Standard Deviation (% RSD) 9 ซ้ำ จากข้อมูลการทดสอบความแม่นยำ (หัวข้อ 2.2)

3. การวิเคราะห์หาปริมาณบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ ในยาเม็ด

ชั่งตัวอย่างผงยาให้มีปริมาณ เฟนิลเอฟริน ไฮโดรคลอไรด์ 10 มิลลิกรัมและ บรอมเฟนิรามีน มาลีเอต 4 มิลลิกรัม (เทียบเท่ากับยา 1 เม็ด) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปแช่ใน ultrasonic bath 5 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำ กรองสารละลายผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์

ข. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยวิธีอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

1.1 การเลือกวิธีการวัดการดูดกลืนแสงและตัวทำละลาย

เตรียมสารละลายเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ และ บรอมเฟนิรามีนมาลีเอตให้มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง FT-IR spectrophotometer โดยตั้งพารามิเตอร์ดังนี้

1.1.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิคการสะท้อน (reflection)

Accessory type	Universal ATR sampling accessory
Scan range	4000-650 cm ⁻¹
Analysis type	Absorbance
Number of scan	64
Resolution	4 cm ⁻¹
Bounces	1
Detector	DTGS
Background	air/water

ขั้นตอนการวัดค่าการดูดกลืนแสง

Scan background โดยใช้น้ำหรืออากาศเป็น background หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างโดยหยดสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ลงบน diamond/ZnSe ATR plate บันทึกสเปกตรัม ล้าง ATR plate ด้วย acetone 3 ครั้ง ทิ้งให้แห้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง

1.1.2 การวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค transmission

Accessory type	Zn/Se liquid cell
Scan range	4000-650 cm ⁻¹

Analysis type	Absorbance
Number of scan	64
Resolution	4 cm ⁻¹
Spacers	0.1, 0.5 mm
Background	air/water/ethanol

ขั้นตอนการวัดค่าการดูดกลืนแสง

Scan background โดยใช้น้ำหรืออากาศ หลังจากนั้นวัดการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง โดยใส่สารละลายตัวอย่างใน Zn/Se liquid cell ที่มี spacer ที่มีความหนา 0.1 หรือ 0.5 มิลลิเมตร บันทึกสเปกตรัม ล้าง Zn/Se liquid cell ด้วยน้ำ 2 ครั้ง และ acetone 3 ครั้ง ทิ้งให้แห้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง

2. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น

ชั่งสารมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต และเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ อย่างถูกต้อง ใส่ขวดวัดปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ ให้มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต และเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์

เตรียมสารละลายมาตรฐานของสารผสมเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้น 0-1800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 30 ตัวอย่าง โดยเจือจางจากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานผสมบромเฟนิรามีนมาลีเอต และ เฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์

สารตัวอย่าง	เฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	บромเฟนิรามีน มาลีเอต (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
1	500	200
2	600	320
3	300	360
4	1200	240
5	600	160
6	1800	160
7	900	280
8	1200	80
9	1200	200
10	300	0
11	0	400
12	250	100
13	300	120
14	300	320
15	600	280
16	900	120
17	1200	160
18	300	240
19	600	200
20	750	100
21	1200	120
22	300	40
23	1500	80
24	750	10
25	250	20
26	750	30
27	800	80
28	50	40
29	100	80
30	400	80

3. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

3.1 ความเป็นเส้นตรง

นำสารละลายมาตรฐานของสารผสมเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้น 0-1800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง แล้วหาความสัมพันธ์กับความเข้มข้นโดยใช้หลักการการเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร โดยใช้ซอฟต์แวร์ spectrum quant⁺ v. 4.61 โดยตั้งค่าพารามิเตอร์ดังนี้

Algorithm	PCR หรือ PLS-1
Scan Range	4000-650 cm ⁻¹
Interval	1 cm ⁻¹
Analysis type	absorbance
Validation	full cross
Scaling	mean
Smooth	yes
Baseline	offset
Number of factors	1-15

พิจารณาความเป็นเส้นตรงของแบบจำลองการเทียบมาตรฐานหลายตัวแปรจากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารที่เตรียมขึ้นจริง (specified) กับปริมาณสารที่ประมาณค่าได้จากแบบจำลอง (estimated) และ ค่า %variance

3.2 ความแม่นยำ

ทดสอบโดยวิธีการเติมสารมาตรฐาน โดยผสมสารละลายตัวอย่างยากับสารละลายมาตรฐานผสมบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้นของยาผสมบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ 80, 100, 120 เปอร์เซ็นต์ที่ระบุบนฉลาก ระดับละ 3 ซ้ำ นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืน

3.3 ความเที่ยง

ทำการทดสอบความทวนซ้ำได้ โดยการคำนวณ % Relative Standard Deviation (% RSD) 9 ซ้ำ จากข้อมูลการทดสอบความแม่นยำ (หัวข้อ 3.2)

4. การวิเคราะห์หาปริมาณบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและ เฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ ในยาเม็ด

ชั่งตัวอย่างผงยาให้มีปริมาณ เฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ 10 มิลลิกรัม และบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต 4 มิลลิกรัม (เทียบเท่ากับยา 1 เม็ด) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร นำไป

แช่ใน ultrasonic bath 5 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำ กรองสารละลายผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์

ค. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยวิธีรังคเลขผิวบางสมรรถนะสูง

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อหาสภาวะวิกฤตเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสม

1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน เฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์

