

บทที่ 4

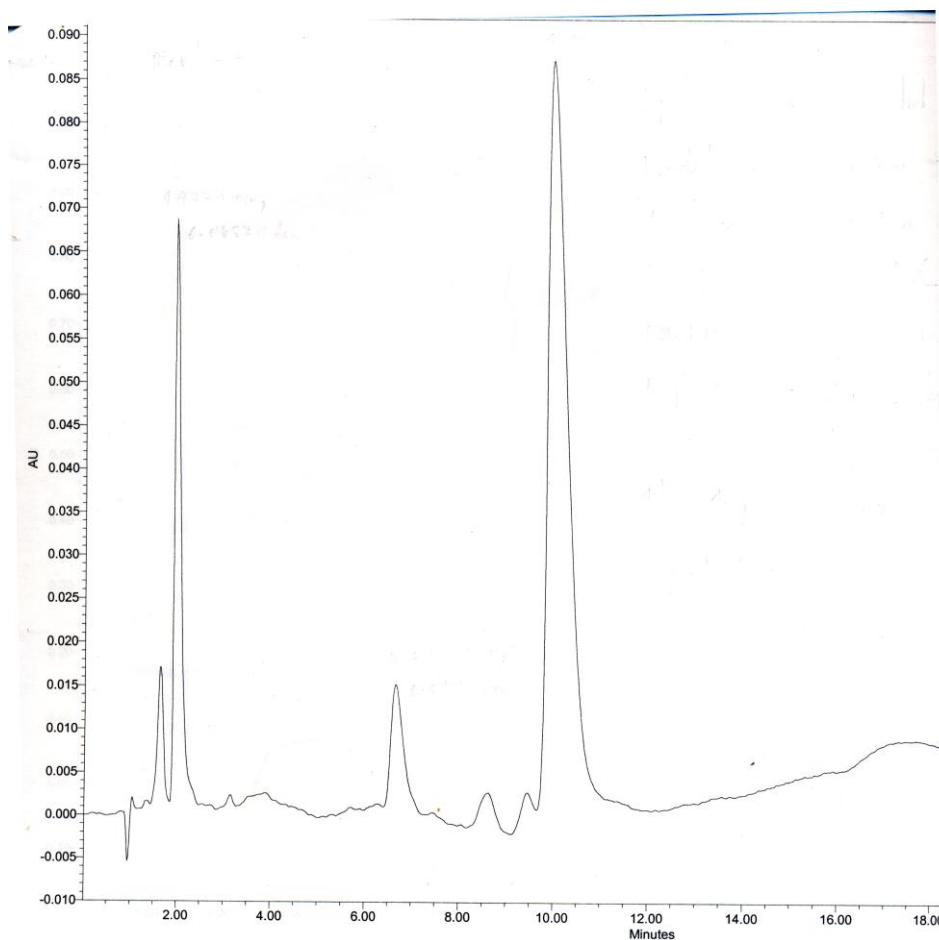
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ศึกษาหาชนิดของสารละลายไอออนิกและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวชะ ในเทคนิค HPLC เพื่อแยกสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย พาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ได้พร้อมกัน

4.1.1 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารละลายไอออนิก

สารละลายไอออนิกที่นำมาศึกษามี 3 ชนิด คือ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ไนเตรต และ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เม-ทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต

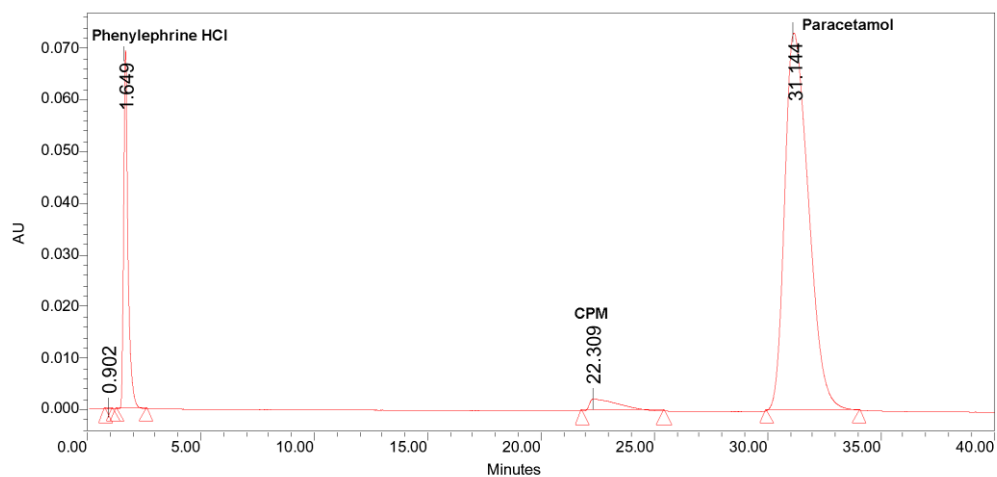
4.1.1.1 เมื่อนำสารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต ความเข้มข้น 2 mM pH 3.0 มาใช้เป็นตัวชะในเทคนิค HPLC อัตราการไหลเท่ากับ 1 mLmin⁻¹ โดยใช้ คอลัมน์ C₁₈ ขนาด 150 x 3.9 mm. i.d.; 5 µm ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 252 nm ปริมาตรสารละลาย มาตรฐานที่ฉีด เท่ากับ 40 µL โดยฉีดสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ความเข้มข้น 150 ppm ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 4.1



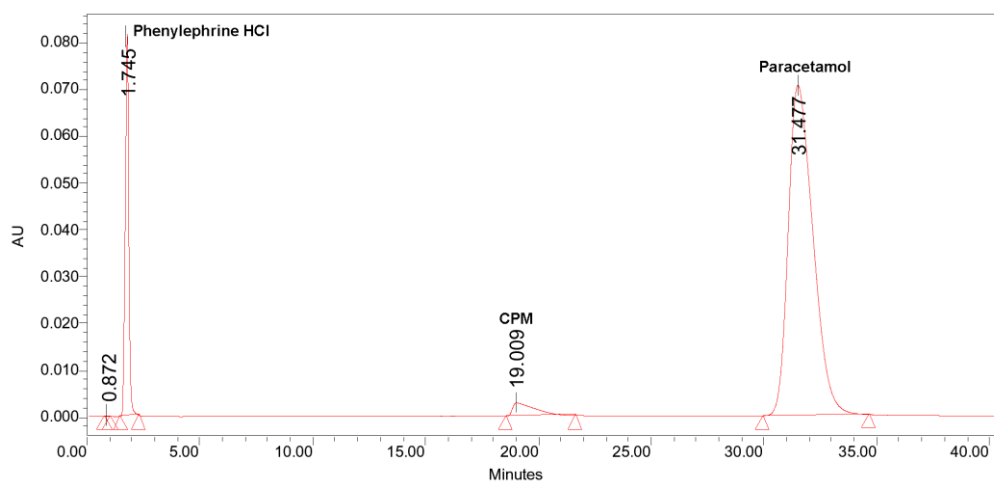
รูปที่ 4.1 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล เมื่อใช้ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต ความเข้มข้น 2 mM pH 3.0 เป็นตัวชะ

จากโครมาโทแกรมที่แสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าการฉีดสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล เพียงตัวเดียวแต่ให้พีกหลายพีก ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่าพีกที่ตำแหน่งใดเป็นพีกของพาราเซตามอล และนอกจากนี้ยังมีปัญหาเรื่องฟอง ทำให้ไม่สามารถนำสารละลายไอออนิกชนิดนี้มาเป็นตัวชะได้

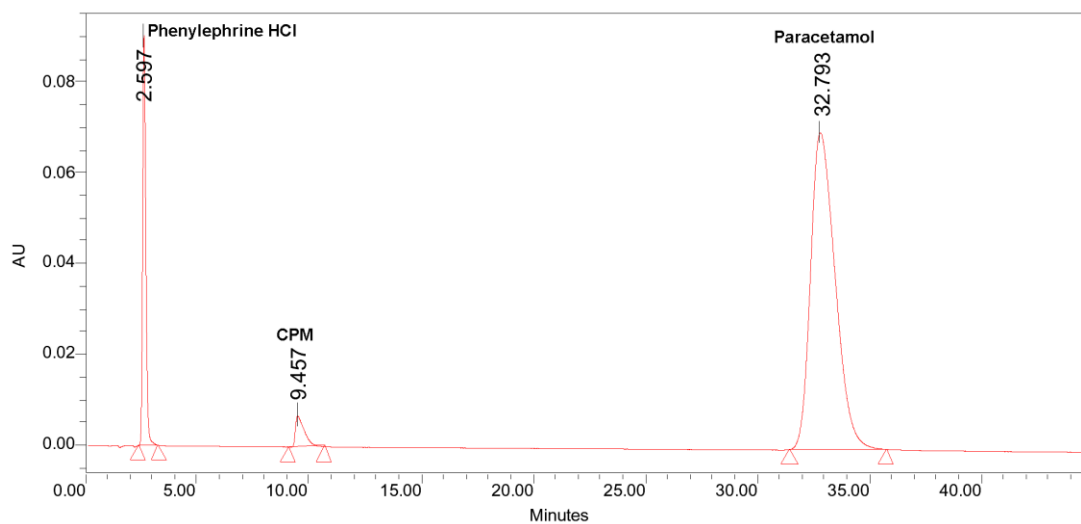
4.1.1.2 เมื่อนำสารละลาย 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ในเตรท ความเข้มข้น 2 และ 4 mM pH 3.0 มาใช้เป็นตัวชะในเทคนิค HPLC อัตราการไหลเท่ากับ 1 mLmin^{-1} โดยใช้คอลัมน์ C_{18} $150 \times 3.9 \text{ mm. i.d.}$; $5 \mu\text{m}$ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 252 nm ปริมาตรสารละลายมาตรฐานที่ฉีด เท่ากับ $40 \mu\text{L}$ โดยฉีดสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย พาราเซตามอล ฟีนิลเอฟริน ไฮโดรคลอไรด์ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ความเข้มข้น 150 ppm แสดงผลดังรูปที่ 4.2 และสรุปค่าพารามิเตอร์ทางการแยกดังตารางที่ 4.1



