บทที่ 2

การวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยาแก้ปวด

คำนำ

ในสมัยปัจจุบันเรามักพบพาราเซตามอลในยาแก้ปวดที่มีขายในท้องตลาด ถึงแม้ว่ายาตัวนี้จะให้โทษน้อยกว่ายาที่มีสมบัติแก้ปวดตัวอื่น ๆ ก็ตาม แต่ยานี้ถ้าเก็บไว้นานมันจะสลายตัว ให้พารา-อะมิโนฟีนอล (p-aminophenol) ซึ่งเป็นพิษต่อผู้รับประทาน ฉะนั้นเพื่อควบคุมคุณภาพของยาแก้ปวดจึงจำเป็นต้องวิเคราะห์หาปริมาณยาดังกล่าวในยาแก้ปวดที่มีขายในท้องตลาด

การวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยามีหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีย่อมมีทั้งข้อดีและข้อเสีย การเลือกวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมจึงขึ้นอยู่กับลักษณะของงานวิจัยว่าต้องการความถูกต้องและแม่นยำเพียงใดรวมถึงความพร้อมของเครื่องมือและทุนทรัพย์ในงานวิจัยนั้น ๆ ด้วย

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลมีดังนี้คือ

1. Gravimetric method
2. Volumetric method
3. Spectrophotometric method
4. Chromatographic method
5. Polarographic method

2.1 ตัวอย่างการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลโดยเทคนิคต่าง ๆ

2.1.1 Gravimetric method

Poethke และ Köhne [8] ได้เขียนรายงานเกี่ยวกับวิธีวิเคราะห์พาราเซตามอลโดยวิธีแกรวิเมตรี (gravimetry) ซึ่งทำได้โดยนำพาราเซตามอล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำปฏิกิริยากับ 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene ในสารละลายที่มี sodium bicarbonate และ dimethylformamide อยู่ด้วย จะได้ผลผลิตเป็นตะกอนของ p-(2,4-dinitrophenoxy) acetanilide การตกตะกอนนี้ใช้เวลานานถึง 4 ชั่วโมง และให้ความแม่นยำของการวิเคราะห์ 0.3 % caffeine, phenazone, 4-aminophenazone, phenacetin และ codeine phosphate ไม่ก่อให้เกิดอุปสรรคในการวิเคราะห์พาราเซตามอลโดยใช้วิธีวิเคราะห์ดังกล่าว

2.1.2 Volumetric method

Differentiating nonaqueous titration

Blake และ Shumaker [9] ใช้เทคนิคนี้วิเคราะห์ยาผสมที่มีพาราเซตามอลและซาลิไซลาไมด์ โดยใช้เตตระบิวทิลแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (tetrabutylamonium hydroxide) เป็น titrant โดยใช้ Fisher titrimeter ซึ่งมี calomel-glass เป็น electrode

2.1.3 Spectrophotometric method

Ultraviolet-Visible spectroscopy

พาราเซตามอลมีสมบัติของฟีนอลลิก กรุ๊ป (Phenolic group) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับกรดไนตรัสได้ Chafetz และคณะ[10] จึงวิเคราะห์หาปริมาณของพาราเซตามอลโดยให้ทำปฏิกิริยากับไนตรัสแอซิด ได้สารสีเหลืองของ 2-ไนโตร-4-อะเซตตะมิโดฟีนอล (2-nitro-4-acetamidophenol) ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 nm ปฏิกิริยานี้สามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

พาราเซตามอล โดยไม่ถูกรบกวนจากฟีนาซีตินและอะเซตตะนีลิด (acetanilid) แต่สำหรับซาลิไซลาไมด์ (salicylamide) ซึ่งมีฟีนอลลิกกรุ๊ปเหมือนกันจะเกิดปฏิกิริยาซึ่งรบกวนการวิเคราะห์พาราเซตามอล

Murfin และ Wragg [11] ได้ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล และฟีนาซีตินจาก automated method[12] โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างพาราเซตามอล หรือฟีนาซีตินกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริก-โซเดียม-ไฮโปคลอไรต์ pH 3.4 และกำจัดโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่มากเกินพอโดยการเติมโซเดียมอาร์ซีไนต์ แล้วทำปฏิกิริยากับฟีนอลใน borate buffer pH 9.9 ก็จะได้สารละลายสีน้ำเงินของอินโดฟีนอล ซึ่งมีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 nm

พาราเซตามอลเมื่อถูกไฮโดรไลส์ (hydrolysed) ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง[13] จะได้ไพรมารี อะโรมาติก เอมีน (Primary aromatic amine) ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับโซเดียมไนไตร์ท (sodium nitrite) และ N-1-naphthyl ethylene-diamine dihydrochloride จะได้สารประกอบเชิงซ้อนซึ่งมีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 nm

Belal และคณะ[14] ได้วิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล โดยปฏิกิริยาคับปิ้ง (coupling) กับ diazotized o-nitroaniline ซึ่งจะได้อนุพันธ์ของอะโซ (-N=N-) มีสมบัติเป็นสาร chelate และเมื่อจับกับคอปเปอร์ (II) จะได้สารประกอบเชิงซ้อนสีเหลือง ซึ่งละลายได้ในคลอโรฟอร์มและมีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร

Sane และ Kamat[15] อาศัยหลักการวัดค่าดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนสีแดงเข้ม (crimson complex) ที่เกิดเมื่อ treat พาราเซตามอลด้วย 10 % โซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยที่ยาต่าง ๆ ไม่รบกวนวิธีนี้เป็นวิธีที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ง่าย และสามารถวัดได้ต่ำสุดถึง 25 ไมโครกรัม พาราเซตามอล/ซม^3

2.1.4 Fluorometry

fluorometry คือวิธีของเคมีวิเคราะห์แบบ physico-chemical วิธีหนึ่ง ซึ่งวัดความเข้มของแสง fluorescence ที่คายออกมาจากโมเลกุลของสารที่สนใจ หลังจากโมเลกุลนั้นได้รับพลังงานแสง UV

Kaito และคณะ[16] ใช้เทคนิคนี้วิเคราะห์หาปริมาณพารา-เซตามอลในยา โดยออกซิไดส์พาราเซตามอลด้วย potassium hexacyano-ferrate (III) ในสารละลายที่เป็นเบสที่ 0°C จะได้ 2,2'-dihydroxy-5,5'-diacetylaminobiphenyl ซึ่งให้ fluorescence สีน้ำเงินม่วง (blue violet fluorescence) โดยมี λ_{ex} = 337 nm และ λ_{em} = 425 nm และความเข้มของแสง (fluorescence intensity) ที่คายออกมาจะเพิ่มขึ้นเมื่อเติม dimethylformamide ลงไปในสารละลายที่ต้องการจะวิเคราะห์

Kaito และ Sagara[17] ยังได้ศึกษาการเกิดสาร fluores-cent จากพาราเซตามอลโดยไฮโดรไลส์พาราเซตามอลด้วยกรดไฮโดรคลอริก จะได้พารา-อะมิโนฟีนอล ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับเบนซีลลามีน (benzylamine) ที่อุณหภูมิ 75°C ในสารละลายเบสจะให้สาร fluorescent โดยมี λ_{ex} = 350 nm, λ_{em} = 490 nm ซึ่งใช้วิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยาได้

Oztunc[18] ใช้เทคนิคนี้วิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล โดยทำให้อยู่ในรูปของ dansyl derivative และนำไปศึกษาที่ λ_{ex} = 365 nm ซึ่งจะมี λ_{em} = 350 nm สัมประสิทธิ์ของการแปรผันของเทคนิคนี้มีค่าเท่ากับ 4.3 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.5 Chromatographic method

Levine และ Hohmann [19] แยกพาราเซตามอลออกจากยาโดยใช้ column chromatography ซึ่งมีซีไลท์ (celite) ผสมกับคาร์บอเนต pH 10.1 โดยใช้อีเทอร์เป็นตัวทำละลาย (solvent) นำพาราเซตามอลที่แยกออกมาไปหาปริมาณโดยวิธีสเปกโตโฟโตเมตรี

Pang และคณะ[20] ได้ศึกษาหาปริมาณของพาราเซตามอลและฟีนาซีตินใน biological fluids โดยใช้ ^{14}C-labelled phenacetin และ ^{3}H-labelled paracetamol และสกัดออกจากเลือด นำไประเหย residue ที่ได้ละลายในเมธานอลและนำไปวิเคราะห์โดยวิธี h.p.l.c. ซึ่งวิธีนี้สามารถแยกพาราเซตามอลและฟีนาซีตินออกจาก metabolites อื่น ๆ ได้ดี

Munson และ Kubiak [21] วิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลใน tablets, capsules, elixirs, suspensions และ suppositories โดยวิธี h.p.l.c. ซึ่งใช้เมธานอลหรือคลอโรฟอร์มเป็น mobile phase วิธีนี้ให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรผัน (coefficient of variation) 1.4 % และสามารถแยกเอาพารา-อะมิโนฟีนอลออกได้ด้วย

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยาแก้ปวดโดยวิธี colorimetry

2.2.1 คำนำ

เนื่องจากในยาอาจจะมีตัวยาหลักหลายชนิดอยู่ในตำรับยาเดียวกัน การทำปริมาณวิเคราะห์ของตัวยาแต่ละชนิดให้ผลถูกต้องจึงต้องวิเคราะห์ที่ functional

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

group ซึ่งเป็นส่วนที่แสดงสมบัติสำคัญทางเคมีของยาแต่ละตัว วิธีวิเคราะห์โดยทั่วไปมักจะใช้วิธีทำให้เกิดสี (colorimetry) กับสารต่าง ๆ แล้ววัดการดูดกลืนแสง (absorbance) เพื่อหาปริมาณของสาร เพราะค่าการดูดกลืนแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารตามกฎของเบียร์

2.2.2 การทดลอง

2.2.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Varian techtron Model 635 Ultraviolet-Visible Recording Spectrophotometer

ผลิตโดย Varian techtron PTY Ltd., Australia ;

1 Pen Recorder Model 135A

ผลิตโดย Matsushita Communication Industrial Co. Ltd., Japan

Condition ที่ใช้

Absorbance	0-1.0	fsd
Slit width	1.0	nm
Scan rate	50	nm/min
Chart speed	10	cm/min

เครื่องมือที่ใช้เป็นแบบ double beam

2. เครื่องแก้วต่าง ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้เป็น Analytical reagent ยกเว้นที่ระบุไว้เป็นพิเศษ ได้นำสารเคมีต่อไปนี้มาใช้ในการวิจัย โดยไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่ง

1. สารเคมีที่ผลิตโดย BDH Chemical Ltd., Poole, England
   - Hydrochloric acid HCl
   - Sodium hydroxide, NaOH
   - Chlorpheniramine Maleate, $C_{16}H_{19}ClN_2 \cdot C_4H_4O_4$, Laboratory reagent
2. สารเคมีที่ผลิตโดย E.Merck, Damstadt, Germany
   - Hydroxylamine hydrochloride (Hydroxyl ammonium chloride), $HONH_3Cl$
   - Ethanol, C_2H_5OH
   - Methanol, CH_3OH
   - Ferric chloride, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, Laboratory reagent
3. สารเคมีที่ผลิตโดย Fluka, Switzerland
   - Phenylpropanolamine, HCl, $C_9H_{13}NO.HCl$, Laboratory reagent
4. สารเคมีที่ผลิตโดย Sigma Chemical Company, U.S.A.
   - N-Acetyl-p-Aminophenol, $C_8H_9NO_2$, Laboratory reagent

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2.3 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลความเข้มข้น 2.5×10^3 ppm

ชั่งพาราเซตามอล 1.25 กรัม แล้วละลายด้วยเมธานอลจนมีปริมาตร 500 ซม^3 จะได้ stock solution เข้มข้น 2.5×10^3 ppm แล้วเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ จาก stock solution นี้โดยใช้เมธานอลเป็นตัวทำละลาย

2. การเตรียมสารละลายไฮดรอกซิลามินไฮโดรคลอไรด์ (hydroxylamine hydrochloride) 1M, 2M, 3M และ 4 M

ชั่งไฮดรอกซิลามินไฮโดรคลอไรด์ 56 กรัม ละลายน้ำกลั่นแล้วทำให้มีปริมาตร 200 ซม^3 ในขวดวัดปริมาตร จะได้สารละลายเข้มข้น 4 M ซึ่งใช้เป็น stock solution สำหรับเตรียมความเข้มข้น 1M, 2M และ 3M

3. การเตรียมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 0.4 M

ชั่งเฟอร์ริกคลอไรด์ 21.62 กรัม ละลายใน 0.1 M HCl แล้วทำให้มีปริมาตรครบ 200 ซม^3 ด้วย 0.1 M HCl ในขวดวัดปริมาตร

4. การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) 3N, 4N, 5N และ 6N

นำกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจำนวน 126 ซม^3 เติมลงในน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 ซม^3 แล้วทำให้ครบปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจะได้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 N ซึ่งใช้เป็น stock solution สำหรับเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นอื่นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) 1N, 2N, 3N, 4N และ 5N

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์มา 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วทำให้มีปริมาตรครบ 250 ซม^3 ในขวดวัดปริมาตร จะได้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5N ซึ่งใช้เป็น stock solution สำหรับเตรียมความเข้มข้นอื่น ๆ ต่อไป

2.2.2.4 การเตรียมยาตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

1) ตัวอย่างยาที่นำมาวิเคราะห์

ก. Decolgen Tablet ของ Siamerican Pharmaceutical Co.Ltd.

ใน 1 เม็ดประกอบด้วย

N-acetyl-p-aminophenol	300.0	มก
Phenylpropanolamine·HCl	12.5	มก
Chlorpheniramine Maleate	1.0	มก
Ascorbic acid	25.0	มก

ข. Paracetamol Tablet B.P. 1973 ของ Bhaesaj Somboon Bangkok ใน 1 เม็ดประกอบด้วย พาราเซตามอล 500 มก

ค. Paracetamol Tablet B.P.C. 1968 ของ B.S. Unitrade Co. Ltd. ใน 1 เม็ดประกอบด้วย พาราเซตามอล 500 มก

ง. Paracetamol Elixer B.P.C. 1973 ของ S.S.P. Laboratories ใน 5 ซม^3 ประกอบด้วย พาราเซตามอล 120 มก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จ. Beramol Syrup (Paracetamol) ของ B.M. Pharmacy Limited Partnership ใน 5 ซม^3 ประกอบด้วย พาราเซตามอล 120 มก

2) การชั่งยาตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์

นำยาตัวอย่างที่เป็นเม็ดแต่ละชนิดมาจำนวน 20 เม็ด ชั่งน้ำหนักรวมทั้ง 20 เม็ด คำนวณน้ำหนักเฉลี่ยของยา 1 เม็ด แล้วบดให้ละเอียด

Decolgen Tablet	= 0.5457	กรัม/เม็ด
Paracetamol Tablet B.P. 1973	= 1.0805	กรัม/เม็ด
Paracetamol Tablet B.P.C. 1968	= 1.0834	กรัม/เม็ด

3) การเตรียมสารละลายยาตัวอย่าง

ก. ยาเม็ด ชั่งผงยาที่บดละเอียดดีแล้วมา 0.25 กรัม ละลายด้วยเมธานอล แล้วทำให้มีปริมาตรครบ 100 ซม^3 ในขวดวัดปริมาตร กรองสารละลายยาแล้วปิเปตสารละลายยาส่วนที่กรองได้มา 10 ซม^3 ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ซม^3 ทำให้ครบปริมาตรด้วยเมธานอล

ข. ยาน้ำ ปิเปตยามา 2 ซม^3 ละลายด้วยเมธานอล แล้วทำให้มีปริมาตรครบ 100 ซม^3 ในขวดวัดปริมาตร ปิเปตสารละลายนี้มา 10 ซม^3 แล้วทำให้มีปริมาตรครบ 100 ซม^3 ด้วยเมธานอล

2.2.3 หลักการ

พาราเซตามอลมีเอไมด์ กรุ๊ป (amide group) จึงสามารถทำปฏิกิริยากับไฮดรอกซิลามินไฮโดรคลอไรด์เกิดไฮดรอกซามิก แอซิด (hydroxamic acid) ซึ่งจะจับกับเฟอร์ริกคลอไรด์ในสภาวะที่เป็นกรด เกิดสารประกอบสีม่วงแดงของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เฟอร์ริก อะซิโตไฮดรอกซาเมท (ferric acetohydroxamate) ซึ่งมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 520 nm การดูดกลืนแสงนี้ใช้เป็นหลักในการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยาได้ เนื่องจากการดูดกลืนแสงของสารที่ได้จากปฏิกิริยาเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของพาราเซตามอล

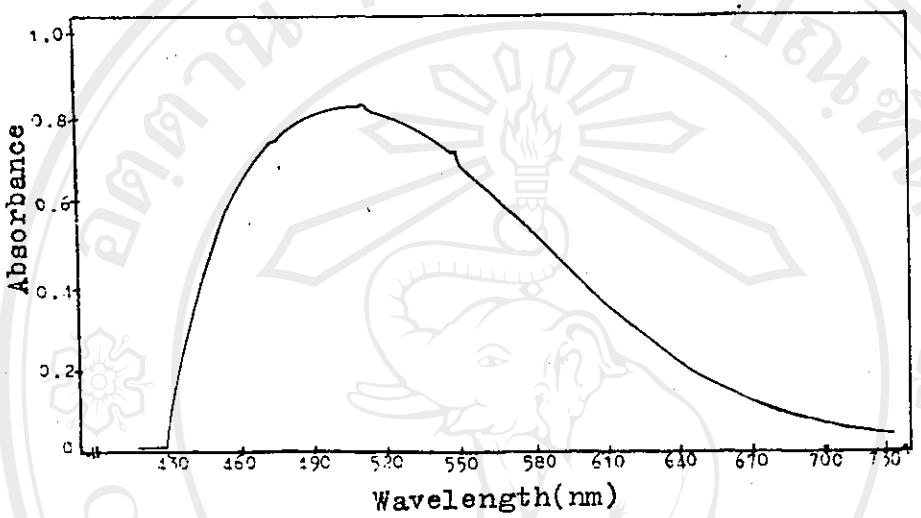
2.2.4 การทดลอง ผลการทดลอง และวิจารณ์

2.2.4.1 VIS-spectrum ของเฟอร์ริก อะซิโตไฮดรอกซาเมท

VIS-spectrum ของเฟอร์ริก อะซิโตไฮดรอกซาเมท ตามภาวะการทดลองของ Deodhar [22] คือ ปิเปตสารละลายมาตรฐานของพาราเซตามอล ความเข้มข้น 500 ppm จำนวน 2 ซม^3 ใส่หลอดสำหรับต้ม เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 N 1 ซม^3 เขย่าสารละลายตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที แล้วเติมสารละลายไฮดรอกซิลามินไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 2M จำนวน 1 ซม^3 นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที แล้วทิ้งให้เย็น เติมเมธานอล, น้ำ, กรดไฮโดรคลอริก 5N และสารละลายเฟอร์ริก คลอไรด์ เข้มข้น 0.4M จำนวน 1, 2, 1 และ 1 ซม^3 ตามลำดับ เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และทำให้สารละลายมีปริมาตรครบ 10 ซม^3 ด้วยน้ำ นำไปวัดการดูดกลืนแสงโดยวัดเปรียบเทียบกับ reagent blank