ชั่งสารมาตรฐาน เฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ 10 มิลลิกรัมลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยเอทานอล

1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน บรอมเฟนิรามีน มาลีเอต

ชั่งสารมาตรฐาน บรอมเฟนิรามีนมาลีเอต 10 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยเอทานอล

ทำการทดสอบเพื่อดูการแยกของตัวยาทั้ง 2 โดยใช้สภาวะโครมาโตกราฟีต่อไปนี้

Stationary phase:	HPTLC plates silica gel 60 F ₂₅₄ , 20.0 x20.0 cm
Mobile phase:	Methanol : Strong ammonia = 100 : 1.5
Developing chamber:	Chamber saturation (precondition 1 hr)
Development:	16 cm
Application volume:	5,7,10 µl ของสารละลายมาตรฐาน Phenylephrine HCl และ Brompheniramine maleate
Detection:	CAMAG TLC Scanner 3
Lamp:	Deuterium
Wavelength:	263 nm และ 273 nm
Slit dimensions:	4.00 x 0.45 mm, Micro
Measurement mode:	Absorption

2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

2.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Specificity/ Selectivity)

2.1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์

ชั่งสารมาตรฐานเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์ 35 มิลลิกรัม และบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต 14 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอทานอล 7 มิลลิลิตร นำไปแช่ใน ultrasonic bath 5 นาที ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล

2.1.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ซึ่งผงยาให้มีปริมาณ เฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ 20 มิลลิกรัม และบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต 8 มิลลิกรัม (ผงยาประมาณ 2 เม็ด) ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอทานอล 7 มิลลิลิตร นำไปแช่ใน ultrasonic bath 5 นาที ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล กรองสารละลายด้วยแผ่นกรอง 0.45 ไมครอน ทำการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง โดยการใส่สารละลาย standard mixture (2.1.1) และ สารละลายตัวอย่าง (2.1.2) จำนวน 1.1 ไมโครลิตร และ 1.0 ไมโครลิตร ลงบน HPTLC plate ตามลำดับ ทำการแยกโดยใช้สภาวะโครมาโตกราฟี ตามหัวข้อ (1.2) คำนวณค่า Rf values เปรียบเทียบ UV spectrum ของสารละลายตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐานและตรวจความบริสุทธิ์ (purity) โดยใช้ พารามิเตอร์ดังนี้

Slit dimensions:	4.00 x 0.45 mm, Micro
Scan speed:	50 nm/s
Lamp:	Deuterium
Start wavelength:	220 nm
End wavelength:	350 nm
Data resolution:	1 nm/ step
Purity scan, relative level:	85%

2.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรง

ซึ่งสารมาตรฐาน บรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ ให้มีน้ำหนัก ถูกต้อง 20 มิลลิกรัม และ 50 มิลลิกรัม ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมเอทานอล 15 มิลลิลิตร นำไปแช่ใน ultrasonic bath 5 นาที ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล

ทำการวิเคราะห์โดยการใส่ สารละลายมาตรฐานผสมของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต และเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ ปริมาตร 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 และ 4.5 ไมโครลิตร ลงบน HPTLC plates ความเข้มข้นของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ คือ 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของ บรอมเฟนิรามีนมาลีเอต คือ 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2 และ 3.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์โดยใช้ สภาวะโครมาโตกราฟีตามหัวข้อ (1.2)

ศึกษาความสัมพันธ์ความเป็นเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีกของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ สร้างกราฟมาตรฐาน คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

2.3 การทดสอบความแม่นยำ

ทดสอบความแม่นยำด้วยวิธีการเติมสารมาตรฐาน โดยการเติมสารละลายมาตรฐานผสม บรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 80%, 100% และ 120% ของความเข้มข้นที่ใช้วิเคราะห์ ลงบน spot หรือ band ของสารละลายตัวอย่าง ทดสอบความเข้มข้นละ

3 ซ้ำ วิเคราะห์หาปริมาณ บรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ ในสารละลาย ตัวอย่าง และในสารตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืน

2.4 การทดสอบความเที่ยง

ทำการทดสอบความทวนซ้ำได้ โดยการชั่งสารมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต และเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ให้มีน้ำหนักถูกต้อง 12 มิลลิกรัม และ 30 มิลลิกรัม ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอธานอล 7 มิลลิลิตร นำไปแช่ใน ultrasonic bath 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย เอธานอล ทำการวิเคราะห์โดยใส่สารละลายมาตรฐาน 1.1 ไมโครลิตร จำนวน 6 ครั้งลงบน plate เดียวกัน ทำการแยกสารโดยใช้ สภาวะโครมาโตกราฟีตามหัวข้อ (1.2) วัดค่า Rf และพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่า %RSD

3. การวิเคราะห์หาปริมาณบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตและ เฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ ในยาเม็ด

ชั่งตัวอย่างผงยาให้มีปริมาณเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ 10 มิลลิกรัมและบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต 4 มิลลิกรัม (เทียบเท่ากับยา 1 เม็ด) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอธานอล 7 มิลลิลิตร นำไปแช่ใน ultrasonic bath 5 นาที ปรับปริมาตรด้วยเอธานอล กรองสารละลายผ่านแผ่นกรองขนาด 0. 45 ไมครอน นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้สารละลาย ตัวอย่างจำนวน 3.5 -4.0 ไมโครลิตร ทำการแยกสารโดยใช้ สภาวะโครมาโตกราฟีตามหัวข้อ (1.2)