(ก) น้ำปราศจากไอออน ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ



(ข) 2 mM 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ไนเตรท ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ



(ค) 4 mM 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ไนเตรท ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ

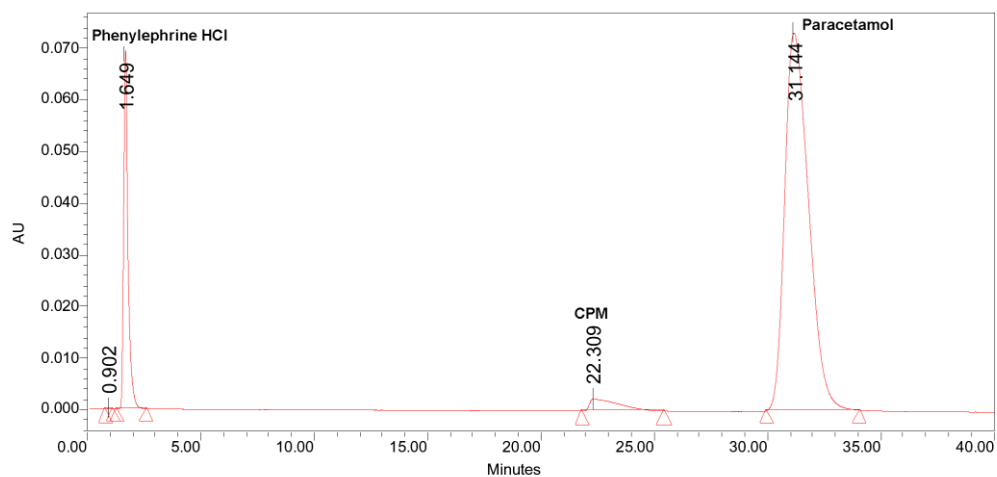
รูปที่ 4.2 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วยคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และ พาราเซตามอล ที่ความเข้มข้น 150 ppm เมื่อใช้ตัวชะที่มีความเข้มข้นของ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ในเตรท แตกต่างกัน ที่ pH 3.0 (ก) 0 (ข) 2 (ค) 4 mM โดยใช้สภาวะ : คอลัมน์ C_{18} (150 x 3.9 mm. i.d.; 5 μ m); อัตราการไหล 1.0 mLmin⁻¹; ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 252 nm; ปริมาตรที่ฉีด 40 μ L

ตารางที่ 4.1 แสดงผลของความเข้มข้นของสารละลาย 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ในเตรท pH 3.0 กับค่าแฟกเตอร์ความจุของ ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท และพาราเซตามอล ที่ความเข้มข้น 150 ppm

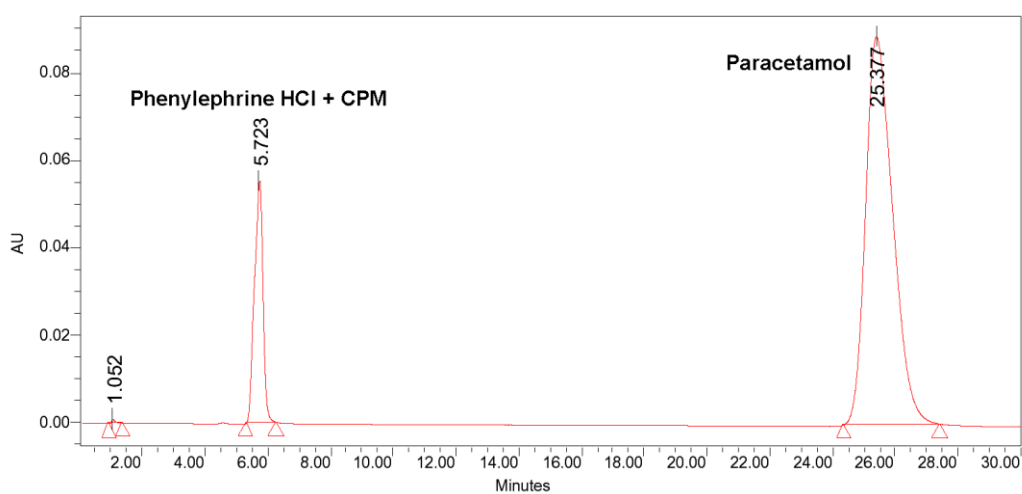
ความเข้มข้นของไอออนิกลิควิด (mM)	ค่าแฟกเตอร์ความจุ		
	PE	CPM	PARA
0	0.83	24.51	33.85
2	1.00	19.74	35.25
4	1.55	8.46	31.20

จากโครมาโทแกรมรูปที่ 4.2 สามารถคำนวณค่าแฟกเตอร์ความจุ(ตามภาคผนวก ก ตารางที่ ก.1; หน้า 82) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าค่าแฟกเตอร์ความจุของคลอเฟนิรามีน มาลีเอทและพาราเซตามอล มีค่ามาก นั่นคือมีการชะที่นานเกินไป (t_R มีค่ามากเกินไป) ซึ่งไม่เหมาะสมเพราะสิ้นเปลืองเวลาและสารเคมี และนอกจากนี้ไอออนิกลิควิดชนิดนี้ยังมีราคาแพงอีกด้วย จึงทำให้ไอออนิกลิควิดชนิดนี้ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นตัวชะ

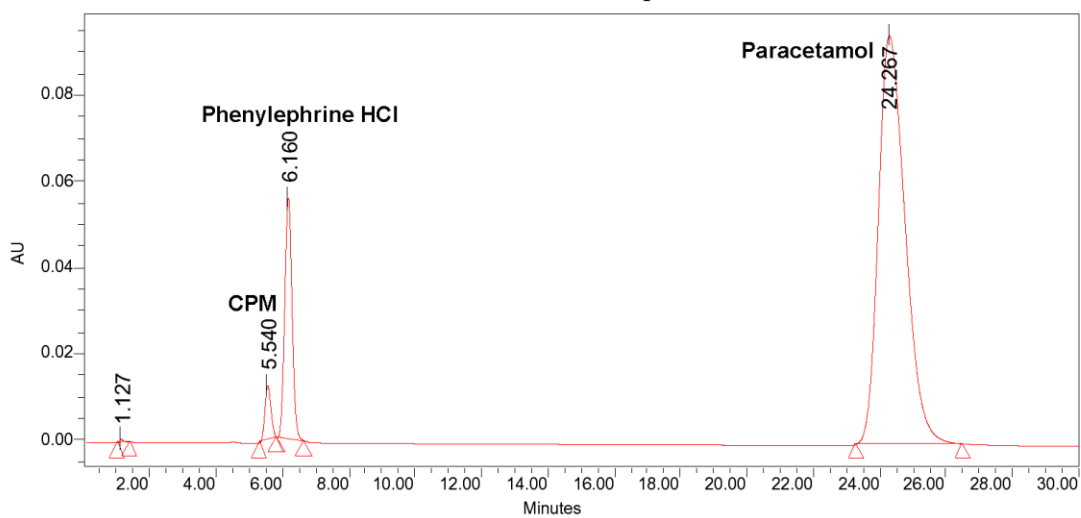
4.1.1.3 เมื่อนำสารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 และ 24 mM pH 3.0 มาใช้เป็นตัวชะในเทคนิค HPLC โดยใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1 mLmin⁻¹ คอลัมน์ C_{18} 150 x 3.9 mm. i.d.; 5 μ m ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 252 nm ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานที่ฉีด 40 μ L โดยฉีดสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล ซึ่งสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดมีความเข้มข้นเท่ากับ 150 ppm แสดงผลดังรูปที่ 4.3



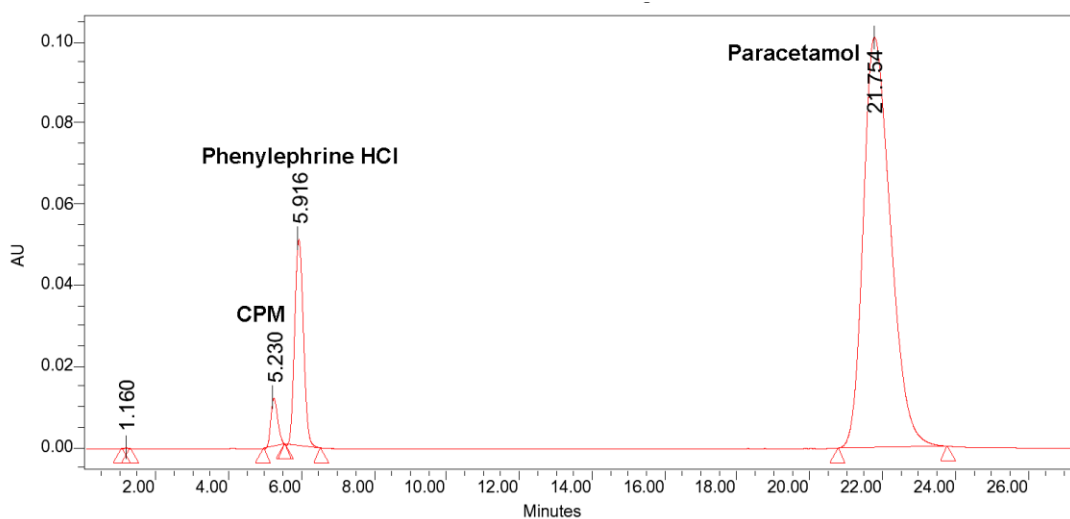
(ก) น้ำปราศจากไอออน ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ



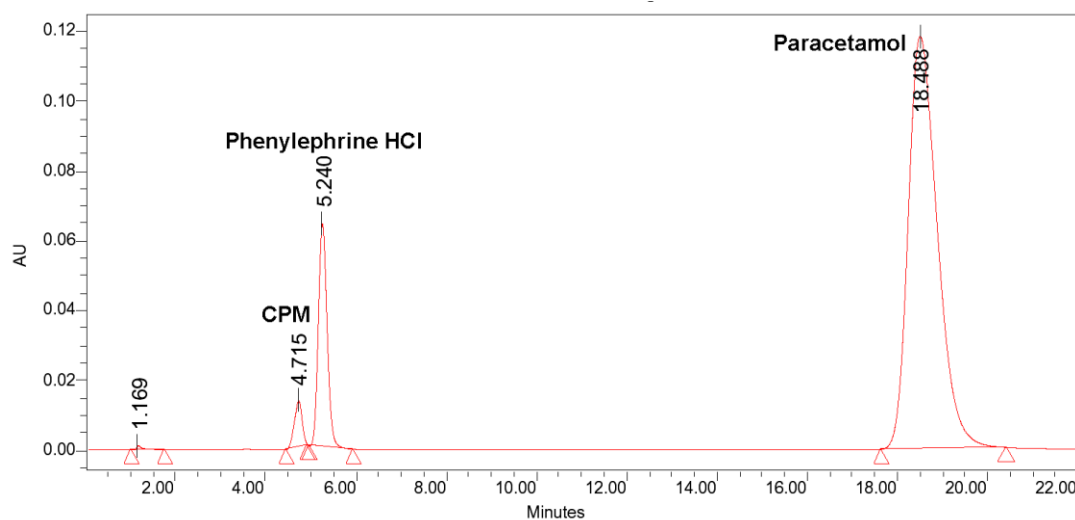
(ข) 2 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ



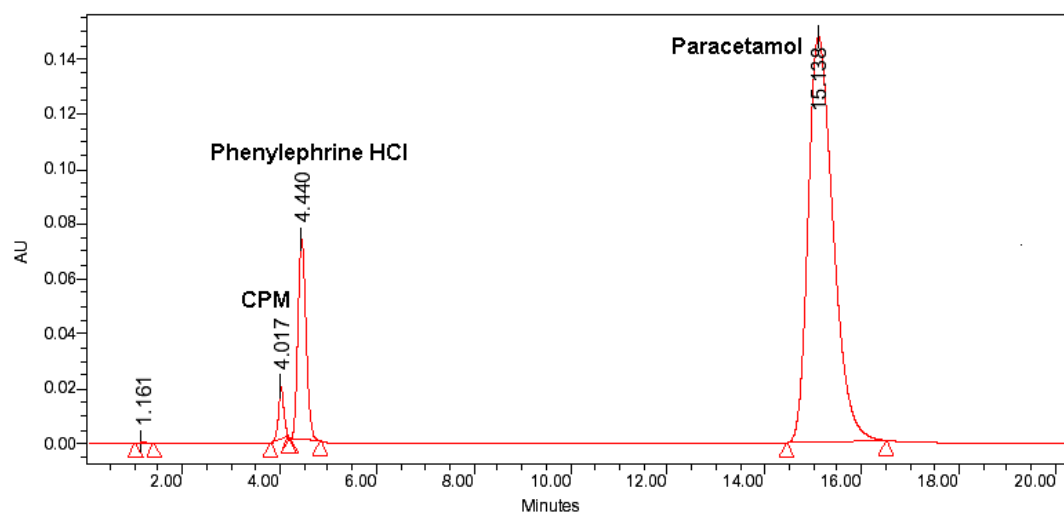
(ก) 4 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0
เป็นตัวชะ



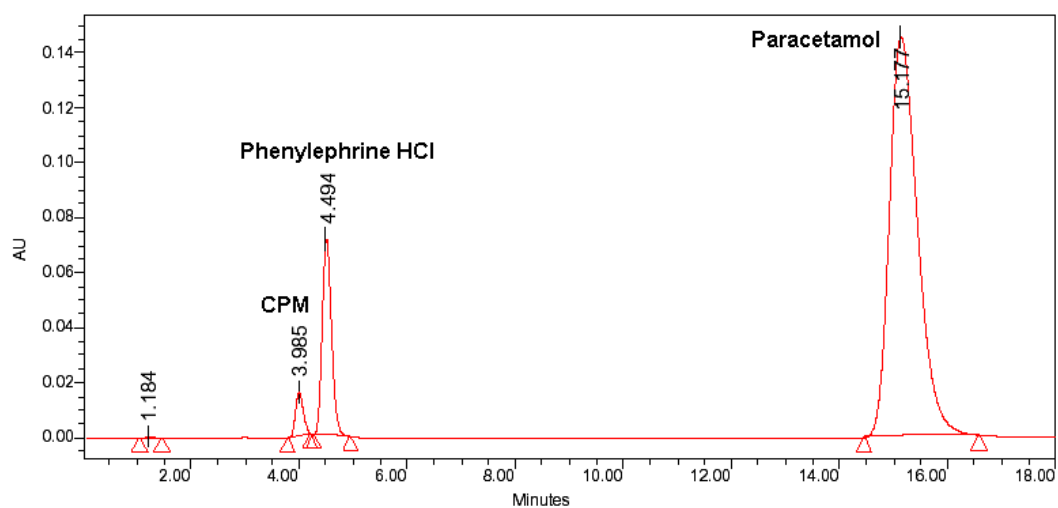
(ง) 6 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0
เป็นตัวชะ



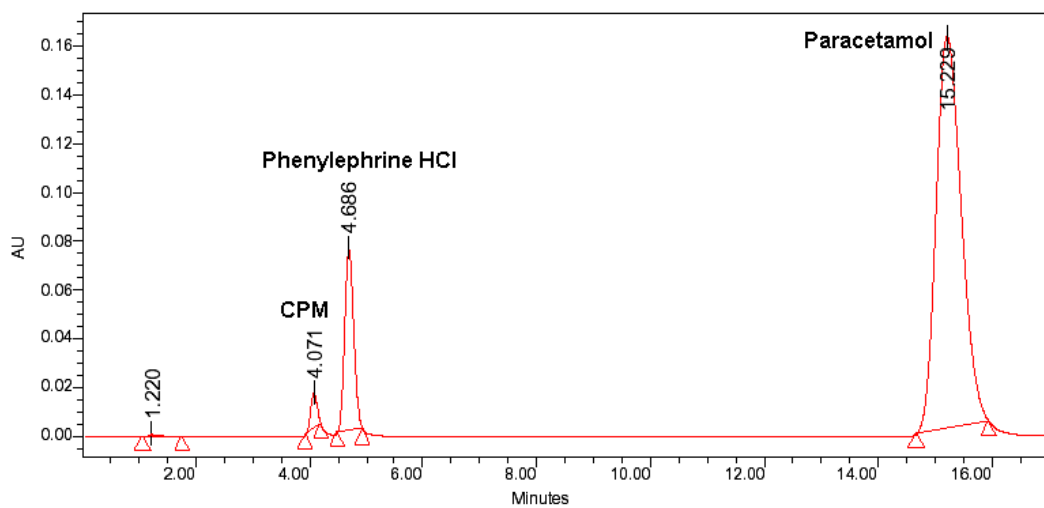
(จ) 8 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0
เป็นตัวชะ



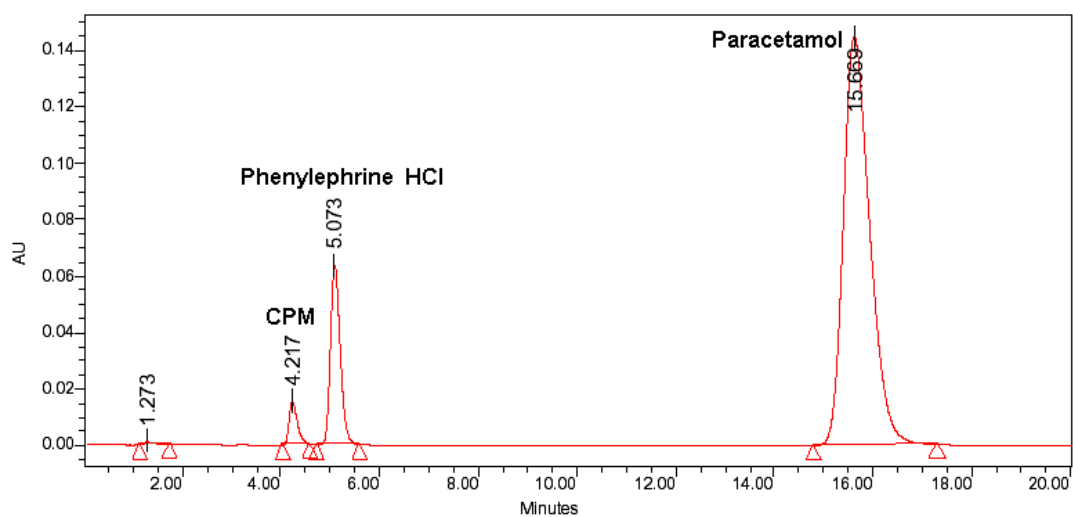
(ฉ) 10 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0
เป็นตัวชะ