จากการทดลองปรากฏว่าได้สารละลายสีม่วงแดงของเฟอร์ริก อะซิโตไฮดรอกซาเมท ซึ่งเมื่อนำไปวัดการดูดกลืนแสงเพื่อหาความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) จะได้ absorption spectrum ดังรูป 2.1 สารประกอบที่เกิดขึ้นมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 510-515 nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 2.1 absorption spectrum ของเฟอร์ริก อะซิโตไฮดรอกซาเมท ที่ได้จากสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลความเข้มข้น 100 ppm

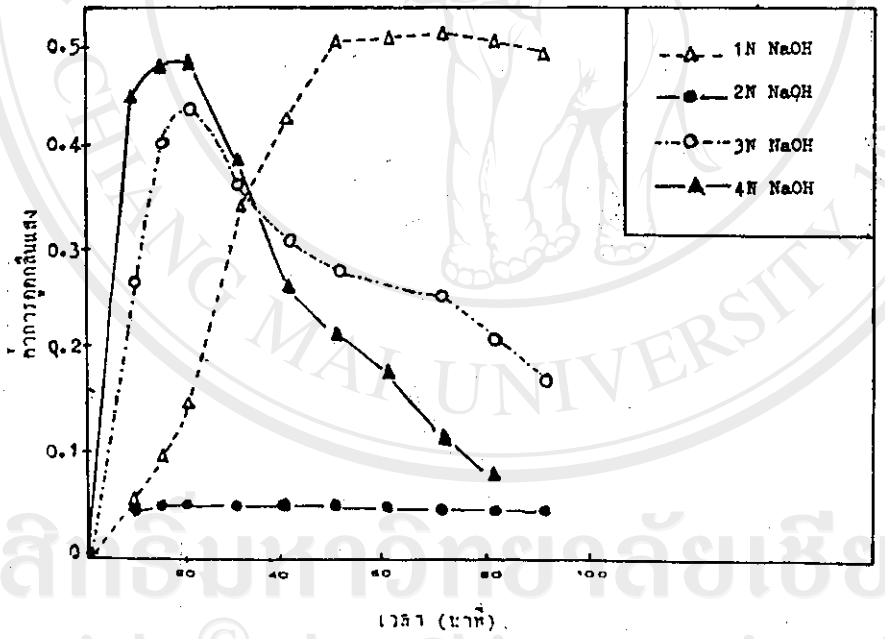
2.2.4.2 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการทดลอง

การทำปริมาณวิเคราะห์โดยวิธีใด ๆ ก็ตาม เราจำเป็นจะต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคที่เราเลือกใช้นั้นเสียก่อน เพื่อจะได้ผลการทดลองที่ถูกต้องและแม่นยำ ดังนั้นการวิเคราะห์พาราเซตามอลโดยวิธี VIS-spectroscopy จะต้องศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(ก) อิทธิพลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์และระยะเวลาในการผสมสารละลาย

ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์และระยะเวลาที่ใช้ในการผสมสารละลายอาจมีผลต่อการเกิดสารประกอบเฟอร์ริก อะซิโตไฮดรอกซาเมท ซึ่งสามารถศึกษาได้โดยดำเนินการทดลองตามหัวข้อ 2.2.4.1 โดยใช้สารละลายพาราเซตามอลเข้มข้น 500 ppm 2 ซม^3 และใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1N, 2N, 3N และ 4N และให้ระยะเวลาในการผสมสารละลายเป็น 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 นาที ได้ผลดังรูป 2.2



รูป 2.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเฟอร์ริก อะซิโตไฮดรอกซาเมทเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และระยะเวลาในการผสมสารละลายเปลี่ยนไป

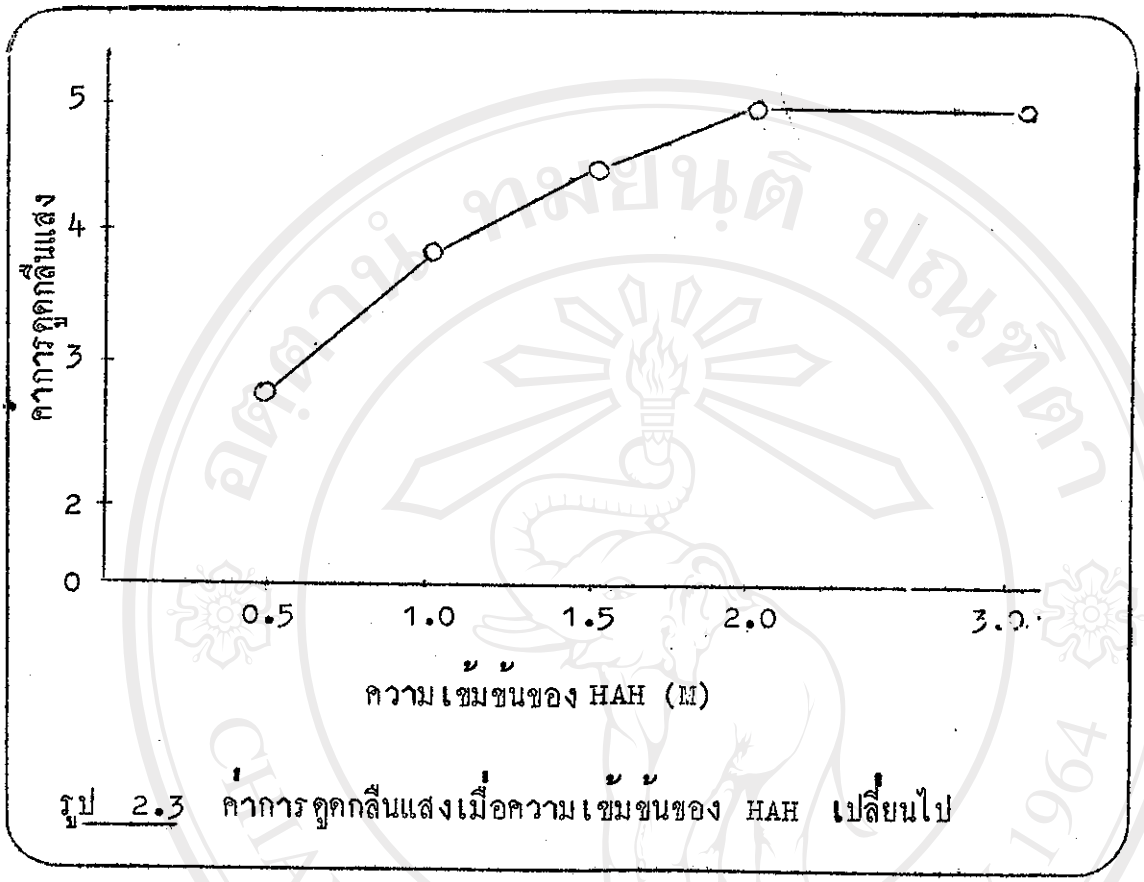
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และระยะเวลาในการต้มสารละลายพาราเซตามอลกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และสารละลายไฮดรอกซิลามิน ไฮโดรคลอไรด์มีผลต่อการเกิดกรดไฮดรอกซามิก จึงทำให้เกิดสารละลายเฟอร์ริก อะซิโตไฮดรอกซาเมทปริมาณต่างกัน ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และระยะเวลาในการต้มสารละลายผสมที่ทำให้เกิดสารละลายเฟอร์ริก อะซิโตไฮดรอกซาเมทมากที่สุดคือ ความเข้มข้น 1N ต้มเป็นเวลานาน 60-70 นาที เพราะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด และมีค่าใกล้เคียงกับเมื่อใช้ความเข้มข้น 4N ต้มเป็นเวลานาน 10-20 นาที ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะกำหนดสภาวะการทดลองที่เหมาะสมโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4N จำนวน 1 ซม^3 และต้มสารละลายผสมเป็นเวลานาน 15 นาที

(ข) <u>อิทธิพลของความเข้มข้นของไฮดรอกซิลามิน ไฮโดรคลอไรด์ (HAH)</u>

ทำการทดลองตามหัวข้อ 2.2.4.1 โดยใช้สารละลายพาราเซตามอลเข้มข้น 500 ppm 2 ซม^3 ทำการทดลองภายใต้ภาวะที่หาได้จากหัวข้อ 2.2.4.2 (ก) และสารละลาย HAH เข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2 และ 3M นำสารประกอบที่เกิดขึ้นไปวัดการดูดกลืนแสงโดยเปรียบเทียบกับ reagent blank ที่ความยาวคลื่น 512 nm ปรากฏผลดังรูป 2.3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 2.3 ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อความเข้มข้นของ HAH เปลี่ยนไป

จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารละลาย HAH มีอิทธิพลต่อการเกิดสารประกอบเฟอร์ริก อะซิโตไฮดรอกซาเมท เพราะได้ค่าการดูดกลืนแสงต่างกัน ค่าการดูดกลืนแสงจะเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วจากความเข้มข้นของ HAH 0.5-1.5 M ถ้าเกินค่าความเข้มข้นนี้แล้วค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มค่อนข้างช้าจนถึงความเข้มข้น 2 M จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ HAH ถึง 3M ค่าการดูดกลืนแสงจะเปลี่ยนน้อยมาก จะเห็นว่าความเข้มข้นของ HAH เกิน 2M เล็กน้อย ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ค่อนข้างคงที่ ความเข้มข้นของ HAH ที่เหมาะสมใช้ในการวิเคราะห์พาราเซตามอลคือ 2M

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(ค) อิทธิพลของความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก

ดำเนินการทดลองตามหัวข้อ 2.2.4.1 โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3N,4N, 5Nและ 6N จำนวน 1 ซม^3 ใช้ภาวะการทดลองที่เหมาะสมตามที่ได้ศึกษาจากหัวข้อ 2.2.4.2 (ก) และ (ข) นำสารละลายที่ได้วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 512 nm โดยวัดเทียบกับ reagent blank จากการทดลอง 2 ครั้ง ปรากฏผลดังตาราง 2.1

ตาราง 2.1 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของกรดไฮโดรคลอริก

ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (N)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย
3N	0.42
4N	0.46
5N	0.39
6N	0.39

จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกมีผลต่อการเกิดสารประกอบเฟอร์ริก อะซิโตไฮดรอกซาเมท เมื่อความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกเปลี่ยนไปค่าการดูดกลืนแสงจะต่างกัน ซึ่งความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่ทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดคือ 4N จำนวน 1 ซม^3 ซึ่งจะใช้ความเข้มข้นนี้ในการทดลองต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(ง) การศึกษาอิทธิพลของตัวทำละลาย

ตัวทำละลายอาจมีอิทธิพลต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารที่จะวิเคราะห์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการทดลองเพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับละลายพาราเซตามอล เพื่อที่จะให้ sensitivity สูงสุดซึ่งทำได้โดยดำเนินขั้นตอนการทดลองตามหัวข้อ 2.2.4.1 โดยใช้ตัวทำละลายคือ เมธานอล, เอธานอล และน้ำ และกำหนดภาวะของการทดลองคือ โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4N 1 ซม^3 ต้มสารละลายผสมเป็นเวลา 15 นาที. และใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4N 1 ซม^3 นำสารประกอบเกิดขึ้นไปวัดการดูดกลืนแสงโดยเปรียบเทียบกับ reagent blank ที่ความยาวคลื่น 512 nm ปรากฏผลดังตาราง 2.2

ตาราง 2.2 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (จากการทดลอง 2 ครั้ง) เมื่อใช้ตัวทำละลายต่างกัน

ตัวทำละลาย	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย
เมธานอล	0.45
เอธานอล	0.38
น้ำ	0.18

จากผลการทดลองพบว่า สารละลายพาราเซตามอลในตัวทำละลายที่ต่างกันจะให้ค่าการดูดกลืนแสงไม่เท่ากัน สารละลายพาราเซตามอลในเมธานอลจะได้สารประกอบที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.4.3 การศึกษา interference

เนื่องจากในยาตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์มีองค์ประกอบอื่น ๆ นอกจากพาราเซตามอลที่อาจจะมีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์ซึ่งอาจจะศึกษาได้ดังนี้

(ก) การทดสอบเบื้องต้น ทำได้โดยนำสารมาตรฐานที่เป็นองค์ประกอบในตัวยาที่นำมาวิเคราะห์คือ phenylpropanolamine . HCl และ chlorpheniramine maleate เข้มข้น 500 ppm มาดำเนินการทดลองตามภาวะการทดลองที่ได้ศึกษาแล้ว พบว่าไม่เกิดสารประกอบสีม่วงแดง และเมื่อนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 512 nm โดยวัดเทียบกับ reagent blank ปรากฏว่าได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0 แสดงว่ายา 2 ตัวนี้ไม่ทำให้เกิดสารประกอบเฟอร์ริก อะซิโตไฮดรอกซาเมท

(ข) เติมสารละลายมาตรฐาน phenylpropanolamine . HCl และ chlorpheniramine maleate ความเข้มข้นต่าง ๆ กันลงในสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลความเข้มข้น 500 ppm 1 ซม^3 ดำเนินการทดลองตามภาวะการทดลองที่ได้ศึกษาแล้ว นำไปวัดการดูดกลืนแสงโดยเปรียบเทียบกับ reagent blank ที่ความยาวคลื่น 512 nm ปรากฏผลดังตาราง 2.3-2.4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2.3 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (จากการทดลอง 2 ครั้ง) ของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล เมื่อมีสารละลายมาตรฐาน phenylpropanolamine.HCl ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้นของพาราเซตามอล (ppm)	ความเข้มข้นของ phenylpropanolamine. HCl (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย
0	20	0.000
20	0	0.063
20	20	0.060
20	40	0.055
20	60	0.045

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2.4 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (จากการทดลอง 2 ครั้ง) ของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล เมื่อมีสารละลายมาตรฐาน chlorpheniramine maleate ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของพาราเซตามอล (ppm)	ความเข้มข้นของ chlorpheniramine maleate (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย
-	20	0.000
20	-	0.063
20	20	0.060
20	40	0.060
20	60	0.060

จากผลการทดลองพบว่าถ้ามี phenylpropanolamine . HCl อยู่ในสารละลายพาราเซตามอล ตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 20 ppm จะรบกวนการวิเคราะห์พาราเซตามอล เพราะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของพาราเซตามอลลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากยาตัวนี้มีอะมิโนกรุ๊ปอยู่จึงมีสมบัติเป็นเบสอ่อน จึงทำให้สารละลายมีความเป็นกรดลดลง ซึ่งในการเกิดสารประกอบเฟอร์ริก อะซิโตไฮดรอกซาเมทขึ้นอยู่กับ pH ของสารละลายด้วย (ต้องอยู่ในสภาวะที่เป็นกรด) ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสงจึงลดลงเมื่อความเข้มข้นของ phenylpropanolamine . HCl เพิ่มขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับ chlorpheniramine maleate ในพาราเซตามอล มีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงเช่นกันแต่น้อยมาก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะยาตัวนี้เมื่ออยู่ในโซเดียมไฮดรอกไซด์[23] จะได้เบสอิสระซึ่งจะทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริกทำให้ pH ของสารละลายเปลี่ยนไปได้ ซึ่งมีผลต่อการเกิดสารประกอบเฟอร์ริก อะซิโตไฮดรอกซาเมท จึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงเมื่อมี chlorpheniramine maleate อยู่

2.2.4.4 การทำ calibration curve

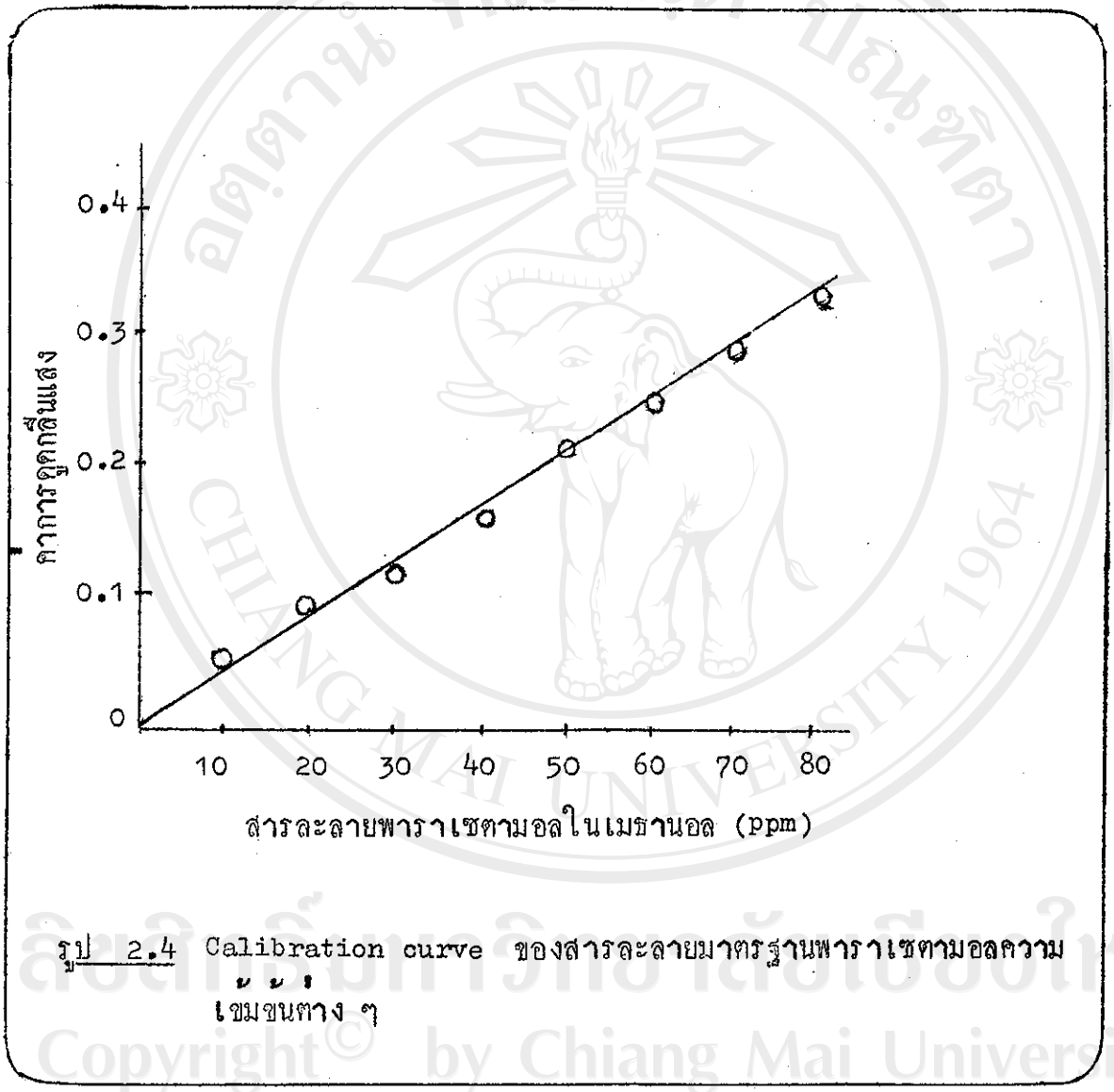
ทำ calibration graph โดยการนำสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (10-80 ppm) ทำการทดลองโดยกำหนดภาวะในการทดลอง (ซึ่งได้จากการศึกษาแล้ว) ดังนี้

