

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) > 99.0%(w/w), A.R. grade ของ บริษัท Analytical Science (LAB-SCAN)
2. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl) 37% (w/v), A.R. grade ของ บริษัท Analytical Science(LAB-SCAN)
3. เมทานอล (Methanol, CH₃OH) HPLC grade ของบริษัท Fisher Scientific
4. อะซิโตรไนล์ (Acetonitrile, CH₃CN) HPLC grade ของบริษัท Fisher Scientific
5. กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid, H₃PO₄) A.R. grade ของบริษัท Analytical Science(LAB-SCAN)
6. พาราเซตามอล (Paracetamol, C₈H₉NO₂) 99.0% ของบริษัท Sigma
7. ฟีนิลเอฟเฟริน ไฮโดรคลอไรด์ (Phenylephrine HCl, C₉H₁₃NO₂·HCl) 99.22% ของบริษัท Sigma
8. คลอเฟนิรามีน มาลีเอท (Chlorpheniramine maleate, C₁₆H₁₉ClN₂·C₄H₄O₄) ของ บริษัท Sigma
9. กรดมาลิก (Maleic acid, C₄ H₄ O₄) ของบริษัท Sigma
10. 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต (1-butyl-3-methylimidazolium octyl sulfate) ของบริษัท Fluka
11. 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต (1-butyl-3-methylimidazolium 2-(2-methoxy ethoxy) ethyl sulfate) ของบริษัท Fluka
12. 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ไนเตรต (1-ethyl-3-methylimidazolium nitrate) ≥99.0% ของบริษัท Fluka
13. น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1.เครื่องโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง(High Performance Liquid Chromatograph; HPLC) บริษัท Waters; 515 HPLC Pump; waters 486 Tunable Absorbance Detector
- 2.เครื่อง pH meter , บริษัท Danver Instrument Model 215
- 3.เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP2103 บริษัท Scientific Promotion
- 4.เครื่อง Fisher Stirring Hotplate บริษัท Fisher Scientific
- 5.เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis Spectrophotometer) บริษัท Jenway รุ่น 6405
- 6.ครกบด

3.2 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาหาชนิดของสารละลายไอออนิกและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวชะในการแยกสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาหาประสิทธิภาพการแยกสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท

ขั้นตอนที่ 3 ทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ขั้นตอนที่ 4 วิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาเม็ดคดไข้ตามท้องตลาด โดยใช้สารละลายไอออนิกเป็นตัวชะ และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้กับปริมาณยาบนฉลาก

ขั้นตอนที่ 5 สรุปผลการทดลองและรายงานผล

3.3 วิธีการวิจัย

3.3.1 การเตรียมสารละลาย

3.3.1.1 สารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลเข้มข้น 1,000 ppm จำนวน 25.0 mL

ชั่งสารมาตรฐานพาราเซตามอลมาจำนวน 0.02500 g เติมน้ำกลั่นจำนวน 1 หยด แล้วปรับปริมาตรจนครบ 25.0 mL ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.1.2 สารละลายมาตรฐาน ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ เข้มข้น 1,000 ppm จำนวน 25.0 mL

ซึ่งสารมาตรฐานฟีนีลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ มาจำนวน 0.02500 g เติมน้ำกลั่นจำนวน 1 หยด แล้วปรับปริมาตรจนครบ 25.0 mL ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.1.3 สารละลายมาตรฐานคลอเฟนิรามีน มาลิเอท เข้มข้น 1,000 ppm จำนวน 25.0 mL

ซึ่งสารมาตรฐานคลอเฟนิรามีน มาลิเอท มาจำนวน 0.02500 g เติมน้ำกลั่นจำนวน 1 หยด แล้วปรับปริมาตรจนครบ 25.0 mL ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.1.4 สารละลายมาตรฐานกรดมาลิอิก เข้มข้น 1,000 ppm จำนวน 25.0 mL

ซึ่งสารมาตรฐานกรดมาลิอิก มาจำนวน 0.02500 g เติมน้ำกลั่นจำนวน 1 หยด แล้วปรับปริมาตรจนครบ 25.0 mL ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.1.5 สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 150 ppm จำนวน 10.0 mL

เปิดสารละลายมาตรฐาน 3.3.1.1, 3.3.1.2, 3.3.1.3 และ 3.3.1.4 อย่างละ 1.50 mL ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10.0 mL แต่ละขวด แล้วเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนจนปริมาตรครบ 10.0 mL

3.3.1.6 เตรียมสารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต ที่ความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 2, 4, 6 mM โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย และปรับ pH เป็น 3 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.01 M