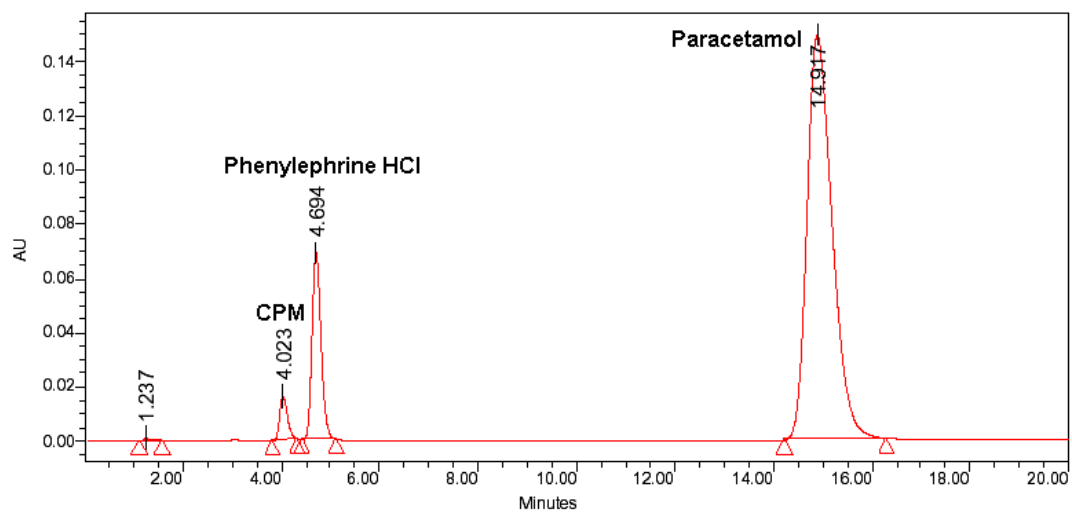
(ข) 12 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0
เป็นตัวชะ



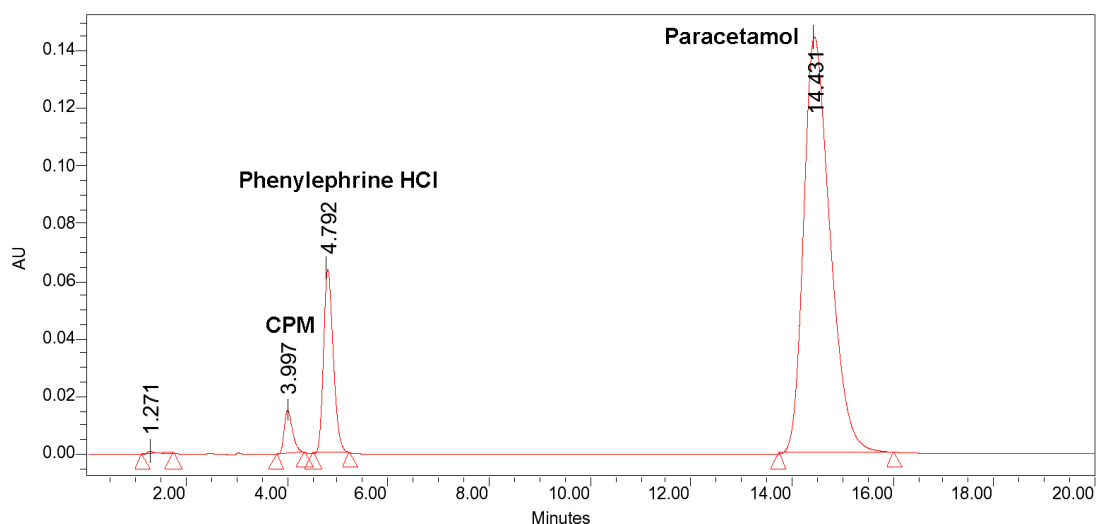
(ข) 14 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0
เป็นตัวชะ



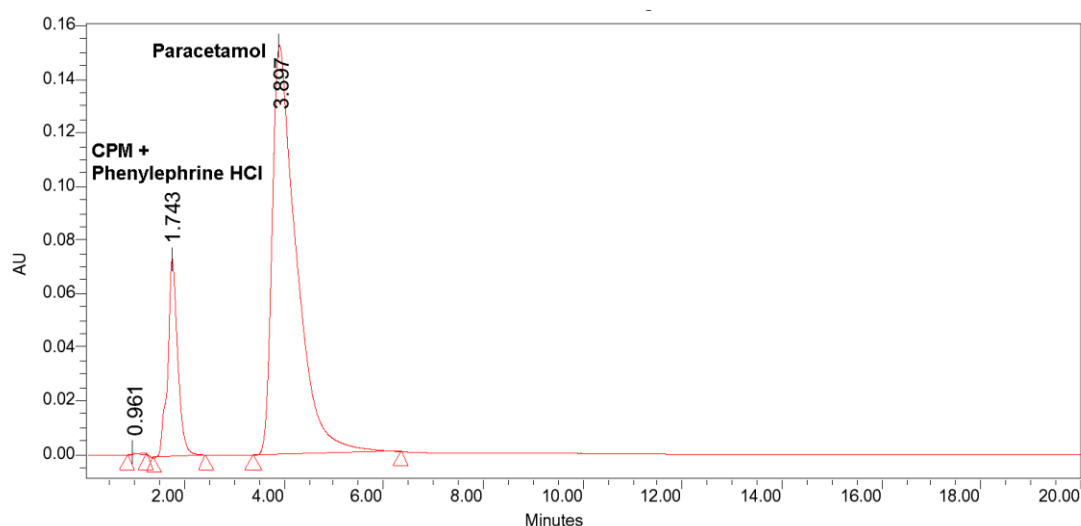
(ง) 16 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ



(ญ) 18 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ



(ก) 20 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ



(ข) 24 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ

รูปที่ 4.3 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟินิล-เอเฟริน ไฮโดรคลอไรด์ และ พาราเซตามอล ที่ความเข้มข้น 150 ppm เมื่อใช้ตัวชะที่มีความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต แตกต่างกัน ที่ pH 3.0 (ก) 0 (ข) 2 (ค) 4 (ง) 6 (จ) 8 (ฉ) 10 (ช) 12 (ซ) 14 (ฌ) 16 (ญ) 18 (ฎ) 20 และ (ฏ) 24 mM โดยใช้สภาวะ คอลัมน์ C_{18} (150 x 3.9 mm. i.d.; 5 μ m) อัตราการไหล 1.0 mLmin⁻¹ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 252 nm และปริมาตรที่ฉีดเท่ากับ 40 μ L

จากรูปที่ 4.3 พบว่า เมื่อใช้สารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ความเข้มข้น 2 mM เป็นตัวชะ ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 4.3 (ข) พบว่าค่าเวลาการคงไว้(retention time) ของพาราเซตามอล และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ลดลงมาก แต่ค่า เวลาการคงไว้ของฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ กลับเพิ่มขึ้น ทำให้ไปเข้าใกล้และซ้อนทับกับพีคของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท

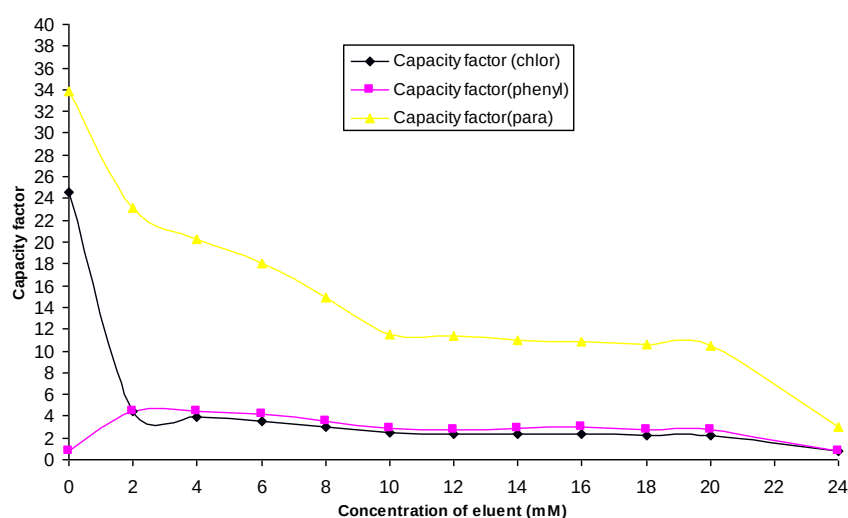
แต่เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต เป็น 4 mM ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 4.3 (ค) พบว่าสามารถแยกสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดได้ แต่ค่าแฟกเตอร์ความจุของพีคพาราเซตามอลยังมีค่าสูงเกินไปทำให้สิ้นเปลืองตัวชะ เวลา และการตรวจวัดทำได้ยาก

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต เป็น 6, 8, 10, 12, 14, 16 และ 18 mM ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 4.3 (ง) (จ) (ฉ) (ช) (ซ) (ณ) และ (ญ) พบว่าสามารถแยกสารผสมทั้ง 3 ชนิดได้ และค่าแฟกเตอร์ความจุของสารผสมทั้ง 3 ชนิด ค่อยๆลดลง แต่ค่าแฟกเตอร์ความจุของพีคพาราเซตามอลยังมีค่าสูงเกินไปทำให้สิ้นเปลืองตัวชะ เวลา และการตรวจวัดทำได้ยาก