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4N (1 ซม^3)
- สารละลายไฮดรอกซิลามินไฮโดรคลอไรด์ 2N (1 ซม^3)
- ระยะเวลาในการผสมสารละลาย 15 นาที
- เมธานอล 1 ซม^3
- สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 4N (1 ซม^3)
- สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 0.4N (1 ซม^3)

นำสารที่ได้วัดการดูดกลืนแสงโดยวัดเปรียบเทียบกับ reagent blank ที่ความยาวคลื่น 512 nm เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น (ppm) ต่าง ๆ ของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ดังรูป 2.4 จะเห็นว่า calibration graph จะผ่านจุดศูนย์และเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของพาราเซตามอลจาก 0-80 ppm ซึ่งจะใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

calibration curve นี้ ในการศึกษาความแม่นยำ, การหาปริมาณพาราเซตามอลในยาและความถูกต้องของการวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้



รูป 2.4 Calibration curve ของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลความเข้มข้นต่าง ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.4.5 ผลการศึกษาความแม่นยำ (precision) ของการวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์ใด ๆ ก็ตามถ้าจะใช้เป็นวิธีหลักในการวิเคราะห์จะต้องมีความแม่นยำสูง ดังนั้นเมื่อค้นพบวิธีวิเคราะห์ใด ๆ ก็ตามจำเป็นจะต้องทำการทดลองเพื่อหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์นั้น ๆ ด้วย ความแม่นยำดังกล่าวหาได้โดยนำสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลความเข้มข้น 20 ppm มาวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลตามเทคนิคนี้ภายใต้ภาวะการทดลองที่เหมาะสม แล้วทำการทดลองซ้ำกัน 10 ครั้ง (หรือมากกว่าก็ได้) ได้ผลดังตาราง 2.5 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาหา mean standard deviation และ relative standard deviation ตามวิธีทางสถิติ

ตาราง 2.5 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลเพื่อศึกษาความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง	ความเข้มข้นของพาราเซตามอลจาก calibration curve (ppm)
1	0.080	19.5
2	0.090	22.0
3	0.070	17.0
4	0.082	20.0
5	0.090	22.0
6	0.095	23.0
7	0.093	22.5
8	0.082	20.0
9	0.082	20.0
10	0.095	23.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณ

1. Mean ($\bar{X}$) จากสูตร

$$\bar{X} = \frac{x_i}{N}$$

เมื่อ X_i = ข้อมูลแต่ละค่า

N = จำนวนข้อมูลทั้งหมด

$$\bar{X} = \frac{209}{10}$$

ดังนั้น $\bar{X}$ = 20.9

2. Standard deviation (S.D.)

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \bar{X})^2}{N-1}}$$

$$= \frac{33.4}{9}$$

ดังนั้น S.D. = $\pm$ 1.93 ppm

3. Relative standard deviation (R.S.D.) หรือ coefficient of variation

$$R.S.D. = \frac{S.D. \times 100}{\bar{X}} \%$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$= \frac{\pm 1.93 \times 100}{20.9}$$

ดังนั้น R.S.D. $= \pm 9.22$ %

จะเห็นว่าการวิเคราะห์พาราเซตามอลความเข้มข้น 20 ppm โดยวิธี VIS-spectrophotometry ภายใต้ภาวะการทดลองที่เหมาะสมพบว่าได้ค่าเฉลี่ย 20.90 ppm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน $\pm$ 1.93 ppm และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ $\pm$ 9.2 % ซึ่งให้ความแม่นยำไม่สู้ดีนักทั้งนี้อาจเนื่องจากในการทดลองไม่ได้ควบคุมอุณหภูมิของน้ำเดือดที่ใช้ในการต้มสารละลายผสมพาราเซตามอล โซเดียมไฮดรอกไซด์และไฮดรอกซิลามินไฮโดรคลอไรด์ ซึ่งมีผลต่อการเกิดกรดไฮดรอกซามิก และถ้ามีไฮดรอกซิลามิน ไฮโดรคลอไรด์เหลืออยู่ก็อาจจะจับเฟอร์ริกคลอไรด์ได้ ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง ผลการวิเคราะห์แต่ละครั้งจึงแตกต่างกัน

จากข้อมูลในตาราง 2.5 ถ้าใช้วิธีทางสถิติตัดผลการทดลอง (rejection of a result) ที่ต่างจากค่าอื่น ๆ มากอย่างเด่นชัด เราอาจกระทำได้โดยใช้ Q test คือวัดข้อมูลให้มีตัวเลขเรียงลำดับจากมากไปหาน้อย ความแตกต่างระหว่างตัวเลขที่สังสัยกับค่าที่ใกล้เคียงมันที่สุดหารด้วยช่วงตัวเลขที่หาได้คือ ความแตกต่างระหว่างตัวเลขสูงสุดและตัวเลขต่ำสุด

<u>ตัวอย่าง</u> จากข้อมูลในตาราง 2.5

23.0 22.5 22.0 20.0 19.5 17.0

ถ้าเราสงสัยว่าผลการทดลองที่ได้ 17.0 จะตัดทิ้งได้หรือไม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$Q = \frac{(19.5 - 17.0)}{(23.0 - 17.0)}$$

$$= 0.17$$

นำค่า Q ที่ได้ไปเทียบกับค่า Q ในตารางแสดงค่า Q ที่ระดับความเชื่อมั่น 90 % ถ้า Q มีค่าเท่ากันหรือมากกว่าค่า Q จากตารางแล้วตัวเลขที่สงสัยสามารถตัดทิ้งได้ด้วยระดับความเชื่อมั่น 90 % จากตารางค่า Q การทดลอง 10 ครั้ง ค่า Q เท่ากับ 0.41 ซึ่งมีค่ามากกว่าค่า Q ที่คำนวณได้ แสดงว่าข้อมูลที่สงสัยนั้นตัดทิ้งไม่ได้

ถ้าเราสงสัย ผลการทดลองที่ได้ 23.0

$$Q = \frac{(23.0 - 22.5)}{(23.0 - 17.0)}$$

$$= 0.13$$

จากตารางค่า Q = 0.41 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.13 ดังนั้นจึงไม่อาจตัดผลการทดลองอันนี้ออกไปได้

2.2.4.6 <u>การศึกษาการดูดกลืนแสงของสารละลายยาตัวอย่าง 5 ชนิด</u>

จากการศึกษาในหัวข้อ 2.2.4.3 พบว่ามีสิ่งรบกวนต่อผลการวิเคราะห์ปริมาณพาราเซตามอล ดังนั้นเพื่อกำจัดปัญหานี้จึงหาปริมาณพาราเซตามอลในยาตัวอย่างโดยวิธี standard addition ซึ่งทำได้โดยใช้สารละลายยาตัวอย่าง (เตรียมตามหัวข้อ 2.2.2.4) 1 ซม^3 แล้วเติมสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (จาก 10-60 ppm) ลงไป นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

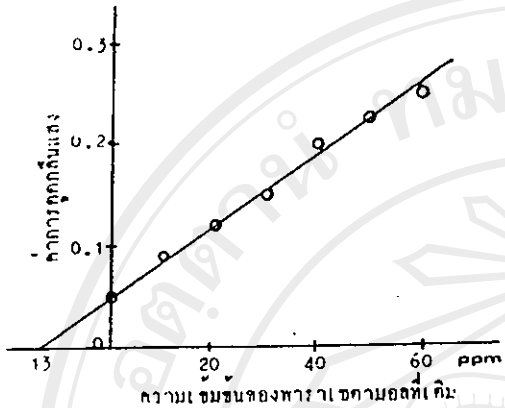
พาราเซตามอลโดยเทคนิคนี้ซึ่งกำหนดสภาวะการทดลองตามหัวข้อ 2.2.4.4 นำสารละลายที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงโดยเปรียบเทียบกับ reagent blank ที่ความยาวคลื่น 512 nm ปรากฏผลดังตาราง 2.6

ตาราง 2.6 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (จากการทดลอง 5 ครั้ง) ของสารละลายาตัวอย่างโดยวิธี standard addition

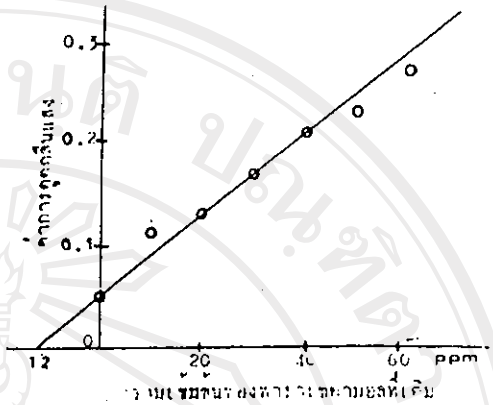
ppm of paracetamol / ชื่อยา / ที่เติม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} = 512 nm						
	0	10	20	30	40	50	60
Decolgen Tablet	0.050	0.091	0.122	0.153	0.200	0.220	0.250
Paracetamol Tablet B.P. 1973	0.050	0.220	0.137	0.179	0.210	0.231	0.272
Paracetamol Tablet B.P.C. 1968	0.040	0.075	0.111	0.145	0.180	0.215	0.260
Beramol Syrup	0.052	0.074	0.130	0.163	0.196	0.235	0.265
Paracetamol Elixer	0.045	0.086	0.125	0.161	0.205	0.210	0.270

นำค่าการดูดกลืนแสงจากตาราง 2.6 มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของพาราเซตามอล (ppm) ที่เติมลงไป ดังรูป 2.5

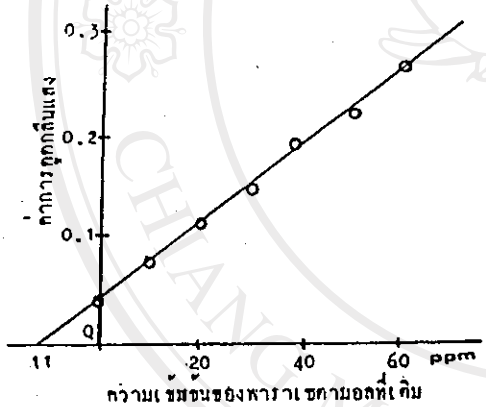
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



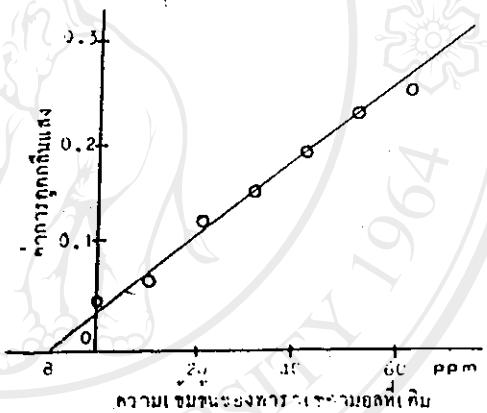
(ก)



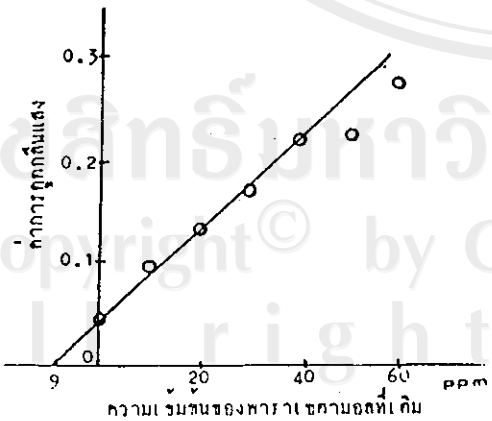
(ข)



(ค)



(ง)



รูป 2.5

Standard addition curves ของสารละลาย
ยาตัวอย่าง 5 ชนิด

(ก) Decolgen Tablet
(ข) Paracetamol Tablet B.P. 1973
(ค) Paracetamol Tablet B.P.C. 19[illegible]
(ง) Berwasol Syrup
(จ) Paracetamol Elixer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.4.7 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยาแก้ปวด โดยวิธี colorimetry

จากรูป 2.5 ตำแหน่งที่เส้นกราฟตัดแกนนอนคือ ความเข้มข้นของพาราเซตามอล (ppm) ในยาตัวอย่าง นำค่านี้มาคำนวณหาปริมาณพาราเซตามอลในยาแก้ปวด 1 กรัม เปรียบเทียบกับการหาโดยวิธี conventional ปรากฏผลดังตาราง 2.7

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2.7 ปริมาณพาราเซตามอลในยาแก้ปวดที่วิเคราะห์โดย conventional method และ standard addition method

ชื่อยา / ปริมาณพาราเซตามอลที่ได้จาก	conventional method		standard addition method	
	ความเข้มข้น (ppm)	ความเข้มข้น (มก/กรัม)	ความเข้มข้น (ppm)	ความเข้มข้น (มก/กรัม)
Decolgen Tablet	12.50	500	13.00	520
Paracetamol Tablet B.P. 1973	12.50	500	12.00	480
Paracetamol Tablet B.P.C. 1968	10.00	400	11.00	440
Beramol Syrup	12.50	62.5 มก/ซม^3	8.00	40 มก/ซม^3
Paracetamol Elixer	9.80	49.0 มก/ซม^3	9.00	45 มก/ซม^3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยาแก้ปวดโดย conventional method และ standard addition method พบว่าให้ค่าแตกต่างกัน ทั้งนี้เพราะวิธีแรกเป็นการนำสารละลายยาตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลโดยตรง ซึ่งอาจจะมีองค์ประกอบในยารบกวนผลการวิเคราะห์ได้ ส่วนวิธี standard addition เป็นการวิเคราะห์ที่กำจัดปัญหาพวก matrix ต่าง ๆ ในสารละลาย ดังนั้นเมื่อไม่ได้กำจัดสิ่งรบกวนในยาตัวอย่าง หรือไม่ทราบว่ามีอะไรอยู่ในยาตัวอย่างบ้างก็ควรใช้วิธี standard addition จะให้ผลดีกว่า

2.2.4.8 <u>การศึกษาความถูกต้อง (accuracy) ของการวิเคราะห์</u>

การหาความถูกต้องในรูป percentage recovery ทำโดยการเติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนลงในสารละลายยาตัวอย่างแล้ววิเคราะห์หาปริมาณของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไปซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. นำสารละลายตัวอย่างมาจำนวนหนึ่ง นำไปวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลที่มีอยู่ โดยวิธี colorimetry ได้ผลดังตาราง 2.7

2. เติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบปริมาณพาราเซตามอลที่แน่นอน (10-60 ppm) ลงไปในสารละลายยาตัวอย่างที่มีปริมาตรเท่ากับที่ใช้ในข้อ 1 แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลโดยใช้เทคนิคเดียวกัน ได้ผลดังตาราง 2.8-2.12

3. นำปริมาณพาราเซตามอลที่หาได้ในข้อ 2 ลบด้วยปริมาณพาราเซตามอลที่หาได้ในข้อ 1 จะได้ปริมาณของพาราเซตามอลของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลที่หาได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. นำปริมาณของพาราเซตามอลของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ที่หาได้จากข้อ 3 หารด้วยปริมาณพาราเซตามอลของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป แล้วคูณผลที่ได้ด้วย 100 ก็จะเป็น percentage recovery ของเทคนิคนี้

ตัวอย่างการคำนวณ

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{paracetamol found (ppm)} \times 100}{\text{paracetamol taken (ppm)}}$$

จากตัวอย่างยา Paracetamol Tablet ในตาราง 2.9 เมื่อเติมสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล 10 ppm ลงในสารละลายยา จากการวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้หาปริมาณพาราเซตามอลได้ 10 ppm หา % recovery ได้ดังนี้

$$\% \text{ recovery} = \frac{10 \text{ (ppm)}}{10 \text{ (ppm)}} \times 100$$

$$= 100$$

2.2.4.9 การหา percentage error

นำปริมาณพาราเซตามอลของสารละลายมาตรฐานที่หาได้ในข้อ 3 ไปลบออกจากปริมาณพาราเซตามอลที่เติมลงไปแล้วหารด้วยปริมาณพาราเซตามอลของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป คูณด้วย 100 จะได้ % error ของการวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณ

$$\% \text{ error} = \frac{\text{paracetamol taken-paracetamol found x 100}}{\text{paracetamol taken}}$$

ตัวอย่างการคำนวณ

จากตัวอย่างยา Decolgen Tablet ในตาราง 2.8 เมื่อเติมสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล 20 ppm ลงในสารละลายยา จากการวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้หาปริมาณพาราเซตามอลในยาได้ 17 ppm หา % error ได้ดังนี้

$$\% \text{ error} = \frac{(20-17)}{20} \times 100$$

$$= 15$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2.8 ค่า percentage recovery และ percentage error ของยา Decolgen Tablet

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลที่เติม (ppm)	ความเข้มข้นของพาราเซตามอล*รวมจาก calibration curve (ppm)	ความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่พบ (ppm)	% recovery	% error
0.00	13.00	13.00	-	-
10.00	21.00	8.00	80	20
20.00	30.00	17.00	85	15
30.00	38.50	25.50	85	15
40.00	47.00	34.00	85	15
50.00	56.00	43.00	86	14
60.00	64.00	51.00	85	15
		ค่าเฉลี่ย	84.33	15.67

* = พาราเซตามอลในยาตัวอย่างรวมกับพาราเซตามอลที่เติมลงไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2.9 ค่า percentage recovery และ percentage error ของยา Paracetamol Tablet B.P. 1973

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลที่เติม (ppm)	ความเข้มข้นของพาราเซตามอล *รวมจาก calibration curve (ppm)	ความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่พบ (ppm)	% recovery	% error
0	12	12	-	-
10	22	10	100	-
20	32	20	100	-
30	42	30	100	-
40	52	40	100	-
50	62	50	100	-
60	72	60	100	-
		ค่าเฉลี่ย	100	-

* = พาราเซตามอลในยาตัวอย่างรวมกับพาราเซตามอลที่เติมลงไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2.10 ค่า percentage recovery และ percentage error ของยา Paracetamol Tablet B.P.C. 1968

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลที่เติม (ppm)	ความเข้มข้นของพาราเซตามอล *รวมจาก calibration curve	ความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่เติม (ppm)	% recovery	% error
0	11	11	-	-
10	19	18	80	20
20	29	18	90	10
30	38	27	90	10
40	46.5	35.5	88.75	11.25
50	56	45	90	10
60	65	54	90	10
		ค่าเฉลี่ย	88.35	11.88

* = พาราเซตามอลในยาตัวอย่างรวมกับพาราเซตามอลที่เติมลงไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2.11 ค่า percentage recovery และ percentage error ของยา Beramol Syrup

