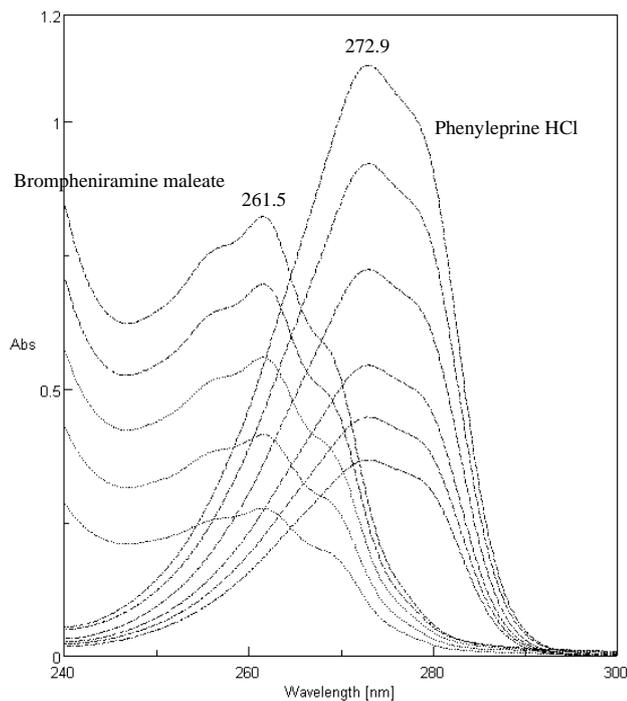


บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล

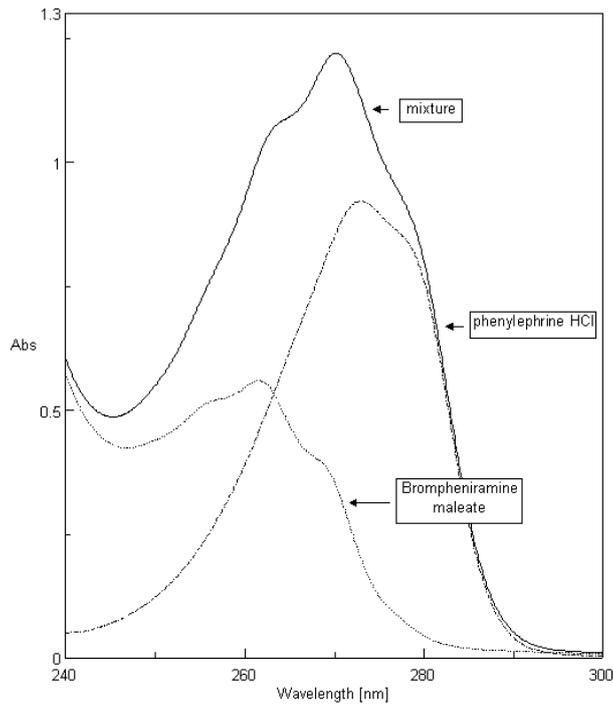
ก. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยวิธีอัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี

1. การวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยวิธี simultaneous equation method

เมื่อนำสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200-300 นาโนเมตรพบว่าความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตสูงสุด (λ_{\max}) ของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์อยู่ที่ 261.5 นาโนเมตรและ 272.9 นาโนเมตรตามลำดับ (รูปที่ 4.1) เมื่อนำสเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานผสมและสารละลายมาตรฐานทั้งสองชนิดมาซ้อนทับกันพบว่ายังคงอ่านค่า λ_{\max} ของสารทั้งสองชนิดได้ (รูปที่ 4.2) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถวิเคราะห์หาปริมาณของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์โดยใช้วิธี simultaneous equation method โดยไม่จำเป็นต้องแยกสารออกจากกัน



รูปที่ 4.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตในน้ำ (ความเข้มข้น 20, 30, 40, 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารละลายมาตรฐานของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ในน้ำ (ความเข้มข้น 40, 50, 60, 80, 100 และ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



รูปที่ 4.2 สเปกตรัมสารละลายมาตรฐานผสมของบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตในน้ำ (ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์ในน้ำ (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบความเป็นเส้นตรง

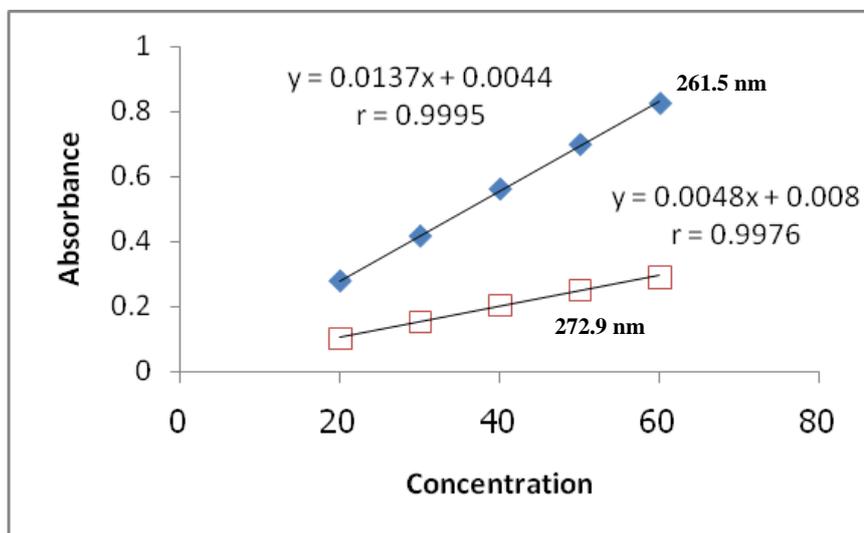
การทดสอบความเป็นเส้นตรง ทำได้โดยการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน จากการเตรียมสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตในช่วงความเข้มข้น 20 ถึง 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ในช่วงความเข้มข้น 40 ถึง 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 261.5 และ 272.9 นาโนเมตร ได้ข้อมูลดังตารางที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ ตารางที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต

ความเข้มข้นของบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง	
	261.5 นาโนเมตร	272.9 นาโนเมตร
20	0.2768	0.1009
30	0.4147	0.1513
40	0.5594	0.2033
50	0.6964	0.2505
60	0.8229	0.2905

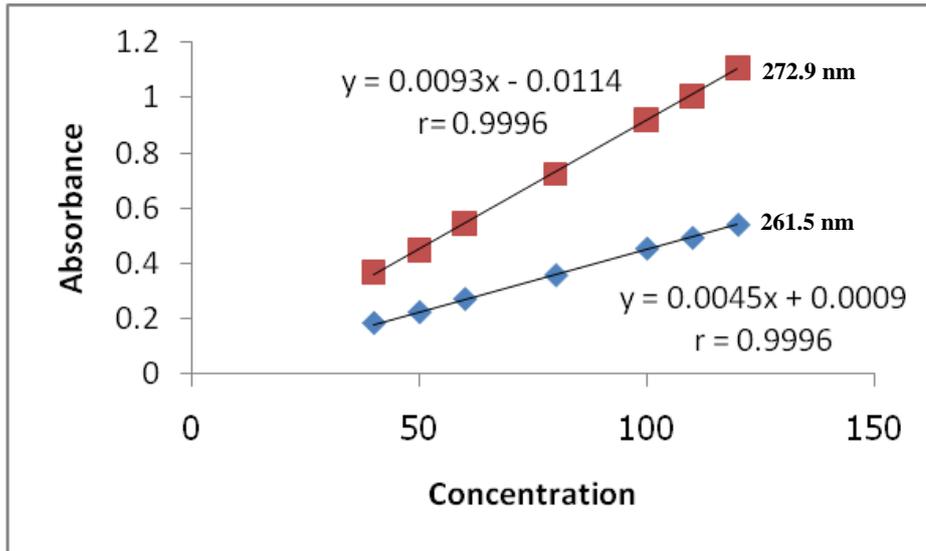
ตารางที่ 4.2 ค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์

ความเข้มข้นของเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์ (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง	
	261.5 นาโนเมตร	272.9 นาโนเมตร
40	0.1832	0.3677
50	0.2225	0.4476
60	0.2704	0.5446
80	0.3565	0.7239
100	0.4533	0.9215
110	0.4922	1.0056
120	0.5397	1.1065

จากข้อมูลในตารางที่ 4.1 และ 4.2 นำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต และสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ กับค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 261.5 และ 272.9 นาโนเมตร ได้ผลดังรูปที่ 4.3 และรูปที่ 4.4 ตามลำดับ



รูปที่ 4.3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 261.5 และ 272.9 นาโนเมตรและความเข้มข้นของสารละลายบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตในน้ำ



รูปที่ 4.4 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 261.5 และ 272.9 นาโนเมตรและความเข้มข้นของสารละลายเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ในน้ำ

จากรูปที่ 4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 261.5 นาโนเมตรกับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต เป็นไปตามสมการ $y = 0.0137x + 0.0044$ และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.9995 และความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272.9 นาโนเมตร กับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต เป็นไปตามสมการ $y = 0.0048x + 0.008$ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9976 แสดงว่าในช่วงความเข้มข้น 20-60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับค่าการดูดกลืนแสง และจากรูปที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 261.5 นาโนเมตร กับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ เป็นไปตามสมการ $y = 0.0045x + 0.0009$ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9996 และความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272.9 นาโนเมตรกับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ เป็นไปตามสมการ $y = 0.0093x - 0.0114$ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9996 แสดงว่าในช่วงความเข้มข้น 40-120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับค่าการดูดกลืนแสง เช่นเดียวกัน ค่าพารามิเตอร์จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงสรุปได้ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่าพารามิเตอร์จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต และเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์

พารามิเตอร์	สารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต		สารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์	
	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	261.5	272.9	261.5
ช่วงความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	20-60	20-60	40-120	40-120
สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	0.9995	0.9976	0.9996	0.9996
สภาพการดูดกลืน (absorptivity) (ลิตร/กรัม เซ็นติเมตร)	13.7	4.8	4.5	9.3
จุดตัดแกน y (Intercept)	0.0044	0.008	0.0009	-0.0114

จากค่าการดูดกลืนแสงและสภาพการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง สามารถนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต และเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ ด้วยวิธี simultaneous equation method จากสูตรต่อไปนี้

$$C_{\text{BPM}} = (A1ay2 - A2ay1) / (ax1ay2 - ax2ay1)$$

$$C_{\text{PEH}} = (A2ax1 - A1ax2) / (ax1ay2 - ax2ay1)$$

C_{BPM} = ความเข้มข้นของบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต

C_{PEH} = ความเข้มข้นของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์

A1 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 261.5 นาโนเมตร

A2 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 272.9 นาโนเมตร

ax1 = ค่าสภาพการดูดกลืนของบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตที่ความยาวคลื่น 261.5 นาโนเมตร

ax2 = ค่าสภาพการดูดกลืนของบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตที่ความยาวคลื่น 272.9 นาโนเมตร

ay1 = ค่าสภาพการดูดกลืนของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความยาวคลื่น 261.5 นาโนเมตร

ay2 = ค่าสภาพการดูดกลืนของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความยาวคลื่น 272.9 นาโนเมตร

การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง

ทำโดยวิธีการเติมสารมาตรฐาน โดยการเติมสารละลายมาตรฐานผสมของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต และเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน 3 ระดับ คือ 80, 100, 120

เปอร์เซ็นต์ที่ระบุบนฉลาก(% L.A.) ลงในสารละลายตัวอย่างยาที่เตรียมให้มีความเข้มข้นคงที่
เปรียบเทียบกับสารละลายตัวอย่างยาที่ไม่ได้เติมสายละลายมาตรฐาน ค้นหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืน
(% recovery) ได้ผลดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การกลับคืนวิเคราะห์โดยวิธี simultaneous equation method

เปอร์เซ็นต์ที่ ระบุบนฉลาก (%L.A.)	บรอมเฟนิรามีนมาลีเอต			เฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์		
	ปริมาณที่เติม (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	ปริมาณที่พบ (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	% การ กลับคืน	ปริมาณที่เติม (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	ปริมาณที่พบ (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	% การ กลับคืน
80	32	32.6	101.9	80	79.4	99.3
80	32	32.3	100.9	80	78.6	98.2
80	32	32.4	101.4	80	78.9	98.6
100	40	40.5	101.2	100	101.0	101.0
100	40	40.8	101.9	100	99.6	99.6
100	40	40.5	101.3	100	99.3	99.3
120	48	48.4	100.8	120	122.4	102.0
120	48	47.7	99.4	120	122.1	101.8
120	48	47.6	99.1	120	123.0	102.5
ค่าเฉลี่ย			100.9			100.3
S.D.			1.0			1.6
% R.S.D.			1.0			1.6

ในการประเมินความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์พิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การกลับคืน จากข้อมูลตารางที่
4.4 เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต มีค่าเฉลี่ย 100.9 (เกณฑ์การยอมรับอยู่ในช่วง
97.0 – 103) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้และเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ มี
ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 100.3 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้เช่นกัน ในการประเมินความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์
พิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% R.S.D.) โดยเกณฑ์การยอมรับ % R.S.D. จะต้อง
มีค่าน้อยกว่า 2 จากข้อมูลตารางที่ 4.4 ค่า % R.S.D. ของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดร
คลอไรด์ 9 ตัวอย่างมีค่า 1.0 และ 1.6 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นจึงนำวิธีวิเคราะห์นี้ไป
วิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญในตัวอย่างยาเม็ดต่อไป

การวิเคราะห์หาปริมาณบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตและ เฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ ในยาเม็ด

นำวิธีการวิเคราะห์ด้วย simultaneous equation method ไปวิเคราะห์ตัวอย่างยา Nasotapp tablets[®] ได้ผลดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ บรอมเฟนิรามีน มาลีเอตและ เฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ ในยาเม็ดด้วยวิธี simultaneous equation method

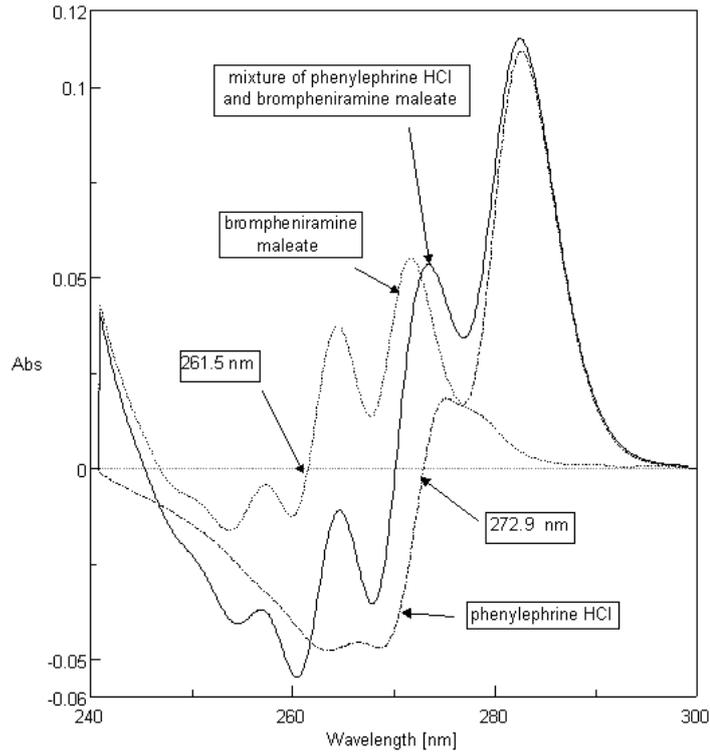
ตัวอย่างยา	Nasotapp tablets [®]			
	บรอมเฟนิรามีนมาลีเอต		เฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์	
	น้ำหนัก/เม็ด (มิลลิกรัม)	% L.A.	น้ำหนัก/เม็ด (มิลลิกรัม)	% L.A.
1	4.12	103.0	10.45	104.5
2	4.20	105.0	10.39	103.9
3	4.17	104.2	10.22	102.2
ค่าเฉลี่ย	4.16	104.1	10.35	103.5
% RSD.		0.97		1.15

จากผลการวิเคราะห์พบว่าในยาเม็ดตรวจพบปริมาณบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต 4.16 มิลลิกรัมหรือเทียบเท่า 104.1% ของปริมาณที่ระบุบนฉลาก และพบเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ 10.35 มิลลิกรัมหรือเทียบเท่ากับ 103.5% ของปริมาณที่ระบุบนฉลากโดยมีความเที่ยงเท่ากับ 0.97 และ 1.15 ตามลำดับ