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต เป็น 20 mM ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 4.3 (ฎ) พบว่าสามารถแยกสารผสมทั้ง 3 ชนิดได้ โดยคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล มีค่าแฟกเตอร์ความจุเท่ากับ 2.16 2.80 และ 10.41 ตามลำดับ ค่าความสามารถในการแยกระหว่างพีคของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท กับฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ เท่ากับ 1.90 ค่าความสามารถในการแยกระหว่างพีคของฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เท่ากับ 11.26 ค่าความเลือกจำเพาะระหว่างพีคของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท กับฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ เท่ากับ 1.30 ค่าความเลือกจำเพาะระหว่างพีคของฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เท่ากับ 3.71 ค่า tailing factor ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และ พาราเซตามอล เท่ากับ 1.38 1.10 และ 1.05 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

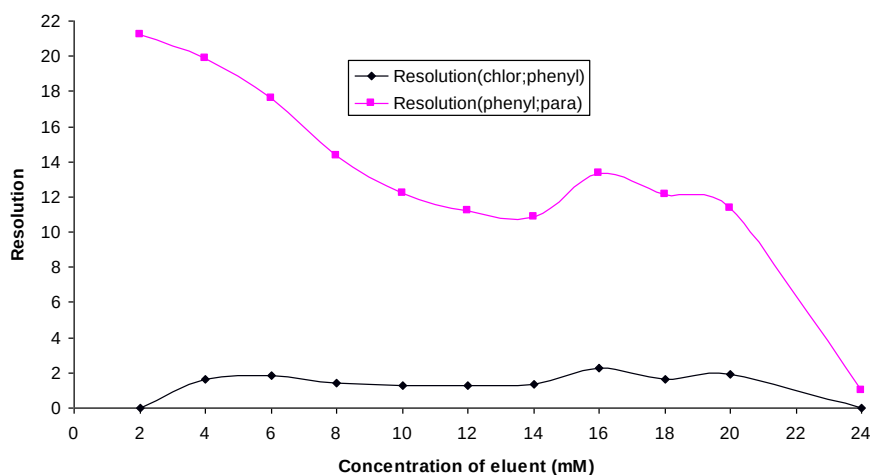
แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต เป็น 24 mM ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 4.3 (ฏ) พบว่าไม่สามารถแยกฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ได้ เพราะฉะนั้นจึงเลือกสารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 20 mM เป็นความเข้มข้นของตัวชะที่เหมาะสม

เมื่อพลอตกราฟระหว่างค่าแฟกเตอร์ความจุ(แสดงการคำนวณในภาคผนวก ก ตารางที่ ก. 2 หน้า 83-84)กับความเข้มข้นของ1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 แสดงผลดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 กับ ค่าแฟกเตอร์ความจุ

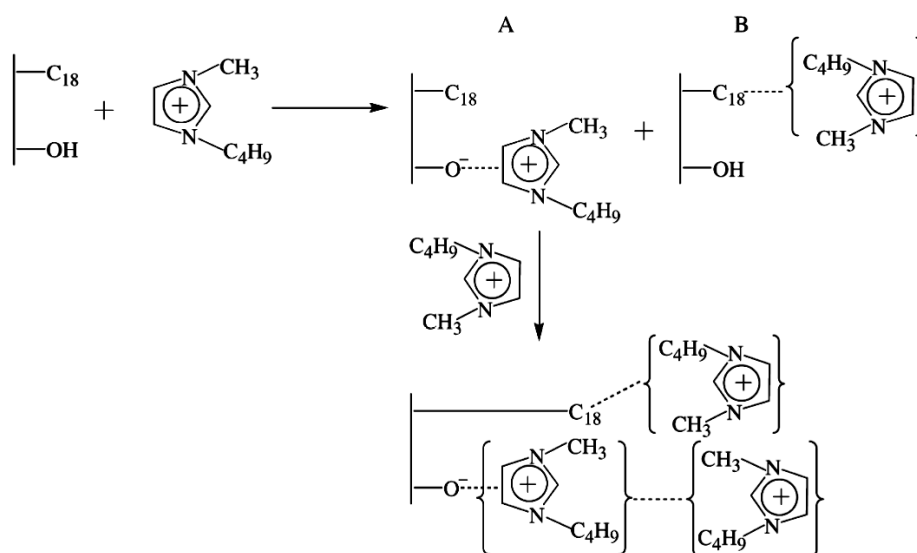
จากกราฟรูปที่ 4.4 พบว่า เมื่อใช้สารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต เป็นตัวชะ pH 3.0 พบว่าค่าแฟกเตอร์ความจุของพาราเซตามอล และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ลดลง อย่างรวดเร็วในตอนแรก จากนั้นค่อยๆ คงที่ จนกระทั่งความเข้มข้น เท่ากับ 20 mM แต่เมื่อความเข้มข้นเท่ากับ 24 mM ค่าแฟกเตอร์ความจุลดลง จนค่าแฟกเตอร์ความ จุของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท และฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ มีค่าเท่ากัน และพิจารณาจาก กราฟรูปที่ 4.5 จะเห็นว่าค่าความสามารถในการแยกที่ความเข้มข้นของสารละลาย 1-บิวทิล-3- เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต เท่ากับ 24 mM ค่าความสามารถใน การแยกมีค่า < 1.5 ทำให้ไม่สามารถแยกพิกของสารทั้งสองได้



รูปที่ 4.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 กับค่าความสามารถในการแยก(แสดงการคำนวณในภาคผนวก ก ตารางที่ ก.4 หน้า 86 – 87)

Yanes และคณะ [21] อธิบายว่า หมู่อิมิดาโซเลียม(Imidazolium group) ที่มีประจุเป็นบวกจะไม่อยู่เฉพาะในสารละลาย(bulk solution) เท่านั้น แต่มันถูกเคลือบบนผนังแคปิลลารีเมื่อไอออนิกลิควิดถูกใช้เป็นตัวเติมในสารละลายอิเล็กโทรไลต์(Electrolytes additive) ในเทคนิคแคปิลลารี อิเล็กโทรโฟเรซิส ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า เมื่อไอออนิกลิควิดถูกใช้เป็นตัวเติมในเฟสเคลื่อนที่(Mobile phase additive) ในเทคนิค HPLC มันจะอยู่ทั้งในสารละลายและถูกเคลือบบน C_{18} คอลัมน์ด้วยเช่นกัน

อิมิดาโซเลียมแคทไอออน(Imidazolium cation) สามารถเกิดอันตรกิริยากับหมู่ซิลานอล(Silanol group) บนผิวอัลคิลซิลิกา(Alkylsilica surface) ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ดังนั้นมันสามารถป้องกันหมู่ซิลานอลที่เหลือในคอลัมน์(Residual silanol) ได้อย่างมีประสิทธิภาพและปรับปรุงรูปร่างของพีคพร้อมกับลดเวลาการคงไว้(Retention time)ของสารที่เราสนใจจะวิเคราะห์ได้อีกด้วย



รูปที่ 4.6 แสดงอันตรกิริยาของอิมิดาโซเลียมแคไทออนในคอลัมน์ C_{18} [9]

ซึ่งจากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต จะทำให้เวลาการคงไว้ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท และพาราเซตามอลลดลง ส่วนเวลาการคงไว้ของฟีนีลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ จะเพิ่มขึ้นในตอนแรกแล้วค่อยลดลงในตอนหลังเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งที่ความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต เท่ากับ 24 mM พบว่าไม่สามารถแยกฟีนีลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ได้ ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า การที่ฟีนีลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ มีเวลาการคงไว้เพิ่มขึ้นในตอนแรก เนื่องจากเมื่อเริ่มเพิ่มความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ทำให้อิมิดาโซเลียมแคไทออนเกิดอันตรกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลบนผิวอัลคิลซิลิกาแบบไฟฟ้าสถิตย์ (Electrostatic interaction; A ในรูปที่ 4.6) หรือด้วยหมู่ไฮดรอกซิลของอิมิดาโซเลียมแคไทออนโดยเกิดอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic interaction; B ในรูปที่ 4.6) ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณคาร์บอนบนเฟสอยู่กับที่ ทำให้เวลาการคงไว้ของฟีนีลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ เพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ขึ้นเรื่อยๆ อิมิดาโซเลียมแคไทออนจะเกิดอันตรกิริยาแบบ A และผลิตโครงสร้างอิเล็กทรอนิกส์แบบสองชั้น (Bilayer electronic structure) แบบอ่อนๆ ที่จับไล่สารที่เราสนใจจะวิเคราะห์ที่มีสมบัติเป็นเบส พร้อมกับเกิดอันตรกิริยาแบบ B ด้วย (แต่เกิดแบบ A ได้ดีกว่า) ดังนั้นเวลาการคงไว้ของสารที่เราสนใจจะวิเคราะห์จึงลดลงภายใต้อันตรกิริยาแบบขับไล่ (Repulsive interaction) และอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic interaction)

4.1.2 ศึกษาการเลือกความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัด

เมื่อได้ชนิดของสารละลายไอออนิกแล้วคือสารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ความเข้มข้น 20 mM pH 3.0 เพื่อใช้เป็นตัวชะ จะทำการปรับเปลี่ยนความยาวคลื่นตั้งแต่ 230 – 275 nm เนื่องจากในตัวอย่างจริงนั้นมีปริมาณพาราเซตามอลมากจนทำให้บดบังสารชนิดอื่น และเพื่อที่จะต้องการตรวจวัดสารผสมทั้ง 3 ชนิดได้พร้อมกัน จึงทำการทดลองโดยเอาตัวอย่างจริงมาทดลองหาความยาวคลื่นที่เหมาะสม โดยจะพิจารณาจากค่าจำนวนเพลท(N)ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท เป็นหลัก เนื่องจากในตัวอย่างจริงนั้นคลอเฟนิรามีน มาลีเอท มีปริมาณน้อยที่สุดและฟีกของพาราเซตามอล ต้องไม่ใหญ่มากเกินไป(overload) ด้วย แสดงผลดังในตารางที่ 4.2(แสดงการคำนวณในภาคผนวก ก; ตารางที่ ก.5 หน้า 88)