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลที่เติม (ppm)	ความเข้มข้นของพาราเซตามอล* รวมจาก calibration curve (ppm)	ความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่พบ (ppm)	% recovery	% error
0	8.00	8.00	-	-
10	18.50	10.50	105.00	-5.00
20	30.00	22.00	110.00	-10.00
30	40.00	32.00	106.67	- 6.67
40	50.00	42.00	105.00	- 5.00
50	60.00	52.00	104.00	- 4.00
60	71.00	63.00	105.00	- 5.00
		ค่าเฉลี่ย	105.95	- 5.95

* = พาราเซตามอลในยาตัวอย่างรวมกับพาราเซตามอลที่เติมลงไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2.12 ค่า percentage recovery และ percentage errorของยา Paracetamol Elixer

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลที่เติม (ppm)	ความเข้มข้นของพาราเซตามอล *รวมจาก calibration curve (ppm)	ความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่พบ (ppm)	% recovery	% error
0	9.00	9.00	-	-
10	20.50	11.50	115.00	-15.00
20	30.00	21.00	105.00	- 5.00
30	41.00	32.00	107.00	- 7.00
40	52.00	43.00	108.00	- 8.00
50	62.00	53.00	106.00	- 6.00
60	73.50	64.50	108.00	- 8.00
		ค่าเฉลี่ย	108.17	- 8.17

* = พาราเซตามอลในยาตัวอย่างรวมกับพาราเซตามอลที่เติมลงไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากผลการหา % recovery ในตาราง 2.8-2.12 พบว่ายาตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์มีค่า % recovery ต่าง ๆ กัน Decolgen Tablet % recovery มีค่าเท่ากับ 84.33 ซึ่งมีค่าน้อย อาจจะเนื่องจากองค์ประกอบในยาคือ phenylpropanolamine. HCl และ chlorpheniramine maleate ซึ่งพบว่าจะรบกวนการวิเคราะห์พาราเซตามอลในยา (จากการทดลองตามหัวข้อ 2.4.3) จึงทำให้วิเคราะห์หาพาราเซตามอลได้น้อยกว่าความเป็นจริง Paracetamol Tablet B.P. 1973 มีค่า % recovery เท่ากับ 100 ซึ่งแสดงว่าการวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้สามารถหาพาราเซตามอลกลับคืนได้เท่ากับที่เติมลงไปจริง จึงคาดว่าในการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยานี้น่าจะมีความถูกต้องสูงด้วย สำหรับ Paracetamol Tablet B.P.C. 1968 มีค่า % recovery ใกล้เคียงกับยา Decolgen คือเท่ากับ 88.35 ซึ่งมีความผิดพลาด (% error) ประมาณ 11 % ซึ่งถือว่ามีค่าค่อนข้างสูง ทั้งนี้อาจเนื่องจากองค์ประกอบในยารวมทั้งสารที่มีสีในยา (ยานี้มีสีส้ม) ซึ่งได้แก้ปัญหานี้โดยเตรียมสารละลายยาเจือจางมาก ๆ แต่อาจมีผลรบกวนต่อการทำปริมาณวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้ Beramol Syrup และ Paracetamol Elixer มีค่า % error ใกล้เคียงกันคือ 105.95 และ 108.17 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่า 3 ตัวอย่างที่กล่าวมาแล้วคือหาปริมาณพาราเซตามอลกลับคืนได้มากกว่าที่เติมลงไปจริง ทำให้ผลการทำปริมาณวิเคราะห์ผิดพลาดประมาณ 5-9 % ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากเหตุผลทำนองเดียวกันคือ สิ่งรบกวนที่มีอยู่ในยาได้แก่ องค์ประกอบอื่น ๆ นอกจากพาราเซตามอลและสีที่มีอยู่ในยา ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าในการหาปริมาณพาราเซตามอลในยาแต่ละชนิด โดยเทคนิคนี้ย่อมมีถูกต้องแตกต่างกัน วิธีแก้ปัญหาการรบกวนของ matrix ต่าง ๆ ทำได้โดยการทำ standard addition

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยาแก้ปวดโดยวิธี Spectrofluorometry

2.3.1 คำนำ

spectrofluorometry เป็นเทคนิคที่ใช้กันทั่วไปในการวิเคราะห์หาปริมาณยา (16), (17) ใช้เทคนิคนี้วิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยา โดยออกซิไดส์พาราเซตามอลทำให้ได้สาร เมื่อกระตุ้นด้วยแสงที่เหมาะสมจะคายแสงออกมาซึ่งใช้ในการหาปริมาณสารได้ นอกจากนี้ (24) ก็ใช้เทคนิคนี้วิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยาแก้ปวด โดยใช้ $K_3Fe(CN)_6$ เป็นตัวออกซิไดส์

spectrofluorometry เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่สำคัญวิธีหนึ่ง เพราะมี sensitivity ดี และ selective สามารถใช้วัดความเข้มข้นได้ต่ำมากถึง ppb ด้วยเหตุนี้จึงใช้เทคนิคนี้ในการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยาแก้ปวดโดยใช้เครื่องมือในการศึกษาแบบเดียวกับการทดลองของ (24)

2.3.2 การทดลอง

2.3.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Aminco-Bowman Ratio Spectrophotofluorometer, 115 V 50 Hz, X-Y recorder, 115 V/50-60 Hz ; Recorder paper ; transformer ของบริษัท American Instrument Company Division of Travenol Laboratories, Inc., 8030 Georgia Avenue, Silver Spring, Maryland 20910

Conditions ที่ใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Slit 4	=	2.0	มม
Sensitivity Vernier (5 V)	=	0	
PM-tube high voltage	=	700	volts
Scan speed	=	250	nm/min

2. เครื่องฉายแสง Ultraviolet 366, 254 nm Fluotest 406 AC, Original HANAU, Quarzlampen GMBH, Germany

2.3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้เป็น Analytical reagent ยกเว้นที่ระบุไว้เป็นพิเศษ ได้นำสารเคมีต่อไปนี้มาใช้ในการวิจัย โดยไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่ง

1. สารเคมีที่ผลิตโดย BDH Chemical Ltd., Poole, England

- Hydrochloric acid, HCl
- Boric acid, H_3BO_3
- Quinine sulfate dihydrate, $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2H_2SO_4.2H_2O$
- Dimethylformamide, Laboratory reagent, $HCON(CH_3)_2$
- Sodium carbonate, Na_2CO_3

2. สารเคมีที่ผลิตโดย E.Merck, Damstadt, Germany

- Ethanol, C_2H_5OH
- Methanol, CH_3OH

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Potassium chloride, KCl
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethane $C_4H_{11}NO_3$

3. สารเคมีที่ผลิตโดย Prolabo, France
- Potassium permanganate, $KMnO_4$

4. สารเคมีที่ผลิตโดย Riedel de Haen, Germany
- L(+)-Ascorbic acid, $C_6H_8O_6$

5. สารเคมีที่ผลิตโดย Sigma Chemical Company, U.S.A.
- N-Acetyl-p-Aminophenol(Paracetamol)

2.3.2.3 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลความเข้มข้น 2.5×10^3 ppm เตรียมเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.2.2.1 โดยใช้เอชานอลเป็นตัวทำละลาย

2. การเตรียมสารละลายโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนต (potassium permanganate) 0.001 %, 0.003 %, 0.005 %, 0.007 % และ 0.010 %

ละลายโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนต 0.010 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วทำให้มีปริมาตรครบ 100 ซม^3 ในขวดวัดปริมาตร 100 ซม^3 จะได้สารละลายโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนตความเข้มข้น 0.010 % ซึ่งใช้เป็น stock solution สำหรับเตรียมสารละลายโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนตความเข้มข้น 0.001 %, 0.003 %, 0.005 % และ 0.007 % ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การเตรียมสารละลายกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) 0.10 %, 0.25 %, 0.35 %, 0.45 % และ 0.55 %

ละลายกรดแอสคอร์บิก 0.55 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วทำให้มีปริมาตรครบ 100 ซม^3 ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ซม^3 จะได้สารละลายกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 0.55 % ซึ่งใช้เป็น stock solution สำหรับเตรียมสารละลายกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 0.10 %, 0.25 %, 0.35 %, 0.45 % ต่อไป

4. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.8, 7.8, 8.2, 8.4, 8.6, 8.8 และ 9.2 ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M H_3BO_3, KCl และ Na_2CO_3

ชั่งกรดบอริก (boric acid) และโปตัสเซียมคลอไรด์ (Potassium Chloride) มาจำนวน 1.24 และ 1.49 กรัม ตามลำดับ ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับ pH ของสารละลายผสมนี้ตามที่ต้องการโดยใช้สารละลาย 0.2 โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) ทำสารละลายบัฟเฟอร์ให้มีปริมาตรครบ 100 ซม^3 ด้วยน้ำกลั่น

5. การเตรียมสารละลาย 0.1 M tris buffer pH 6.8, 7.8, 8.2, 8.4, 8.6, 8.8 และ 9.2

ชั่ง tris(hydroxymethyl)-aminomethane 1.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับ pH ของสารละลายนี้ให้มี pH ตามที่ต้องการโดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (0.1 M) ทำสารละลายบัฟเฟอร์ให้มีปริมาตรครบ 100 ซม^3 ด้วยน้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.2.4 การเตรียมสารละลายยาตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ยาตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์เป็นชนิดเดียวกับหัวข้อ 2.2.2.4

ก. ยาเม็ด

ชั่งผงยามา 0.10 กรัม ละลายในเมธานอลทำให้มีปริมาตรครบ 50 ซม^3 ในขวดวัดปริมาตร กรองสารละลายยา ปิเปตสารละลายยาส่วนที่กรองได้มา 2 ซม^3 ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ซม^3 ทำให้ครบปริมาตรด้วยเมธานอล

ข. ยาน้ำ

ปิเปตยามา 5 ซม^3 ละลายด้วยเมธานอลแล้วทำให้มีปริมาตรครบ 50 ซม^3 ปิเปตสารละลายนี้มา 1 ซม^3 ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ซม^3 ทำให้ครบปริมาตรด้วยเมธานอล

2.3.2.5 การเตรียมสารละลายยาผสม (synthetic mixes)

เตรียมได้จากการนำสารมาตรฐานมาจำนวนเท่ากับที่ระบุไว้ในยาตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ สารละลายยาผสมที่เตรียมมี 3 ตัวอย่าง ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้คือ

sample 1 นำสารมาตรฐานพาราเซตามอล, phenylpropanolamine·HCl, chlorpheniramine maleate และกรดแอสคอร์บิก จำนวน 0.3, 0.0125, 0.001 และ 0.25 กรัม ตามลำดับ ละลายในเมธานอลทำให้มีปริมาตรครบ 100 ซม^3 ด้วยเมธานอล แล้วปิเปตสารละลายนี้มา 2 ซม^3 ทำให้มีปริมาตรครบ 100 ซม^3 ด้วยเมธานอล

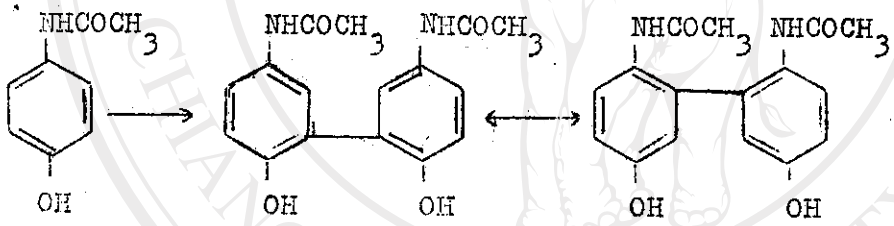
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

sample 2 นำสารมาตรฐานพาราเซตามอล 0.5 กรัม มาดำเนินการเช่นเดียวกับ sampos 1

sample 3 นำสารมาตรฐานพาราเซตามอล 0.12 กรัม มาดำเนินการเช่นเดียวกับ sample 1

2.3.3 หลักการ

เมื่อนำพาราเซตามอลมาออกซิไดส์ (oxidise) ด้วย $K_3Fe(CN)_6$ [16] ในสารละลายที่เป็นเบส จะทำให้เกิดสาร fluorescent คือ 2,2'-dihydroxy-5,5'-diacetylaminobiphenyl ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นแทนด้วยสมการ (2.1)



(2.1)

เมื่อหลังจากนำไปฉายแสงซึ่งมีความยาวคลื่น 337 nm และจะคายแสงออกมาที่ความยาวคลื่น 425 nm นั่นคือ λ_{ex} ที่ 337 nm และ λ_{em} ที่ 425 nm เมื่อ λ_{ex} = excitation wavelength และ λ_{em} = emission wavelength

ปฏิกิริยานี้ใช้เป็นหลักในการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลโดยวิธี spectrofluorimetry ได้ ซึ่งอาศัยความสัมพันธ์ที่ derived มาจาก Beer's law ซึ่งแสดงให้ทราบว่าความเข้มของ fluorescence ที่โมเลกุลคายออกมาจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้น หรือปริมาณของสารในสารตัวอย่าง ดังสมการ 2.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$F = \Phi I_0(1-e^{-\epsilon bC}) \quad \text{..... (2.2)}$$

เมื่อ Φ = quantum yield

I_0 = incident radiation power

ϵ = molar absorptivity

b = path length ของ cell

C = molar concentration

F = fluorescence intensity

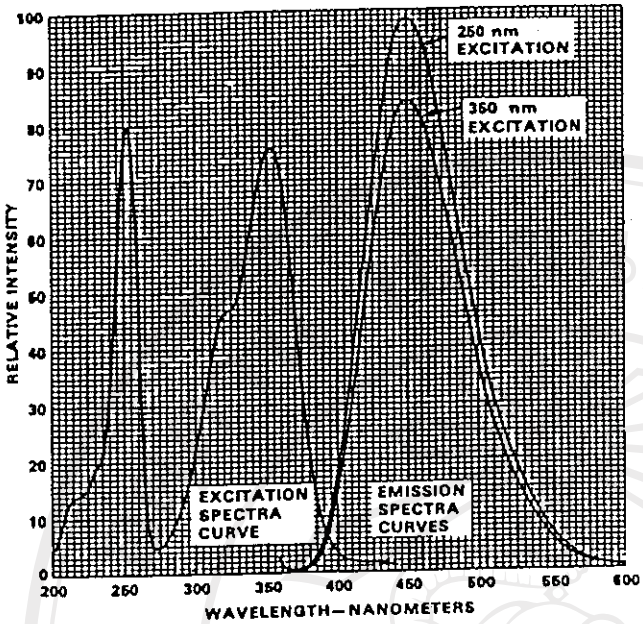
ในการทดลองนี้ได้อาศัยหลักการที่กล่าวแล้วข้างต้นเพื่อศึกษาวิธีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณของพาราเซตามอลโดยวิธี spectrofluorimetry โดยเปลี่ยนตัวออกซิไดส์เป็นโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนต และคาดว่าจะเกิดสารซึ่งเรืองแสงได้และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเช่นเดียวกับที่กล่าวแล้วข้างต้น

2.3.4 วิธีการทดลอง, ผลการทดลอง และวิจารณ์

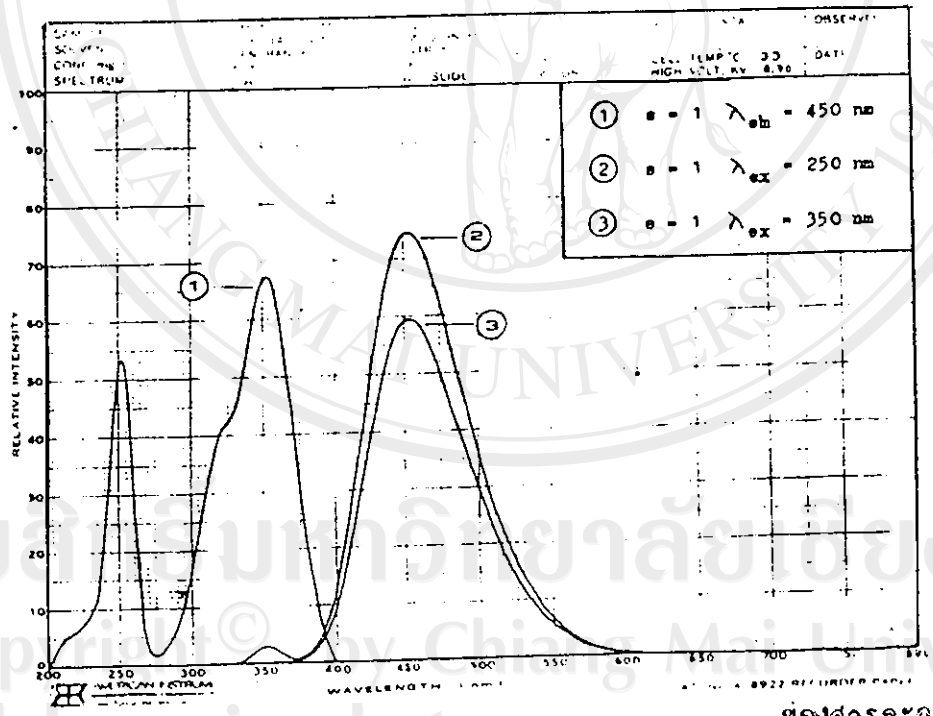
2.3.4.1 ผลการทดลองเพื่อเช็คความยาวคลื่น และ relative intensity

โดยใช้สารละลายมาตรฐาน quinine sulfate dihydrate (QSD) เข้มข้น 1.0 ppm ในสารละลายกรดซัลฟูริกซึ่งมีความเข้มข้น 0.1 N spectrum ที่ได้ควรจะมีลักษณะเหมือนรูป 2.6 แต่ relative intensity อาจจะต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสิ่งต่าง ๆ เช่น sensitivity, H.V.control, λ_{em}, อุณหภูมิ และ sensitivity vernier แต่การทดลองนี้ calibration curves มีไว้สำหรับดูลักษณะ excition และ emission spectrums ซึ่งก่อนใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 2.6
Calibration Curve ที่ได้จาก operator's manual ของเครื่อง Aminco-Bowman SPF.