2. การวิเคราะห์โดยใช้สเปกตรัมอนุพันธ์(derivative spectra)

2.1 การวิเคราะห์โดยใช้สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1

นำสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต และเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ แปลงเป็นสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 โดยใช้ Savitzky-Golay algorithm โดยใช้ $\Delta\lambda$ เท่ากับ 15 points มาซ้อนทับกัน พบว่าสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 ของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต มีจุดผ่านศูนย์ (zero crossing) ที่ความยาวคลื่น 261.5 นาโนเมตร และสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 ของสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ มีจุดผ่านศูนย์ที่ความยาวคลื่น 272.9 นาโนเมตร ดังรูปที่ 4.5



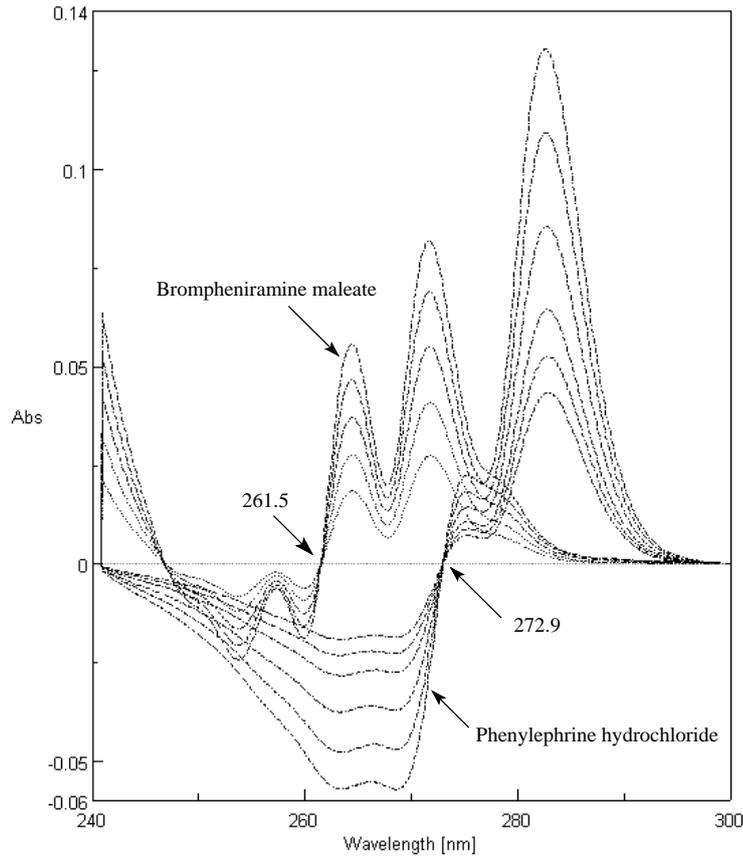
รูปที่ 4.5 สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 ของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์

จากสเปกตรัมรูปที่ 4.5 สามารถนำมาใช้หาปริมาณของสารละลายบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและสารละลายเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ได้ โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าอนุพันธ์อันดับที่ 1 กับความเข้มข้นของสารละลายบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและสารละลายเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความยาวคลื่น 261.5 และ 272.9 นาโนเมตร

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบความเป็นเส้นตรง

การทดสอบความเป็นเส้นตรง ทำได้โดยการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าอนุพันธ์อันดับที่ 1 และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน โดยการนำสเปกตรัมการดูดแสงของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตในช่วงความเข้มข้น 20 ถึง 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ในช่วงความเข้มข้น 40 ถึง 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาแปลงเป็นสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 แล้วนำมาซ้อนทับกันดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 ของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตในน้ำ (ความเข้มข้น 20, 30, 40, 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารละลายมาตรฐานของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ในน้ำ (ความเข้มข้น 40, 50, 60, 80, 100 และ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

จากสเปกตรัมรูปที่ 4.6 สามารถนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตกับค่าอนุพันธ์อันดับที่ 1 ที่ความยาวคลื่น 272.9 นาโนเมตร และสามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์กับค่าอนุพันธ์อันดับที่ 1 ที่ความยาวคลื่น 261.5 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และ 4.7 ตามลำดับ

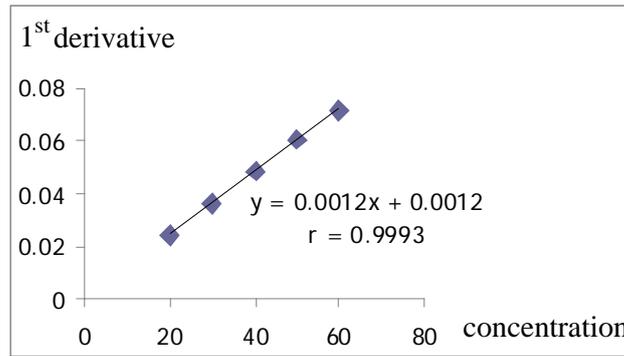
ตารางที่ 4.6 ค่าอนุพันธ์อันดับที่ 1 ของบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต ที่ความยาวคลื่น 272.9 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของสารละลายบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าอนุพันธ์อันดับที่ 1 ที่ความยาวคลื่น 272.9 นาโนเมตร
20	0.02459
30	0.03645
40	0.04877
50	0.06077
60	0.07138

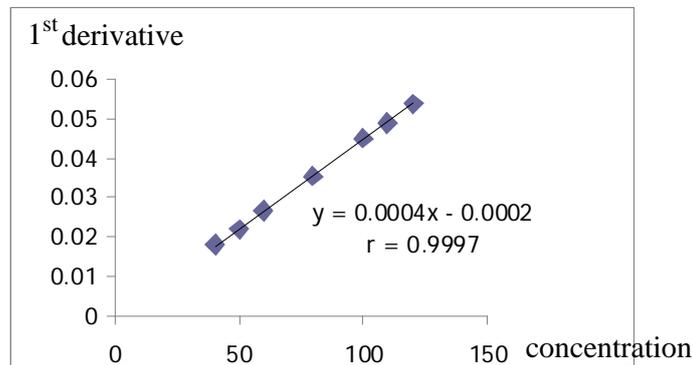
ตารางที่ 4.7 ค่าอนุพันธ์อันดับที่ 1 ของสารละลายเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์ ที่ความยาวคลื่น 261.5 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของสารละลายเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าอนุพันธ์อันดับที่ 1 ที่ความยาวคลื่น 261.5 นาโนเมตร
40	0.01805
50	0.02194
60	0.02675
80	0.03555
100	0.04495
110	0.0490
120	0.05372

จากข้อมูลในตารางที่ 4.6 และ 4.7 นำไปสร้างกราฟ หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าอนุพันธ์อันดับที่ 1 กับ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต และ สารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ ได้ผลดังรูปที่ 4.7 และ 4.8 ตามลำดับ



รูปที่ 4.7 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าอนุพันธ์อันดับที่ 1 ของสารละลาย บรอมเฟนิรามีน มาลีเอต ที่ความยาวคลื่น 272.9 นาโนเมตร



รูปที่ 4.8 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าอนุพันธ์อันดับที่ 1 ของ สารละลายเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความยาวคลื่น 261.5 นาโนเมตร

จากรูปที่ 4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตกับค่าอนุพันธ์อันดับที่ 1 ที่ความยาวคลื่น 272.9 นาโนเมตร เป็นไปตามสมการ $y = 0.0012x + 0.0012$ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9993 แสดงว่าในช่วงความเข้มข้น 20-60 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร สารละลายบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับค่าอนุพันธ์อันดับที่ 1 และ รูปที่ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ กับค่าอนุพันธ์อันดับที่ 1 ที่ความยาวคลื่น 261.5 นาโนเมตร เป็นไปตามสมการ $y = 0.0004x - 0.0002$ มีค่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9997 แสดงว่าในช่วงความเข้มข้น 40-120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับค่าอนุพันธ์อันดับที่ 1

การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง

ทำโดยวิธีการเติมสารมาตรฐาน โดยการเติมสารละลายมาตรฐานผสมของบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน 3 ระดับ คือ 80, 100, 120 เปอร์เซ็นต์ที่ระบุบนฉลาก ลงในสารละลายตัวอย่างยาที่เตรียมให้มีความเข้มข้นคงที่ เปรียบเทียบกับ สารละลายตัวอย่างยาที่ไม่ได้เติมสายละลายมาตรฐาน กำหนดหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืนดังตารางที่ 4.8 ในการประเมินความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ พิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การกลับคืน จากข้อมูลตารางที่ 4.8

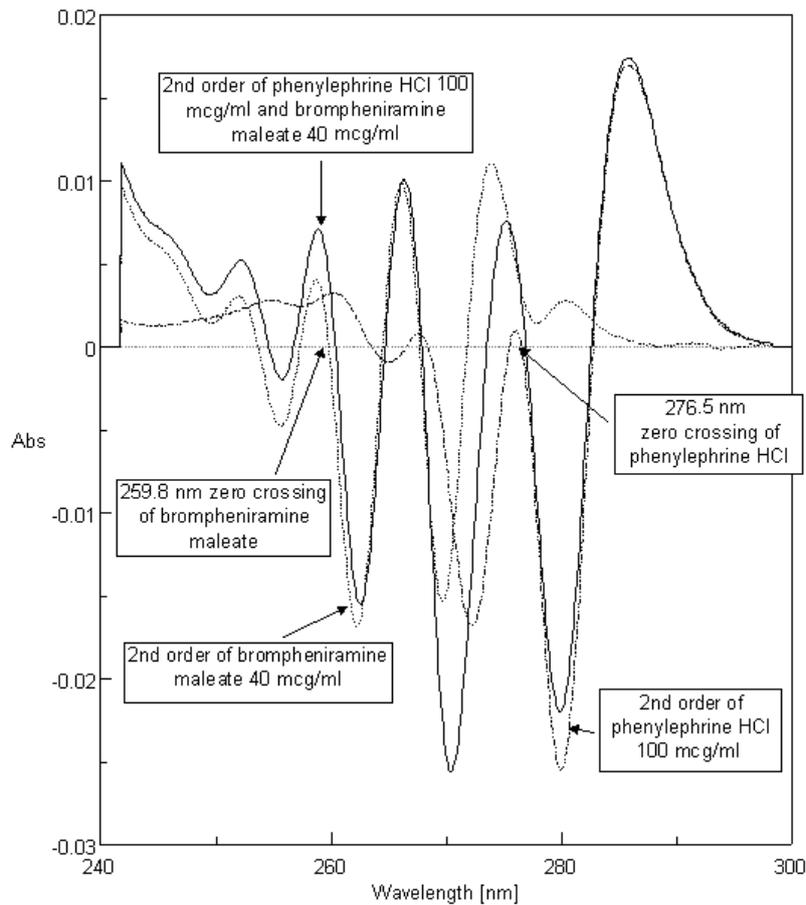
เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 109.1 ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 123.1 ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้เช่นกัน ในการประเมินความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์พิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% R.S.D) จากข้อมูลตารางที่ 4.8 ค่า % R.S.D. ของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ 9 ตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 4.4 และ 3.0 ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นวิธีการนี้จึงไม่เหมาะสมในการนำไปใช้วิเคราะห์สารในตัวอย่างยาเม็ด

ตารางที่ 4.8 เปอร์เซ็นต์การกลับคืน วิเคราะห์โดยใช้อัลตราไวโอเลตสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1

เปอร์เซ็นต์ที่ ระบุบนฉลาก (%LA)	บรอมเฟนิรามีน มาลีเอต			เฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์		
	ปริมาณที่เติม (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	ปริมาณที่พบ (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	% การ กลับคืน	ปริมาณที่เติม (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	ปริมาณที่พบ (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	% การ กลับคืน
80	32	33.17	103.7	80	95.88	119.9
80	32	32.94	102.9	80	94.98	118.7
80	32	33.51	104.7	80	95.35	119.2
100	40	43.69	109.2	100	123.70	123.7
100	40	43.87	109.7	100	121.83	121.8
100	40	43.14	107.9	100	121.93	121.9
120	48	55.90	116.5	120	152.95	127.5
120	48	54.71	114.0	120	152.85	127.4
120	48	54.49	113.5	120	153.45	127.9
ค่าเฉลี่ย			109.1			123.1
S.D.			4.8			3.7
%RSD			4.4			3.0

2.2 การวิเคราะห์โดยใช้สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 2

นำสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ เปลี่ยนเป็นสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 2 โดยใช้ Savitzky-Golay algorithm โดยใช้ $\Delta\lambda$ เท่ากับ 15 points มาซ้อนทับกัน พบว่าสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 2 ของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต มีจุดผ่านศูนย์ที่ความยาวคลื่น 259.8 นาโนเมตร และสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 2 ของสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ มีจุดผ่านศูนย์ที่ความยาวคลื่น 276.5 นาโนเมตร ดังรูปที่ 4.9



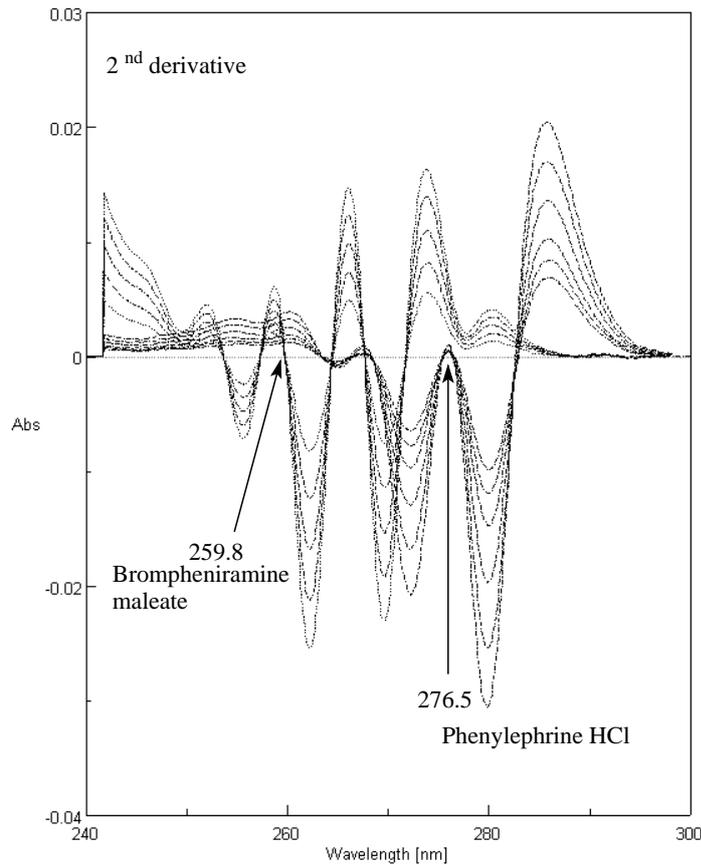
รูปที่ 4.9 สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 2 ของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตและสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์

จากสเปกตรัมรูปที่ 4.9 สามารถนำมาใช้หาปริมาณของสารละลายบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและสารละลายเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ได้ โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าอนุพันธ์อันดับที่ 2 กับความเข้มข้นของสารละลายบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต และสารละลายเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความยาวคลื่น 259.8 และ 276.5 นาโนเมตร

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบความเป็นเส้นตรง

การทดสอบความเป็นเส้นตรง ทำได้โดยการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าอนุพันธ์อันดับที่ 2 และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน โดยการนำสเปกตรัมการดูดแสงของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตในช่วงความเข้มข้น 20 ถึง 60 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ในช่วงความเข้มข้น 40 ถึง 120 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร มาแปลงเป็นสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 2 แล้วนำมาซ้อนทับกันดังรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 2 ของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตในน้ำ (ความเข้มข้น 20, 30, 40, 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารละลายมาตรฐานของเฟนิลเอพีน ไฮโดรคลอไรด์ในน้ำ (ความเข้มข้น 40, 50, 60, 80, 100 และ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

จากสเปกตรัมรูปที่ 4.10 สามารถนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตกับค่าอนุพันธ์อันดับที่ 2 ที่ความยาวคลื่น 276.5 นาโนเมตร และสามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพีนไฮโดรคลอไรด์ กับค่าอนุพันธ์อันดับที่ 2 ที่ความยาวคลื่น 259.8 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.9 และ 4.10 ตามลำดับ