ตารางที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า N ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท และพาราเซตามอล กับ ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัด

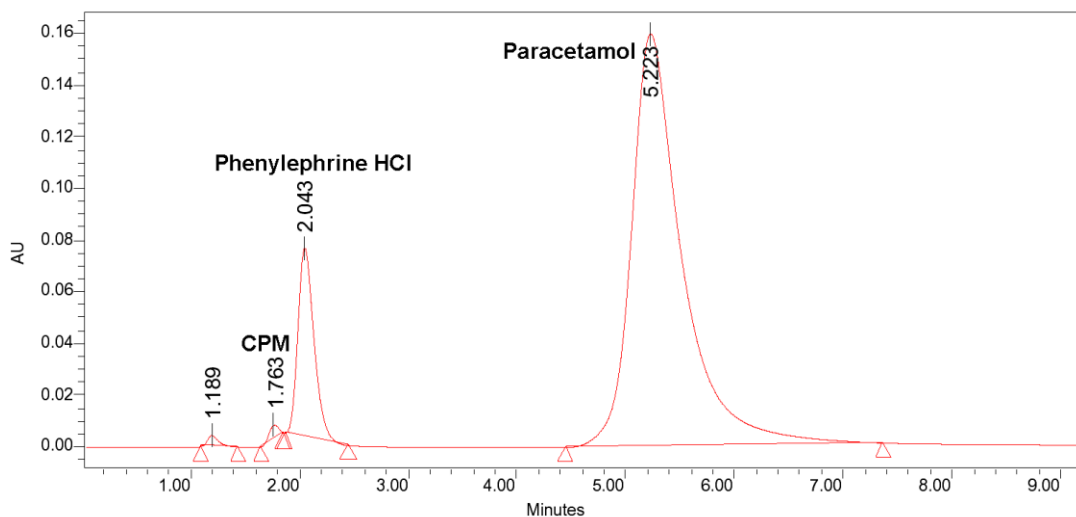
ความยาวคลื่น (nm)	N(CPM)	N(Paracetamol)
230	ND	Overload
240	311.17	Overload
250	322.29	Overload
255	361.24	4977.36
260	378.16	4662.35
262	273.66	4728.6
265	268.24	4915.12
270	224.42	4686.81
275	316.63	4829.69

หมายเหตุ ND = Non detect

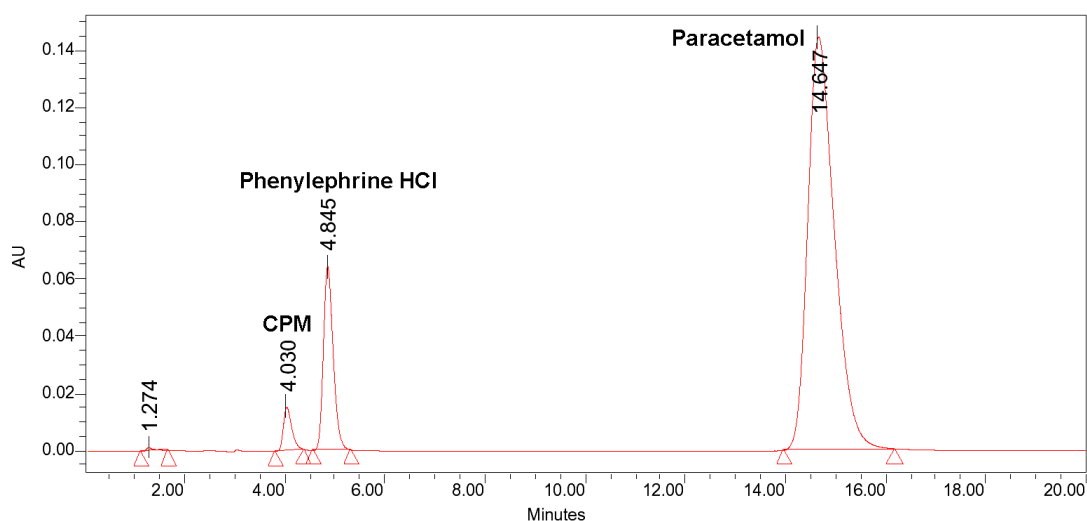
จากตารางที่ 4.2 จะเห็นว่าที่ความยาวคลื่น 260 nm ค่า N ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท สูงที่สุด และฟีกของพาราเซตามอลไม่ overload ด้วย ดังนั้นในการตรวจวัดจึงเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมเท่ากับ 260 nm

4.1.3 ผลการศึกษา pH ของตัวชะ

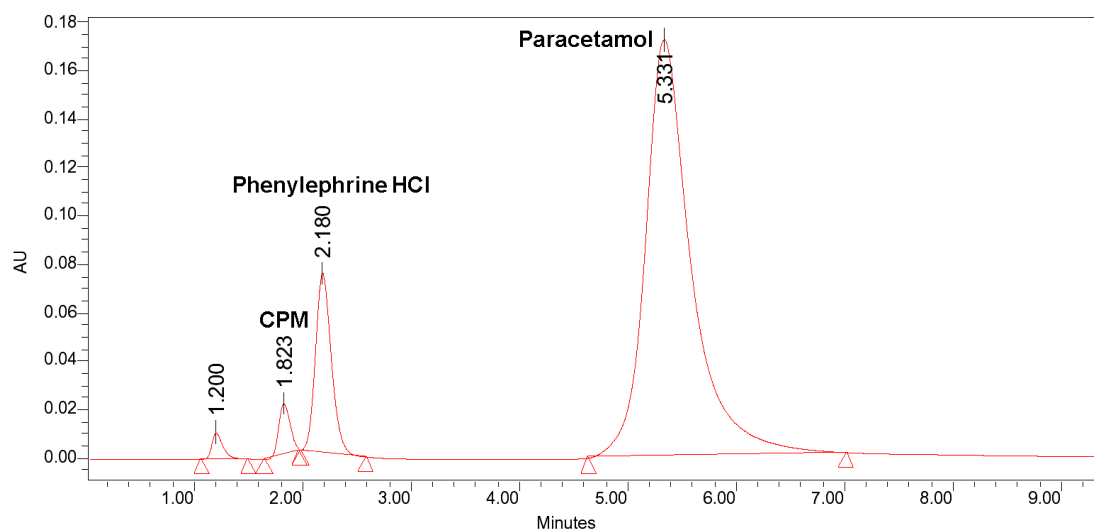
ทำการศึกษาที่ pH ของตัวชะ ต่างๆ กัน ดังนี้ คือ 2, 3, 6, 7 และ 8 ขณะที่ตัวแปรอื่นๆคงที่ คือ สารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต เข้มข้น 20 mM, ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 260 nm, อัตราการไหลเท่ากับ 1 mLmin⁻¹ ปริมาตรสารที่ฉีดเท่ากับ 40 μ L ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 4.7



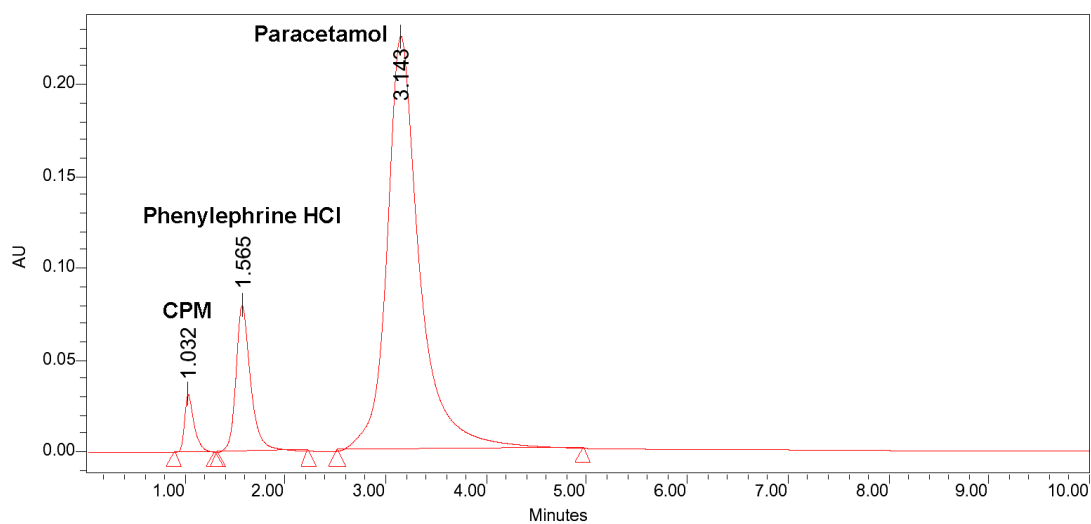
(ก) 20 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต pH 2.0 เป็นตัวชะ