รูป 2.7 Excitation และ emission spectrum ของสารละลาย QSD ใน 0.1 N H_2SO_4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เครื่องทุกครั้ง หลังจากจุด source แล้วจะต้องดูลักษณะ spectrum ของ QSD ก่อนให้มีลักษณะดังกล่าว

การทดลองทำได้โดยนำ 1.0 ppm QSD ใน 0.1 N H_2SO_4 ไปศึกษา excitation spectrum โดยตั้ง λ_{em} ไว้ที่ความยาวคลื่น = 450 nm (เพื่อเป็นการเปิดทางออกให้แสงที่ fluoresce ออกมา), S(sensitivity) = 1 ส่วน λ_{ex} scan จาก 200-800 nm จะได้ excitation spectrum (1) ในรูป 2.7 หลังจากนั้นใช้ความยาวคลื่น (λ_{ex}) ที่ 250 และ 350 nm เป็นลำแสงในการ excite สารละลาย ส่วน λ_{em} scan จาก 200-800 nm จะได้ emission spectrums (2) และ (3) ตามลำดับในรูป 2.7

จากรูปที่ 2.6 และ 2.7 จะพบว่าในรูป 2.6 มี $\lambda_{ex}(max)$ จากการทดลอง (รูป 2.7) $\lambda_{em}(max)$ จะต่างไปประมาณ 2.5 nm ที่ 250 nm และ 350 nm และ $\lambda_{em}(max)$ จะต่างไปประมาณ 2.5 nm ที่ 450 nm เช่นกัน ทั้งที่ได้ set λ_{ex} และ λ_{em} ไว้ตรง 200-800 nm ซึ่งเป็นผลทำให้ λ_{em} ที่ 450 nm เปลี่ยนไปด้วยเป็น $\lambda_{em}(max)$ ที่ 452.5 nm

ถ้าใช้ λ_{em} = 250 nm เป็นแสง excite จะได้ spectrum (2) มี relative intensity (R) สูงกว่าแสงที่ excite ถ้าใช้ λ_{ex} = 350 nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จะได้ spectrum ③ ซึ่งมี relative intensity สูงกว่าแสงที่ excite เช่นกัน และมีค่าสูงกว่าเมื่อใช้แสงที่ 250 nm excite ,ตรงกับรูปที่ 2.6

จากผลการทดลองแสดงว่าเครื่องมือมีความยาวคลื่นตรงตาม specification ที่กำหนดไว้ จึงสามารถนำไปศึกษา fluorescence spectra ของสารละลายต่าง ๆ ในงานวิจัยโดยเทคนิคนี้ได้ ซึ่งก่อนใช้เครื่องทุกครั้งหลังจากจุด source แล้วจะต้องดูลักษณะ spectrum ของ QSD ก่อนให้มีลักษณะดังกล่าวมาแล้ว

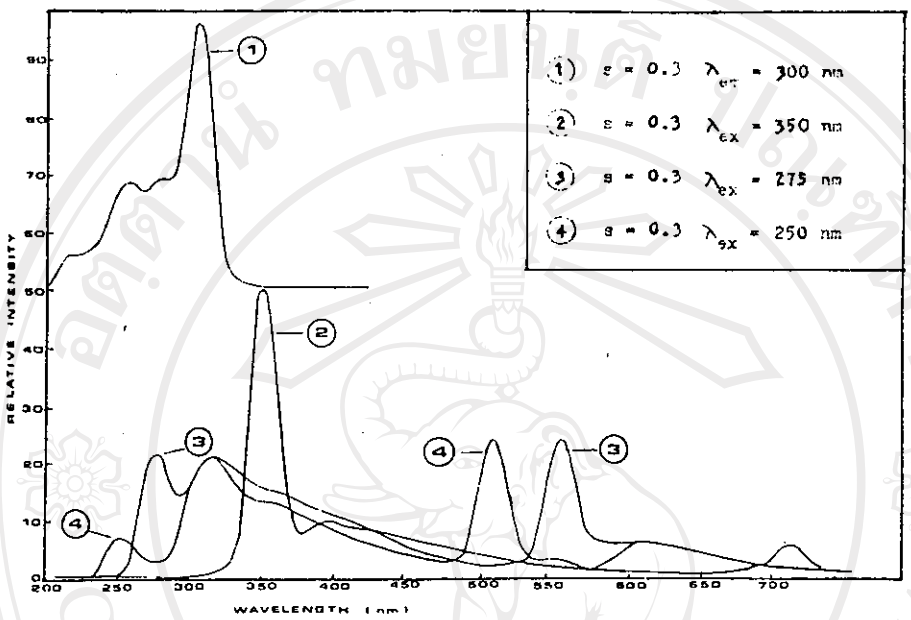
2.3.4.2 <u>การศึกษา fluorescence spectrum ของตัวทำละลายต่าง ๆ</u>

การ run fluorescence spectrum ของสารที่สนใจใด ๆ ก็ตามจะต้องเลือกใช้ตัวทำละลายที่ไม่ให้ spectrum ที่ซ้อนทับกับ spectrum ของสารที่เราต้องการจะศึกษา ซึ่งในการทดลองนี้มีปัญหาเนื่องจากไม่ทราบว่าตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลองนี้เมื่อ excite ด้วยลำแสงจะมีการคายแสงออกมาหรือไม่ ดังนั้นจะต้องทำการทดสอบโดยปรับ λ_{ex} และ λ_{em} ที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสมแล้วศึกษา excitation และ emission spectrum ของตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลอง

(1) <u>เอทานอล</u> (CH_3CH_2OH), AR grade

นำเอทานอลมาศึกษา excitation spectrum โดย S = 0.3, λ_{em} = 300 nm λ_{ex} ตั้งที่ 200-800 nm ได้ลักษณะ excitation spectrum ① ดังรูปที่ 2.8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



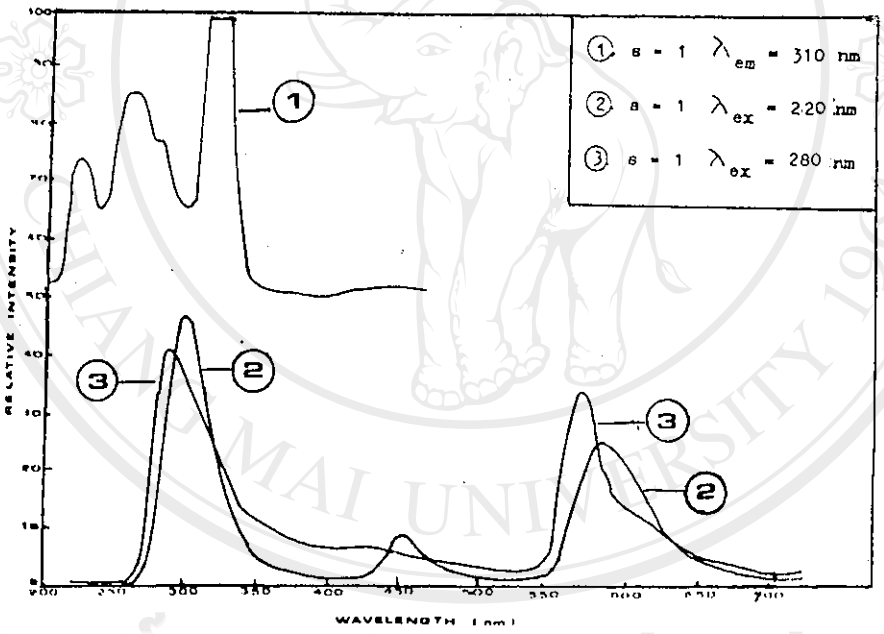
รูป 2.8 spectrum ของ ethanol โดยเปลี่ยนทั้ง λ_{ex} และ λ_{em}

จากรูป 2.8 excitation spectrum (1) พบว่ามี peak ที่ 300 nm เป็นความยาวคลื่นเดียวกับ λ_{em} แสดงว่า peak นี้มีผลมาจาก Rayleigh scattering เมื่อทดลอง run emission ดูโดยใช้ λ_{ex} = 350 nm ปรากฏว่าได้ emission spectrum (2) ที่ความยาวคลื่นเดียวกันกับ λ_{ex} จากนั้นทดลองเปลี่ยน λ_{ex} ไปเป็น 250 และ 275 nm พบว่า emission spectrum (4), (3) ที่ใกล้ ๆ 500 และ 550 nm มี R สูงพอสมควร แต่ shift ไปเรื่อยขณะที่เปลี่ยนค่า λ_{ex} แสดงว่าไม่มี fluorescence เพราะไม่มีความยาวคลื่นที่แน่นอน ดังนั้นจึงใช้เอธานอลเป็นตัวทำละลายในการศึกษา fluorescence

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(2) <u>เมธานอล</u> (CH_3OH), AR grade

นำเมธานอลศึกษา excitation spectrum โดย S = 1 , λ_{em} = 310 nm λ_{ex} ตั้งที่ 200-800 nm ได้ลักษณะ excitation spectrum (1) ดังรูปที่ 2.9



<u>รูป 2.9</u> spectrum ของ methanol โดยเปลี่ยนทั้ง λ_{ex} และ λ_{em}

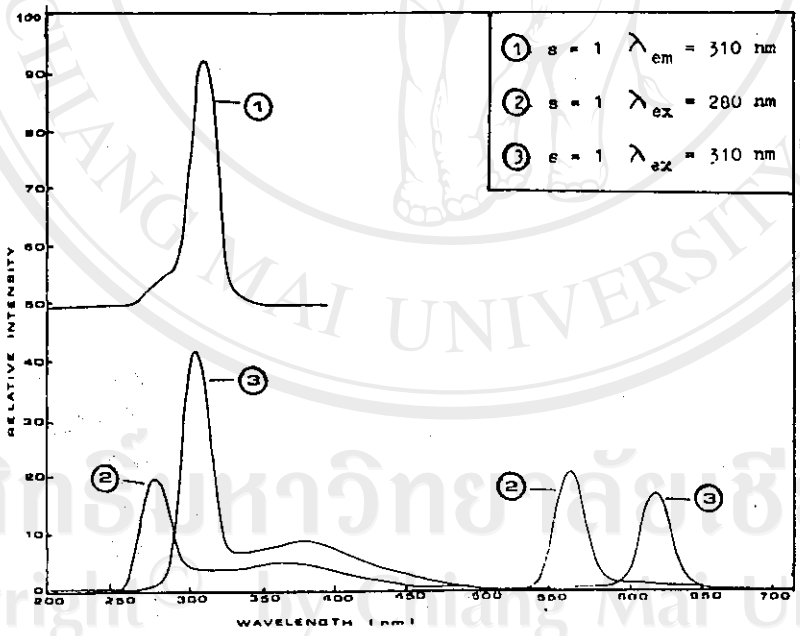
จากรูปที่ 2.9 excitation spectrum (1) พบว่ามี 4 wavelength ที่สามารถนำมา excite สารละลายได้ จึงศึกษา emission spectrum (2) โดยใช้ λ_{ex} = 220 nm และจะได้ emission spectrum (3) ถ้า excite

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมธานอลที่ λ_{ex} = 280 nm พบว่า emission spectrum จะ shift ไปเรื่อย ขณะที่เปลี่ยนค่า λ_{ex} แสดงว่าไม่มี fluorescence เพราะไม่มีความยาวคลื่นแน่นอน ดังนั้นจึงใช้เมธานอลเป็นตัวทำละลายในการศึกษา fluorescence ได้

(3) Dimethylformamide (DMF)

เมื่อนำ DMF มาศึกษา excitation spectrum โดยใช้ S = 1.0 และ λ_{em} = 310 nm จะได้ excitation spectrum ① ในรูป 2.10



รูป 2.10 spectrum ของ dimethylformamide โดยเปลี่ยนทั้ง λ_{ex} และ λ_{em}

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จาก excitation spectrum (1) พบว่ามี 2 ความยาวคลื่นที่สามารถนำมา excite สารละลายได้ จึงใช้ λ_{ex} = 280 nm จะได้ emission spectrum (2) และจะได้ emission spectrum (3) ถ้า excite DMF ที่ λ_{ex} = 310 nm พบว่าใช้ความยาวคลื่นใดในการ excite สารก็จะพบความยาวคลื่นนั้นออกมาด้วย แสดงว่าเป็นการสะท้อนแสงมากกว่าการดายแสง การสะท้อนนี้คือ Rayleigh scattering ส่วน emission spectrum (2), (3) ที่ใกล้ ๆ wavelength 550 และ 600 nm มี R สูงพอสมควร แต่ shift ไปเรื่อย ๆ ขณะที่เปลี่ยนค่า λ_{ex} แสดงว่าไม่มี fluorescence เพราะไม่มีความยาวคลื่นที่แน่นอน ดังนั้นจึงใช้ DMF เป็นตัวทำละลายในการศึกษาโดยเทคนิคนี้ได้

(4) น้ำกลั่น

จากการศึกษา spectrum ของน้ำกลั่นพบว่าลักษณะ peak ที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจาก Rayleigh scattering เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงใช้น้ำเป็นตัวทำละลายได้

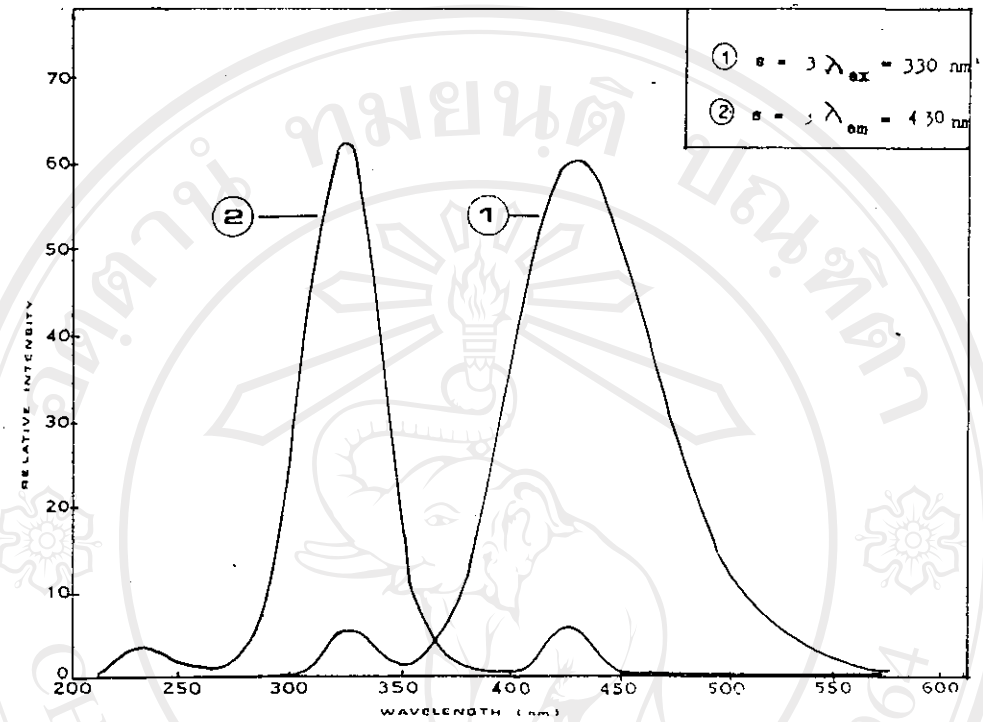
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.4.3 การทดลองเบื้องต้น

การทดลองนี้ทำเพื่อทดสอบว่าถ้าเปลี่ยนตัวออกซิไดส์จาก $K_3Fe(CN)_6$ เป็น $KMnO_4$ จะเกิด fluorescence หลังจากได้รับพลังงานจากแหล่งกำเนิดแสง UV หรือไม่

ทำการทดลองโดยนำสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลในเอธานอลความเข้มข้น 500 ppm 1 ซม^3 ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 ซม^3 เติม 0.2 M H_3BO_3-KCl-Na_2CO_3 buffer pH 8.5 1 ซม^3 แล้วเติม 0.005 % $KMnO_4$ 1 ซม^3 ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที จึงเติมสารละลายกรดแอสคอร์บิก 0.25 % 1 ซม^3 นำสารละลายที่ได้ทดสอบด้วย UV-lamp พบว่าได้ fluorescence สีม่วงน้ำเงิน และนำสารละลายนี้ไปศึกษา fluorescence spectrum โดยใช้ความยาวคลื่นในการ excite สารที่ 330 nm และ set λ_{ex} ไว้ที่ 200-800 nm ปรากฏว่าได้ลักษณะ emission spectrum (1) ในรูป 2.11 ซึ่งมี λ_{em} (max) ที่ 430 nm เมื่อทดลอง run excitation spectrum ดูโดยใช้ λ_{em} = 430 nm ปรากฏว่าได้ excitation spectrum (2) ในรูป 2.11 ซึ่งมี λ_{ex} (max) ที่ 332 nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 2.11 Excitation และ emission spectrum ของ fluorescent substance ที่ได้จากสารละลายพาราเซตามอลเข้มข้น 20 ppm, S=3

จากผลการทดลองแสดงว่า $KMnO_4$ สามารถออกซิไดส์พาราเซตามอลได้สาร fluorescent เช่นเดียวกับ $K_3Fe(CN)_6$ เพราะเมื่อ excite สารละลายด้วยแสง UV จะได้ fluorescence สีม่วงน้ำเงิน นอกจากนี้ excitation spectrum และ emission spectrum มีลักษณะเป็น mirror image ซึ่งกันและกันด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่าการใช้ $KMnO_4$ เป็นตัวออกซิไดส์พาราเซตามอลในสารละลายด่าง น่าจะให้แสง fluorescence ออกมาซึ่งมีความเข้มเพียงพอสำหรับที่จะใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลได้ แต่จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาหาภาวะการทดลองที่เหมาะสมเสียก่อน ดังนั้นจึงต้องทำการทดลองศึกษาปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความเข้มข้นของ $KMnO_4$, pH ของบัฟเฟอร์, อุณหภูมิ และความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกว่าจะมีอิทธิพลต่อ fluorescence intensity หรือไม่ และการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมที่สุด เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ในยาได้

2.3.4.4 <u>การศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการทดลอง</u>

ก่อนที่จะทำปริมาณวิเคราะห์สารตัวอย่างใด ๆ ก็ตามจำเป็นต้องศึกษาภาวะที่เหมาะสม เพื่อจะได้พบเทคนิคที่ sensitive มีความถูกต้องความแม่นยำ และปราศจากสิ่งรบกวน ดังนั้นการวิเคราะห์พาราเซตามอลจึงจำเป็นต้องศึกษาเงื่อนไขต่าง ๆ ดังจะได้อภิปรายต่อไป

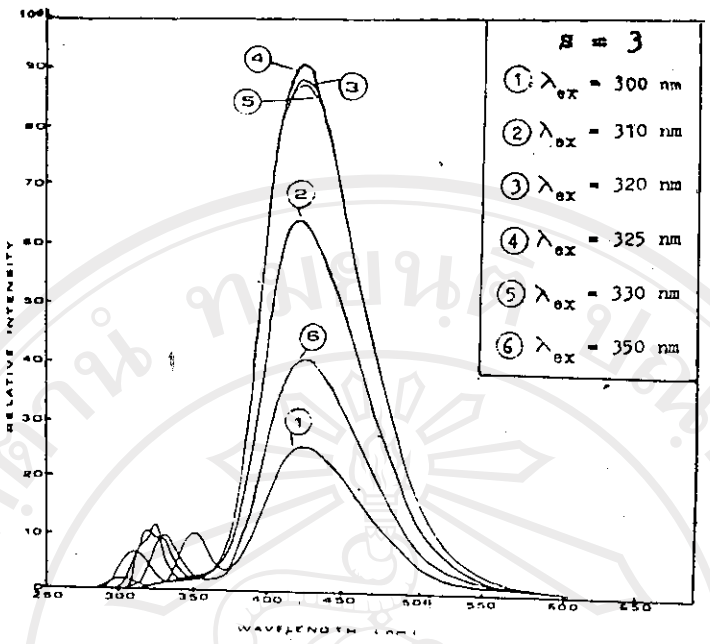
(ก) <u>การศึกษาอิทธิพลของบัฟเฟอร์ที่มีต่อ fluorescence intensity</u>

ในการทดลองนี้ได้ใช้ buffer 2 อย่างในการปรับ pH ของสารละลายคือ (1) 0.2 M H_3BO_3-KCl-Na_2CO_3 buffer