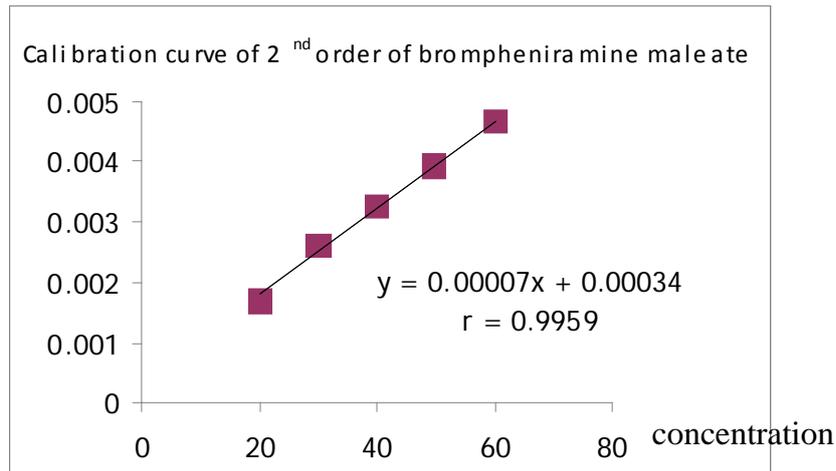
ตารางที่ 4.9 ค่าอนุพันธ์อันดับที่ 2 ของสารละลายบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต ที่ความยาวคลื่น 276.5 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของสารละลายบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าอนุพันธ์อันดับที่ 2 ที่ความยาวคลื่น 276.5 นาโนเมตร
20	0.00170
30	0.00262
40	0.00326
50	0.00393
60	0.00466

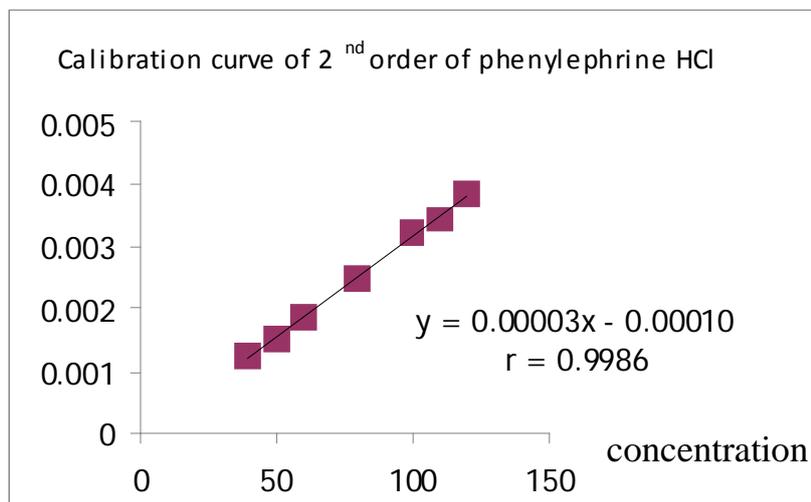
ตารางที่ 4.10 ค่าอนุพันธ์อันดับที่ 2 ของสารละลายเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความยาวคลื่น 259.8 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของสารละลายเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าอนุพันธ์อันดับที่ 2 ที่ความยาวคลื่น 259.8 นาโนเมตร
40	0.00124
50	0.00151
60	0.00185
80	0.00251
100	0.00321
110	0.00343
120	0.00385

จากข้อมูลในตารางที่ 4.9 และ 4.10 นำไปสร้างกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าอนุพันธ์อันดับที่ 2 กับ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต และสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ ได้ผลดังรูปที่ 4.11 และ 4.12 ตามลำดับ



รูปที่ 4.11 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าอนุพันธ์อันดับที่ 2 ของสารละลาย บรอมเฟนิรามีน มาลีเอต ที่ความยาวคลื่น 276.5 นาโนเมตร



รูปที่ 4.12 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าอนุพันธ์อันดับที่ 2 ของสารละลายเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์ ที่ความยาวคลื่น 259.8 นาโนเมตร

จากรูปที่ 4.11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตกับค่าอนุพันธ์อันดับที่ 2 ที่ความยาวคลื่น 276.5 นาโนเมตร เป็นไปตามสมการ $y = 0.00007x + 0.00034$ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9959 แสดงว่าในช่วงความเข้มข้น 20-60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับค่าอนุพันธ์อันดับที่ 2 และรูปที่ 4.12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์กับค่าอนุพันธ์อันดับที่ 2 ที่ความยาวคลื่น 259.8 นาโนเมตร เป็นไปตามสมการ $y = 0.00003x - 0.00010$ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9986 แสดงว่าในช่วงความเข้มข้น 40-120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับค่าอนุพันธ์อันดับที่ 2 การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง

ทำโดยวิธีการเพิ่มสารมาตรฐาน โดยการเพิ่มสารละลายมาตรฐานผสมของบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน 3 ระดับ คือ 80, 100, 120 เปอร์เซ็นต์ที่ระบุบนฉลากลงในสารละลายตัวอย่างยาที่เตรียมให้มีความเข้มข้นคงที่ เปรียบเทียบกับ สารละลายตัวอย่างยาที่ไม่ได้เติมสายละลายมาตรฐาน ค้นหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืนดังตารางที่ 4.11 จากข้อมูลตารางที่ 4.11 เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 100.7 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 147.4 ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ในการประเมินความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์จากข้อมูลตารางที่ 4.11 ค่าเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ 9 ตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 3.0 และ 9.0 ตามลำดับ ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นวิธีการนี้จึงไม่เหมาะสม ในการนำไปใช้วิเคราะห์สารตัวอย่าง

ตาราง 4.11 เปอร์เซ็นต์การกลับคืน วิเคราะห์โดยใช้อัลตราไวโอเลตสเปกโตรมิทรีบนพื้นฐานอันดับที่ 2

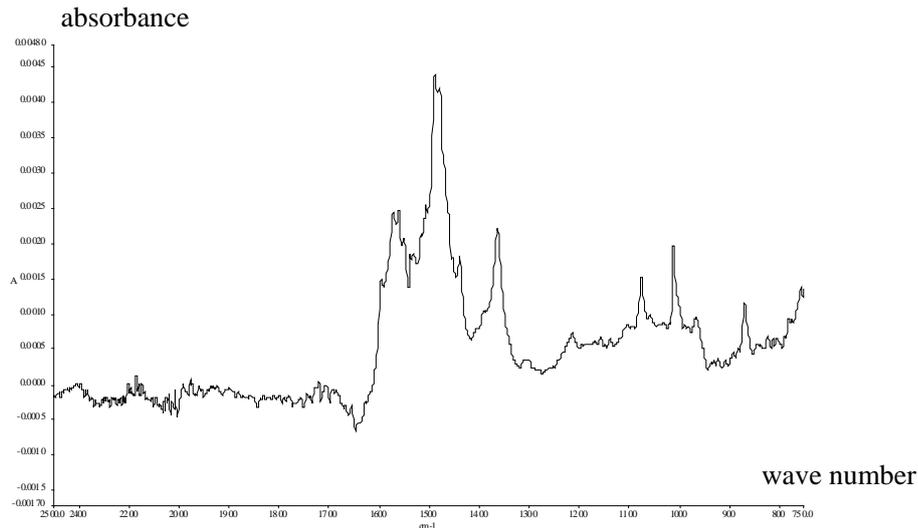
%L.A.	บรอมเฟนิรามีน มาลีเอต			เฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์		
	ปริมาณที่เติม (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	ปริมาณที่พบ (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	% การ กลับคืน	ปริมาณที่เติม (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	ปริมาณที่พบ (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	% การ กลับคืน
80	32	32.00	100.0	80	106.3	132.9
80	32	31.71	99.1	80	108.0	135.0
80	32	31.29	97.8	80	107.0	133.8
100	40	41.71	104.3	100	146.3	146.3
100	40	38.71	96.8	100	141.6	141.7
100	40	39.71	99.3	100	145.3	145.3
120	48	50.86	105.9	120	196.0	163.3
120	48	49.14	102.4	120	198.8	165.6
120	48	48.43	100.9	120	195.6	163.1
ค่าเฉลี่ย			100.7			147.4
S.D.			3.0			13.0
%RSD			3.0			9.0

ข. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยวิธีอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

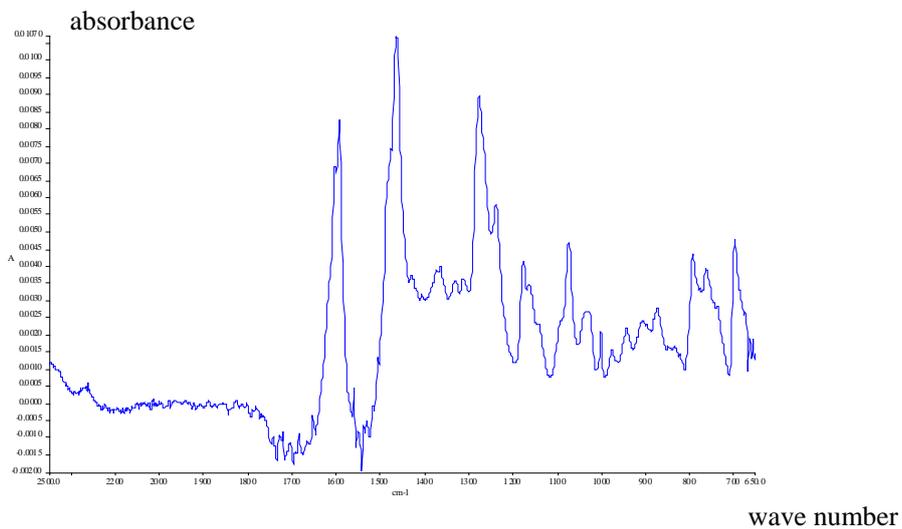
1. การหาสถานะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

1.1 การวัดการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิคการสะท้อน

เตรียมสารละลายบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต และเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงอินฟราเรด ด้วยเทคนิค UATR โดยใช้น้ำเป็น background ได้สเปกตรัมดังรูปที่ 4.13 และ 4.14 ตามลำดับ



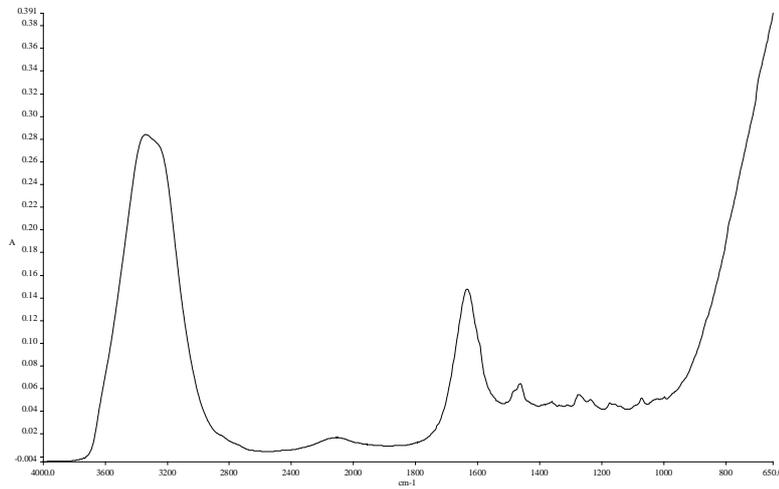
รูปที่ 4.13 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารละลายบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตในน้ำด้วย UATR sampling technique โดยใช้น้ำเป็น background



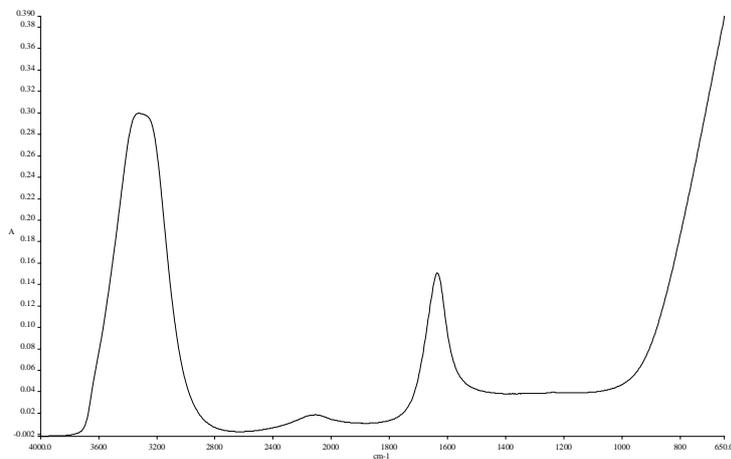
รูปที่ 4.14 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารละลายเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์ในน้ำด้วย UATR sampling technique โดยใช้น้ำเป็น background

จากรูปที่ 4.13 และ 4.14 พบว่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ มีพิกซ้อนทับกันในช่วงเลขคลื่นตั้งแต่ $1700-650\text{ cm}^{-1}$ และ

มีค่าการดูดกลืนแสงต่ำมาก เมื่อนำสารละลายผสมบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตและเฟนิลเอพรินไฮโดรคลอไรด์ในน้ำไปวัดการดูดกลืนแสงอินฟราเรดด้วยเทคนิค UATR โดยใช้อากาศเป็น background ได้สเปกตรัมดังรูปที่ 4.15 และเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของน้ำ โดยใช้อากาศเป็น background (รูปที่ 4.16) จะมีลักษณะคล้ายกัน



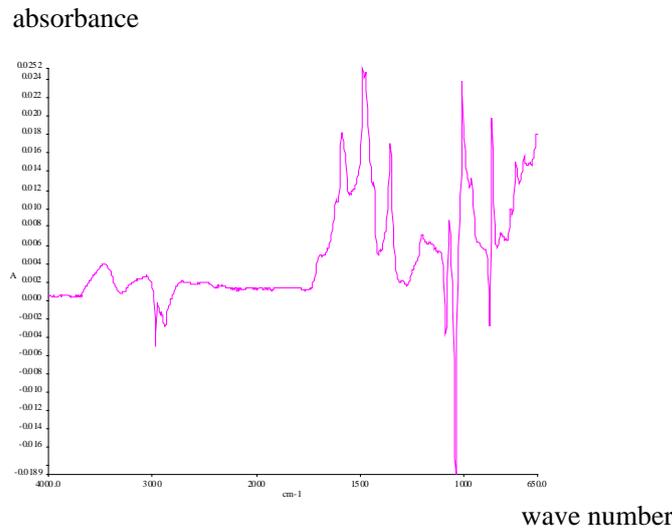
รูปที่ 4.15 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารละลายผสมบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต และเฟนิลเอพรินไฮโดรคลอไรด์ในน้ำด้วย UATR sampling technique โดยใช้อากาศเป็น background



รูปที่ 4.16 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของน้ำด้วย UATR sampling technique โดยใช้ อากาศเป็น background

จากรูปที่ 4.15 และ 4.16 พบว่าสเปกตรัมของน้ำจะมีค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรดสูงมาก ในช่วง $3600-2900\text{ cm}^{-1}$ และ $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งพบได้ในสเปกตรัมของสารตัวอย่างด้วย แต่ช่วง เลขคลื่น $1650-1300\text{ cm}^{-1}$ จะเป็นการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่แตกต่างจากสเปกตรัมของน้ำ เมื่อทดลองเปลี่ยนตัวทำละลาย โดยการเตรียมสารละลายบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตในเอทานอล แล้ว

นำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วย UATR sampling technique และใช้เอทานอลเป็น background ได้ สเปกตรัมดังรูปที่ 4.17 ซึ่งพบว่าสเปกตรัมที่ได้จะมีพีคหลายช่วงที่มีค่าลบ (negative peaks)

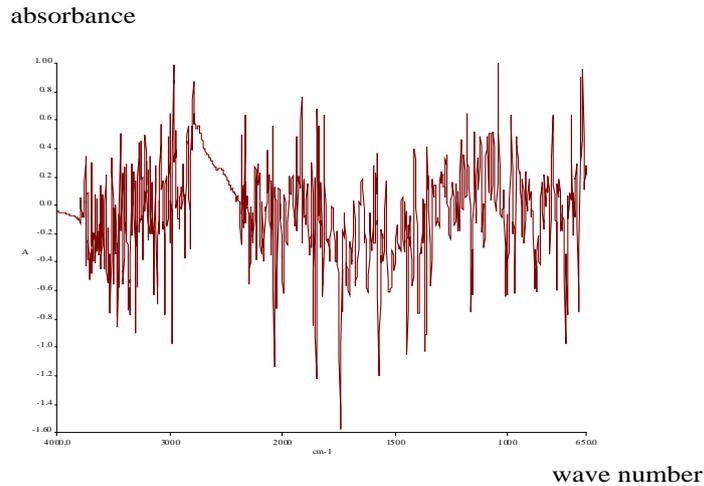


รูปที่ 4.17 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารละลายบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตในเอทานอล ด้วย UATR sampling technique โดยใช้เอทานอลเป็น background

จากข้อมูลสเปกตรัมที่ได้ จะเห็นว่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่วัดด้วย UATR sampling technique ที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย มีความเหมาะสมกว่าสเปกตรัมที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย เนื่องจากไม่มีค่าการดูดกลืนแสงที่เป็นค่าลบ อย่างไรก็ตามค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้เนื่องจาก UATR sampling technique เป็นเทคนิคที่วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างโดยใช้หลักการการสะท้อนของแสงอินฟราเรดที่ตกกระทบสารตัวอย่างเพียงครั้งเดียว ประกอบกับ pathlength ที่ใช้ด้วยเทคนิคนี้ มีค่าน้อยมาก (ประมาณ 2-5 ไมครอน) ดังนั้นการที่จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าสูงขึ้น เพื่อให้การวิเคราะห์มีความถูกต้องมากขึ้นจะต้องใช้สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูง

1.2 การวัดการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค transmission

การวัดการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค transmission ใช้ liquid cell ที่ทำด้วย ZnSe ซึ่งจะบรรจุสารตัวอย่างได้มากกว่า และ pathlength มีค่ามากกว่า UATR sampling technique ดังนั้นจะทำให้ได้สเปกตรัมที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าวิธี UATR อย่างไรก็ตามจากการทดลองวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตในน้ำด้วยเทคนิค transmission โดยใช้น้ำเป็น background สเปกตรัมที่ได้มีสัญญาณรบกวนมากจนไม่สามารถอ่านค่าได้ดังรูปที่ 4.18 นอกจากนี้การเปลี่ยนตัวทำละลายจากน้ำเป็นเอทานอล สเปกตรัมที่ได้ก็ยังคงมีสัญญาณรบกวนจนไม่สามารถอ่านค่าได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้การวัดการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค transmission



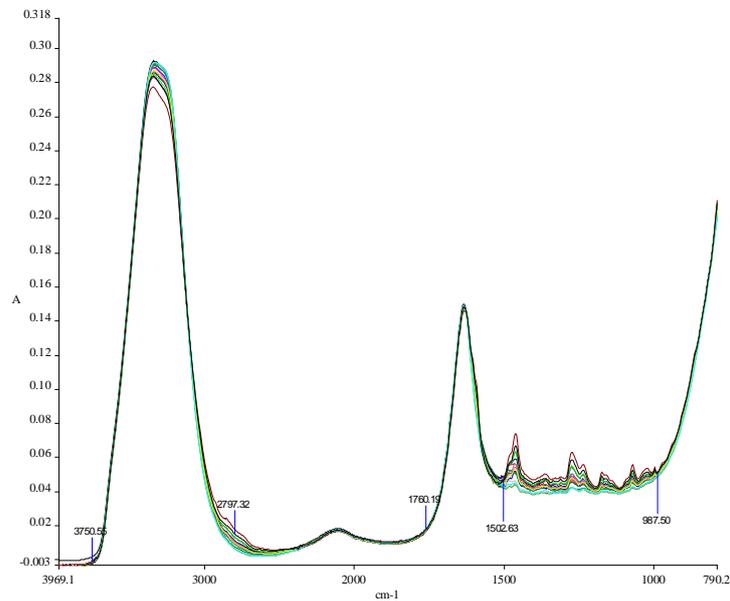
รูปที่ 4.18 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตในน้ำด้วยเทคนิค transmission โดยใช้ น้ำเป็น background

2. การวิเคราะห์โดยใช้หลักการเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร

จากสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต และเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ รูปที่ 4.13-4.15 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารทั้งสองซ้อนทับกันตลอดช่วงของสเปกตรัมจนไม่สามารถหาช่วงเลขคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โดยใช้หลักการเทียบมาตรฐานตัวแปรเดียว ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงนำหลักการเทียบมาตรฐานหลายตัวแปรมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์

2.1 การสร้างแบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร

เตรียมสารละลายมาตรฐานของสารผสมเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้น 0-1800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ บรอมเฟนิรามีนมาลีเอต ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 30 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 3.1 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง FT-IR ด้วยเทคนิค UATR โดยใช้อากาศเป็น background ได้สเปกตรัมดังรูปที่ 4.19



รูปที่ 4.19 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารละลายมาตรฐานผสมเฟนิลเอพรินไฮโดรคลอไรด์ และบรอมเฟนิรามีนมาลิเอตในน้ำ ด้วย UATR sampling technique โดยใช้อากาศเป็น background

การสร้างแบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปรจากสเปกตรัมรูปที่ 4.19 โดยใช้ PCR และ PLS-1 algorithm ใช้ซอฟต์แวร์ spectrum quant⁺ ของเครื่อง FT-IR spectrophotometer

2.1.1 การสร้างแบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปรด้วย PCR algorithm

ในการสร้างแบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร กำหนดพารามิเตอร์ดังนี้

Number of standards	30
Number of properties	2
Regression algorithm	PCR
Validation sample	full cross validation
Spectrum range	3750-970 cm^{-1}
Interval	1 cm^{-1}
Analysis data	absorbance
Scaling	mean
Smooth	yes
Baseline correction	offset
Number of factors	1-15

สิ่งสำคัญในการสร้างแบบจำลองมาตรฐานหลายตัวแปร คือจะต้องเลือกช่วงเลขคลื่นที่เหมาะสม ซึ่งเป็นตัวแทนของข้อมูลของสารที่ต้องการวิเคราะห์ เพื่อนำไปใช้สร้างแบบจำลอง ถ้าการเลือกช่วงเลขคลื่นไม่เหมาะสม เช่น เลือกช่วงเลขคลื่นที่เป็นสารรบกวนเป็นข้อมูลไปใช้ในการสร้างแบบจำลอง จะมีผลทำให้แบบจำลองที่ได้มีข้อผิดพลาดและไม่สามารถนำไปใช้ทำนายผลการวิเคราะห์สารตัวอย่าง และในการประเมินความใช้ได้ของแบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปรสามารถพิจารณาได้จากพารามิเตอร์หลายชนิด ในการวิจัยนี้จะใช้ค่า %Variance, Standard Error of Estimation (SEE) และ Standard Error of Prediction (SEP) ในการประเมินความใช้ได้ของแบบจำลอง โดยที่ค่า %Variance ของแบบจำลองควรมีค่าใกล้เคียง 100 ส่วนค่า SEE และ SEP ซึ่งเป็นค่าความผิดพลาดที่เกิดขึ้นในการสร้างแบบจำลองและความผิดพลาดที่เกิดขึ้นจากการนำแบบจำลองไปใช้ในการทำนาย ตามลำดับ จะต้องมียกค่า ในการเลือกช่วงเลขคลื่นเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการสร้างแบบจำลอง เมื่อพิจารณาสเปกตรัมรูปที่ 4.19 จะแบ่งออกเป็น 4 ช่วง คือ 3750-2800, 2800-1760, 1760-970 และ 3700-970 cm^{-1} และเมื่อนำช่วงเลขคลื่นดังกล่าวไปสร้างแบบจำลองโดยใช้ซอฟต์แวร์ spectrum quant+ ได้ผลดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 แบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร สร้างจากสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ด้วย PCR algorithm

Model	Range (cm^{-1})	Number of factor	% Variance		SEE		SEP	
			PEH ¹	BPM ²	PEH ¹	BPM ²	PEH ¹	BPM ²
R01	3750-2800	8	99.77		2.536		4.062	
		7		94.16		3.055		4.099
R02	2800-1760	5	99.69		2.75		3.071	
		2		62.79		69.96		7.108
R03	1760-970	3	99.75		2.239		2.735	
		3		99.58		0.7543		0.9201
R04	3750-970	4	99.79		2.262		2.900	
		6		99.53		0.8510		1.168

PEH¹ = Phenylephrine hydrochloride BPM² = Brompheniramine maleate

จากตารางที่ 4.12 พบว่า แบบจำลอง R03 ซึ่งใช้ข้อมูลช่วงเลขคลื่น 1760-970 cm^{-1} เป็นแบบจำลองที่ดีที่สุด เนื่องจากมีค่า % variance สูง (% variance ของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์ มีค่าเท่ากับ 99.75 และ 99.58 ตามลำดับ) ส่วน ค่า SEE และ SEP ของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ มีค่าต่ำที่สุด จากข้อมูลดังกล่าวสรุปได้ว่าช่วงเลขคลื่นที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปสร้างแบบจำลองต่อไป คือ 1760-970 cm^{-1}

ขั้นตอนต่อไปจะทดลองเปลี่ยนพารามิเตอร์ที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองเพื่อให้ได้แบบจำลองที่ดีที่สุด โดยจะสร้างแบบจำลองที่ใช้ข้อมูลจากสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 ซึ่งได้จากการแปลงสเปกตรัมรูปที่ 4.19 เป็นสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 โดยที่การใช้ข้อมูลอนุพันธ์อันดับที่ 1 ในการสร้างแบบจำลองจะช่วยลดสัญญาณรบกวน และลดความผิดพลาดที่เกิดจาก baseline drift

ในการสร้างแบบจำลองดังกล่าว กำหนดค่าพารามิเตอร์ดังนี้

Number of standards	30
Regression algorithm	PCR
Validation sample	full cross, 10, 8, 6 respectively
Spectrum range	1760-970 cm^{-1}
Data interval	5 cm^{-1}
Analysis data	first derivative
Scaling	mean
Smooth	yes
Number of factors	1-15

การสร้างแบบจำลองจากสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 โดยใช้ช่วงเลขคลื่น 1760-970 cm^{-1} และใช้สารมาตรฐานเป็น validation samples โดยเลือกแบบสุ่ม 4 แบบ คือ 6, 8, 10, และ 30 ตัวอย่าง ได้ข้อมูลแสดงดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 แบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร สร้างจากสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 ด้วย PCR algorithm

Model	Range (cm^{-1})	Validation samples	Number of factor	% Variance		SEE		SEP	
				PEH ¹	BPM ²	PEH ¹	BPM ²	PEH ¹	BPM ²
R05	1760-970	30	2	99.75		2.249		2.566	
			8		99.76		0.6343		0.8598
R06	1760-970	10	2	99.70		2.287		2.935	
			3		99.30		1.004		1.263
R07	1760-970	8	2	99.68		2.260		3.133	
			6		99.76		0.6726		1.235
R08	1760-970	6	2	99.74		2.357		2.489	
			7		99.67		0.8005		0.8630

PEH¹ = Phenylephrine hydrochloride

BPM² = Brompheniramine maleate

จากตารางที่ 4.13 เป็นแบบจำลองที่สร้างจากสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 ที่ใช้ช่วงเลขคลื่น $1760-970\text{ cm}^{-1}$ โดยเปลี่ยนแปลงจำนวนสารมาตรฐานที่ใช้ตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง (validation samples) เป็น 30, 10, 8, และ 6 ตัวอย่าง พบว่าแบบจำลอง R05 เป็นแบบจำลองที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากมี %Variance สูง และมีค่า SEE และ SEP ต่ำ โดยแบบจำลองดังกล่าวที่มีค่า %Variance, SEE และ SEP ของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์เท่ากับ 99.75, 2.249 และ 2.566 ตามลำดับ และ %Variance, SEE และ SEP ของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตเท่ากับ 99.76, 0.6343 และ 0.8598 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบแล้วจะเป็นแบบจำลองที่ดีกว่า R03 อย่างไรก็ตามเพื่อที่จะหาแบบจำลองที่ดีที่สุด จึงทดลองสร้างแบบจำลองโดยใช้สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 2 ได้ผลดังตารางที่ 4.14 ซึ่งพบว่าแบบจำลอง R09 สร้างขึ้นโดยใช้สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 2 มีค่า SEE และ SEP ของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์มีค่าสูงขึ้น แสดงว่าแบบจำลอง R09 ทำให้เกิดความผิดพลาดมากขึ้น ดังนั้นจึงเลือก R05 เพื่อใช้ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วยแบบจำลองนี้ต่อไป

ตารางที่ 4.14 แบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร สร้างจากสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 2 ด้วย PCR algorithm

Model	Range (cm^{-1})	Validation samples	Number of factor	% Variance		SEE		SEP	
				PEH ¹	BPM ²	PEH ¹	BPM ²	PEH ¹	BPM ²
R09	1760 - 970	Full cross	6	99.79		2.314		3.015	
			3		99.41		1.072		1.485

PEH¹ = Phenylephrine hydrochloride

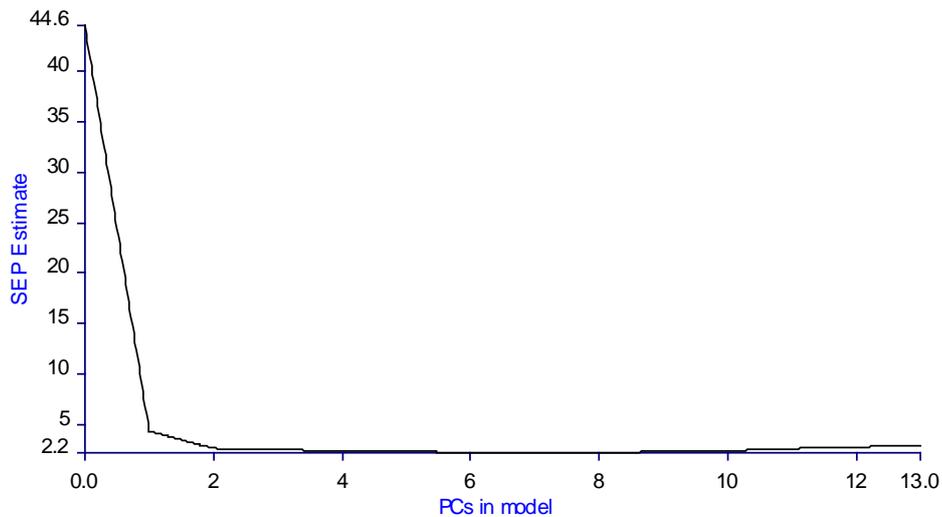
BPM² = Brompheniramine maleate

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

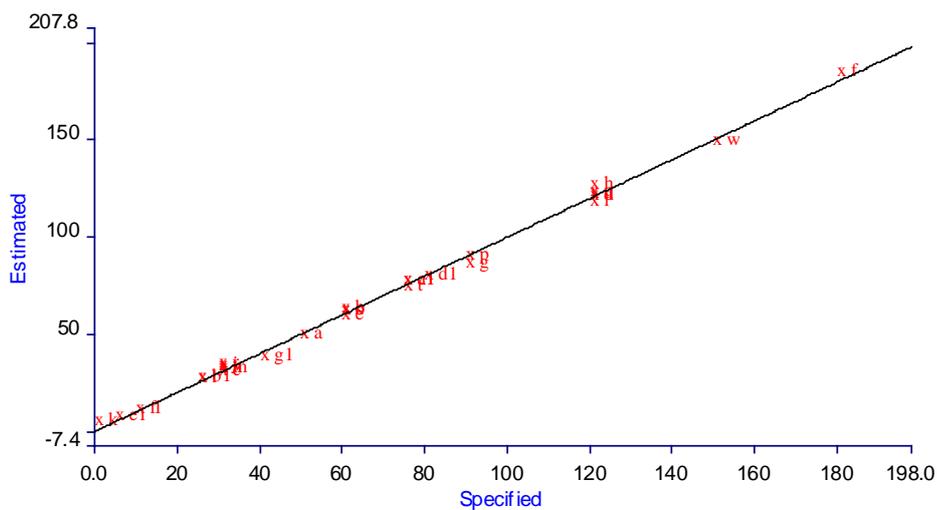
การทดสอบความเป็นเส้นตรง

การประเมินความเป็นเส้นตรงของแบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร พิจารณาได้จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารที่เตรียมขึ้นจริง (specified) กับปริมาณสารที่ประมาณค่าได้จากแบบจำลอง (estimated) ในที่นี้การสร้างแบบจำลองเทียบมาตรฐาน R05 เพื่อใช้ทำนายปริมาณของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ เลือกใช้ factor เท่ากับ 2 และเลือกใช้ factor เท่ากับ 8 สำหรับทำนายปริมาณบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต (รูปที่ 4.20 และ 4.22) โดยซอฟต์แวร์จะใช้ค่า factor ไปคำนวณและสร้างแบบจำลองขึ้นมา ในระหว่างขั้นตอนการสร้างแบบจำลอง ซอฟต์แวร์จะมีการใช้แบบจำลองทำนาย

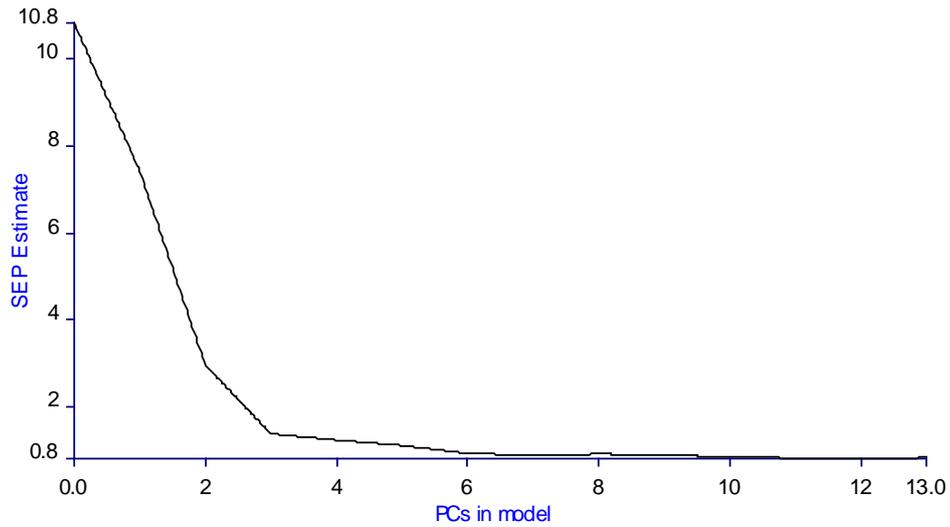
ปริมาณสารซึ่งซอฟต์แวร์จะคำนวณค่าความคลาดเคลื่อนของการทำนายผล (SEP) เปรียบเทียบกับปริมาณสารที่คำนวณได้จากแบบจำลอง ถ้าแบบจำลองที่ถูกสร้างขึ้นมา สามารถทำนายปริมาณสารได้ใกล้เคียงกับปริมาณสารที่มีอยู่จริง เมื่อนำข้อมูลมาสร้างกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารที่มีอยู่จริงกับปริมาณที่ประมาณค่าได้จากแบบจำลอง จะได้กราฟเป็นเส้นตรงดังรูปที่ 4.21 และ 4.23 นอกจากนี้ความเป็นเส้นตรงของแบบจำลองยังสามารถพิจารณาได้จากค่า % Variance ซึ่งแบบจำลอง R05 ที่ใช้ทำนายปริมาณของเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์และบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต มีค่า % Variance เท่ากับ 99.75 และ 99.76 ตามลำดับ



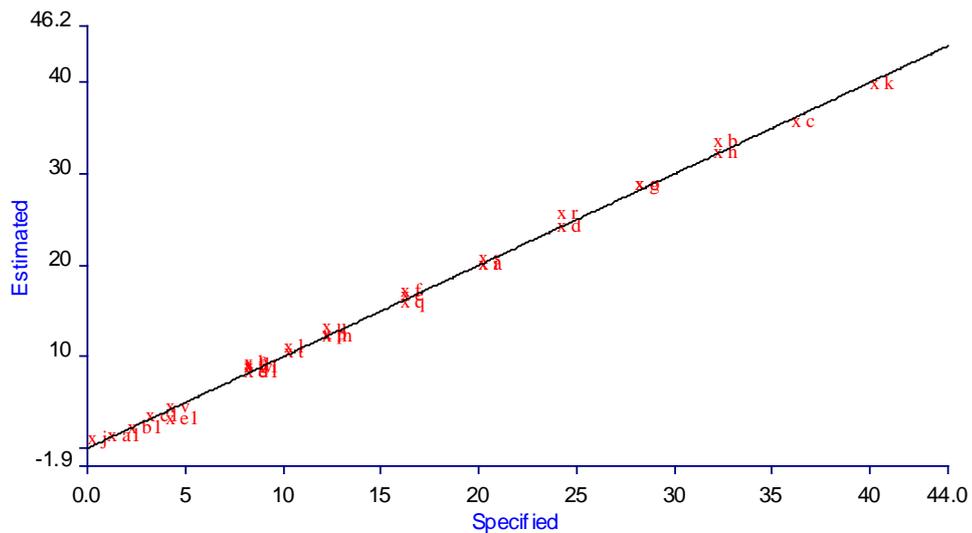
รูปที่ 4.20 SEP และ จำนวน principal components (PC) หรือ factors ของแบบจำลองเทียบมาตรฐาน R05 ของเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์



รูปที่ 4.21 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ที่เตรียมขึ้นกับปริมาณที่ประมาณค่าได้จากแบบจำลองเทียบมาตรฐาน R05



รูปที่ 4.22 SEP และ จำนวน principal components (PC) หรือ factors ของแบบจำลองเทียบมาตรฐาน R05 ของบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต



รูปที่ 4.23 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตที่เตรียมขึ้นกับปริมาณที่ประมาณค่าได้จากแบบจำลองเทียบมาตรฐาน R05

การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง

ทำโดยวิธีการเติมสารมาตรฐาน โดยการเติมสารละลายมาตรฐานผสมของบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน 3 ระดับคือ 80, 100, 120 เปอร์เซ็นต์ที่ระบุบนฉลากลงในสารละลายตัวอย่างยาที่เตรียมให้มีความเข้มข้นคงที่เปรียบเทียบกับสารละลายตัวอย่างยาที่ไม่ได้เติมสารละลายมาตรฐาน แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืนได้ผลลัพธ์ดังตารางที่ 4.15 ในการประเมินความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ของแบบจำลองเทียบมาตรฐาน R05 พบว่า

เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 109.0 ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 110.0 ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้เช่นเดียวกัน และในการประเมินความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์นี้ พิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ จากข้อมูลตารางที่ 4.15 ค่าเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต 9 ตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 4.3 และเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์ 9 ตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 2.9 ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นจึงไม่ใช้แบบจำลองนี้ไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารในตัวอย่างยาเม็ด

ตารางที่ 4.15 เปอร์เซ็นต์การกลับคืน วิเคราะห์โดยใช้แบบจำลองเทียบมาตรฐาน R05

% L.A.	บรอมเฟนิรามีน มาลีเอต			เฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์		
	ปริมาณที่เติม (mg/mL)	ปริมาณที่พบ (mg/mL)	% การ กลับคืน	ปริมาณที่เติม (mg/mL)	ปริมาณที่พบ (mg/mL)	% การ กลับคืน
80	32	33	103.1	80	88	110.0
80	32	34	106.3	80	86	107.5
80	32	34	106.3	80	87	108.8
100	40	42	105.0	100	112	112.0
100	40	43	107.5	100	114	114.0
100	40	46	115.0	100	114	114.0
120	48	54	112.5	120	126	105.0
120	48	56	116.7	120	128	106.7
120	48	52	108.3	120	134	111.7
ค่าเฉลี่ย			109.0			110.0
S.D.			4.7			3.2
%RSD			4.3			2.9

2.1.2 การสร้างแบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปรด้วย PLS-1 algorithm

ในการสร้างแบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร กำหนดพารามิเตอร์เพื่อใช้สร้างแบบจำลองดังนี้

Number of standards	30
Number of properties	2
Regression algorithm	PLS-1
Validation sample	full cross validation
Spectrum range	3750-970 cm^{-1}
Interval	1 cm^{-1}
Analysis data	absorbance
Scaling	mean
Smooth	yes
Baseline correction	offset
Number of factors	1-15

ในการเลือกช่วงเลขคลื่นเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการสร้างแบบจำลองเทียบมาตรฐาน เมื่อพิจารณาสเปกตรัมรูปที่ 4.19 จะแบ่งออกเป็น 4 ช่วง คือ 3750-2800, 2800-1760, 1760-970 และ 3700-970 cm^{-1} เมื่อนำช่วงเลขคลื่นดังกล่าวไปสร้างแบบจำลองโดยใช้ซอฟต์แวร์ spectrum quant+ ได้ผลดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 แบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร สร้างจากสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ด้วย PLS-1 algorithm

Model	Range (cm^{-1})	Number of factor	% Variance		SEE		SEP	
			PEH ¹	BPM ²	PEH ¹	BPM ²	PEH ¹	BPM ²
S01	3750-2800	4	99.49		3.494		4.194	
		8		99.13		1.209		2.400
S02	2800-1760	3	99.62		2.950		3.550	
		3		77.57		5.507		6.980
S03	1760-970	3	99.78		2.253		2.407	
		3		99.67		0.6685		0.8265
S04	3750-970	3	99.76		2.330		3.038	
		4		99.32		0.9812		1.685

PEH¹ = Phenylephrine hydrochloride BPM² = Brompheniramine maleate

ข้อมูลจากตารางที่ 4.16 พบว่าแบบจำลอง S03 ซึ่งใช้ข้อมูลช่วงเลขคลื่น 1760-970 cm^{-1} เป็นแบบจำลองที่ดีที่สุด เนื่องจากมีค่า % variance สูงและ SEE และ SEP ของบรอมเฟนิรามีนมาลี

เอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์มีค่าต่ำที่สุด จากข้อมูลดังกล่าวสรุปได้ว่าช่วงเลขคลื่นที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปสร้างแบบจำลองคือ $1760-970\text{ cm}^{-1}$ โดยทฤษฎีการสร้างแบบจำลองโดยใช้สเปกตรัมอนุพันธ์จะช่วยลดสัญญาณรบกวนและลดความผิดพลาดที่เกิดจาก baseline drift ดังนั้นเพื่อให้ได้แบบจำลองที่ดีขึ้น ขั้นตอนต่อไปจึงแปลงสเปกตรัมรูปที่ 4.19 เป็นสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 และ 2 แล้วนำไปสร้างแบบจำลองได้ผลลัพธ์ดังตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.17 แบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร สร้างจากสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 และ 2 ด้วย PLS-1 algorithm

Model	Derivative	No. of factor	% Variance		SEE	SEP
			PEH ¹	BPM ²		
S05	First	2	99.78		2.213	2.505
		5		99.64	0.7280	1.065
S06	Second	4	99.81		2.257	2.686
		9		99.72	0.6957	1.470

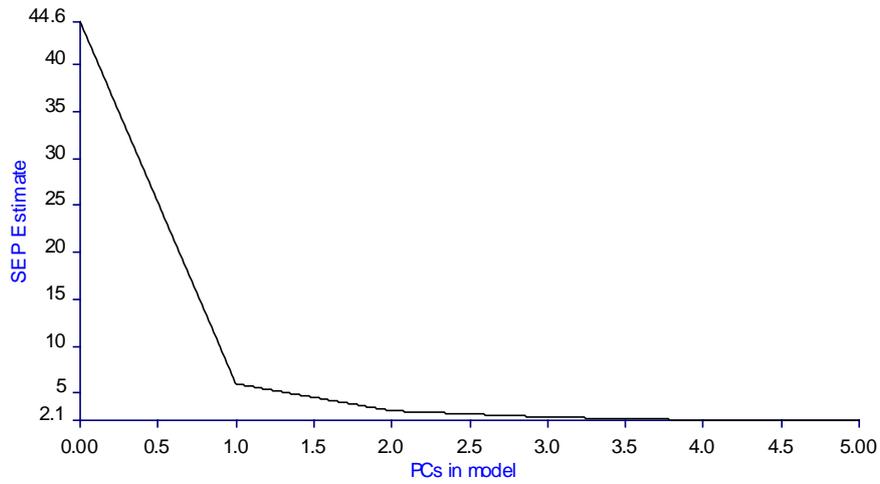
PEH¹ = Phenylephrine hydrochloride BPM² = Brompheniramine maleate

อย่างไรก็ตามจากตารางที่ 4.17 พบว่าแบบจำลองเทียบมาตรฐาน S05 และ S06 มีค่า SEE และ SEP ของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ และบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต มีค่าสูงกว่าแบบจำลอง S03 แสดงว่าแบบจำลองดังกล่าวมีค่าความคลาดเคลื่อนสูงชัน ดังนั้นจึงเลือกแบบจำลองเทียบมาตรฐาน S03 เพื่อใช้ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วยแบบจำลองนี้ต่อไป

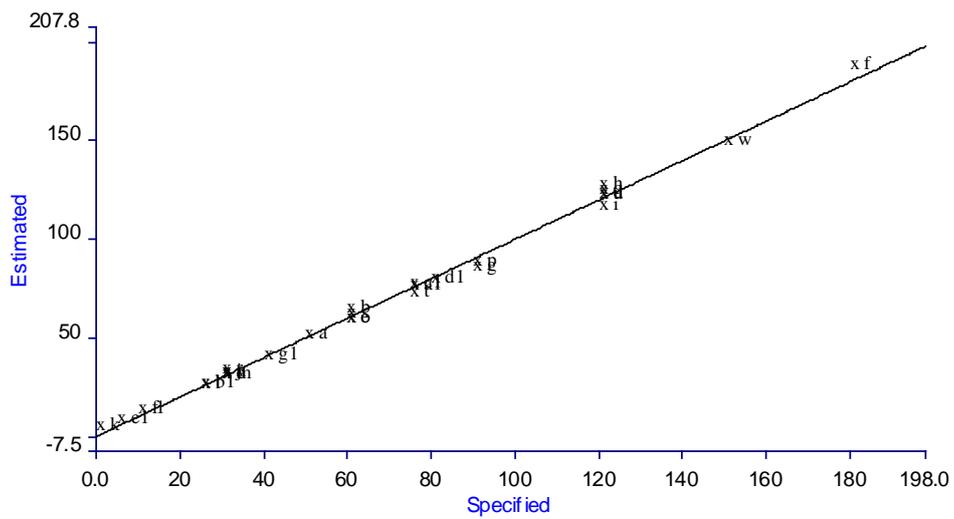
การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบความเป็นเส้นตรง

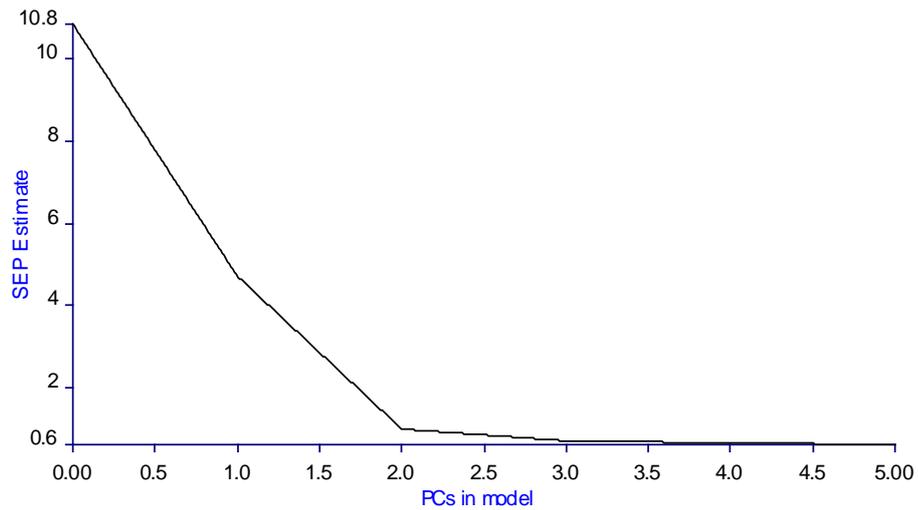
การประเมินความเป็นเส้นตรงของแบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร พิจารณาได้จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารที่เตรียมขึ้นจริงกับปริมาณสารที่ประมาณค่าได้จากแบบจำลอง ในที่นี้การสร้างแบบจำลองเทียบมาตรฐาน S03 เพื่อใช้ทำนายปริมาณของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ เลือกใช้ factor เท่ากับ 3 และเลือกใช้ factor เท่ากับ 3 สำหรับทำนายปริมาณบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต (รูปที่ 4.24 และ 4.26) เมื่อนำข้อมูลมาสร้างกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารที่มีอยู่จริงกับปริมาณที่ประมาณค่าได้จากแบบจำลอง จะได้กราฟเป็นเส้นตรงดังรูปที่ 4.25 และ 4.27 นอกจากนี้ความเป็นเส้นตรงของแบบจำลองยังสามารถพิจารณาได้จากค่า % Variance ซึ่งแบบจำลอง S03 ที่ใช้ทำนายปริมาณของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์และบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต มีค่า % Variance เท่ากับ 99.78 และ 99.67 ตามลำดับ



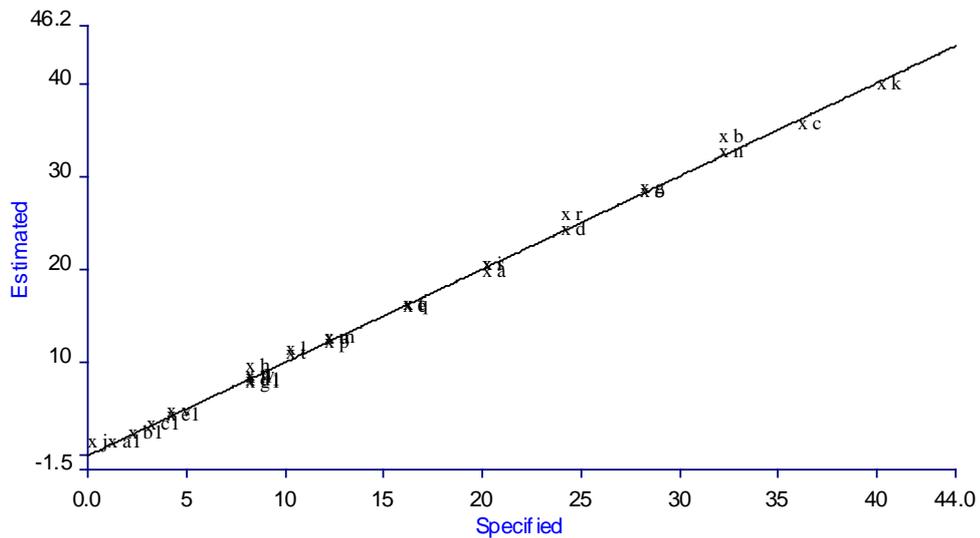
รูปที่ 4.24 SEP และจำนวน principal components (PC) หรือ factors ของแบบจำลองเทียบมาตรฐาน S03 ของเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์



รูปที่ 4.25 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์ที่เตรียมขึ้นกับปริมาณที่ประมาณค่าได้ด้วยแบบจำลองเทียบมาตรฐาน S03



รูปที่ 4.26 SEP และ จำนวน principal components (PC) หรือ factors ของแบบจำลองเทียบมาตรฐาน S03 ของบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต



รูปที่ 4.27 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตที่เตรียมขึ้นกับปริมาณที่ประมาณค่าได้ด้วยแบบจำลองเทียบมาตรฐาน S03

การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง

ทำโดยวิธีการเติมสารมาตรฐาน โดยการเติมสารละลายมาตรฐานผสมของบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน 3 ระดับคือ 80, 100, 120 เปอร์เซ็นต์ที่ระบุบนฉลากลงในสารละลายตัวอย่างยาที่เตรียมให้มีความเข้มข้นคงที่ เปรียบเทียบกับสารละลายตัวอย่างยาที่ไม่ได้เติมสายละลายมาตรฐาน แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืนได้ผลลัพธ์ดังตารางที่ 4.18 ในการประเมินความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ของแบบจำลองเทียบมาตรฐาน S03 พบว่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 121.1 ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 115.7 ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์

ที่ยอมรับได้เช่นเดียวกัน ในการประเมินความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์นี้ พิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ จากข้อมูลตาราง 4.18 ค่าเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ 9 ตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 2.8 และ 3.0 ตามลำดับ ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นแบบจำลองนี้จึงไม่เหมาะสมในการนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารในตัวอย่างยาเม็ด

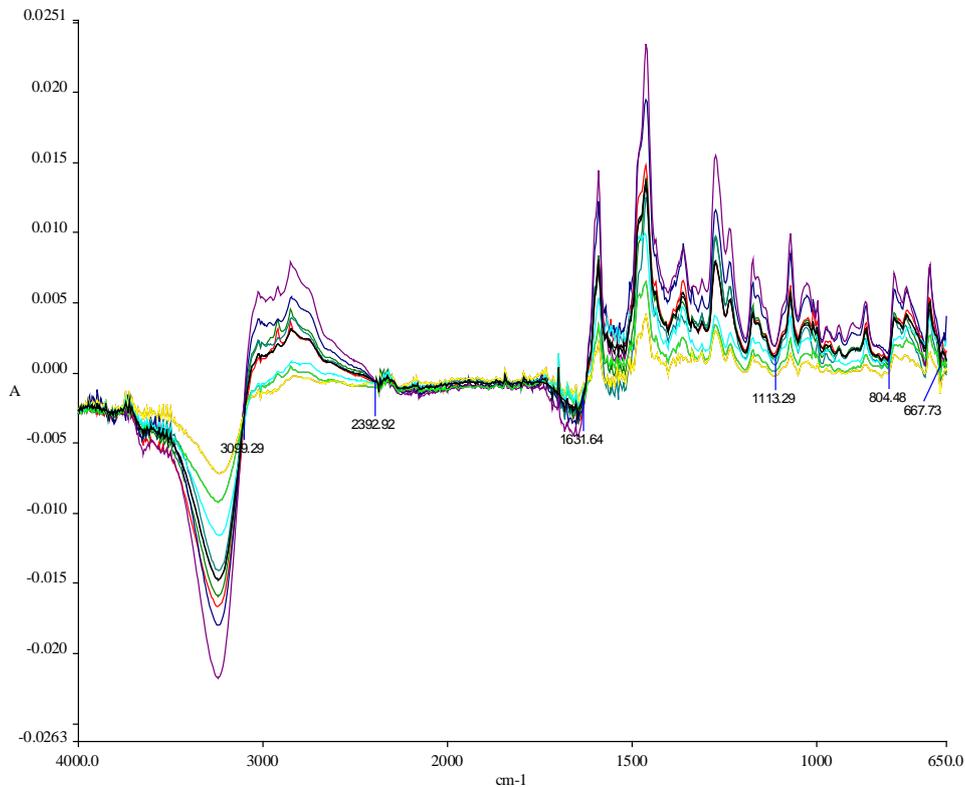
ตารางที่ 4.18 เปอร์เซนต์การกลับคืน วิเคราะห์โดยใช้แบบจำลองเทียบมาตรฐาน S03

% L.A.	บรอมเฟนิรามีน มาลีเอต			เฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์		
	ปริมาณที่เติม (mg/mL)	ปริมาณที่พบ (mg/mL)	% การคืน กลับ	ปริมาณที่เติม (mg/mL)	ปริมาณที่พบ (mg/mL)	% การคืน กลับ
80	32	38	118.8	80	88	110.0
80	32	40	125.0	80	96	120.0
80	32	39	121.9	80	92	115.0
100	40	48	120.0	100	119	119.0
100	40	50	125.0	100	120	120.0
100	40	50	125.0	100	115	115.0
120	48	56	116.7	120	136	113.3
120	48	58	120.8	120	135	112.5
120	48	56	116.7	120	140	116.7
ค่าเฉลี่ย			121.1			115.7
S.D.			3.4			3.5
%RSD			2.8			3.0

2.2 การสร้างแบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร โดยใช้สเปกตรัมของผลต่างค่าการดูดกลืนแสง

ในการสร้างแบบจำลองเทียบมาตรฐานที่กล่าวมาข้างต้น ใช้สเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานในตัวทำละลายเป็นน้ำ (รูปที่ 4.19) ซึ่งวัดด้วยเทคนิคการสะท้อนแบบ UATR และใช้อากาศเป็น background ซึ่งโมเลกุลของน้ำจะดูดกลืนแสงอินฟราเรดในช่วงเลขคลื่นดังกล่าวด้วย (รูปที่ 4.16) การสร้างแบบจำลองจากสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าวจึงอาจเกิดความผิดพลาดขึ้น ดังนั้นการนำสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานในน้ำหักออกจากสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของน้ำจะได้สเปกตรัมของผลต่างค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน

ดังรูปที่ 4.28 ซึ่งสามารถนำสเปกตรัมดังกล่าวไปใช้สร้างแบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร โดยมีขั้นตอนการสร้างแบบจำลองเหมือนกับการสร้างแบบจำลองที่ผ่านมา แตกต่างกันที่ข้อมูลที่ใช้สร้างแบบจำลองในที่นี้ได้จากสเปกตรัมผลต่างค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานผสม



รูปที่ 4.28 สเปกตรัมผลต่างค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานผสมของบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต และเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์ในน้ำและน้ำ

2.2.1 การสร้างแบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปรด้วย PCR algorithm

ในการสร้างแบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร จะต้องเลือกช่วงเลขคลื่นที่เป็นตัวแทนของสารที่ต้องการวิเคราะห์เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการนำไปใช้สร้างแบบจำลอง เมื่อพิจารณาจากสเปกตรัมรูปที่ 4.28 จะแบ่งออกเป็น 5 ช่วง คือ 3100-660, 3100-2390, 1630-800 และ 1630-660 และ 3100-2390 และ 1630-800 cm^{-1} เมื่อนำช่วงเลขคลื่นดังกล่าวไปสร้างแบบจำลองโดยใช้ซอฟต์แวร์ spectrum quant+ ได้ผลดังตารางที่ 4.19 เมื่อพิจารณาข้อมูลจากตารางดังกล่าวพบว่าแบบจำลอง RD04 ซึ่งใช้ข้อมูลช่วงเลขคลื่น 1630-660 cm^{-1} เป็นแบบจำลองที่ดีที่สุด เนื่องจากมีค่า % variance สูง และ SEE และ SEP ของบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตและเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์ มีค่าต่ำที่สุด จากข้อมูลดังกล่าวสรุปได้ว่า ช่วงเลขคลื่นที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปสร้างแบบจำลองคือ 1630-660 cm^{-1} ขั้นตอนต่อไปจะสร้างแบบจำลองโดยใช้สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่

1 และ 2 โดยการแปลงสเปกตรัมรูปที่ 4.28 เป็นสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 และ 2 ได้ผลดังตารางที่ 4.20

ตารางที่ 4.19 แบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร สร้างจากสเปกตรัมผลต่างค่าการดูดกลืนแสงด้วย PCR algorithm

Model	Range (cm ⁻¹)	Number of factor	% Variance		SEE		SEP	
			PEH ¹	BPM ²	PEH ¹	BPM ²	PEH ¹	BPM ²
RD01	3100-660	5	99.79		2.283		2.527	
		6		99.67		0.7049		1.188
RD02	3100-2390	5	99.81		2.166		2.474	
		6		99.41		0.9528		1.443
RD03	1630-800	2	99.71		2.543		2.811	
		4		99.61		0.7421		0.8704
RD04	1630-660	4	99.79		2.216		2.565	
		4		99.69		0.6632		0.7573
RD05	3100-2390	4	99.79		2.237		2.495	
	และ 1630-800	6		99.72		0.6499		1.003

PEH¹ = Phenylephrine hydrochloride BPM² = Brompheniramine maleate

ตารางที่ 4.20 แบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร สร้างจากสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 และ 2 ของสเปกตรัมผลต่างค่าการดูดกลืนแสง ด้วย PCR algorithm

Model	Derivative	Number of factor	% Variance		SEE		SEP	
			PEH ¹	BPM ²	PEH ¹	BPM ²	PEH ¹	BPM ²
RD06	First	2	99.74		2.386		2.599	
		3		99.26		1.000		0.9589
RD07	Second	5	99.77		2.367		3.020	
		7		97.27		2.090		2.788

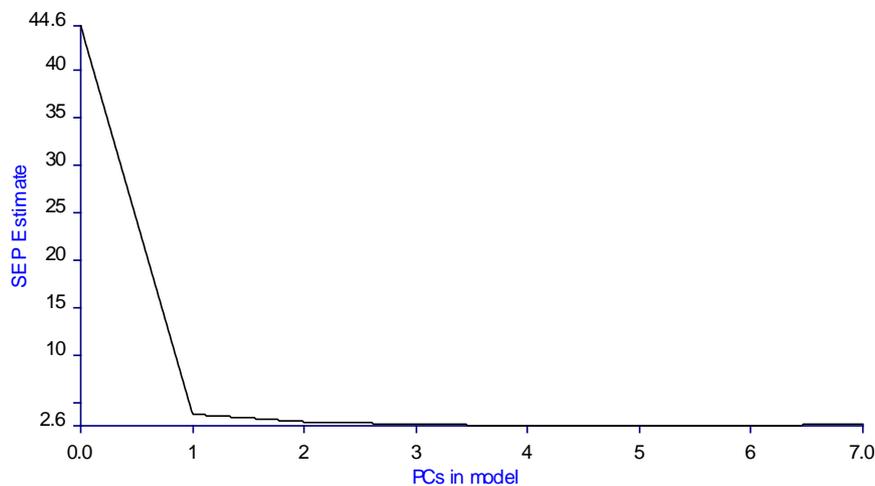
PEH¹ = Phenylephrine hydrochloride BPM² = Brompheniramine maleate

จากตารางที่ 4.20 พบว่าแบบจำลองเทียบมาตรฐาน ที่ได้จากสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 และอันดับที่ 2 มีค่า SEE และ SEP ของเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต มีค่าสูงกว่าแบบจำลอง RD04 แสดงว่าแบบจำลองดังกล่าวมีความคลาดเคลื่อนสูงขึ้น ดังนั้นจึงเลือกแบบจำลอง RD04 เพื่อใช้ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ต่อไป

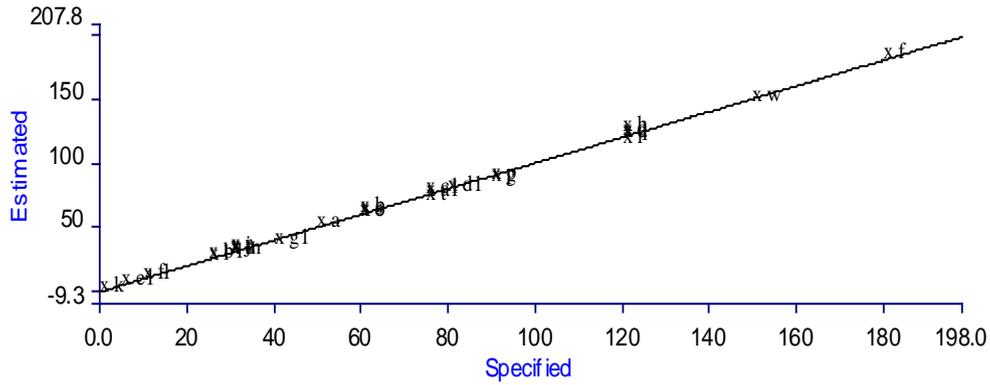
การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบความเป็นเส้นตรง

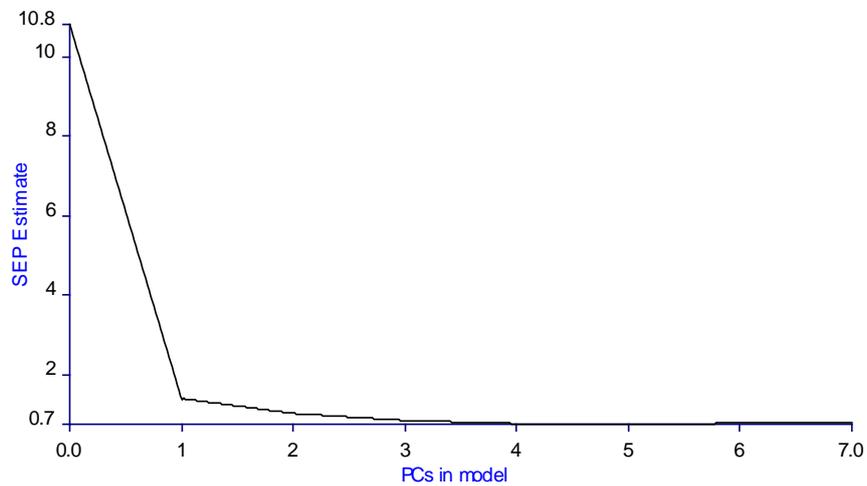
การประเมินความเป็นเส้นตรงของแบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร พิจารณาได้จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารที่เตรียมขึ้นจริงกับปริมาณสารที่ประมาณค่าได้จากแบบจำลอง ในที่นี้การสร้างแบบจำลองเทียบมาตรฐาน RD04 เพื่อใช้ทำนายปริมาณของเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์ เลือกใช้ factor เท่ากับ 4 และเลือกใช้ factor เท่ากับ 4 สำหรับทำนายปริมาณบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต (รูปที่ 4.29 และ 4.31) เมื่อนำข้อมูลมาสร้างกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารที่มีอยู่จริงกับปริมาณที่ประมาณค่าได้จากแบบจำลอง จะได้กราฟเป็นเส้นตรงดังรูปที่ 4.30 และ 4.32 นอกจากนี้ความเป็นเส้นตรงของแบบจำลองยังสามารถพิจารณาได้จากค่า % Variance ซึ่งแบบจำลอง RD04 ที่ใช้ทำนายปริมาณของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์และบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต มีค่า % Variance เท่ากับ 99.79 และ 99.69 ตามลำดับ



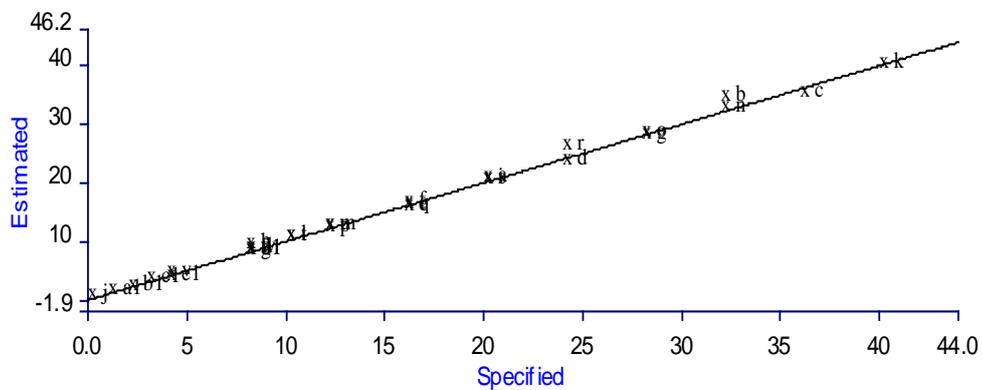
รูปที่ 4.29 SEP และ จำนวน principal components (PC) หรือ factors ของแบบจำลองเทียบมาตรฐาน RD04 ของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์



รูปที่ 4.30 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลพรีนไฮโดรคลอไรด์ที่เตรียมขึ้นกับปริมาณที่ประมาณค่าได้ด้วยแบบจำลองเทียบมาตรฐาน RD04



รูปที่ 4.31 SEP และ จำนวน principal components (PC) หรือ factors ของแบบจำลองเทียบมาตรฐาน RD04 ของบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต



รูปที่ 4.32 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตที่เตรียมขึ้นกับปริมาณที่ประมาณค่าได้ด้วยแบบจำลองเทียบมาตรฐาน RD04

การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง

ทำโดยวิธีการเติมสารมาตรฐาน โดยการเติมสารละลายมาตรฐานผสมของบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน 3 ระดับคือ 80, 100, 120 เปอร์เซ็นต์ที่ระบุบนฉลากลงในสารละลายตัวอย่างยาที่เตรียมให้มีความเข้มข้นคงที่เปรียบเทียบกับสารละลายตัวอย่างยาที่ไม่ได้เติมสายละลายมาตรฐาน แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืนได้ผลลัพธ์ดังตารางที่ 4.21 ในการประเมินความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ของแบบจำลองเทียบมาตรฐาน RD04 พบว่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 100.0 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 112.7 ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้เช่นเดียวกัน ในการประเมินความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์นี้ พิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ จากข้อมูลตาราง 4.21 ค่าเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ 9 ตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 5.4 และ 2.5 ตามลำดับ ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นแบบจำลองนี้จึงไม่เหมาะสมในการนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารในตัวอย่างยาเม็ด

ตารางที่ 4.21 เปอร์เซ็นต์การกลับคืน วิเคราะห์โดยใช้แบบจำลองเทียบมาตรฐาน RD04

% L.A.	บรอมเฟนิรามีน มาลีเอต			เฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์		
	ปริมาณที่เติม (mg/mL)	ปริมาณที่พบ (mg/mL)	% การ กลับคืน	ปริมาณที่เติม (mg/mL)	ปริมาณที่พบ (mg/mL)	% การ กลับคืน
80	32	36	112.5	80	92	115
80	32	34	106.3	80	90	112.5
80	32	38	118.8	80	92	115
100	40	46	115.0	100	108	108
100	40	44	110.0	100	110	110
100	40	46	115.0	100	116	116
120	48	48	100.0	120	135	112.5
120	48	52	108.3	120	132	110
120	48	50	104.2	120	138	115
ค่าเฉลี่ย			100.0			112.7
S.D.			6.0			2.8
%RSD			5.4			2.5

2.2.2 การสร้างแบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปรด้วย PLS-1 algorithm

ในการสร้างแบบจำลองจะต้องเลือกช่วงเลขคลื่น เป็นตัวแทนของสารที่ต้องการวิเคราะห์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการนำไปใช้สร้างแบบจำลอง เมื่อพิจารณาจากสเปกตรัมรูป 4.28 จะแบ่งออกเป็น 5 ช่วง คือ 3100-660, 3100-2390, 1630-800 และ 1630-660 และ 3100-2390 และ 1630-800 cm^{-1} เมื่อนำช่วงเลขคลื่นดังกล่าวไปสร้างแบบจำลองโดยใช้ซอฟต์แวร์ spectrum quant+ ได้ผลดังตารางที่ 4.22 เมื่อพิจารณาข้อมูลจากตารางดังกล่าวพบว่า แบบจำลอง SD03 ซึ่งใช้ข้อมูลช่วงเลขคลื่น 1630-800 cm^{-1} เป็นแบบจำลองที่ดีที่สุด เนื่องจากมีค่า % variance สูง และ SEE และ SEP ของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์มีค่าต่ำที่สุด จากข้อมูลดังกล่าวสรุปได้ว่า ช่วงเลขคลื่นที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปสร้างแบบจำลองคือ 1630-800 cm^{-1} หลังจากนั้นจะสร้างแบบจำลองโดยใช้สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 และ 2 โดยการแปลงสเปกตรัมรูปที่ 4.28 เป็นสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 และ 2 ได้ผลดังตารางที่ 4.23

ตารางที่ 4.22 แบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร สร้างจากสเปกตรัมผลต่างค่าการดูดกลืนแสงด้วย PLS-1 algorithm

Model	Range (cm^{-1})	Number of factor	% Variance		SEE		SEP	
			PEH ¹	BPM ²	PEH ¹	BPM ²	PEH ¹	BPM ²
SD01	3100-660	3	99.69		2.648		3.284	
		5		99.71		0.6525		1.352
SD02	3100-2390	5	99.84		1.964		2.214	
		6		99.39		0.9628		1.412
SD03	1630-800	2	99.71		2.323		2.440	
		4		99.69		0.6549		0.7670
SD04	1630-660	3	99.77		2.312		2.805	
		4		99.67		0.805		0.8226
SD05	3100-2390	3	99.75		2.405		2.764	
	และ 1630-800	3		99.26		0.9991		1.424

PEH¹ = Phenylephrine hydrochloride

BPM² = Brompheniramine maleate

ตารางที่ 4.23 แบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร สร้างจากสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 และ 2 ของสเปกตรัมผลต่างค่าการดูดกลืนแสง ด้วย PLS-1 algorithm

Model	Derivative	Number of factor	% Variance		SEE		SEP	
			PEH ¹	BPM ²	PEH ¹	BPM ²	PEH ¹	BPM ²
SD06	First	2	99.78		2.185		2.406	
		4		99.59		0.6505		0.6681
SD07	Second	4	99.84		1.976		2.462	
		3		99.33		1.015		1.573

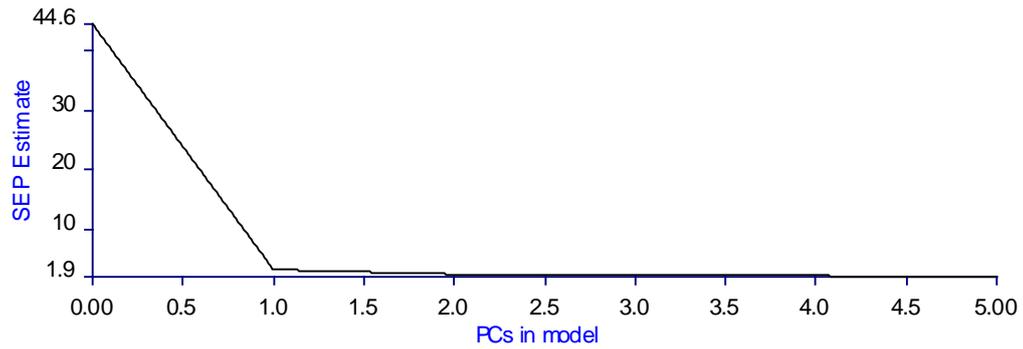
PEH¹ = Phenylephrine hydrochloride BPM² = Brompheniramine maleate

จากตารางที่ 4.23 แบบจำลอง SD06 มีค่า SEE และ SEP ของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ มีค่าต่ำลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับแบบจำลอง SD03 แสดงว่าแบบจำลองดังกล่าวมีความคลาดเคลื่อนลดลง ดังนั้นจึงเลือกแบบจำลอง SD06 เพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ต่อไป

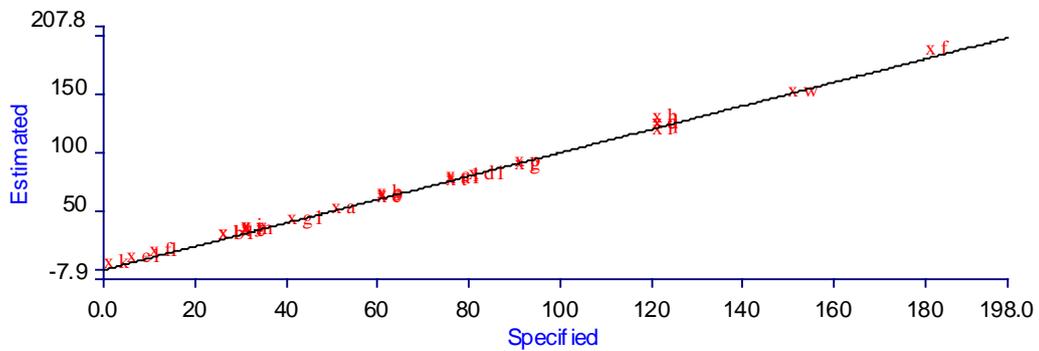
การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบความเป็นเส้นตรง

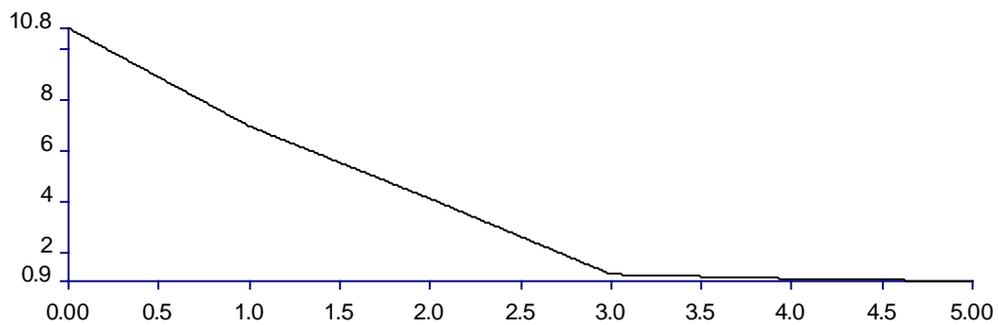
การประเมินความเป็นเส้นตรงของแบบจำลองเทียบมาตรฐานหลายตัวแปร พิจารณาได้จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารที่เตรียมขึ้นจริงกับปริมาณสารที่ประมาณค่าได้จากแบบจำลอง ในที่นี้การสร้างแบบจำลองเทียบมาตรฐาน SD06 เพื่อใช้ทำนายปริมาณของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ เลือกใช้ factor เท่ากับ 2 และเลือกใช้ factor เท่ากับ 4 สำหรับทำนายปริมาณบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต (รูปที่ 4.33 และ 4.35) เมื่อนำข้อมูลมาสร้างกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารที่มีอยู่จริงกับปริมาณที่ประมาณค่าได้จากแบบจำลอง จะได้กราฟเป็นเส้นตรงดังรูปที่ 4.34 และ 4.36 นอกจากนี้ความเป็นเส้นตรงของแบบจำลองยังสามารถพิจารณาได้จากค่า % Variance ซึ่งแบบจำลอง SD06 ที่ใช้ทำนายปริมาณของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์และบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต มีค่า % variance เท่ากับ 99.78 และ 99.59 ตามลำดับ



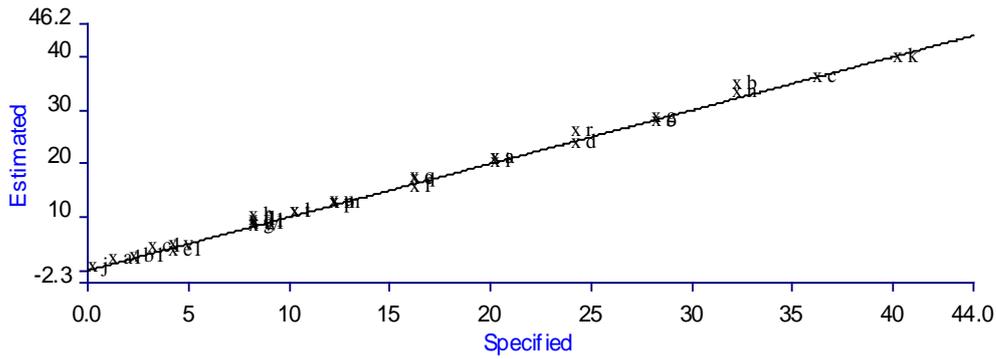
รูปที่ 4.33 SEP และ จำนวน principal components (PC) หรือ factors ของแบบจำลองเทียบมาตรฐาน SD06 ของฟีนอล์ฟทาลีน ไฮโดรคลอไรด์



รูปที่ 4.34 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอล์ฟทาลีน ไฮโดรคลอไรด์ที่เตรียมขึ้นกับปริมาณที่ประมาณค่าได้ด้วยแบบจำลองเทียบมาตรฐาน SD06



รูปที่ 4.35 SEP และ จำนวน principal components (PC) หรือ factors ของแบบจำลองเทียบมาตรฐาน SD06 ของบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต



รูปที่ 4.36 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตที่เตรียมขึ้นกับปริมาณที่ประมาณค่าได้ด้วยแบบจำลองเทียบมาตรฐาน SD06

การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง

ทำโดยวิธีการเติมสารมาตรฐาน โดยการเติมสารละลายมาตรฐานผสมของบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน 3 ระดับคือ 80, 100, 120 เปอร์เซ็นต์ที่ระบุบนฉลากลงในสารละลายตัวอย่างยาที่เตรียมให้มีความเข้มข้นคงที่เปรียบเทียบกับสารละลายตัวอย่างยาที่ไม่ได้เติมสารละลายมาตรฐาน แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืนได้ผลลัพธ์ดังตารางที่ 4.24 ในการประเมินความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ของแบบจำลองเทียบมาตรฐาน SD06 พบว่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 104.6 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 108.5 ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้เช่นเดียวกัน ในการประเมินความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์นี้ พิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ จากข้อมูลตาราง 4.21 ค่าเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ 9 ตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 2.8 และ 3.0 ตามลำดับ ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ อย่างไรก็ตามแบบจำลอง SD06 ให้ผลการตรวจสอบความถูกต้องดีที่สุดจึงนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารในตัวอย่างยาเม็ด Nasotapp tablets[®] ได้ผลลัพธ์ดังตารางที่ 4.25

ตารางที่ 4.24 เปอร์เซ็นต์การกลับคืน วิเคราะห์โดยใช้แบบจำลองเทียบมาตรฐาน SD06

% L.A.	บรอมเฟนิรามีน มาลีเอต			เฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์		
	ปริมาณที่เติม (mg/mL)	ปริมาณที่พบ (mg/mL)	% การ กลับคืน	ปริมาณที่เติม (mg/mL)	ปริมาณที่พบ (mg/mL)	% การ กลับคืน
80	32	34	106.3	80	88	110.0
80	32	32	100.0	80	90	112.5
80	32	34	106.3	80	86	107.5
100	40	42	105.0	100	104	104.0
100	40	40	100.0	100	113	113.0
100	40	43	107.5	100	109	109.0
120	48	52	108.3	120	125	104.2
120	48	50	104.2	120	132	110.0
120	48	50	104.2	120	128	106.7
ค่าเฉลี่ย			104.6			108.5
S.D.			3.0			3.2
%RSD			2.8			3.0

ตารางที่ 4.25 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ บรอมเฟนิรามีน มาลีเอตและ เฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์
ในยาเม็ดโดยใช้แบบจำลองเทียบมาตรฐาน SD06

ตัวอย่างยา	Nasotapp tablets [®]			
	บรอมเฟนิรามีน มาลีเอต		เฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์	
	น้ำหนัก/เม็ด (มิลลิกรัม)	% L.A.	น้ำหนัก/เม็ด (มิลลิกรัม)	% L.A.
1	4.22	105.5	11.22	112.2
2	4.38	109.5	11.86	118.6
3	4.54	113.5	10.84	108.4
ค่าเฉลี่ย	4.38	109.5	11.31	113.1
% RSD.		3.65		4.56

จากผลการวิเคราะห์พบว่าในยา 1 เม็ดตรวจพบปริมาณบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต 4.38 มิลลิกรัมหรือเทียบเท่า 109.5 % ของปริมาณที่ระบุบนฉลาก และ พบเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์

11.31 มิลลิกรัม หรือเทียบเท่ากับ 113.1 % ของปริมาณที่ระบุบนฉลาก โดยมีความเที่ยงเท่ากับ 3.65 และ 4.56 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าเกณฑ์ อาจเกิดเนื่องจากมีสารรบกวนซึ่งสามารถดูดกลืนแสงอินฟราเรดผสมอยู่ในตัวอย่างยาเม็ด

ค. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยวิธีรังสีเลขฉิวบางประสิทธิภาพสูง

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

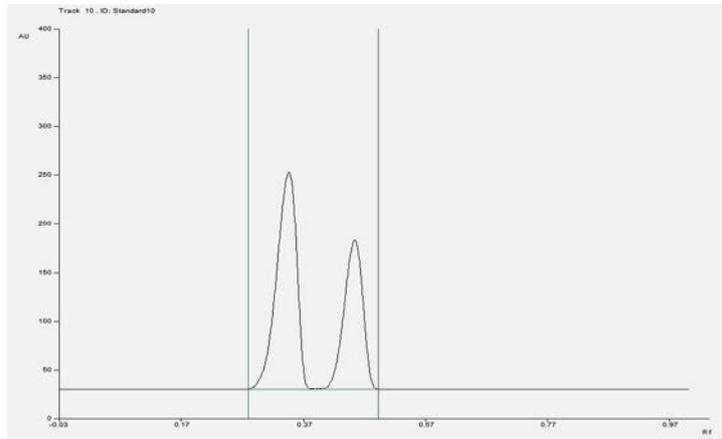
จากการทดสอบเพื่อดูการแยกของตัวอย่างทั้ง 2 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมมีดังนี้

Stationary phase:	HPTLC plates silica gel 60 F ₂₅₄ 20.0 x 20.0 cm
Mobile phase:	Methanol : Strong ammonia = 100 : 1.5
Developing chamber:	Chamber saturation (pre-condition 1 hr.)
Application volume:	1 – 5 μ L
Development:	16 cm
Detection:	CAMAG TLC Scanner 3
Lamp:	Deuterium
Wavelength:	263 nm
Slit dimensions:	4.00 x 0.45 mm, Micro
Measurement mode:	Absorption

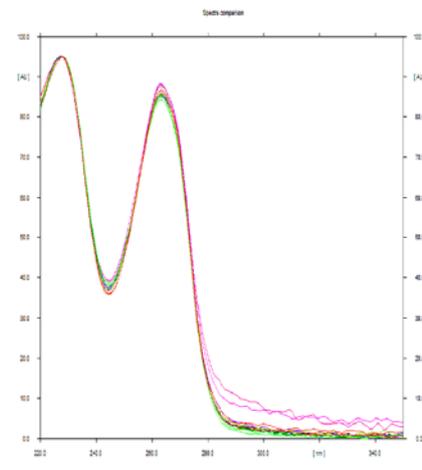
2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Specificity or Selectivity)

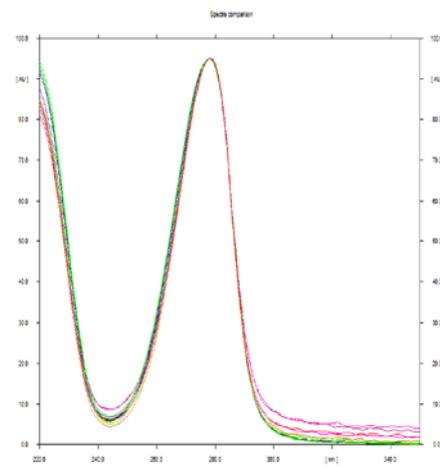
จากโครมาโตแกรมรูปที่ 4.37 พบว่าพีกของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต และเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ สามารถแยกออกจากกันได้ ซึ่งเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์มีค่า R_f เท่ากับ 0.32 และบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต มีค่า R_f เท่ากับ 0.43 และจากสเปกตรัมอัลตราไวโอเลตรูปที่ 4.38 และ 4.39 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต และเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ อยู่ที่ความยาวคลื่น 263 นาโนเมตร และ 278 นาโนเมตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.37 โครมาโตแกรม แสดงค่า Rf ของ เฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์และบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต ที่ 0.32 และ 0.43 ตามลำดับ



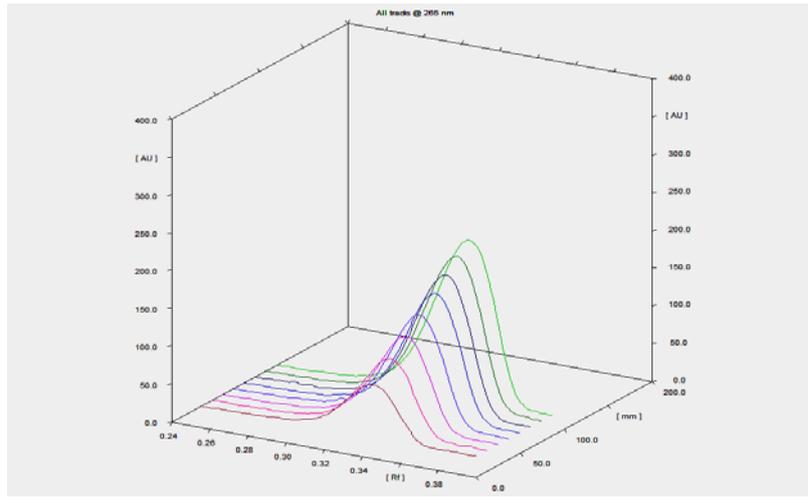
รูปที่ 4.38 อัลตราไวโอเลตสเปกตรัมของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตที่ 263 นาโนเมตร



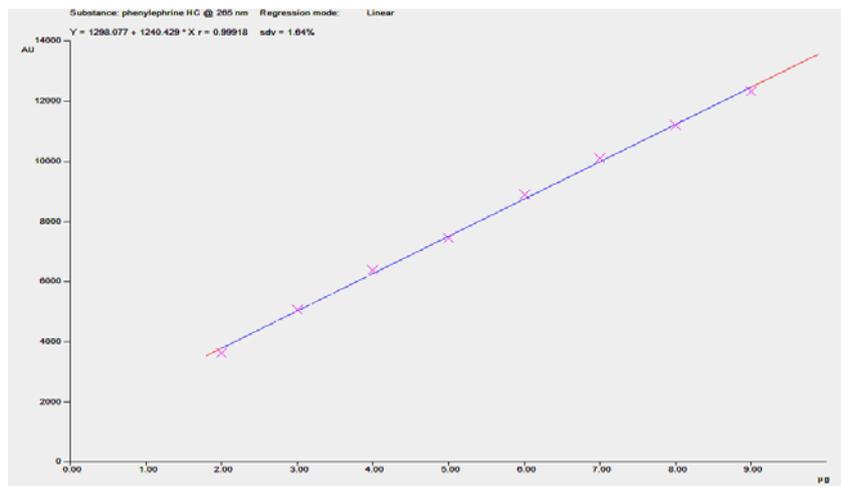
รูปที่ 4.39 อัลตราไวโอเลตสเปกตรัมของเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ที่ 278 นาโนเมตร

การทดสอบความเป็นเส้นตรง

จากการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์ ในช่วง 2-9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับพื้นที่ใต้พีค ได้สเปกตรัมดังรูปที่ 4.40 และเมื่อนำข้อมูลมาสร้างกราฟ จะได้กราฟเส้นตรงที่มีสมการ $y = 1240.43 x + 1298.08$ และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9992 ดังรูปที่ 4.41



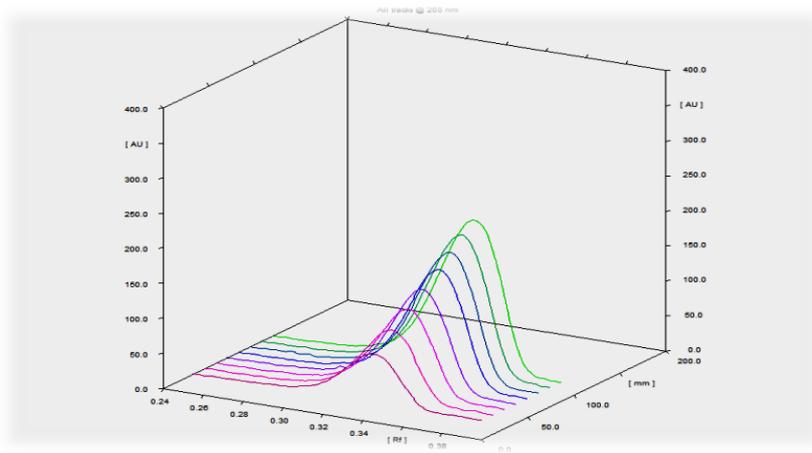
รูปที่ 4.40 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์ (ความเข้มข้น 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



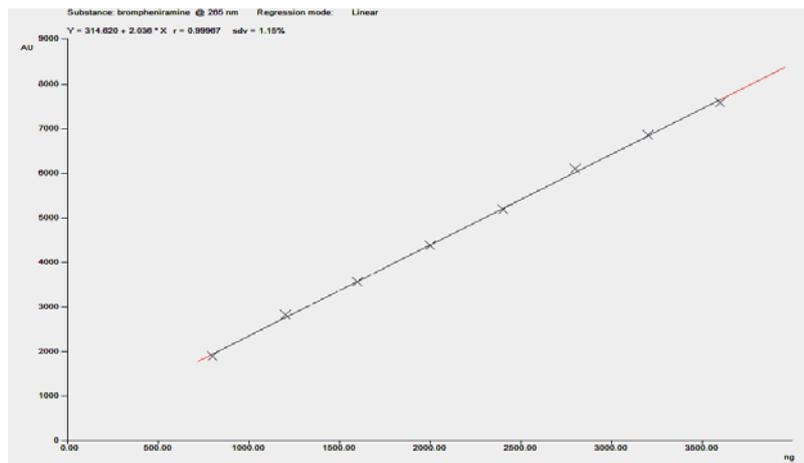
รูปที่ 4.41 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าพื้นที่ใต้พีค ของสารละลายเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร

จากการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นช่วง 0.8-3.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับพื้นที่ใต้พีคของบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต ได้สเปกตรัมดังรูปที่ 4.42 และเมื่อนำข้อมูลมาสร้างกราฟ

จะได้กราฟเส้นตรงที่มีสมการ $y = 2.036x + 314.62$ และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9997 ดังรูปที่ 4.43



รูปที่ 4.42 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 263 นาโนเมตรของสารละลายบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต (ความเข้มข้น 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2 และ 3.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)



รูปที่ 4.43 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าพื้นที่ใต้พีคของสารละลาย บรอมเฟนิรามีน มาลีเอต ที่ความยาวคลื่น 263 นาโนเมตร การทดสอบความแม่นยำ

ทำโดยวิธีการเติมสารมาตรฐาน โดยการเติมสารละลายมาตรฐานผสมของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต และเฟนิลเอพริโนไฮโดรคลอไรด์ ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน 3 ระดับ คือ 80, 100, 120 ของความเข้มข้นที่ใช้วิเคราะห์ลงในสารละลายตัวอย่างยาที่เตรียมให้มีความเข้มข้นคงที่ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืนได้ผลดังตารางที่ 4.26 จากข้อมูลตารางที่ 4.26 เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต และของเฟนิลเอพริโนไฮโดรคลอไรด์ มีค่าเฉลี่ย 100.9 และ 98.5 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

การทดสอบความเที่ยง

การทดสอบความเที่ยงจากการทดสอบความทวนซ้ำได้ โดยพิจารณาจากผลการวิเคราะห์พื้นที่ได้พัก จำนวน 6 ซ้ำ ของเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และ บรอมเฟนิรามีน มาลีเอต ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 1.33 และ 1.81 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.27 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมีความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 4.26 เปอร์เซนต์การกลับคืน วิเคราะห์โดยตรงเลขพิวบางสมรรถนะสูง

% L.A.	บรอมเฟนิรามีน มาลีเอต			เฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์		
	ปริมาณที่เติม ($\mu\text{g}/\text{band}$)	ปริมาณที่พบ ($\mu\text{g}/\text{band}$)	% การ กลับคืน	ปริมาณที่เติม ($\mu\text{g}/\text{band}$)	ปริมาณที่พบ ($\mu\text{g}/\text{band}$)	% การ กลับคืน
80	0.74	0.74	100.0	1.83	1.80	98.4
80	0.74	0.75	101.4	1.86	1.81	97.3
80	0.74	0.75	101.4	1.83	1.88	102.7
100	1.12	1.11	99.1	2.75	2.69	97.8
100	1.11	1.13	101.8	2.79	2.82	101.1
100	1.12	1.14	101.8	2.74	2.64	96.4
120	1.49	1.50	100.7	3.66	3.56	97.3
120	1.48	1.49	100.7	3.72	3.62	97.3
120	1.48	1.50	101.4	3.66	3.60	98.4
ค่าเฉลี่ย			100.9			98.5
S.D.			0.9			2.1
%RSD			0.9			2.1

ตารางที่ 4.27 เปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของพื้นที่ใต้พีค จากการทดสอบความเที่ยง

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีค	
	บรอมเฟนิรามีน มาลีเอต	เฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์
1	3019.18	4027.21
2	3092.97	4120.75
3	2921.64	3979.66
4	3010.94	4104.36
5	3000.00	4034.40
6	3010.32	4022.63
ค่าเฉลี่ย	3009.18	4048.17
SD	54.54	53.67
%RSD	1.81	1.33

3. การวิเคราะห์หาปริมาณบรอมเฟนิรามีน มาลีเอตและเฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์ ในยาเม็ด

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์โดยรังสีเอกซ์ฟลูออโรสเปกโตรสโกปีสูงที่พัฒนาขึ้นไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างยาเม็ด Nasotapp tablets[®] ได้ผลดังตารางที่ 4.28

ตารางที่ 4.28 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ บรอมเฟนิรามีน มาลีเอตและ เฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ ในยาเม็ดด้วยวิธีรังสีเอกซ์ฟลูออโรสเปกโตรสโกปีสูง

ตัวอย่างยา	Nasotapp tablets [®]			
	บรอมเฟนิรามีน มาลีเอต		เฟนิลเอพรีน ไฮโดรคลอไรด์	
	น้ำหนัก/เม็ด (มิลลิกรัม)	% L.A.	น้ำหนัก/เม็ด (มิลลิกรัม)	% L.A.
1	4.14	103.5	9.68	96.8
2	4.28	107	9.88	98.8
3	4.24	106	9.90	99.0
ค่าเฉลี่ย	4.22	105.5	9.82	98.2
% RSD.		1.71		1.24

จากผลการวิเคราะห์พบว่าในยา 1 เม็ดตรวจพบปริมาณบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต 4.22 มิลลิกรัมหรือเทียบเท่า 105.5 % ของปริมาณที่ระบุบนฉลาก และ พบเฟนิลเอพรีนไฮโดรคลอไรด์ 9.82 มิลลิกรัม หรือเทียบเท่ากับ 98.20 % ของปริมาณที่ระบุบนฉลาก โดยมีความเที่ยงเท่ากับ 1.71 และ 1.24 ตามลำดับ