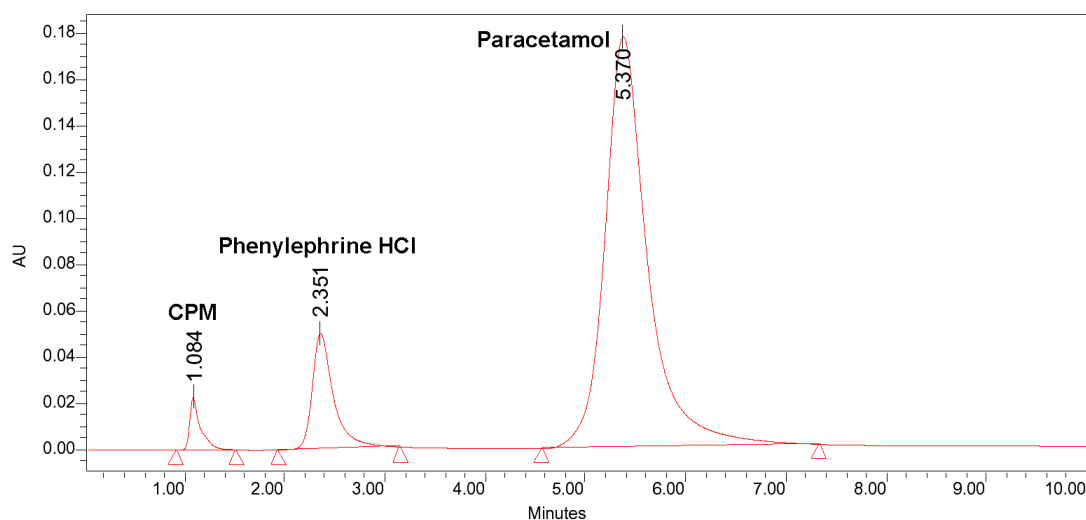
(ข) 20 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต pH 3.0 เป็นตัวชะ



(ค) 20 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต pH 6.0
เป็นตัวชะ



(ง) 20 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต pH 7.0
เป็นตัวชะ



(จ) 20 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต pH 8.0
เป็นตัวชะ

รูปที่ 4.7 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วยคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และ พาราเซตามอล ที่ความเข้มข้น 150 ppm เมื่อใช้ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ความเข้มข้น 20 mM เป็นตัวชะ (ก) pH 2.0 (ข) pH 3.0 (ค) pH 6.0 (ง) pH 7.0 และ (จ) pH 8.0 โดยใช้สภาวะ คอลัมน์ C_{18} (150 x 3.9 mm. i.d.; 5 μ m) อัตราการไหล 1.0 mLmin⁻¹ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 260 nm

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการศึกษา pH ของตัวชะ(แสดงการคำนวณในภาคผนวก ก ตารางที่ ก.6 – ก.8 หน้า 89 - 91)

pH ของตัวชะ	แฟกเตอร์ความจุ; k'			ความสามารถในการแยก; R_s		Tailing factor		
	CPM	PE	Para	PE : CPM	Para : PE	CPM	PE	Para
2.0	0.48	0.72	3.42	0.42	2.38	ND	ND	1.30
3.0	2.16	2.81	10.50	1.88	11.38	1.40	1.12	1.01
6.0	0.54	0.95	3.48	0.55	2.21	ND	ND	1.17
7.0	0	0.52	2.05	0.99	1.61	1.48	1.05	1.06
8.0	0	1.14	3.84	2.22	2.35	1.41	1.40	1.07

จากผลที่แสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า ที่ pH เท่ากับ 3.0 ให้ประสิทธิภาพการแยกสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วยพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ดีที่สุด

จากการศึกษาหาชนิดของสารละลายไอออนิกและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัว
 ะในการแยกสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน
 มาลีเอท โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง พบว่า สภาวะที่เหมาะสม
 คือ

- 1.ชนิดและความเข้มข้นของสารละลายไอออนิกที่เหมาะสม คือ สารละลาย 1-บิวทิล-3-
 เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต 20 mM
- 2.ความยาวคลื่นในการตรวจวัดที่เหมาะสมเท่ากับ 260 nm
- 3.ค่า pH ของตัวชะที่เหมาะสมเท่ากับ 3.0
- 4.อัตราการไหลของตัวชะที่เหมาะสมเท่ากับ 1 mLmin⁻¹ (ไม่ได้มีการปรับเปลี่ยนทำตาม
 งานวิจัยเดิม เนื่องจากที่อัตราการไหลนี้ ให้ค่าทางการแยกดีแล้วและค่าความดันอยู่ในช่วง 2000-
 2300 psi ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูง จึงไม่ทำการเพิ่มอัตราการไหลเนื่องจากจะทำให้ความดันของ
 คอลัมน์เพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้อายุการใช้งานของคอลัมน์น้อยลง)
- 5.ปริมาตรของสารที่ฉีด เท่ากับ 40 μ L (ไม่ได้มีการปรับเปลี่ยนเนื่องจากขนาดของ
 Sample loop เท่ากับ 20 μ L จึงทำการฉีดให้ล้น loop เพื่อให้แน่ใจว่าสารตัวอย่างเข้าไปใน loop
 เท่ากับ 20 μ L เนื่องจากอาจเกิดฟองอากาศในเข็มฉีดขณะทำการฉีดซึ่งจะทำให้ปริมาตรของสารที่
 ฉีดเข้าระบบผิดพลาดและรบกวนการตรวจวัดสัญญาณของดีเทคเตอร์ส่งผลทำให้ผลการทดลองที่
 ได้ผิดพลาดด้วย)

4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการแยกสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วยพารา- เซตามอล ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท

สภาวะที่ใช้ในการทดลอง คือ คอลัมน์ C₁₈ 150 x 3.9 mm. i.d.; 5 μ m ตัวชะ คือ
 สารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ความเข้มข้น
 20 mM pH 3.0, อัตราการไหลเท่ากับ 1 mLmin⁻¹, ปริมาตรสารที่ฉีด 40 μ L ตรวจวัดที่ความยาว
 คลื่น 260 nm และสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วยพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดร-
 คลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ซึ่งสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดมีความเข้มข้นเท่ากับ 150
 ppm แสดงผลดังในตารางที่ 4.4 (แสดงการคำนวณในภาคผนวก ก; ตารางที่ ก.9 ; หน้า 92)

ตารางที่ 4.4 แสดงประสิทธิภาพในการแยกสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วยพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอทซึ่งสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดมีความเข้มข้นเท่ากับ 150 ppm

พารามิเตอร์	CPM	PE	PARA
k'	2.16	2.81	10.50
N	4003.72	3487.55	4820.62
Tailing factor	1.40	1.12	1.01
α	1.30		3.74
R_s	1.88		11.38

ซึ่งเกณฑ์การยอมรับค่าของพารามิเตอร์ต่างๆมีดังต่อไปนี้

1. ค่าแฟกเตอร์ความจุ ในกรณีที่ระบบการชะเป็นแบบไอโซครีติกค่าแฟกเตอร์ความจุควรมีค่าอยู่ในช่วง $1 \leq k' \leq 10$ จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าค่าแฟกเตอร์ความจุของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท และฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ เท่ากับ 2.16 และ 2.81 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แต่ค่าแฟกเตอร์ความจุของพาราเซตามอล เท่ากับ 10.50 ซึ่งเป็นค่าที่เกินเกณฑ์กำหนดมาเล็กน้อยซึ่งจัดเป็นค่าที่ยังยอมรับได้

2. ค่าจำนวนเพลท(N) ควรมีค่า > 2000 จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าค่า N ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เท่ากับ 4003.72 3487.55 และ 4820.62 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

3. ค่าเทลลิงแฟกเตอร์(T) ควรมีค่า < 2 จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าค่า T ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เท่ากับ 1.40 1.12 และ 1.01 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

4. ค่าซีเลกติวิตี(Selectivity; α) ควรมีค่าอยู่ในช่วง 1.5 – 4.0 จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าค่าซีเลกติวิตีของฟีกคลอเฟนิรามีน มาลีเอทกับฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ เท่ากับ 1.30 แสดงให้เห็นว่าฟีกทั้งสองสามารถแยกออกจากกันได้ แต่เป็นค่าที่น้อยกว่าเกณฑ์อยู่เล็กน้อย ซึ่งค่าซีเลกติวิตีนี้เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าฟีกของสารสองชนิดที่อยู่ใกล้กันแยกออกจากกันดีเพียงใดซึ่งการแยกออกจากกันนี้ขึ้นกับค่าเวลาการคงไว้เท่านั้นโดยไม่คำนึงถึงความกว้างของฟีก ในทางปฏิบัติเราจะพิจารณาจากค่าความสามารถในการแยก(R_s)ร่วมด้วย ส่วนค่าซีเลกติวิตีของฟีกฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์กับพาราเซตามอล เท่ากับ 3.74 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

5. ค่าความสามารถในการแยก(R_s) ควรมีค่า ≥ 1 จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าค่าความสามารถในการแยกของฟีกคลอเฟนิรามีน มาลีเอทกับฟีนิลเอฟพรีน

ไฮโดรคลอไรด์ เท่ากับ 1.88 ส่วนค่าความสามารถในการแยกของฟิสิกัลไนลอฟฟริน ไฮโดรคลอไรด์กับพาราเซตามอล เท่ากับ 11.38 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

4.3 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

นำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากหัวข้อ 4.2 มาใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ โดยข้อมูลในการคำนวณนั้นแสดงไว้ในภาคผนวก สามารถสรุปผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังตาราง ที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

พารามิเตอร์		CPM	PE	PARA
System linearity	intercept	0	0	0
	slope	1046.8 ± 42.65	4441.6 ± 297.81	38123 ± 951.55
	R ²	0.9996	0.9999	1
	Range(μg/ml)	5-40	25-200	40-240
Method linearity	intercept	0	0	0
	slope	1046.8 ± 0	4441.6 ± 0	38123 ± 0
	R ²	1	1	1
	Range(μg/ml)	10-30	51-152	61-180
Accuracy	% Recovery	99.61±2.39(10 ppm)	99.24±1.12(50 ppm)	101.10±1.10(60 ppm)
	% Recovery	98.11±1.68(20 ppm)	98.73±1.50(100 ppm)	99.10±0.73(120 ppm)
	% Recovery	96.35±1.81(30 ppm)	98.65±1.83(150 ppm)	100.01±0.82(180 ppm)
LOD		1.52 ppm	12.47 ppm	5.37 ppm
LOQ		5.08 ppm	50.83 ppm	19.78 ppm

หมายเหตุ	System linearity แสดงการคำนวณในภาคผนวก ข หน้า 93 - 101
	Method linearity แสดงการคำนวณในภาคผนวก ค หน้า 105 - 112
	Accuracy แสดงการคำนวณในภาคผนวก จ หน้า 124 - 128
	LOD แสดงการคำนวณในภาคผนวก ง หน้า 116 - 119
	LOQ แสดงการคำนวณในภาคผนวก ช หน้า 161 - 162

4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาเม็ดลดไข้ตามท้องตลาด โดยใช้สารละลายไอออนิกเป็นตัวชะและเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้กับปริมาณยาบนฉลาก

นำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากหัวข้อ 4.2 มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาเม็ดลดไข้ตามท้องตลาด 2 ยี่ห้อ คือ ดิคอลเจน และ ทิฟฟี แต่ละยี่ห้อได้จากการเก็บตัวอย่างมา 20 เม็ด ทำ 2 ชุด แต่ละชุดวิเคราะห์ซ้ำ 6 ครั้ง แสดงผลดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการวิเคราะห์ในตัวอย่างจริง

วิธีทดสอบ	ทิฟฟี			ดิคอลเจน		
	CPM (mg/Tablet)	PE (mg/Tablet)	Para (mg/Tablet)	CPM (mg/Tablet)	PE (mg/Tablet)	Para (mg/Tablet)
ปริมาณบนฉลาก	2	7.5	500	2	10	500
(ชุดที่ 1) วิธีที่พัฒนาขึ้น (%RSD) repeatability (n = 6)	1.92±0.11	7.49±0.11	500.66±4.27	1.93 ± 0.10	9.99±0.10	498.06±4.56
	5.58	1.42	0.85	5.31	0.98	0.91

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

วิธีทดสอบ	ทีพีพี			ดีคอลเจน		
	CPM (mg/Tablet)	PE (mg/Tablet)	Para (mg/Tablet)	CPM (mg/Tablet)	PE (mg/Tablet)	Para (mg/Tablet)
ปริมาณบนฉลาก	2	7.5	500	2	10	500
(ชุดที่ 2) วิธีที่พัฒนาขึ้น (%RSD) repeatability (n = 6)	1.90 ± 0.11 5.87	7.46 ± 0.22 2.92	494.61 ± 5.89 1.19	1.93 ± 0.10 5.09	9.92 ± 0.32 3.23	491.44 ± 8.33 1.70
(ชุดที่ 1 + 2) วิธีที่พัฒนาขึ้น (% RSD) reproducibility (n = 12)	1.91 ± 0.10 5.49	7.47 ± 0.16 2.19	497.64 ± 5.83 1.17	1.93 ± 0.10 4.96	9.95 ± 0.23 2.29	494.75 ± 7.28 1.47

หมายเหตุ การวิเคราะห์หาปริมาณด้วยในตัวอย่างจริง แสดงการคำนวณในภาคผนวก จ
หน้า 152 - 164
ค่าความเที่ยง(Repeatability, Reproducibility) แสดงการคำนวณในภาคผนวก ช
หน้า 165 - 183

จากตารางที่ 4.6 สามารถสรุปได้ว่า

1. ในยาหือทีพีพีจากการทำการวิเคราะห์ชุดที่ 1 พบปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟิ-
นิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เท่ากับ 1.92 ± 0.11 (mg/Tablet), 7.49 ± 0.11 (mg/
Tablet) และ 500.66 ± 4.27 (mg/Tablet) ตามลำดับ นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับ
ปริมาณขยาบนฉลากโดยใช้หลักสถิติ Paired-t-test เป็นตัวทดสอบ ได้ค่า t จากการคำนวณ เท่ากับ
1.85, 0.27 และ 0.38 ตามลำดับ โดยค่า t จากตารางที่ระดับขั้นความเสรี($n - 1$; $6-1 = 5$) และที่
ระดับความมั่นใจ 95% มีค่าเท่ากับ 2.57 พบว่าค่า t ที่ได้จากการคำนวณน้อยกว่าค่า t จากตาราง
แสดงว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

2. ในยาหือดีคอลเจนจากการทำการวิเคราะห์ชุดที่ 1 พบปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟินิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และ พาราเซตามอล เท่ากับ 1.93 ± 0.10 (mg/Tablet), 9.99 ± 0.10 (mg/Tablet) และ 498.06 ± 4.56 (mg/Tablet) ตามลำดับ นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับ ปริมาณยาบนฉลากโดยใช้หลักสถิติ Paired-t-test เป็นตัวทดสอบ ได้ค่า t จากการคำนวณ เท่ากับ 1.68, 0.35 และ 1.04 ตามลำดับ โดยค่า t จากตารางที่ระดับชั้นความเสรี ($n - 1$; $6 - 1 = 5$) และที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่าเท่ากับ 2.57 พบว่าค่า t ที่ได้จากการคำนวณน้อยกว่าค่า t จากตาราง แสดงว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

3. ในยาหือทิฟี่จากการทำการวิเคราะห์ชุดที่ 2 พบปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟินิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และ พาราเซตามอล เท่ากับ 1.90 ± 0.11 (mg/Tablet), 7.46 ± 0.22 (mg/Tablet) และ 494.61 ± 5.89 (mg/Tablet) ตามลำดับ นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับ ปริมาณยาบนฉลากโดยใช้หลักสถิติ Paired-t-test เป็นตัวทดสอบ ได้ค่า t จากการคำนวณ เท่ากับ 2.27, 0.43 และ 2.24 ตามลำดับ โดยค่า t จากตารางที่ระดับชั้นความเสรี ($n - 1$; $6 - 1 = 5$) และที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่าเท่ากับ 2.57 พบว่าค่า t ที่ได้จากการคำนวณน้อยกว่าค่า t จากตาราง แสดงว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

4. ในยาหือดีคอลเจนจากการทำการวิเคราะห์ชุดที่ 2 พบปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟินิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และ พาราเซตามอล เท่ากับ 1.93 ± 0.10 (mg/Tablet), 9.92 ± 0.32 (mg/Tablet) และ 491.44 ± 8.33 (mg/Tablet) ตามลำดับ นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับ ปริมาณยาบนฉลากโดยใช้หลักสถิติ Paired-t-test เป็นตัวทดสอบ ได้ค่า t จากการคำนวณ เท่ากับ 1.75, 0.59 และ 2.52 ตามลำดับ โดยค่า t จากตารางที่ระดับชั้นความเสรี ($n - 1$; $6 - 1 = 5$) และที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่าเท่ากับ 2.57 พบว่าค่า t ที่ได้จากการคำนวณน้อยกว่าค่า t จากตาราง แสดงว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

5. ค่าความเที่ยง (Repeatability, Reproducibility)

ในยาหือดีคอลเจนจากการเก็บตัวอย่างมา 20 เม็ด ทำ 2 ชุด แต่ละชุดวิเคราะห์ซ้ำ 6 ครั้ง ชุดที่ 1 ($n = 6$) ได้ค่า %RSD (Repeatability) ของ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟินิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เท่ากับ 5.31 0.98 และ 0.91 ตามลำดับ ชุดที่ 2 ($n = 6$) ได้ค่า %RSD (Repeatability) ของ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟินิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เท่ากับ 5.09 3.23 และ 1.70 ตามลำดับ เมื่อนำผลการวิเคราะห์ชุดที่ 1 และชุดที่ 2 รวมกัน เพื่อหาค่า %RSD (Reproducibility; $n = 12$) ของ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟินิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล มีค่าเท่ากับ 4.96 2.29 และ 1.47 ตามลำดับ และนำค่าความเที่ยงที่ได้มา ประเมินว่าค่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้หรือไม่ โดยใช้ Horwitz equation เพื่อหาค่า Horrat จากการคำนวณดังแสดงไว้ในภาคผนวก ข พบว่า ค่า Horrat มีค่าน้อยกว่า 2 แสดงว่าค่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเที่ยงที่ยอมรับได้

ในยี่ห้อที่ฟี่จากการเก็บตัวอย่างมา 20 เม็ด ทำ 2 ชุด แต่ละชุดวิเคราะห์ซ้ำ 6 ครั้ง ชุดที่ 1 ($n = 6$) ได้ค่า%RSD(Repeatability) ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟินิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เท่ากับ 5.58 1.42 และ 0.85 ตามลำดับ ชุดที่ 2 ($n = 6$) ได้ค่า%RSD(Repeatability) ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟินิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เท่ากับ 5.87 2.92 และ 1.19 ตามลำดับ เมื่อนำผลการวิเคราะห์ชุดที่ 1 และชุดที่ 2 รวมกันเพื่อหาค่า%RSD (Reproducibility; $n = 12$) ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟินิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล มีค่าเท่ากับ 5.49 2.19 และ 1.17 ตามลำดับ และนำค่าความเที่ยงที่ได้มาประเมินว่าค่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้หรือไม่ โดยใช้ Horwitz equation เพื่อหาค่า Horrat จากการคำนวณดังแสดงไว้ในภาคผนวก ข พบว่าค่า Horrat มีค่าน้อยกว่า 2 แสดงว่าค่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้ แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนา ขึ้นนี้มีความเที่ยงที่ยอมรับได้