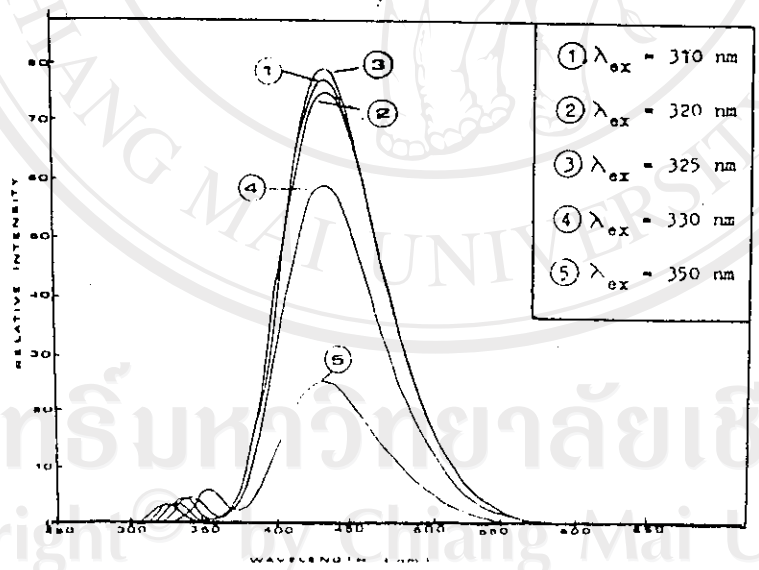
(2) 0.1 M tris buffer

ทำการทดลองตามหัวข้อ 2.3.4.3 โดยใช้บัฟเฟอร์ทั้ง 2 ชนิด pH 8.5 แล้วนำไปศึกษา fluorescence spectrum โดยใช้ความยาวคลื่นในการ excite สารที่ 330 nm และ set λ_{em} ไว้ตรง 200-800 nm ปรากฏว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 2.12 emission spectrum ที่ λ_{ex} ต่าง ๆ กันของ fluorescent substance ใน 0.2 M H_3BO_3-KCl-Na_2CO_3 buffer



รูป 2.13 emission spectrum ที่ λ_{ex} ต่าง ๆ กันของ fluorescent substance ใน 0.1 M tris buffer.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้ emission spectrum ที่ λ_{em} = 430 nm แต่มี relative intensity ต่างกัน

จากผลการทดลองแสดงว่า $KMnO_4$ สามารถออกซิไดส์พาราเซตามอลใน 0.1 M tris buffer ได้เช่นเดียวกัน จึงต้องทำการศึกษาต่อไปเพื่อหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการ excite สารละลายที่ทำให้ได้ค่า fluorescence intensity สูงสุด หรือหา λ_{em} (max) ของสารละลายโดยทำการทดลองเปลี่ยนความยาวคลื่นในการ excite สาร fluorescent ใน buffer pH 8.5 ทั้ง 2 ชนิด จากการทดลองใช้ลำแสงในการ excite สารที่ λ_{ex} = 300, 310, 320, 325, 330 และ 350 nm ปรากฏว่าสารนี้จะคายแสงออกมาที่ความยาวคลื่นเดียวเท่านั้นคือที่ประมาณ 430 nm ดังรูป 2.12 ส่วนค่า relative intensity (R) จะต่างกัน ซึ่งพบว่าเมื่อใช้ลำแสงในการ excite สารละลายที่ λ_{ex} = 325 nm จะได้ emission spectrum (4) ที่มีค่า R สูงสุด ใน tris buffer ก็ได้ผลทำนองเดียวกัน แสดงว่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการ excite สารคือ 325 nm (ดังรูป 2.13)

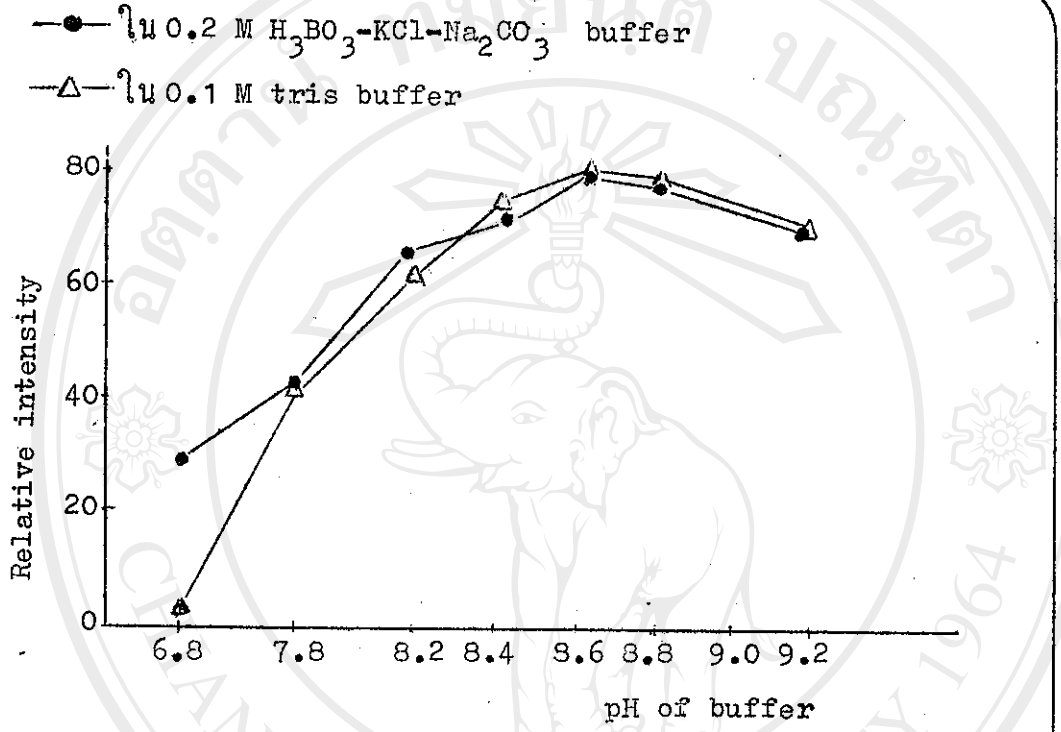
(ข) <u>การศึกษาอิทธิพลของ pH ที่มีต่อ fluorescence intensity</u>

ทำการทดลองศึกษา fluorescence intensity ใน pH ต่าง ๆ กัน คือ 6.8, 7.8, 8.2, 8.4, 8.6, 8.8 และ 9.2 ของบัฟเฟอร์ทั้ง 2 ชนิด โดยใช้สภาวะในการทดลองคือ

- สารละลายบัฟเฟอร์ 1 ซม^3
- สารละลาย $KMnO_4$ 0.005 % 1 ซม^3
- สารละลายกรดแอสคอร์บิก 0.25 % 1 ซม^3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยใช้ความยาวคลื่นในการ excite สารละลายที่ความยาวคลื่น 325 nm ปรากฏผลดังรูป 2.14



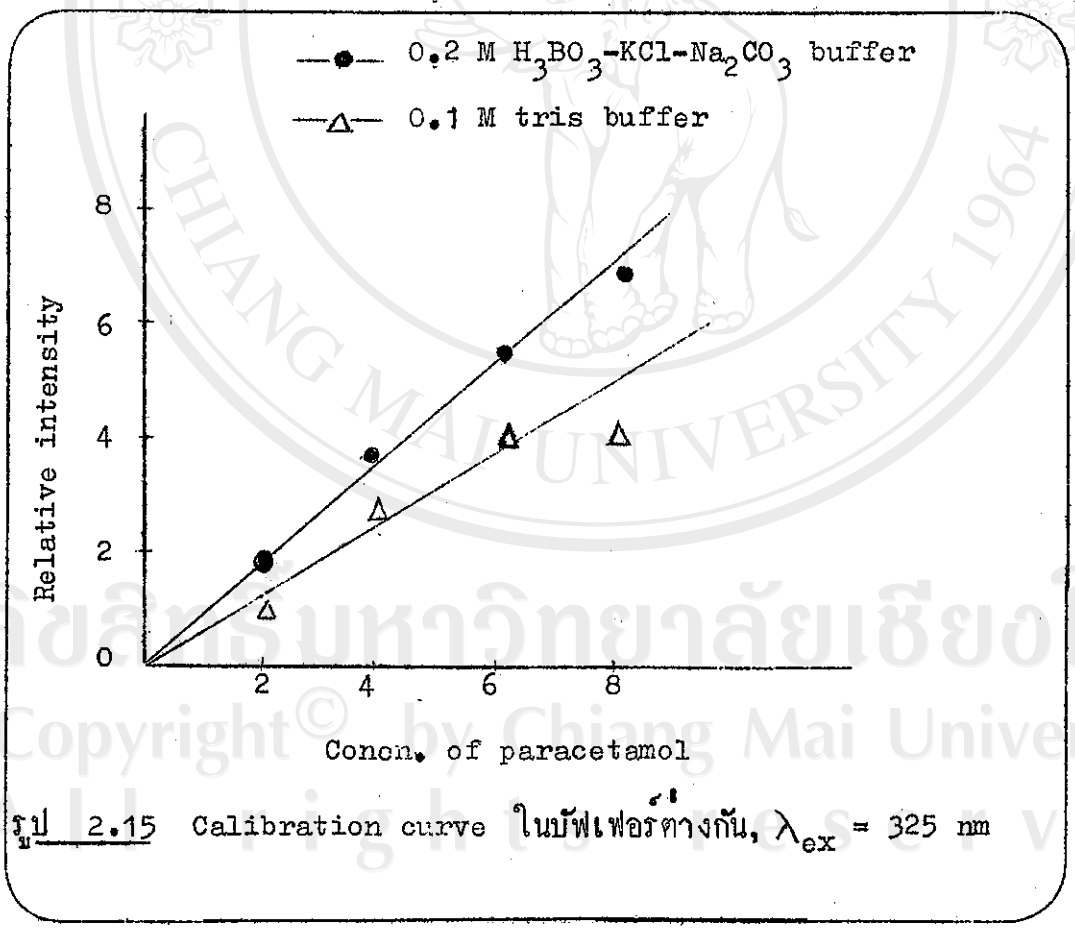
รูป 2.14 ผลของ pH ต่อ fluorescence intensity : λ_{ex} = 325 nm, S = 3

จากผลการทดลองพบว่า pH มีผลต่อ fluorescence intensity โดยในสารละลาย 0.2 M H_3BO_3-KCl-Na_2CO_3 buffer pH 8.6 สารจะมีการคายแสงออกมามากที่สุดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง เพราะมีค่า R สูงสุด สำหรับในสารละลาย 0.1 M tris buffer pH 8.6 ก็ให้ R สูงสุดเช่นเดียวกัน แสดงว่า pH ที่เหมาะสมของการทดลองคือ 8.6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(ค) การทดลองเพื่อศึกษา calibration curve ใน buffer ต่างกัน

วัตถุประสงค์ในการทดลองส่วนนี้เพื่อเลือกใช้บัฟเฟอร์ให้เหมาะสมที่จะสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลได้ จึงทำ calibration curves ในสารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 2 ชนิดเพื่อศึกษาช่วงที่เป็นเส้นตรง โดยนำสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลความเข้มข้น 2-8 ppm มาดำเนินการทดลองตามหัวข้อ 2.3.4.4 (ข) โดยใช้บัฟเฟอร์ 2 ชนิดคือ 0.2 M H_3BO_3-KCl-Na_2CO_3 buffer และ 0.1 M tris buffer pH 8.6 แล้วนำค่า R ที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R กับความเข้มข้นของสารละลายพาราเซตามอลได้ดังรูป 2.15



รูป 2.15 Calibration curve ในบัฟเฟอร์ต่างกัน, λ_{ex} = 325 nm

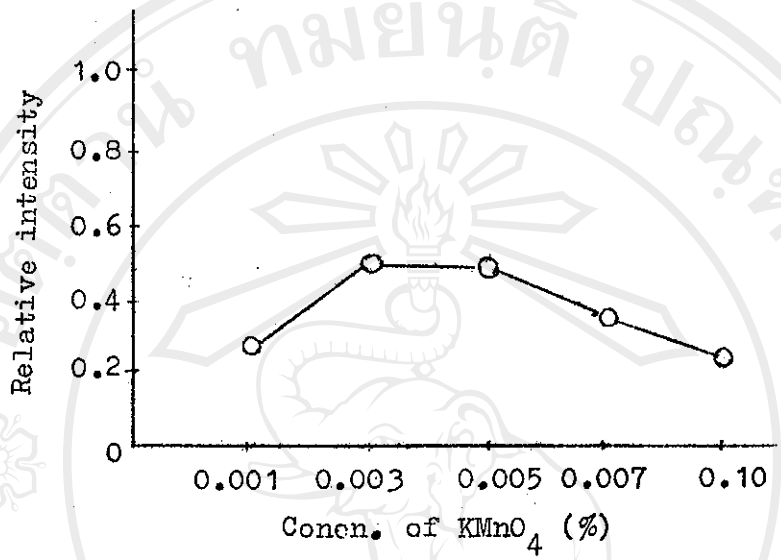
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากผลการทดลองพบว่า calibration curve ที่ได้จากการทดลองช่วงที่เป็นเส้นตรงคือ 0-6 ppm ซึ่งใน 0.2 M H_3BO_3-KCl-Na_2CO_3 buffer จะผ่านจุดต่างมากกว่าใน 0.1 M tris-buffer และเส้นกราฟจะเริ่มโค้งเบี่ยงเบนไปทางลบ เมื่อความเข้มข้นเป็น 8 ppm การทดลองต่อไปจะใช้ 0.2 M H_3BO_3-KCl-Na_2CO_3 pH 8.6 เพราะช่วงที่เป็นเส้นตรงผ่านจุดต่าง ๆ มากกว่าใน 0.1 M tris-buffer

(ง) การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของ $KMnO_4$ ต่อ fluorescence intensity

ปริมาณของ oxidising agent ที่ใช้ในการออกซิไดส์พาราเซตามอลอาจมีผลต่อความเข้มของแสงที่เราต้องการวัด จึงจำเป็นต้องศึกษาหาว่าจะต้องใช้ $KMnO_4$ อย่างมากที่สุดเท่าไรจึงจะให้ fluorescence intensity สูงสุด ทดลองโดยวัด fluorescence intensity ของสารที่ได้จากการใช้สารละลาย $KMnO_4$ ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0.001, 0.003, 0,005, 0.007 และ 0.10 % ออกซิไดส์ สารละลายพาราเซตามอลใน 0.2 M H_3BO_3-KCl-Na_2CO_3 pH 8.6 ปรากฏผลดังรูป 2.16

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



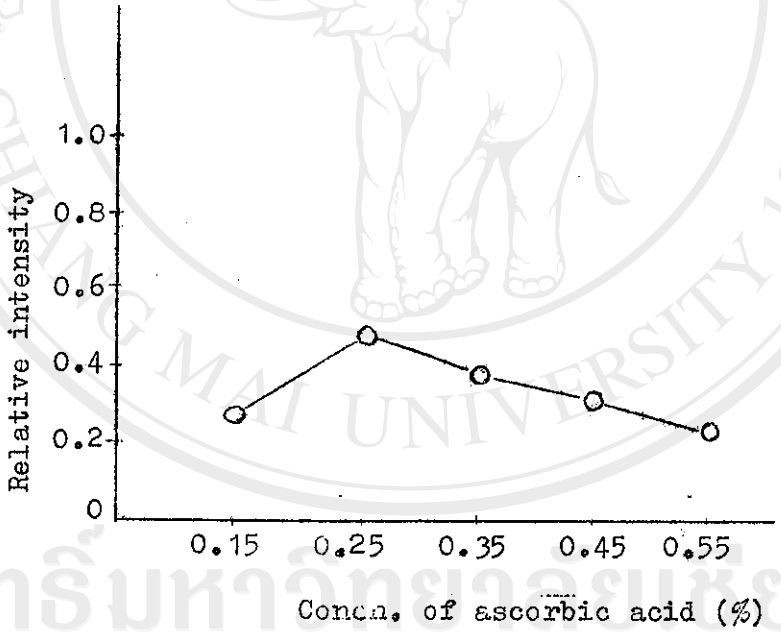
รูป 2.16 ผลของความเข้มข้นของ $KMnO_4$ ต่อ fluorescence intensity, λ_{ex} = 325 nm

จากผลการทดลองพบว่าค่าของ R ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลาย $KMnO_4$ โดยเมื่อมีความเข้มข้น 0.003 และ 0.005 % จะทำให้ค่าใกล้เคียงกัน เมื่อความเข้มข้นมากขึ้นเท่ากับ 0.007 % ค่า R จะลดลง และจะลดลงมากเมื่อความเข้มข้นของ $KMnO_4$ เท่ากับ 0.10 % การที่ค่า R ลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลาย $KMnO_4$ สูงขึ้นเพราะเกิด quenching ซึ่งทำให้ fluorescence ลดลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(จ) ผลของความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสคอร์บิกต่อ fluorescence intensity

กรดแอสคอร์บิกทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ (reduce) กำจัด oxidant ที่มากเกินพอ ซึ่งความเข้มข้นจะมีผลต่อ fluorescence intensity หรือไม่ ทำการทดลองโดยวัด fluorescence ของสารโดยใช้สารละลาย $KMnO_4$ 0.004% 1 ซม^3 ออกซิไดส์พาราเซตามอล และใช้สารละลายกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0.15, 0.25, 0.35, 0.45 และ 0.55 % เป็นตัวรีดิวซ์ ค่า R จะมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก ดังรูป 2.17



รูป 2.17 ผลของความเข้มข้นของสารละลายกรดแอสคอร์บิกต่อ fluorescence intensity, λ_{ex} = 325 nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกมีผลต่อ fluorescence intensity กล่าวคือเมื่อมีความเข้มข้นมากกว่า 0.25 % จะทำให้ค่า R ลดลง ในการทดลองต่อไปจะใช้สารละลายกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 0.25 % เพราะมีค่า R สูงสุด

(ฉ) การศึกษาอิทธิพลของตัวทำละลายที่มีต่อ fluorescence intensity

ตัวทำละลายบางตัวอาจมีอิทธิพลต่อความเข้มของแสง fluorescence ฉะนั้นจึงจำเป็นศึกษาเพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับละลายยาที่จะวิเคราะห์ ทำการทดลองโดยนำสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลความเข้มข้น 40 ppm 1 ซม^3 ในตัวทำละลายต่าง ๆ ดังนี้ เอ ธานอล, เมธานอล, น้ำ และ DMF โดยใช้สภาวะในการทดลองดังนี้

- 0.2 M H_3BO_3-KCl-Na_2CO_3 buffer pH 8.6
- สารละลาย $KMnO_4$ 0.004 %(1 ซม^3)
- สารละลายกรดแอสคอร์บิก 0.25 % (1 ซม^3)

และทำให้มีปริมาตรครบ 5 ซม^3 ด้วยตัวทำละลายที่ใช้ ปรากฏผลดังตาราง 2.13

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2.13 fluorescence intensity ของสารในตัวทำละลายต่างกัน