3.3.1.7 เตรียมสารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24 mM โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย และปรับ pH เป็น 3 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.01 M

3.3.1.8 เตรียมสารละลาย 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ในเตรท ที่ความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 2, 4 mM โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย และปรับ pH เป็น 3 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.01 M

3.3.2 ศึกษาหาชนิดของสารละลายไอออนิกและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวชะในการแยกสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ฟีนีลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลิเอท โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

3.3.2.1 นำสารละลายไอออนิกชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมขึ้น กรองภายใต้ระบบสุญญากาศผ่านกระดาษกรองในลอนที่มีความละเอียด 0.45 μm จากนั้นนำมาไล่อากาศโดยใช้เครื่องอัลตราโซนิก(Ultrasonic bath) เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาใช้เป็นตัวชะในเทคนิค โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงโดยใช้คอลัมน์เป็น C_{18} ขนาด 150 x 3.9 mm i.d. และใช้ยูวี-ดีเทคเตอร์

3.3.3 ศึกษาหาประสิทธิภาพการแยกสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท

3.3.3.1 เมื่อได้ชนิดและสภาวะที่เหมาะสมของสารละลายไอออนิกซึ่งใช้เป็นตัวชะแล้ว ให้ทำการหาประสิทธิภาพการแยกสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ซึ่งทำการหาค่าต่างๆดังต่อไปนี้

1. แฟกเตอร์ความจุ(Capacity factor , k')
2. จำนวนเพลทตามทฤษฎี(Number of theoretical plates of the column, N)
3. เทลลิ่ง แฟกเตอร์ (Tailing factor, T)
4. ความจำเพาะเจาะจง(Separation factor, α)
5. ความสามารถในการแยก(Resolution, R_s)
6. R.S.D of peak area($n=6$)

3.3.4 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

3.3.4.1 ความจำเพาะ(Selectivity)

นำสารละลายตัวอย่างและสารประกอบอื่นที่ไม่มีตัวยา(Placebo)ที่เตรียมที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน มาทำการวิเคราะห์ โดยใช้สภาวะในการทดลองเดียวกัน เปรียบเทียบโครมาโทแกรมที่ได้จากสารละลายตัวอย่างและPlacebo

3.3.4.2 ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)

1. System linearity

นำสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย พาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดร-คลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ที่ความเข้มข้นต่างๆ 5 ระดับความเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้น

สารละลายมาตรฐาน	ช่วงความเข้มข้น(ppm)
พาราเซตามอล	40 - 240
ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์	25-200
คลอเฟนิรามีน มาลีเอท	5-40

มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้สารละลายไอออนิกที่สภาวะที่เหมาะสมเป็นตัวชะและใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1 mLmin^{-1} คอลัมน์ C_{18} ยูวีเป็นดีเทคเตอร์ ปริมาตรที่ฉีด $40 \mu\text{L}$ ทำการวัดสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยของสัญญาณที่อ่านได้ที่แต่ละระดับความเข้มข้น พล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้น(แกนX) และสัญญาณที่อ่านได้(แกน Y) จากกราฟที่พลอตระหว่างค่าสัญญาณที่อ่านได้กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (อย่างน้อย 6 จุด

รวม แปลงค่านำมาคำนวณหาสมการเส้นถดถอย(Regression line) โดยใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด (The method of least squares) ทั้งนี้ค่าความชัน(Slope)ของสมการเส้นถดถอย ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสนใจ(Regression Coefficient, R^2) และ จุดตัดแกน Y สามารถนำมาเป็นเกณฑ์การยอมรับความถูกต้อง

ผลของความเป็นเส้นตรงที่ดีจะได้กราฟเส้นตรง โดยมี ค่าความชัน = 1 ค่า $R^2 = 1$ (โดยทั่วไปยอมรับ ค่า R^2 ที่ 0.999 ถึง 0.995) และค่าจุดตัดแกน $y = 0$

2. Method linearity

นำตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน(Spiked sample) 3 ระดับความเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้น

ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน	ช่วงความเข้มข้น(ppm)
พาราเซตามอล	60-180
ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์	50-150
คลอเฟนิรามีน มาลีเอท	10-30

มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้สารละลายไอออนิกที่สภาวะที่เหมาะสมเป็นตัวชะและใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1 mLmin^{-1} คอลัมน์ C_{18} ยูวีเป็นดีเทคเตอร์ ปริมาตรที่ฉีด $40 \mu\text{L}$ ทำการวัดสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ นำค่าของสัญญาณที่อ่านได้ที่แต่ละระดับความเข้มข้นพลอตกราฟระหว่างความเข้มข้น(แกนX) และสัญญาณที่อ่านได้(แกน Y) จากกราฟที่พลอตระหว่างสัญญาณที่อ่านได้กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน(อย่างน้อย 4 จุด รวมแปลงค่านำมาคำนวณหาสมการเส้นถดถอย(Regression line) โดยใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด(The method of least squares) ทั้งนี้ค่าความชัน(Slope)ของสมการเส้นถดถอย ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสนใจ(Regression Coefficient, R^2) และ จุดตัดแกน Y สามารถนำมาเป็นเกณฑ์การยอมรับความถูกต้อง โดยทั่วไปยอมรับ ค่า $R^2 > 0.99$

3.3.4.3 สภาพไว(Sensitivity)

1. ขีดจำกัดของการตรวจหา(Limit of Detection, LOD)

สามารถหาได้โดยใช้ข้อมูลจากการทำ System linearity โดยใช้สูตร

$$y = y_B + 3s_B$$

เมื่อ y_B = จุดตัดแกน y (a) ที่คำนวณได้จากสมการเส้นถดถอย
 s_B = ค่า standard error of estimate, $s_{y/x}$

(หมายเหตุ โดยอธิบายวิธีการคำนวณอย่างละเอียดไว้ในภาคผนวก ง)

2. Limit of Quantitation, LOQ

สามารถหาได้โดยใช้ข้อมูลจากการทำ System linearity โดยใช้สูตร

$$y = y_B + 10s_B$$

เมื่อ y_B = จุดตัดแกน y (a) ที่คำนวณได้จากสมการเส้นถดถอย
 s_B = ค่า standard error of estimate, $s_{y/x}$

เมื่อได้ค่า LOQ โดยประมาณมาแล้ว ให้เติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับเท่ากับ LOQ ลงใน Sample blank อย่างน้อย 7 ซ้ำ แล้วนำไปวิเคราะห์ คำนวณหา %Recovery และ %RSD ถ้าค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ก็สามารถใช้นั้น เป็น LOQ ของวิธี แต่ถ้าค่าที่ได้ไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ให้กำหนดค่าใหม่ที่สูงกว่าเดิม ทดสอบความแม่นยำ(Accuracy) และความเที่ยง(Precision)จนกว่าจะได้

3.3.4.4 ความถูกต้อง(Accuracy)

สามารถหาได้โดยใช้ข้อมูลจากการทำ Method linearity โดยใช้สูตร

$$\text{Recovery}(\%) = \frac{(C_1 - C_2) \times 100}{C_3}$$

C_1 = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน
 C_2 = ความเข้มข้นของตัวอย่าง(Unfortified sample)
 C_3 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติม

3.3.4.5 ความเที่ยง(Precision)

ค่าที่แสดงถึงความใกล้เคียงกันของผลทดสอบตัวอย่างที่ทำการทดสอบซ้ำหลายครั้ง โดยทั่วไปจะแสดงด้วยค่าเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์(% Relative Standard Deviation ; RSD) หรือ สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน(Coefficient of Variation ;CV)

$$\%RSD = \frac{SD \times 100}{\bar{X}}$$

หมายเหตุ $\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบ
 SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบ

3.3.5 วิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาเม็ดคลดไข้ตามท้องตลาด

3.3.5.1 นำตัวอย่างยา 20 เม็ด มาบดให้ละเอียดและเป็นเนื้อเดียวกันด้วยครกบดยา ซึ่งตัวอย่างยามาเท่ากับน้ำหนักยา 1 เม็ด บันทึกรับน้ำหนักที่แน่นอนไว้ ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50.0 mL เติมนีเมทานอล 37.5 mL นำสารละลายตัวอย่างไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่องอัลตราโซนิก แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนให้ถึงขีดบอกปริมาตร เขย่าให้สารละลายผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จะมีตะกอนที่ก้นขวด กรองสารละลายด้วยเครื่องกรองสารตัวอย่าง โดยผ่านเมมเบรนที่มีขนาดของรู 0.45 μm เก็บสิ่งกรองไว้ในขวดแก้วขนาดเล็กปิดฝาให้สนิท

1.การวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 0.12 mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10.0 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 10.0 mL ด้วย 75% เมทานอล นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

2.การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลี-เอท ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 5 mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10.0 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 10.0 mL ด้วย 75% เมทานอล นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

3.3.6 สรุปผลการทดลองและรายงานผล