ตัวทำละลาย	λ^*_{ex} (nm)	λ^*_{em} (nm)	Relative intensity
เมธานอล	330	430	0.39
เอธานอล	325	430	0.29
น้ำ	325	424	0.29
DMF	325,330	435	0.32

λ^*_{ex} = ความยาวคลื่นที่ใช้ excite สารละลายซึ่งทำให้ได้ fluorescence intensity สูงสุด

λ^*_{em} = emission maximum

จากผลการทดลองพบว่าแสงที่คายออกมามีค่า R สูงสุดในตัวทำละลายยาแต่ละชนิดต้องใช้ลำแสงไป excite สารละลายที่ความยาวคลื่น (λ_{ex}) ต่างกัน และจะคายแสงออกมาที่ความยาวคลื่น (λ_{em}) ต่างกันด้วย เนื่องมาจากผลของตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่ทำให้ได้ค่า R สูงสุดคือ เมธานอลจะใช้เป็นตัวทำละลายในการทดลองต่อไป ซึ่งจะต้องทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อจะได้ค่า R สูงโดยใช้พาราเซตามอลความเข้มข้นน้อย ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(ช) การศึกษาอิทธิพลของ DMF ต่อ fluorescence intensity

มีรายงานเปิดเผยว่า DMF จะช่วยเสริมสร้างให้ fluorescence intensity ที่เกิดจาก oxidation production ของพาราเซตามอลให้สูงขึ้นจึงได้ทำการทดลองโดยใช้สารละลายพาราเซตามอลความเข้มข้น 125 ppm 1 ซม^3 และกำหนดสภาวะของการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.3.4.4 (ฉ) แล้วเติม DMF ลงไปจำนวนต่าง ๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ซม^3 ทำให้มีปริมาตรครบ 25 ซม^3 ด้วยน้ำ นำไปศึกษา fluorescence intensity ปรากฏผลดังตาราง 2.14

ตาราง 2.14 ผลของ DMF ต่อ fluorescence intensity, λ_{ex} = 330 nm, S = 3

ปริมาณ DMF (ซม^3)	Relative intensity
0	16.50
2	35.75
4	39.50
6	59.50
8	62.25
10	52.83

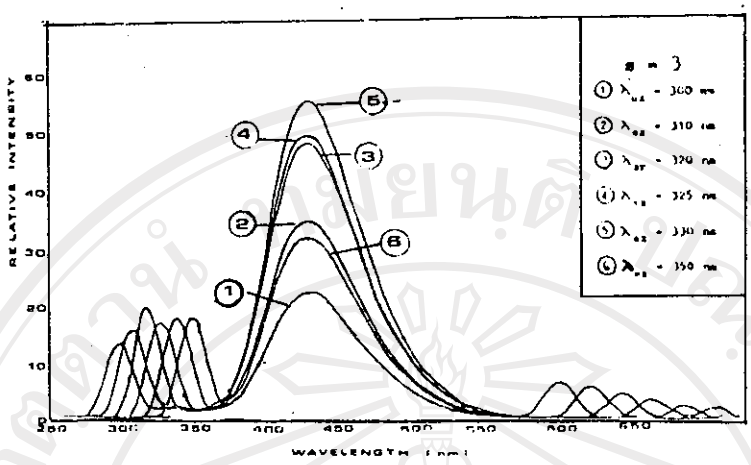
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากผลการทดลองพบว่า DMF ช่วยเพิ่มความเข้มของแสงที่คายออกมาโดยค่า R จะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ DMF ปริมาณมากขึ้น และจะมีค่าสูงสุดเมื่อ DMF เท่ากับ 8 ซม^3 แต่เมื่อ DMF มากกว่า 8 ซม^3 ค่า R จะลดลงเพราะเกิด concentration quenching ซึ่งทำให้ fluorescence ลดลง ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้ DMF ช่วยเพิ่ม fluorescence intensity โดยเติม DMF ลงในสารละลายที่ต้องการศึกษาจำนวน 5 ซม^3

(ช) <u>การทดลองเพื่อศึกษา λ_{em} (max) ของ fluorescent substance ในเมธานอล</u>

เพื่อต้องการทราบว่าสารที่ต้องการศึกษาในเมธานอลเมื่อมี DMF จะมีผลทำให้ λ_{ex} และ λ_{em} เป็นอย่างไร จึงทำการทดลองโดยใช้สารละลายพาราเซตามอลในเมธานอลและกำหนดสภาวะการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.3.4.4 (ฉ) แล้วใช้ลำแสงในการ excite สารละลายที่ λ_{ex} = 300, 310, 320, 325, 330 และ 350 nm เติม DMF 5 ซม^3 ปรากฏว่าแสงจะ emit ออกมามีค่าเดียวที่ = 430 nm ซึ่งถือว่าเป็น λ_{em} = 430 nm และมีค่า relative intensity สูงสุดเมื่อใช้ลำแสงในการ excite สารละลายที่ความยาวคลื่น = 330 nm ดังรูป 2.18 ซึ่งจะใช้เป็น λ_{ex} ในการ excite สารที่จะศึกษาต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

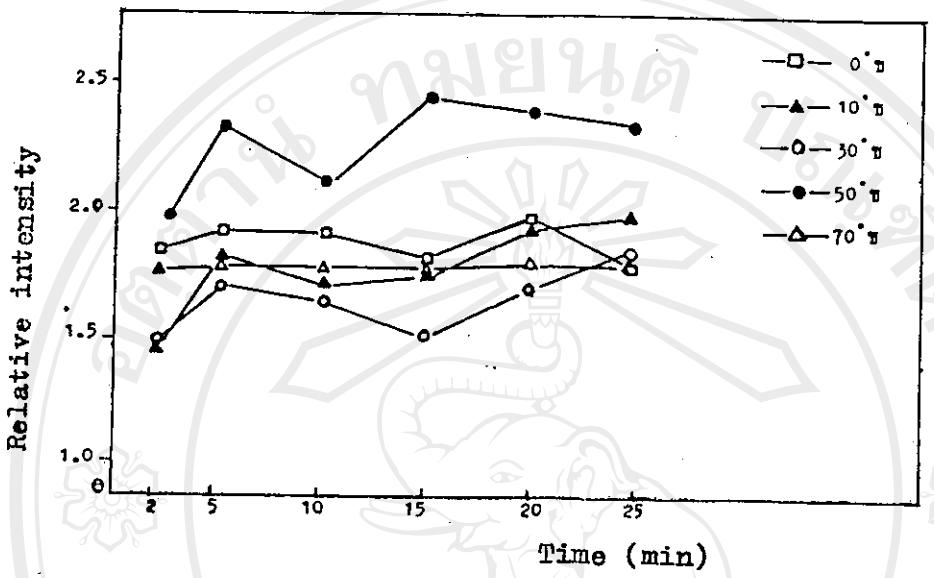


รูป 2.18 emission spectrum ของ fluorescent substant ใน เมธานอลที่ λ_{ex} ต่าง ๆ กัน

(ฉ) <u>การทดลองเพื่อศึกษา reaction time และอุณหภูมิที่มีต่อ fluorescence intensity</u>

ทดลองโดยใช้สารละลายพาราเซตามอลความเข้มข้น 125 ppm 1 ซม^3 และกำหนดสภาวะการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.3.4.4 (ฉ) โดยให้พาราเซตามอลทำปฏิกิริยากับสารละลาย $KMnO_4$ ที่อุณหภูมิ 0°, 10°, 30°, 50° และ 70° ซึ่งมี reaction time เป็น 2, 5, 10, 15, 20 และ 25 นาที ตามลำดับ เติม DMF 5 ซม^3 และทำให้มีปริมาตร 25 ซม^3 ด้วยน้ำ ศึกษา fluorescence intensity โดยใช้ความยาวคลื่นในการ excite สารที่ 330 nm ปรากฏผลดังรูป 2.19

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 2.19 ความสัมพันธ์ระหว่าง reaction time และ fluorescence intensity ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน, λ_{ex} = 330 nm

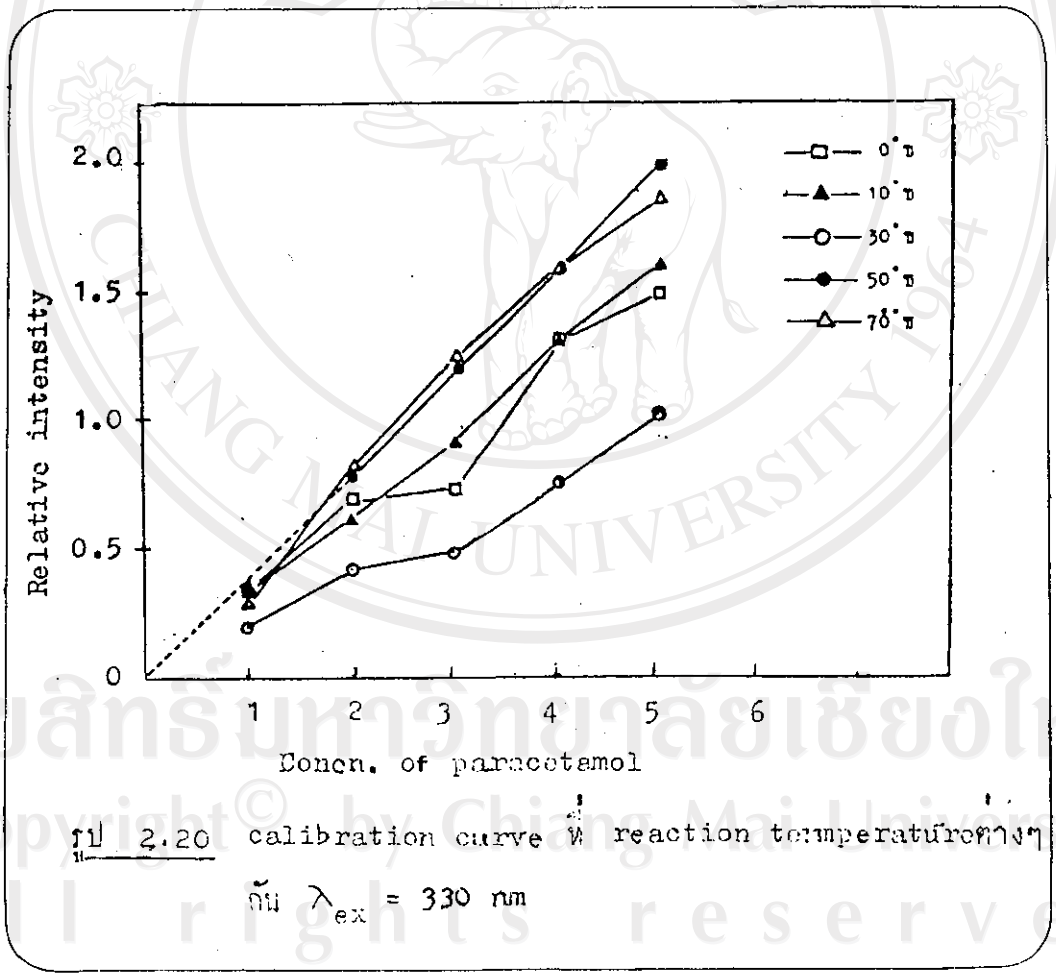
จากผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิ และ reaction time มีผลต่อ fluorescence intensity แต่การทดลองที่อุณหภูมิประมาณ 70°C พบว่า fluorescence intensity ของสารมีค่าใกล้เคียงกันมากที่ reaction time ต่าง ๆ

(ญ) การศึกษา calibration curve ที่ reaction temperature ต่าง ๆ กัน

ทำการทดลองโดยใช้สารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลความเข้มข้น 1-5 ppm ทำการทดลองตามหัวข้อ 2.3.4. (ฌ) โดยให้ reaction time

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

= 5 นาที และ reaction temperature = 0°, 10°, 30°, 50° และ 70°C ศึกษา fluorescence intensity โดยใช้ λ_{ex} = 330 nm เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของพาราเซตามอล และค่า relative intensity จะได้ดังรูป 2.20



รูป 2.20 calibration curve ที่ reaction temperatureต่างๆ กัน λ_{ex} = 330 nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 0°, 10° และ 70°C ได้ calibration curves ที่ไม่เป็นเส้นตรง ที่อุณหภูมิ 30°C ได้ calibration curve ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 3-5 ppm สำหรับอุณหภูมิ 50°C ได้ calibration curve ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 2-5 ppm และเริ่มต้นจาก 0 ppm ด้วย ดังนั้นจึงถือว่าเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาโดยเทคนิคนี้ และให้ reaction time เท่ากับ 5 °C เพราะให้ค่า R สูง (ดังรูป 2.19)

2.3.4.5 การศึกษา interference

ในยาตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์นอกจากจะมีพาราเซตามอลแล้วยังมียาตัวอื่น ๆ อีก ซึ่งอาจจะเกิดปฏิกริยาได้เช่นเดียวกับพาราเซตามอล หรืออาจจะเป็น quencher ซึ่งมีผลทำให้ fluorescence ลดลง ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลอาจจะไม่ถูกต้อง การศึกษา interferences ทำได้ดังนี้

(1) การทดลองเบื้องต้น

นำสารละลายมาตรฐานที่เป็นองค์ประกอบในยาที่นำมาวิเคราะห์ คือ phenylpropanolamine.HCl และ chlorpheniramine maleate ความเข้มข้น 125 ppm มาดำเนินการทดลองตามภาวะการทดลองที่เหมาะสมของเทคนิคนี้ นำไปศึกษา fluorescence intensity ปรากฏว่าได้ relative intensity เท่ากับ 0 ดังตาราง 2.15

(2) เติมสารละลายมาตรฐาน phenylpropanolamine.HCl และ chlorpheniramine maleate ความเข้มข้นต่าง ๆ กันลงในสารละลายมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พาราเซตามอลเข้มข้น 125 ppm แล้วดำเนินการทดลองตามภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคนี้ นำไปศึกษา fluorescence intensity ได้ผลดังตาราง 2.15

ตาราง 2.15 อิทธิพลของ phenyl propanolamine.HCl และ chlorpheniramine maleate ต่อ fluorescence intensity, λ_{ex} = 330 nm

อัตราส่วนความเข้มข้น พาราเซตามอล : interference	Relative intensity*					
	1:0	1:1	1:2	1:3	1:4	0:1
พาราเซตามอล : phenyl propanolamine.HCl	2.075	1.725	1.750	1.875	1.700	0
พาราเซตามอล : chlorpheniramine maleate	2.075	1.725	1.725	1.725	1.725	0

* ได้จากการทดลอง 2 ครั้ง (หัก blank แล้ว)

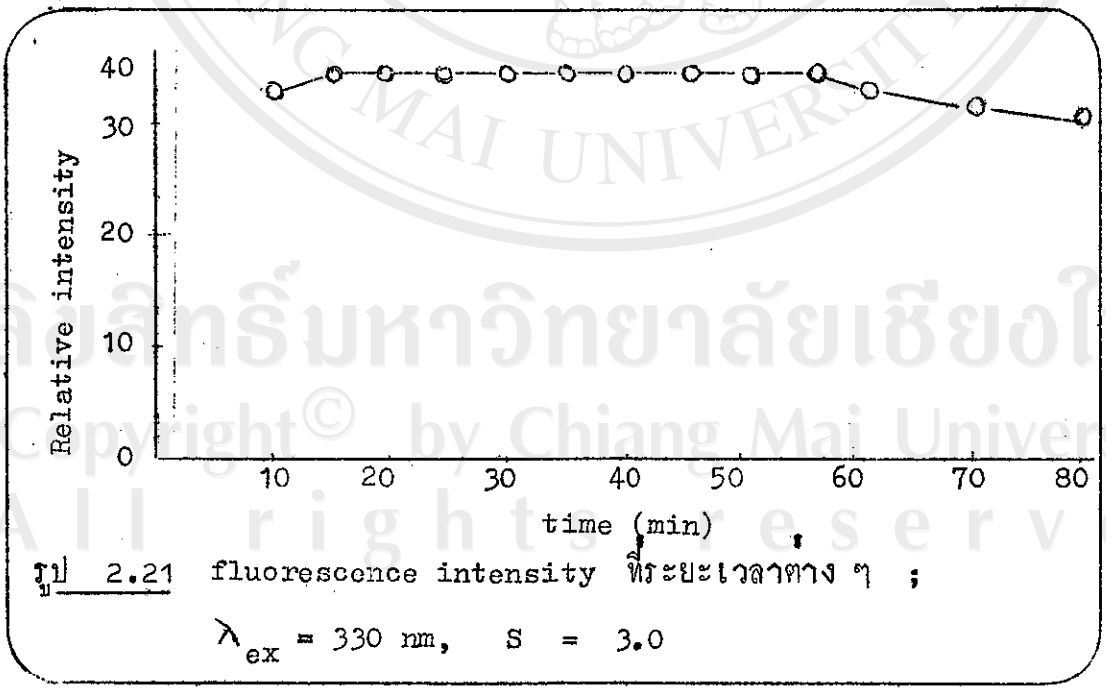
จากผลการทดลองพบว่า phenylpropanolamine.HCl ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน มีผลทำให้ค่า relative intensity (R) ของสารละลายพาราเซตามอลมีค่าลดลง ซึ่งการลดลงจะไม่เท่ากัน กล่าวคือเมื่อมี phenylpropanolamine ในสารละลายพาราเซตามอลในอัตราส่วน 1:4 มีผลทำให้ค่า R

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลดลงไป 18.07 % เมื่ออัตราส่วนของ 1:3 ค่า R จะลดลงเพียง 9.64 % แสดงว่า phenylpropanolamine.HCl ทำให้ค่า R ของสารละลายพาราเซตามอลลดลงในอัตราส่วนที่ไม่แน่นอน สำหรับ chlorpheniramine maleate ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน มีผลทำให้ค่า R ของสารละลายพาราเซตามอล ลดลงจากเดิมเท่ากันคือ ประมาณ 16.87 %

2.3.4.6 การทดลองเพื่อศึกษา stability ของ fluorescent substance

วัตถุประสงค์ของการทดลองคือ เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการนำสาร fluorescence ไปศึกษาหลังจากสารทำปฏิกิริยาแล้ว ทำการทดลองได้โดยดำเนินการทดลองตามที่กล่าวมาแล้ว นำสารละลายที่ได้ไปศึกษา fluorescence intensity ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน จะได้ความสัมพันธ์ระหว่าง fluorescence intensity กับระยะเวลาดังรูป 2.21



รูป 2.21 fluorescence intensity ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ;

λ_{ex} = 330 nm, S = 3.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยาจะเกิดสมบูรณ์เมื่อระยะเวลาหลังจากการทำปฏิกิริยาผ่านไปประมาณ 10 นาที และ fluorescence intensity ของสารจะมีค่าคงที่นานประมาณ 40 นาที หลังจากนั้น intensity จะลดลงเมื่อเวลาผ่านไปแต่ลดลงน้อยมาก ดังนั้นสาร fluorescence ที่เกิดขึ้นจะมี stability ภายใน 15-55 นาที หลังจากสารทำปฏิกิริยาจึงใช้ระยะเวลาในช่วงนี้ศึกษา fluorescence intensity ของสาร

2.3.4.7 การทำ calibration curve

ทดลองโดยนำสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลในเมธานอลความเข้มข้น 1-16 ppm มาทำการทดลองโดยกำหนดสภาวะในการทดลองดังนี้

- สารละลาย 0.2 M H_3BO_3-KCl-Na_2CO_3 pH 8.6 (1 ซม^3)
- สารละลาย $KMnO_4$ 0.004 % (1 ซม^3)
- สารละลายกรดแอสคอร์บิก 0.25 % (1 ซม^3)
- DMF 5 ซม^3
- เติมน้ำให้มีปริมาตรครบ 25 ซม^3

ใช้ลำแสงในการ excite สารละลายที่ความยาวคลื่น 330 nm จะได้ emission spectrum ที่ความยาวคลื่น 430 nm ปรากฏผลดังตาราง 2.16

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

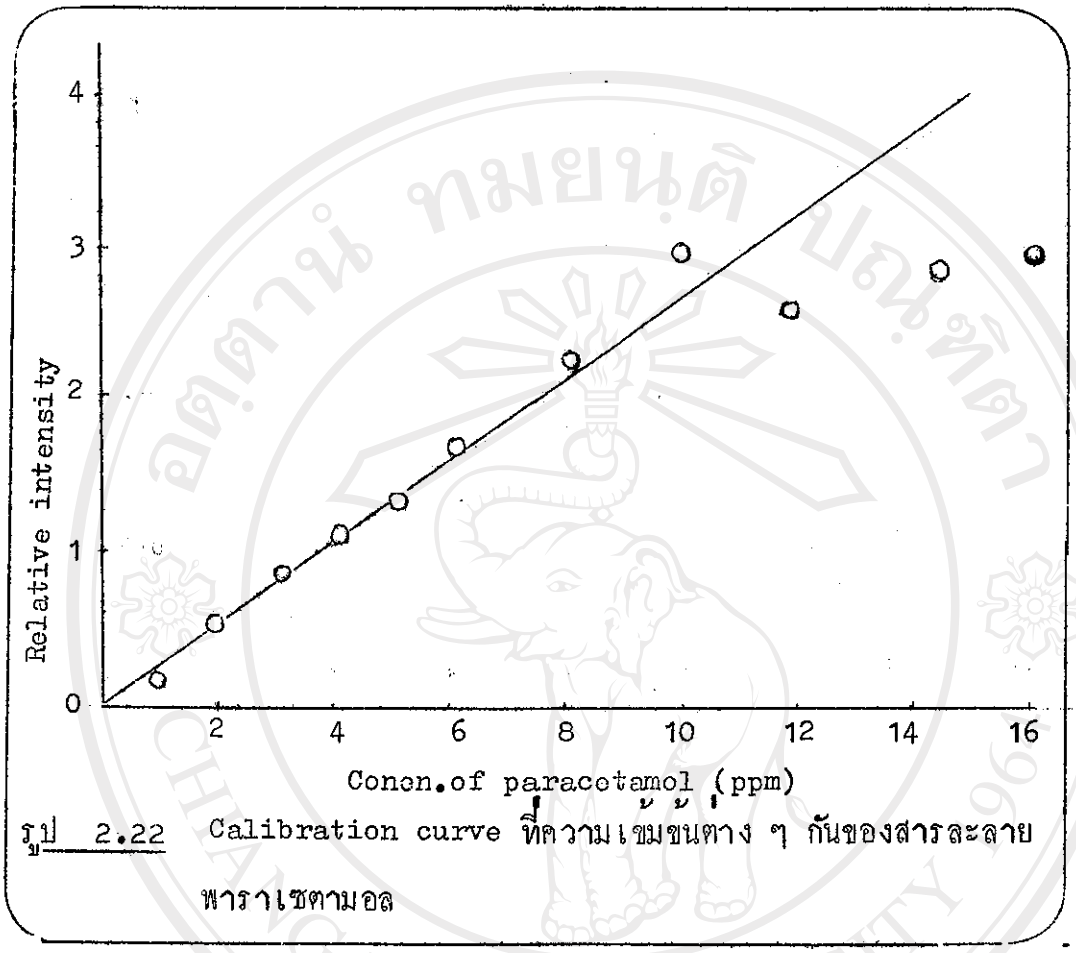
ตาราง 2.16 ค่า relative intensity ของสารละลายพาราเซตามอล ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้นของสารละลายพาราเซตามอล (ppm)	R หักค่าของ blank*
1	0.22
2	0.58
3	0.85
4	1.10
5	1.33
8	2.29
10	3.00
12	2.60
14	2.87
16	3.00

S = 3, blank = 0.0015

จากตาราง 2.16 นำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายพาราเซตามอล (1-16 ppm) ได้ดังรูป 2.22

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 2.22 Calibration curve ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันของสารละลายพาราเซตามอล

จากผลการทดลองพบว่า calibration curve ที่ได้ไม่เป็นเส้นตรงตลอดช่วงที่ศึกษา ช่วงที่เป็นเส้นตรงคือ 1 ถึง 8 ppm เมื่อความเข้มข้นมากขึ้นค่า R จะลดลง curve จะเบี่ยงเบนไปทางลบ ซึ่งผลนี้อาจจะเกิดขึ้นจาก quenching และ inner filter effect ทำให้ fluorescence ลดลง

2.3.4.8 การทดลองเพื่อศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์

จากการทดลองนำสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลความเข้มข้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1 ppm มาทำการทดลองโดยเทคนิคนี้ 10 ครั้ง แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัด fluorescence intensity ที่ λ_{ex} = 330 nm, S = 3 ปรากฏผลดังตาราง 2.17

ตาราง 2.17 ค่า relative intensity ของ fluorescent substance จากการทดลอง 10 ครั้ง

ครั้งที่	Relative* intensity	ความเข้มข้นสารละลายพาราเซตามอลจาก calibration curve (ppm)
1	0.195	0.75
2	0.225	0.85
3	0.225	0.85
4	0.210	0.77
5	0.210	0.77
6	0.195	0.75
7	0.195	0.75
8	0.195	0.75
9	0.195	0.75
10	0.195	0.75

*หัก blank แล้ว (blank = 0)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากตารางคำนวณค่าต่าง ๆ ได้ดังนี้

$$X = 0.74 \text{ ppm}$$

Standard deviation = $\pm$ 0.03 ppm

Relative standard deviation = $\pm$ 4.26 %

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล โดยเทคนิคนี้ให้ความแม่นยำดีพอสมควร กล่าวคือ เมื่อนำสารละลายพาราเซตามอลความเข้มข้น 1 ppm มาวิเคราะห์จะได้ค่าเฉลี่ย 0.74 ppm, ความเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ $\pm$ 0.03 และความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ $\pm$ 4.26 %

2.3.4.9 การทดลองเพื่อศึกษา detection limit

Detection limit หมายถึงความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายของธาตุที่ต้องการวิเคราะห์ด้วยความมั่นใจ 95 % ซึ่งเป็นปริมาณของธาตุที่ให้ absorbance อ่านออกมาได้เป็น 2 เท่าของความเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ 10 ครั้ง การหา detection limit ทำได้ นำสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลความเข้มข้น $2 \times 10^{-1} - 6 \times 10^{-1}$ ppm มาดำเนินการทดลองตามเทคนิคนี้ นำไปวัด fluorescence intensity ที่ S = 0.1 ซึ่งเป็น sensitivity สูงสุดของเครื่องมือนี้ โดยใช้ความยาวคลื่นในการ excite สารที่ 330 nm ปรากฏผลดังตาราง 2.18

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2.18 ค่า relative intensity ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลที่มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับ detection limit

ความเข้มข้นของสารละลายพาราเซตามอล (ppm)	Relative intensity * (R)	ความเข้มข้นของสารละลายพาราเซตามอลจาก calibration curve
0 (blank)	0.011	-
2×10^{-1}	0.0035	-
4×10^{-1}	0.047	0.175
5×10^{-1}	0.070	0.250
6×10^{-1}	0.090	0.350

* หัก blank แล้ว (blank = 0.011)

ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของเทคนิคนี้มีค่าเท่ากับ 0.03 (จากหัวข้อ 2.3.4.8) ความเข้มข้นของสารละลายพาราเซตามอล (ppm) ที่ทำให้ได้ค่า R เป็น 2 เท่าของค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน คือ 5×10^{-1} ppm ซึ่งมีค่า R เท่ากับ 0.070 นำค่านี้ไปอ่านความเข้มข้นจาก calibration curve ปรากฏว่ามีความเข้มข้น 2.5×10^{-1} ppm ดังนั้น detection limit ของเทคนิคนี้มีค่าเท่ากับ 2.5×10^{-1} ppm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.4.10 ผลการทดลองเพื่อหาปริมาณของพาราเซตามอลในยาตัวอย่าง

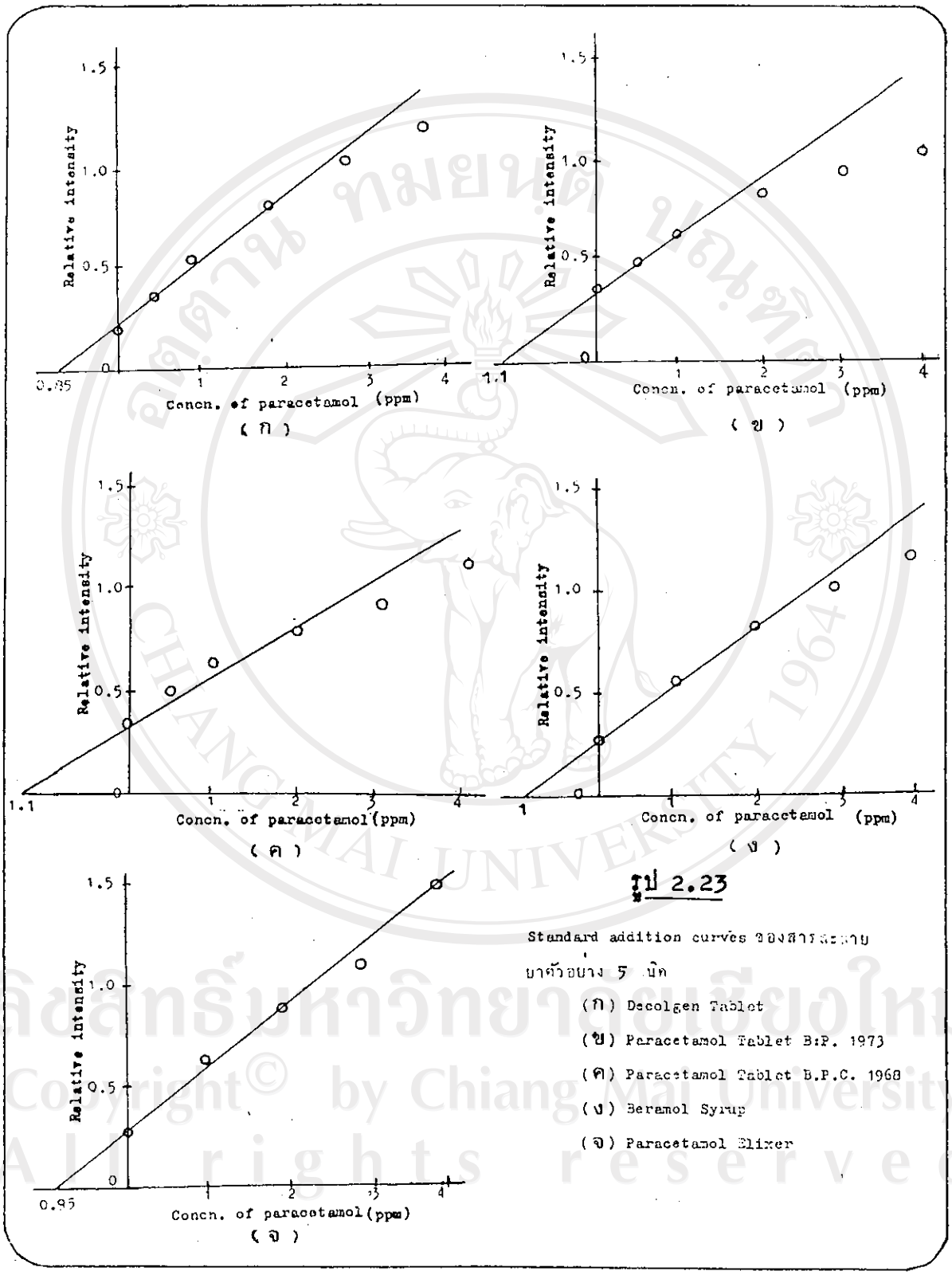
จากการทดลองตามหัวข้อ 2.3.4.6 พบว่าส่วนประกอบบางตัวในยามีผลทำให้ fluorescence intensity ลดลง ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหานี้จึงวิเคราะห์หาปริมาณของพาราเซตามอลตามเทคนิคนี้โดยทำ standard addition ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. นำสารละลายยาตัวอย่าง (ที่เตรียมจากหัวข้อ 2.3.2.4) 1 ซม^3 นำไปวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลโดยเทคนิคนี้กำหนดภาวะในการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.3.4.7

2. ทำ standard addition โดยเติมสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (1-4 ppm) ลงในสารละลายยาตัวอย่าง 1 ซม^3 นำไปวิเคราะห์ปริมาณพาราเซตามอลโดยใช้เทคนิคเดียวกัน

นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายพาราเซตามอลได้ผลดังรูป 2.23

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 2.23

Standard addition curves ของสารละลาย
ยาตัวอย่าง 5 นิด
(ก) Decolgen Tablet
(ข) Paracetamol Tablet B.P. 1973
(ค) Paracetamol Tablet B.P.C. 1968
(ง) Beramol Syrup
(จ) Paracetamol Elixer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากรูป 2.23 ตำแหน่งที่เส้นกราฟตัดแกนนอนคือ ความเข้มข้นของพาราเซตามอลในยาตัวอย่าง ซึ่งนำค่านี้มาคำนวณหาปริมาณพาราเซตามอลในยา 1 กรัม

ตัวอย่างการคำนวณ

Decolgen Tablet

X-intercept = 0.85 ppm

ดังนั้น ในสารละลาย 25 ซม^3 จะมีพาราเซตามอล = 21.25 ppm ในสารละลายยา 50 ซม^3 จะมีพาราเซตามอล = 53.125 มก นั่นคือ ยา Decolgen 0.1 กรัม จะมีพาราเซตามอล = 53.125 มก ดังนั้นในยา 1 กรัม จะมีพาราเซตามอล = 531.25 มก

หมายเหตุ.- สารละลายยาตัวอย่าง 0.1 กรัม ละลายในเมธานอลจนมีปริมาตรครบ 50 ซม^3 แล้วปิเปตสารละลายนี้มา 2 ซม^3 ทำให้มีปริมาตรครบ 100 ซม^3 ด้วยเมธานอล นำสารละลายนี้ไปศึกษาโดยเทคนิคนี้

คำนวณหาปริมาณพาราเซตามอลในยาตัวอย่างอื่น ๆ เช่นเดียวกับข้างต้น ได้ผลดังตาราง 2.19

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2.19 ปริมาณของพาราเซตามอลในยาตัวอย่าง 5 ชนิด

ยาตัวอย่าง	ความเข้มข้นของพาราเซตามอลในสารละลายยาตัวอย่าง (ppm)	ปริมาณของพาราเซตามอลในยา (มก/กรัม.)
Decolgen Tablet	0.85	531.25
Paracetamol Tablet B.P.1973	1.10	637.50
Paracetamol Tablet B.P.C.1968	1.10	637.50
Beramol Syrup	1.00	25.00 มก/ซม^3
Paracetamol Elixer	0.95	23.75 มก/ซม^3

2.3.4.11 การทดลองเพื่อหาความถูกต้องการวิเคราะห์

ทำได้โดยนำสารละลายยาผสม (เตรียมจากหัวข้อ 2.3.2.5) จำนวน 1 ซม^3 มาวิเคราะห์หาปริมาณของพาราเซตามอลโดยทำการทดลองตามหัวข้อ 2.3.4.7 นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า percentage recovery และ percentage error ได้ผลดังตาราง 2.20

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2.20 ความเข้มข้นของพาราเซตามอลในสารละลายยาผสม (λ_{ex} = 330 nm, S = 3)

สารละลายยาผสม	Relative intensity*	ความเข้มข้นของพาราเซตามอลจาก calibration curve (ppm)	ปริมาณของพาราเซตามอลที่พบ มก/100 ซม^3	ปริมาณของพาราเซตามอลที่มีอยู่ (มก/100 ซม^3)	% recovery	% error
sample 1	0.670	2.450	306	300	102	-2
sample 2	1.220	4.080	510	500	102	-2
sample 3	0.230	0.970	121.25	120	101.04	-2.04

*ได้จากการทดลอง 3 ครั้ง หัก blank แล้ว (blank = 0)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หมายเหตุ.-

sample 1 ประกอบด้วยสารมาตรฐานพาราเซตามอล, phenylpropanolamine.HCl, chorpheniramine maleate และกรดแอสคอร์บิก จำนวน 300, 12.5, 1 และ 25 มก ตามลำดับ ละลายในเมธานอลทำให้มีปริมาตรครบ 100 ซม^3

sample 2 ประกอบด้วยสารมาตรฐานพาราเซตามอล 500 มก ละลายในเมธานอลแล้วทำให้มีปริมาตรครบ 100 ซม^3

sample 3 ประกอบด้วยสารมาตรฐานพาราเซตามอล 120 มก ละลายในเมธานอลแล้วทำให้มีปริมาตรครบ 100 ซม^3

จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าการหาปริมาณพาราเซตามอลในสารละลายยาผสมทั้ง 3 sample มีความถูกต้องสูง กล่าวคือสารละลายยาผสมทั้ง 3 sample มีค่า % recovery ประมาณ 101-102 แสดงว่าการหาปริมาณพาราเซตามอลในยาโดยเทคนิคนี้จะได้ปริมาณใกล้เคียงกับที่มีอยู่จริงในยา โดย sample 3 มี % error ต่ำสุดคือ -1.04 ส่วน sample 1 และ sample 2 มี % error เท่ากันคือ -2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 การหา % label amount ของพาราเซตามอล

การวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยาแก้ปวดโดยวิธี colorimetry และ spectrofluorometry เมื่อนำค่าที่ได้(จากตาราง 2.7 และ 2.19) มาคำนวณหาค่า % label amount ของพาราเซตามอล โดยคำนวณจากปริมาณพาราเซตามอล(มก)ที่วิเคราะห์เทียบกับปริมาณพาราเซตามอลที่ระบุไว้ในยา 1 เม็ด หรือยาน้ำ 5 ซม^3 ได้ผลดังตาราง 2.20

ตาราง 2.21 ค่า % label amount ของพาราเซตามอลในยาตัวอย่าง 5 ชนิด ที่ได้จากการวิเคราะห์โดย 2 เทคนิค

ชื่อยาตัวอย่าง	% label amount of paracetamol	
	Colorimetry	Spectrofluorometry
Decolgen Tablets	94.59	96.63
Paracetamol Tablets B.P 1973	103.73	148.57
Paractamol Tablets B.P.C.1968	95.34	148.96
Beramol Syrup	166.67	104.17
Paracetamol Elixer	187.50	98.96

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved