บทที่ 3

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซตินในยาแก้ปวด

คำนำ

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซตินมีหลายเทคนิคเช่นเดียวกับการหาปริมาณพาราเซตามอล ซึ่งแต่ละวิธีก็มีความแตกต่างกันในด้านความแม่นยำ, ความถูกต้อง, ความสะดวกและรวดเร็วในการวิเคราะห์

ต่อไปนี้จะกล่าวถึงตัวอย่างของการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซตินบางเทคนิคโดยสังเขป

3.1 ตัวอย่างการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซตินโดยเทคนิคต่าง ๆ

3.1.1 Gravimetric method การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซตินโดยเทคนิคนี้ (25) ทำได้โดยนำยาตัวอย่างที่มีฟีนาเซตินไป extract ด้วยปิโตรเลียม เบนซิน (petroleum benzin) เพื่อกำจัดพวก tablet lubricants แล้ว extract อีกครั้งด้วยคลอโรฟอร์ม (chloroform) หลังจากนั้นก็ระเหยเอาคลอโรฟอร์มออกได้ residue นำไปชั่งก็จะเป็นปริมาณของฟีนาเซตินในยาตัวอย่าง วิธีนี้ใช้สำหรับวิเคราะห์ฟีนาเซตินในปริมาณค่อนข้างสูง สำหรับในระดับไมโครกรัมจะต้องใช้เทคนิคอื่น

3.1.2 Volumetric method มีหลายวิธีดังต่อไปนี้

1. Nonaqueous titration เป็นวิธีวิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซตินโดยการติเตรทกับพวกสารละลาย nonaqueous Viktor Leszlo (26). ใช้เทคนิคนี้วิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซตินโดยไฮโดรไลส์ฟีนาเซตินด้วยกรดซัลฟูริก 15 % และทำให้เกิดพารา-ฟีนิทีดีน แล้วสกัดด้วยคลอโรฟอร์มเอาชั้นคลอโรฟอร์มที่สกัดได้กรองโดยผ่านแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (anhydrous

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

sodium sulfate) นำไปติเตรทด้วย 0.02 N กรดเปอร์คลอริก (Perchloric acid) ในแอนไฮดรัสอะซิติกแอซิด (anhydrous acetic acid) โดยใช้บรอมฟีนอลบลู-เมธิลีนบลู เป็นอินดิเคเตอร์

2. Amperometric titration Abramov และ Medvedskaya (27) วิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซติน โดยนำฟีนาเซตินต้มกับกรดซัลฟุริก 20 % จนได้สารละลายใสทำให้เจือจางด้วยน้ำ แล้วผสมกับ 20 % กรดไฮโดรคลอริก และโปตัสเซียมโบรไมด์ (potassium bromide) นำไปติเตรทกับ 0.1 M โซเดียมไนไตร์ท (sodium nitrite) โดยวิธี amperometric ซึ่งมี platinum electrode v.s. s.c.e.

3.1.3 Spectrophotometric method เป็นเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี (spectroscopy) เกี่ยวกับการดูดกลืนคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในการทำคุณภาพวิเคราะห์ และการทำปริมาณวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีอยู่ในของผสมหรือในสารบริสุทธิ์

- Visible spectrophotometry

เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซติน โดยทำให้เกิดสารที่มีสีแล้ววัดการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นวิสิเบิล

Iovcher และคณะ[28] วิเคราะห์ฟีนาเซติน โดยทำให้เกิดสีกับเฟอร์ริกไฮดรอกซามิกในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ pH 2.0 แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Ivakhnenko และคณะ[29] อาศัยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของฟีนาเซตินกับสารละลายโซเดียมไนไตร์ทจำนวน excess ที่ทราบปริมาณแล้วหาปริมาณโซเดียมไนไตร์ทที่เหลือโดยใช้ ethacridine lactate จะได้สีแดงของเกลือ diazonium ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 508 nm ทำให้หาปริมาณฟีนาเซตินได้

3.1.4 Chromatographic method เป็นเทคนิคที่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณยาที่อยู่รวมกัน เพราะในยามักจะประกอบด้วยตัวยาหลายชนิดในตำรับยาเดียวกัน Mayell และคณะ[30] ใช้เทคนิค liquid chromatography วิเคราะห์หาปริมาณแคฟฟีอีน, แอสไพริน, ฟีนาเซติน และเฮกโซบาร์บิทอล (hexobarbital) โดยใช้ weak anion exchanger column ซึ่งบรรจุ "Zipax" ที่ coated ด้วย amine substituted polyamide polymer โดยมี internal standard คือ เบนโซอิก แอซิด (benzoic acid) สำหรับ Percodan และ methylparaben สำหรับ Percobarb

3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซตินในยาแก้ปวดโดยวิธี Colorimetry

3.2.1 คำนำ

ยาแก้ปวดมักจะมียาหลายชนิดอยู่ในตำรับยาเดียวกัน ฟีนาเซตินเป็นตัวยาหนึ่งที่ยังคงนิยมใช้กันอยู่ การหาปริมาณฟีนาเซตินในยาทำได้โดยมุ่งวิเคราะห์ที่ functional group เพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้ตัวยาอื่นรบกวนการทำปริมาณวิเคราะห์ได้ วิธีหนึ่งที่ใช้กันทั่วไปคือ การทำให้เกิดสารประกอบที่มีสี (colorimetry) กับสารต่าง ๆ แล้ววัดการดูดแสงเพื่อหาปริมาณสาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2 การทดลอง

3.2.2.1 เครื่องมือ การทดลองนี้ใช้เครื่องมือแบบลำแสงคู่ (double-beam instrument) ดังจะกล่าวต่อไปนี้

1. Varian techtron 635 Ultraviolet-Visible Recording Spectrophotometer ผลิตโดย Varian techtron PTY Ltd., Australia

   Conditions ที่ใช้ศึกษาการดูดกลืนแสงของสาร

Absorbance	0-2.0	fsd.
Slit width	1.0	nm

2. Pye-Unicam SP 8000 Ultraviolet-Visible Recording Spectrophotometer ผลิตโดยบริษัท Pye-Unicam Ltd., Cambridge England

   Conditions ที่ใช้ในการศึกษา spectrum

Absorbance	0-1.0	fsd.
Scan speed	fast	

3.2.2.2 สารเคมี สารเคมีที่ใช้เป็น Analytical reagent ยกเว้นที่ระบุไว้เป็นพิเศษได้นำสารเคมีต่อไปนี้มาใช้ในการวิจัย โดยไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่ง

1. สารเคมีที่ผลิตโดย BDH Chemical Ltd., Poole, England
   - Hydrochloric acid, HCl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Caffeine, $C_8H_{10}N_4O_2$ Laboratory grade
- Phenacetin, $C_{10}H_{13}NO_2$, Laboratory grade

2. สารเคมีที่ผลิตโดย E.Merck, Damstadt, Germany
- Ethanol, C_2H_5OH
- Methanol, CH_3OH
- Vanillin, $C_8H_8O_3$, Laboratory grade

3. สารเคมีที่ผลิตโดย Sigma Chemical Company, U.S.A.
- Aspirin, $C_9H_9O_4$, Laboratory grade

3.2.2.3 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 %, 15 % และ 20 %

นำกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจำนวน 118, 176 และ 236 ซม^3 เติมลงในน้ำกลั่นในขวดปริมาตรขนาด 500 ซม^3 ตามลำดับ แล้วทำให้ครบปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2. การเตรียมสารละลายวานิลิน 5 % ในเอธานอล

ชั่งวานิลิน 25 กรัม ละลายในเอธานอล แล้วทำให้ครบ 500 ซม^3 ด้วยเอธานอลในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 ซม^3

3.2.2.4 ตัวอย่างยาที่นำมาวิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซติน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. องค์ประกอบในยา ยาที่นำมาวิเคราะห์มี 5 ชนิด ซึ่งมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

ก) ซาลาไพริน ของห้างขายยาอังกฤษ (ตราง) ใน 1 เม็ดประกอบด้วย

Aspirin	225	มก
Phenacetin	150	มก
Caffeine	30	มก

ข) ยาตราไก่ ของบริษัท อี เอ็ล ฮั้ว ใน 1 ซองประกอบด้วย

Aspirin	450	มก
Phenacetin	300	มก
Caffeine citrate	120	มก

ค) ประสะยอแรด (สำหรับเด็ก) ของบริษัทเทวกรรมโอสถ ใน 1 ซอง ประกอบด้วย

Aspirin	225	มก
Phenacetin	150	มก

ง) หัวสิงห์ ของห้างขายยานำกักตราหัวสิงห์ ใน 1 ซองประกอบด้วย

Aspirin	450	มก
Phenacetin	250	มก
Caffeine citrate	80	มก (eq.caf.40)

จ) ไวกุล ของบริษัทสหการโอสถ ใน 1 ซองประกอบด้วย

Aspirin	450	มก
Phenacetin	300	มก
Caffeine citrate	120	มก (eq.caf.base 60)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. น้ำหนักเฉลี่ยของยา ยาตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ ในแต่ละเม็ดหรือซองน้ำหนักต่าง ๆ กัน ซึ่งหาน้ำหนักเฉลี่ยได้โดยนำยามาจำนวน 20 เม็ด หรือ 10 ซอง ชั่งหาน้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ดหรือซอง แล้วบดให้ละเอียดเพื่อนำไปเตรียมสารละลายยาตัวอย่าง

ตาราง 3.1 น้ำหนักเฉลี่ยของยาตัวอย่าง

ชื่อยา	น้ำหนัก (กรัม/ซอง)
ซาลาไพริน	0.4788*
ตราไก่	0.7786
ประสะมอแรด	1.3167
หัวสิงห์	0.9628
ไวกุล	1.0439

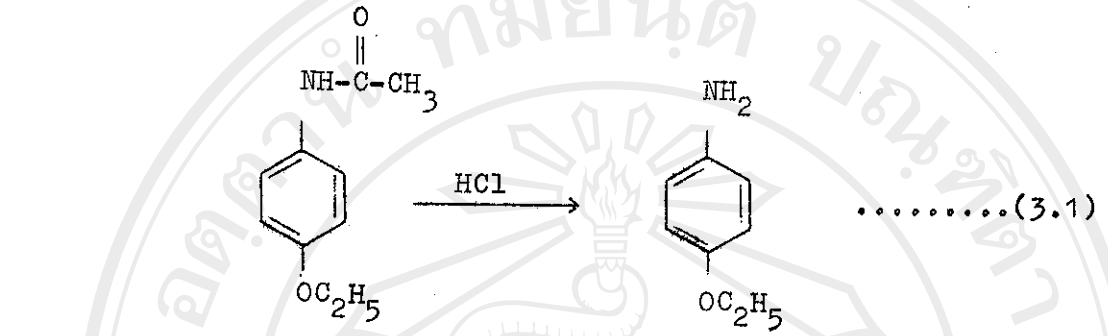
* กรัม/เม็ด

3.2.3 หลักการ

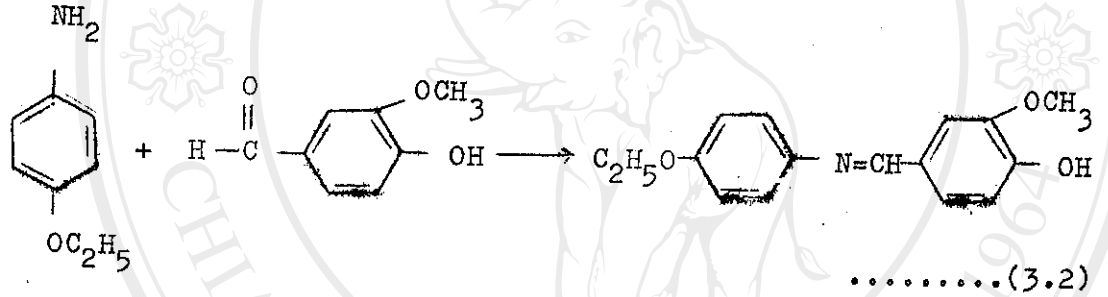
Sanghavi (31) ได้ศึกษาพบว่า กรดไฮโดรคลอริกสามารถไฮโดรไลส์ฟีนาเซตินทำให้ได้ไพมารี่ อะโรมาติกเอมีน (primary aromatic amine) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับวานิลลิน(vanillin) ได้สารประกอบ imine คือ 4-ethoxy(3-methoxy-4-hydroxybenzylidene)aniline (ดังแสดงในสมการ 3.1 และ 3.2) ซึ่งมีสีเหลือง มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความยาวคลื่น 394 nm การดูดแสงนี้ใช้เป็นหลักในการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซตินในยาแก้ปวดได้



.....(3.1)



.....(3.2)

สารประกอบ imine

3.2.4 การทดลอง, ผลการทดลองและวิจารณ์

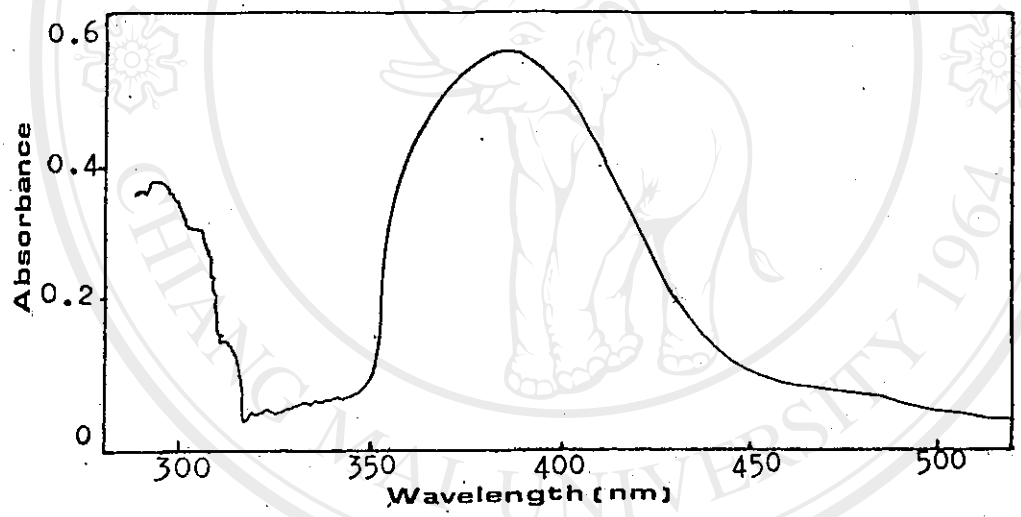
3.2.4.1 การทดลองเบื้องต้น

UV spectrum ของ 4-ethoxy(3-methoxy-4-hydroxy benzylidene)aniline

การศึกษา UV spectrum ของสารประกอบ imine นี้ทำการทดลองได้ดังนี้ นำสารมาตรฐานฟีนาเซตินจำนวน 0.2 กรัม ใส่ในขวดแก้วก้นกลมขนาด 100 ซม^3 เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 15 % จำนวน 25 ซม^3 นำไปต้ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภายใต้การ reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยสารละลายให้เย็นและเติมน้ำให้ครบ 100 ซม^3 ในขวดปริมาตร ปิเปตสารละลายนี้มา 1 ซม^3 ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 25 ซม^3 เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 15% จำนวน 1 ซม^3 และวานิลลิน 5% ในเอธานอลจำนวน 2 ซม^3 เขย่านาน 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติมน้ำจนครบปริมาตร จะได้สารประกอบสีเหลือง นำไปวัดการดูดกลืนแสงโดยเปรียบเทียบกับ reagent blank พบว่ามีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 390–398 nm ดังรูป 3.1 ในการทดลองต่อไปจะศึกษาการดูดกลืนแสงของสาร ที่ความยาวคลื่น 394 nm



รูป 3.1 UV spectrum ของ 4-ethoxy(3-methoxy-4-hydroxybenzylidene) aniline ที่ได้จากสารละลายมาตรฐานพีนาเซตินความเข้มข้น 30 ppm (จาก Unicam SP 800)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.4.2 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการทดลอง

ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซตินโดยวิธี UV-spectroscopy เพื่อให้ได้ความถูกต้องและแม่นยำสูงจึงจำเป็นต้องศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่จะมีผลต่อการทดลองเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคนี้

(ก) ผลของความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก

วัตถุประสงค์ในการทดลองคือ เพื่อศึกษาว่าความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกมีผลต่อการเกิดสารประกอบ imine หรือไม่ ทำการทดลองได้โดยดำเนินขั้นตอนการทดลองตามหัวข้อ 3.2.4.1 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 %, 15 % และ 20 % นำสารละลายที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงโดยเปรียบเทียบกับ reagent blank ที่ความยาวคลื่น 394 nm ปรากฏผลดังตาราง 3.2

ตาราง 3.2 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (จากการทดลอง 3 ครั้ง) ของสารประกอบ imine เมื่อความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเปลี่ยนไป

ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (%)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย
10	0.48
15	0.54
20	0.51

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกมีผลต่อการเกิดสารประกอบ imine เพราะได้ค่าการดูดกลืนแสงต่างกัน โดยเมื่อใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 % จะให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำสุด กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 15 % และ 20 % จะได้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกัน ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 15 % ในการไฮโดรไลส์ฟีนาเซติน เพราะให้ค่าการดูดแสงสูงสุด

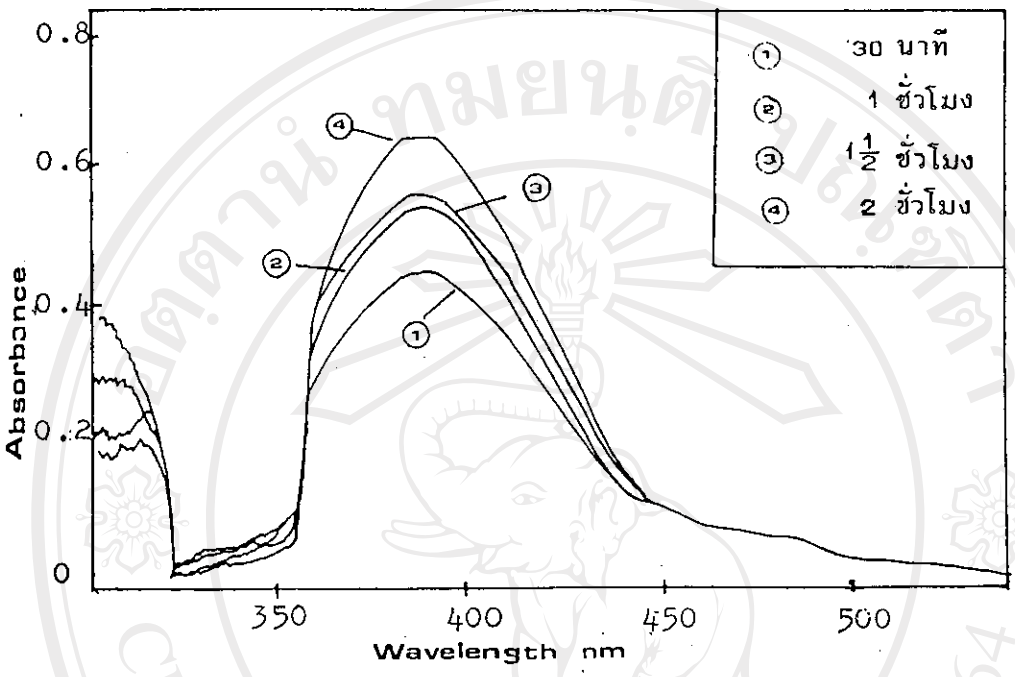
(ข) ผลของระยะเวลาในการไฮโดรไลส์สารละลายฟีนาเซติน

ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกมีผลต่อการไฮโดรไลส์ฟีนาเซติน (จากผลการทดลองในหัวข้อ 3.2.4.2 (ก)) ระยะเวลาในการไฮโดรไลส์อาจจะมีผลต่อการเกิดสารประกอบ imine ด้วย ซึ่งสามารถศึกษาได้โดยดำเนินขั้นตอนการทดลองตามหัวข้อ 3.2.4.1 โดยใช้สารละลายฟีนาเซตินเข้มข้น 60 ppm และกำหนดสภาวะการทดลองดังนี้

- ต้มสารละลายฟีนาเซตินกับกรดไฮโดรคลอริก 15 % (25 ซม^3) ภายใต้การ reflux เป็นระยะเวลา 30 นาที, 1, $1\frac{1}{2}$ และ 2 ชั่วโมง
- สารละลายวานิลิน 5 % ในเอธานอล (2 ซม^3)
- กรดไฮโดรคลอริก 15 % (1 ซม^3)

นำสารละลายสีเหลืองที่เกิดไปวัดการดูดกลืนแสงโดยเปรียบเทียบกับ reagent blank ปรากฏผลดังรูป 3.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 3.2 UV-spectrum ของสารประกอบ imine ที่ได้จากการไฮโดรไลส์ฟีนาเซตินในระยะเวลาต่าง ๆ กัน

จากผลการทดลองพบว่าระยะเวลาในการไฮโดรไลส์ฟีนาเซตินมีผลต่อการเกิดสารประกอบ imine เพราะได้ค่าการดูดกลืนแสงต่างกัน กล่าวคือเมื่อระยะเวลาในการไฮโดรไลส์ฟีนาเซตินเพิ่มขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงก็จะเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งระยะเวลาในการ reflux สารละลาย 2 ชั่วโมง จะให้ค่าดูดกลืนแสงสูงสุด ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้กรดไฮโดรคลอริก 15 % ไฮโดรไลส์ฟีนาเซตินคือ 2 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.4.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

โดยใช้สารมาตรฐานฟีนาเซตินจำนวน 0.4 กรัม ต้มภายใต้การ reflux กับกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นและระยะเวลาในการต้มตามภาวะการทดลองที่ศึกษาได้ แล้วทำให้สารละลายมีปริมาตรครบ 200 ซม^3 จะได้สารละลายมาตรฐานมีความเข้มข้น 2 x 10^3 ppm ปิเปตสารละลายนี้มา 62.5, 50, 37.5, 25, 12.5 ซม^3 ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ซม^3 เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร ก็จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1250, 1000, 750, 500, 250 ppm ตามลำดับ

3.2.4.4 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งผงยาที่บดละเอียดแล้วมา 0.5 กรัม ใส่ในขวดแก้วก้นกลมขนาด 100 ซม^3 ต้มภายใต้การ reflux กับกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 15 % เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นและเติมน้ำจนครบปริมาตร 100 ซม^3 ในขวดวัดปริมาตร กรองโดยทิ้งสารละลายในส่วนแรกไปประมาณ 20 ซม^3 เก็บสารละลายส่วนที่กรองได้นำไปทดลองต่อไป

3.2.4.5 การศึกษา interference

ในการทำปริมาณวิเคราะห์เพื่อให้ได้ผลถูกต้องจำเป็นจะต้องศึกษาถึง interference ที่จะมีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์ ในยาตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ประกอบด้วยยาตัวอื่น ๆ นอกจากฟีนาเซติน ดังนั้นในการศึกษา interference จึงทำได้ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(ก) การทดสอบเบื้องต้น

นำสารมาตรฐานที่เป็นองค์ประกอบในยาที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ แอสไพริน (aspirin) และแคฟฟีอีน (caffeine) จำนวน 0.5 กรัม มาเตรียมสารละลายมาตรฐานแอสไพรินและแคฟฟีอีน และดำเนินการทดลองตามภาวะการทดลองที่ศึกษาแล้ว นำไปศึกษาการดูดกลืนแสงโดยเปรียบเทียบกับ reagent blank ที่ความยาวคลื่น 394 nm พบว่าทั้งแอสไพรินและแคฟฟีอีนไม่สามารถวัดค่าดูดกลืนแสงได้เพราะได้ค่าน้อยกว่า 0

(ข) นำสารละลายมาตรฐานแอสไพรินและแคฟฟีอีนความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (30-120 ppm) เติมลงในสารละลายมาตรฐานฟีนาเซติน (จากหัวข้อ 3.2.4.2) 30 ppm ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน แล้วดำเนินการทดลองตามภาวะการทดลองที่ศึกษาแล้ว นำไปวัดการดูดกลืนแสงโดยเปรียบเทียบกับ reagent blank ที่ความยาวคลื่น 394 nm ปรากฏผลดังตาราง 3.3

ตาราง 3.3 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (จากการทดลอง 2 ครั้ง) ของสารละลายมาตรฐานฟีนาเซติน เมื่อมีสารละลายมาตรฐานแอสไพรินและแคฟฟีอีน

อัตราส่วนความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย					
	0:1	1:0	1:1	1:2	1:3	1:4
ฟีนาเซติน : แอสไพริน	< 0	0.315	0.300	0.310	0.309	0.315
ฟีนาเซติน : แคฟฟีอีน	< 0	0.315	0.298	0.300	0.300	0.303

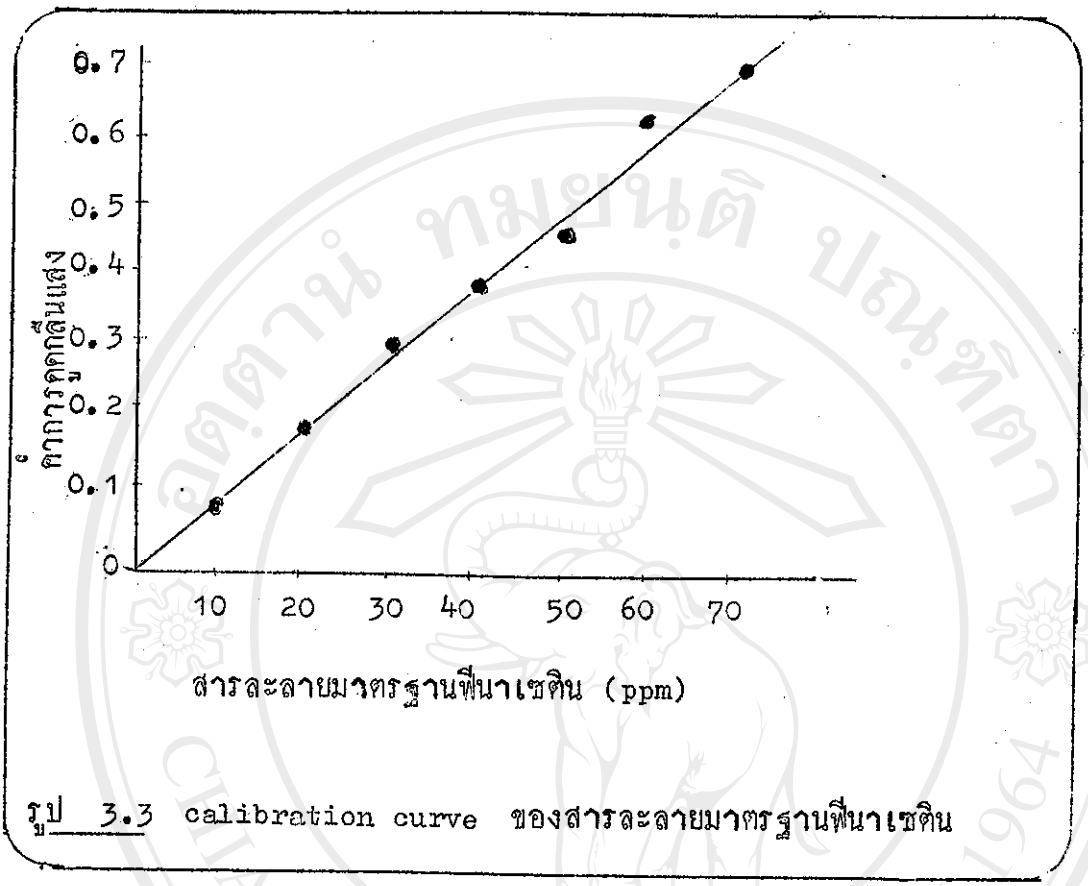
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากผลการทดลองพบว่าแอสไพรินที่มีอยู่ในสารละลายมาตรฐานฟีนาเซติน ในอัตราส่วนต่าง ๆ กันมีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงไปน้อยมาก และบางอัตราส่วนก็ไม่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลง จึงอาจสรุปได้ว่าแอสไพรินไม่มีผลรบกวนต่อการทำปริมาณวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้ สำหรับแคฟฟีอิน ในสารละลายฟีนาเซตินอัตราส่วนต่าง ๆ กันมีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงใกล้เคียงกันและไม่เป็นสัดส่วนกันคือ เมื่ออัตราส่วนระหว่างฟีนาเซตินต่อแคฟฟีอินเป็น 1:1 ค่าการดูดกลืนแสงจะลดลง 0.017, อัตราส่วน 1:2 จะลดลง 0.015 และเมื่ออัตราส่วนเป็น 1:4 ค่าการดูดกลืนแสงจะลดลงเพียง 0.012 ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าแคฟฟีอินไม่มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์ฟีนาเซติน

3.2.4.6 การทำ calibration curve

ทำ calibration graphโดยการนำสารละลายมาตรฐานฟีนาเซตินที่เตรียมได้จากหัวข้อ 3.2.4.3 ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน มาทำการทดลองตามภาวะการทดลองที่ศึกษาแล้ว เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น (ppm) ต่าง ๆ ของสารละลายมาตรฐานฟีนาเซติน ดังรูป 3.3 จะเห็นว่า calibration graph ผ่านจุดศูนย์และเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของฟีนาเซติน 0-70 ppm ซึ่งจะใช้ calibration curve นี้ในการศึกษาความแม่นยำ การหาปริมาณฟีนาเซตินในยาและความถูกต้องของการวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 3.3 calibration curve ของสารละลายมาตรฐานฟีนาเซติน

3.2.4.7 ผลการศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์

การศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์นี้สามารถทำการทดลองได้โดยนำสารละลายมาตรฐานฟีนาเซตินความเข้มข้น 10 ppm มาวิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซตินตามเทคนิคนี้ภายใต้ภาวะการทดลองที่เหมาะสม โดยทำการทดลอง 10 ครั้ง จะได้ผลดังตาราง 3.4 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาหา mean, standard deviation และ relative standard deviation ตามวิธีทางสถิติ (ดังหัวข้อ 2.2.4.5)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนาเซตินเพื่อศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ครั้งที่	absorbance	ความเข้มข้นของฟีนาเซตินจาก calibration curve (ppm)
1	0.102	11.5
2	0.090	10.0
3	0.090	10.0
4	0.095	10.5
5	0.095	10.5
6	0.102	11.5
7	0.090	10.0
8	0.090	10.0
9	0.100	11.0
10	0.090	10.0

จากข้อมูลข้างต้น คำนวณค่าต่าง ๆ ได้ดังนี้

1. ค่าเฉลี่ย = 10.5 ppm
2. ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน = $\pm$ 0.62 ppm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ = ± 5.94 %
(coefficient of variation)

จะเห็นว่าการวิเคราะห์ฟีนาเซทินความเข้มข้น 10 ppm โดยวิธี UV-spectrophotometry ภายใต้ภาวะการทดลองที่เหมาะสมจะได้ค่าเฉลี่ย 10.5 ppm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ± 0.62 ppm และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ± 5.94 % จึงอาจสรุปได้ว่าการทำปริมาณวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้ให้ความแม่นยำในเกณฑ์ดีพอสมควร

3.2.4.8 ผลการศึกษาความแม่นยำของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

ในการทำปริมาณวิเคราะห์สิ่งสำคัญอันหนึ่งคือ เครื่องมือที่ใช้ศึกษาการดูดกลืนแสงของสาร ซึ่งจะต้องมีความแม่นยำในการวัดเพื่อให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้อง การศึกษาแม่นยำของเครื่องมือ (Varian techtron 635 UV-VIS Recording Spectrophotometer) ทำได้โดยนำสารละลายยาตัวอย่างมาทำการทดลองตามภาวะการทดลองของเทคนิคนี้ แล้วไปวัดการดูดกลืนแสงโดยเปรียบกับ reagent blank ที่ความยาวคลื่น 394 nm วัดซ้ำกัน 10 ครั้ง ได้ผลดังตาราง 3.5 นำค่าที่ได้มาคำนวณค่า mean, standard deviation และ relative standard deviation

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.5 ผลการวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายยาตัวอย่าง จำนวน 10 ครั้ง

ครั้งที่	การดูดกลืนแสง	ความเข้มข้นของฟีนาเซตินจาก calibration curve (ppm)
1	0.040	4.90
2	0.040	4.90
3	0.040	4.90
4	0.040	4.90
5	0.041	5.00
6	0.040	4.90
7	0.040	4.90
8	0.040	4.90
9	0.040	4.90
10	0.041	5.00

จากข้อมูลข้างต้น คำนวณค่าต่าง ๆ ได้ดังนี้

1. Mean = 4.92 ppm
2. Standard deviation = $\pm$0.04 ppm
3. Relative standard deviation = $\pm$0.86 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จะเห็นว่าการใช้เครื่องมือนี้วัดการดูดกลืนแสงของสารละลายยาตัวอย่างซ้ำกัน 10 ครั้ง เพื่อหาปริมาณฟีนาเซตินในยาตัวอย่างจะได้ค่า mean 4.92 ppm ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ± 0.04 ppm และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ± 0.86 % ซึ่งให้ความแม่นยำสูง

3.2.4.9 <u>การวิเคราะห์ปริมาณฟีนาเซตินในยาแก้ปวด</u>

นำสารละลายยาตัวอย่าง 0.1 ซม^3 (จากหัวข้อ 3.2.4.4) จำนวน 5 ชนิด มาทำการทดลองตามภาวะการทดลองที่ศึกษาแล้ว นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาหาปริมาณฟีนาเซตินโดยอ่านความเข้มข้นจาก calibration curve ได้ผลดังตาราง 3.6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.6 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (จากการทดลอง 5 ครั้ง) ของสารละลายยาตัวอย่างและปริมาณฟีนาเซตินในยาตัวอย่าง 5 ชนิด

ชื่อยา	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย	ปริมาณของฟีนาเซตินที่อ่านจาก calibration curve (ppm)	ปริมาณของฟีนาเซตินในยา (มก/กรัม)
ซาลาไพริน	0.043	5.00	250.00
ตราไก่	0.050	6.00	300.00
ประสะบอแรด	0.023	2.90	145.00
หัวสิงห์	0.041	4.90	245.00
ไวกุล	0.043	5.00	250.00

จากผลการวิเคราะห์พบว่าในยาแต่ละชนิดมีปริมาณฟีนาเซตินแตกต่างกัน โดยในยาตราไก่จะมีฟีนาเซตินมากที่สุด และในยาประสะบอแรดมีปริมาณน้อยที่สุด ซึ่งผลการวิเคราะห์จะใกล้เคียงกับปริมาณฟีนาเซตินที่มีอยู่จริงในยาหรือไม่ ต้องทำการศึกษาเพื่อหาความถูกต้อง (accuracy) ของการวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้ต่อไป

3.2.4.10 การศึกษาความถูกต้อง (accuracy) ของการวิเคราะห์

การหาความถูกต้องในรูป percentage recovery โดยใช้วิธี single standard addition ทำโดยการเติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (ความเข้มข้นเดียว) ลงในสารละลายยาตัวอย่าง แล้ววิเคราะห์หาปริมาณของฟีนาเซตินที่เติมลงไป (มีวิธีการเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.2.4.8) ได้ผลดังตาราง 3.7-3.11

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.7 ค่า percentage recovery และ percentage error ของการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซตินในยาซาลาไพริน

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟีนาเซตินที่เติม (ppm)	ความเข้มข้นของฟีนาเซตินจาก calibration curve (ppm)	ความเข้มข้นของฟีนาเซตินที่พบ (ppm)	% recovery	% error
0.00	5.00	5.00	-	-
30.00	39.00	34.00	113.33	-13.33
30.00	38.00	33.00	110.00	-10.00
30.00	36.00	31.00	103.33	- 3.33
30.00	40.00	35.00	116.67	-16.67
30.00	39.00	34.00	114.00	-13.33
		เฉลี่ย	111.47	-11.33

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.8 ค่า percentage recovery และ percentage error ของการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซตินในยาตราไก่

ความเข้มข้นของสารละลายฟีนาเซตินที่เติม (ppm)	ความเข้มข้นของฟีนาเซติน* จาก calibration curve (ppm)	ความเข้มข้นของฟีนาเซตินที่พบ (ppm)	% recovery	% error
0.00	6.00	6.00	-	-
20.00	27.50	21.50	107.50	-7.50
20.00	25.50	19.50	98.00	-2.00
20.00	26.50	20.50	102.50	-2.50
20.00	26.50	20.50	102.50	-2.50
20.00	25.50	19.50	98.00	-2.00
		เฉลี่ย	101.70	-3.30

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.9 ค่า percentage recovery และ percentage error ของการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซตินในยาประสะบอแรด

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติม (ppm)	ความเข้มข้นของฟีนาเซตินจาก calibration curve (ppm)	ความเข้มข้นของฟีนาเซตินที่พบ (ppm)	% Recovery	% error
0	2.90	2.90	-	-
30	37.00	34.10	113.67	-13.67
30	33.00	30.10	100.33	- 0.33
30	35.00	32.10	107.00	- 7.00
30	36.00	33.10	110.33	-10.33
30	36.00	33.10	110.33	-10.33
		เฉลี่ย	108.33	- 8.33

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.10 ค่า percentage recovery และ percentage error ของการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซตินในยาหัวสิงห์

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟีนาเซตินที่เติม (ppm)	ความเข้มข้นของฟีนาเซติน* จาก calibration curve (ppm)	ความเข้มข้นของฟีนาเซตินที่พบ (ppm)	% recovery	% error
0	4.90	4.90	-	-
10	14.00	9.10	91.00	+9.00
10	13.00	8.10	81.00	+1.00
10	15.00	10.10	101.00	-1.00
10	15.00	10.10	101.00	-1.00
10	15.00	10.10	101.00	-1.00
		เฉลี่ย	95.00	+1.4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.11 ค่า percentage recovery และ percentage error ของการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซตินในยาไวกุล

ความเข้มข้นของสารละลายฟีนาเซตินที่เติม (ppm)	ความเข้มข้นของฟีนาเซติน * จาก calibration curve	ความเข้มข้นของฟีนาเซตินที่พบ (ppm)	% recovery	% error
0.00	5.00	5.00	-	-
40.00	46.50	47.50	103.75	-3.75
40.00	48.50	43.50	108.75	-8.75
40.00	44.50	39.50	98.75	+1.25
40.00	44.50	39.50	98.75	+1.25
40.00	46.50	47.50	103.75	-3.75
		เฉลี่ย	102.75	-13.75

* = ผลรวมของฟีนาเซตินที่มีอยู่กับฟีนาเซตินที่เติมลงไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากผลการทดลองจะเห็นว่ายาตัวอย่าง 4 ชนิด มีค่า % recovery เกินกว่า 100 โดยยาซาลาไพรินจะมีค่ามากที่สุดคือ 111.47 รองลงมาคือ ในยาประสะบอแรด เท่ากับ 108.33 ยาตราไก่มีค่า % recovery เท่ากับ 101.70 ใกล้เคียงกับในยาไวกุล ซึ่งเท่ากับ 102.75 แสดงว่าในยาทั้ง 4 ชนิด เมื่อทำปริมาณวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้จะได้ปริมาณฟีนาเซตินกลับคืนมามากกว่าที่เติมลงไป ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ไม่ถูกต้อง ในยาไวกุลจะมี % error มากที่สุด คือ 13.75 สำหรับในยาหัวสิงห์จะมีค่า % recovery ต่ำสุด คือ 95.00 ซึ่งแสดงว่าจากเทคนิคนี้สามารถวิเคราะห์ฟีนาเซตินกลับคืนได้น้อยกว่าที่เติมลงไป มีความผิดพลาดถึง 5 % ทั้งนี้อาจเนื่องจากองค์ประกอบต่าง ๆ ในยามีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์

3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซตินในยาแก้ปวดโดยวิธีแยกสกัดและสเปกโตโฟโตเมตรี

3.3.1 คำนำ

ยาแก้ปวดส่วนมากมักจะประกอบด้วยแอสไพรินและฟีนาเซตินรวมกัน หรือแอสไพริน, แคฟฟีอินและฟีนาเซติน (APC) ถ้าต้องการจะวิเคราะห์หาปริมาณของแต่ตัวโดยที่ไม่เกิดการรบกวนกัน ก็ทำได้โดยแยกตัวยาที่จะวิเคราะห์ออกมาซึ่งจะใช้วิธีใดก็ต้องพิจารณาถึงสมบัติของยาที่ต้องการวิเคราะห์และตัวยาหรือสารอื่นๆ ที่มีอยู่ในตำรับ ซึ่งมีหลายวิธีเช่นสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) หรือรงคเลขต่าง ๆ (chromatography) แล้วนำไปหาปริมาณโดยวิธี gravimetry หรือ spectrophotometry

3.3.2 การทดลอง

3.3.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. Varian techtron 635 Ultraviolet-Visible Recording Spectro-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

photometer ผลิตโดย Varian techtron PTY Ltd., Australia; 1 Pen Recorder Model 135 A ผลิตโดย Matsushita communication Industrial Co. Ltd., Japan. Condition ที่ใช้

Absorbance	0-2.0	fsd
Slit width	1.0	nm
Scan rate	50	nm/min
Chart speed	$3\frac{1}{3}$	cm/min

2. คอลัมน์ขนาด 250 x 25, 250 x 20 และ 250 x 10 มม

3.3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้เป็น Analytical reagent ยกเว้นที่ระบุไว้เป็นพิเศษ ได้นำสารเคมีต่อไปนี้มาใช้ในการวิจัย โดยไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่ง

1. สารเคมีที่ผลิตโดย BDH Chemical Ltd., Poole, England
   - Phenacetin, $C_{10}H_{13}NO_2$, Laboratory grade
   - Sodium bicarbonate, $NaHCO_3$
   - Chloroform, $CHCl_3$
2. สารเคมีที่ผลิตโดย E.Merck, Damstadt, Germany
   - Ethanol, C_2H_5OH
   - Ether, $C_4H_{10}O$
3. สารเคมีที่ผลิตโดย Fluka, Switzerland
   - Celite 545
4. สารเคมีที่ผลิตโดย Sigma Chemical Company, U.S.A.
   - Aspirin, $C_9H_9O_4$, Laboratory grade

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5. สารเคมีที่ผลิตโดย May & Baker Ltd.

- Sulfuric acid, H_2SO_4

3.3.2.3 การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายโซเดียม ไบคาร์บอเนต 1 M ละลายโซเดียม ไบคาร์บอเนต 0.84 กรัมในน้ำกลั่น แล้วทำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ซม^3 ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ซม^3

2. การเตรียมสารละลายโซเดียม ไบคาร์บอเนต 0.1, 0.5, 1.5 และ 2.0 M เตรียมได้เช่นเดียวกับข้อ 1 โดยใช้โซเดียม ไบคาร์บอเนต 0.084, 0.42, 1.26 และ 1.68 กรัม ตามลำดับ

3. การเตรียมสารละลายกรดซัลฟุริก 8 N, 6 N, 4 N, 2 N และ 0.1 N นำกรดซัลฟุริกเข้มข้นจำนวน 56.54 ซม^3 ละลายในน้ำกลั่น ทำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 ซม^3 ในขวดวัดปริมาตร สารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้น 8 N ซึ่งใช้เป็น stock solution สำหรับเตรียมสารละลายกรดซัลฟุริกความเข้มข้นอื่น ๆ

4. การเตรียมสารละลาย acid alcohol (HCl-methanol)

ปิเปตสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจำนวน 2 ซม^3 ละลายในเมธานอลและทำให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ซม^3 ในขวดวัดปริมาตร

5. การเตรียม siliceous earth (celite 545, acid-washed) นำ celite 545 มาผ่านด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (1 : 2) จนกระทั่ง eluate ที่ได้ไม่มีสีเหลือง แล้วจึงผ่านด้วยน้ำกลั่น จนกระทั่ง eluate เป็นกลาง ผ่านต่อไปด้วย alcohol 95 % แล้วจึงนำ celite ไปอบที่อุณหภูมิ 100°C จนกระทั่งไม่มีกลิ่นของ alcohol เหลืออยู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟีนาเซตินเข้มข้น 1.0×10^3 ppm

ละลายสารมาตรฐานฟีนาเซติน 0.10 กรัม ในเอธานอล แล้วทำให้ปริมาตรครบ 100 ซม^3 ด้วยเอธานอลในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ซม^3 สารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้น 1.0×10^3 ppm ซึ่งใช้เป็น stock solution สำหรับเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อไป

7. การเตรียมสารละลายยาตัวอย่าง

ชั่งยาตัวอย่าง (ชนิดเดียวกับในหัวข้อ 3.2.2.4) 0.01 กรัม ละลายใน acid alcohol 2 ซม^3 และทำให้ครบปริมาตร 50 ซม^3 ด้วยคลอโรฟอร์ม ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 ซม^3

8. การเตรียมสารละลายยาผสมแอสไพริน, ฟีนาเซตินและแคฟฟีอิน

สารละลายยาผสมซึ่งเตรียมขึ้นจากการผสมตัวยามาตรฐานแอสไพริน ฟีนาเซตินและแคฟฟีอิน จำนวนเท่ากับที่ยาแต่ละชนิดระบุไว้มาละลายใน acid alcohol จำนวน 1 ซม^3 และทำให้เจือจางด้วยคลอโรฟอร์ม ในการทดลองนี้เตรียมสารละลายยาผสม 4 sample โดยกำหนดให้ปริมาณสารมาตรฐานแอสไพรินและแคฟฟีอินในแต่ละ sample เท่ากัน แต่ปริมาณฟีนาเซตินจะเท่ากับที่ยาแต่ละชนิดระบุไว้

sample 1 นำสารมาตรฐานแอสไพริน, แคฟฟีอินและฟีนาเซตินมา 0.45, 0.1 และ 0.35 กรัม ตามลำดับ ละลายใน acid alcohol จำนวน 1 ซม^3 และทำให้มีปริมาตรครบ 100 ซม^3 ด้วยคลอโรฟอร์มในขวดวัดปริมาตร

sample 2 เตรียมได้เช่นเดียวกับ sample 1 โดยนำแอสไพริน, แคฟฟีอินและฟีนาเซติน มา 0.45, 0.1 และ 0.30 กรัม ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

sample 3 เตรียมได้เช่นเดียวกับ sample 1 โดยนำแอสไพริน แคฟฟีอิน และฟีนาเซติน มา 0.45, 0.1 และ 0.25 กรัม ตามลำดับ

sample 4 เตรียมได้เช่นเดียวกับ sample 1 โดยนำแอสไพริน แคฟฟีอิน และฟีนาเซติน มา 0.45, 0.10 และ 0.15 กรัม ตามลำดับ

3.3.3 หลักการวิเคราะห์

ยาผสมซึ่งประกอบด้วยแอสไพริน, ฟีนาเซติน และแคฟฟีอิน สามารถนำมาแยกออกจากกันโดย partition chromatography และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธีสเปกโตโฟโตเมตรี (spectrophotometry)

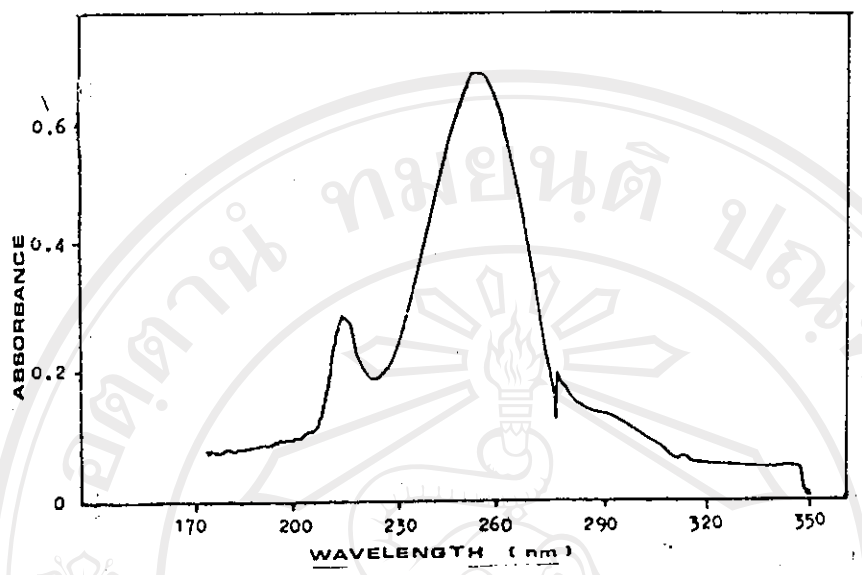
ในการแยกสารทั้ง 3 ตัว ออกจากกันนั้นจะใช้โซเดียมไบคาร์บอเนต และกรดซัลฟุริก โดยโซเดียมไบคาร์บอเนต จะเป็นตัวจับแอสไพริน ส่วนชั้นที่มีกรดซัลฟุริกจะจับแคฟฟีอินไว้ ดังนั้นเมื่อ elute คอลัมน์ด้วยอีเทอร์ก็จะได้ฟีนาเซตินออกมา นำไปวัดการดูดกลืนแสง ซึ่งจะมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 250 nm ค่าการดูดกลืนแสงนี้จะใช้เป็นหลักในการหาปริมาณฟีนาเซตินในยาได้

3.3.4 การทดลอง ผลการทดลองและวิจารณ์

3.3.4.1 UV absorption spectrum ของสารละลายมาตรฐานฟีนาเซติน

ในการศึกษาโดยเทคนิคนี้จำเป็นจะต้องทราบว่าสารที่ต้องการศึกษาคือ ฟีนาเซตินมีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเท่าใด (λ_{max}) ซึ่งทำการทดลองได้โดยนำสารละลายมาตรฐานฟีนาเซตินในเอธานอล ความเข้มข้น 6 ppm มาวัดการดูดกลืนแสงโดยเปรียบเทียบกับเอธานอลจะได้ absorption spectrum ดังรูป 3.4 ซึ่งพบว่าฟีนาเซตินมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 252 nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



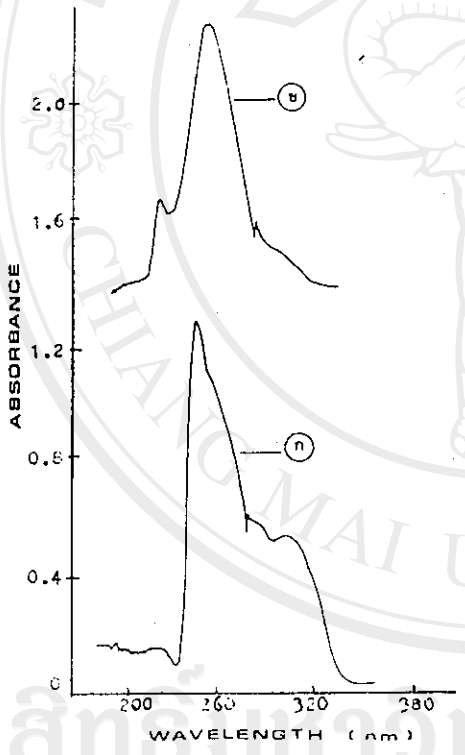
รูป 3.4 UV absorption spectrum ของสารละลายมาตรฐานฟีนาเซติน เข้มข้น 6 ppm

3.3.4.2 UV absorption spectrum ของสารละลายผสมแอสไพริน, แคฟฟีอิน และฟีนาเซติน

ในการทำปริมาณวิเคราะห์ของสารโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นหนึ่ง ๆ ต้องมีสารที่จะศึกษาเพียงตัวเดียวเท่านั้นที่ดูดกลืนแสงได้ ผลการวิเคราะห์จึงจะถูกต้อง ดังนั้นเราจึงต้องศึกษาดูว่าในสารละลายผสมแอสไพริน, แคฟฟีอินและฟีนาเซติน มีการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นใดบ้าง ซึ่งทำการทดลองได้โดยนำสารละลายผสม (sample 1) 1 ซม^3 ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 10 ซม^3 ทำให้ครบปริมาตรด้วยเอธานอล นำไปวัดการดูดกลืน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แสงโดยวัดเทียบกับเอธานอล จะได้ absorption spectrum ดังรูป 3.5 ก ซึ่งจะเห็นว่ามีการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 305, 281, 252 และ 245 nm เป็นผลมาจากการดูดกลืนแสงของแอสไพริน แคฟฟีอีน และฟีนาเซติน ซึ่งอยู่รวมกันในเอธานอล



รูป 3.5 UV absorption spectrum ของสารละลายผสม แอสไพริน แคฟฟีอีนและฟีนาเซติน เมื่อไม่ผ่านคอลัมน์ (ก) และผ่านคอลัมน์ (ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.4.3 UV absorption spectrum ของสารที่ได้จากการสกัดสารผสม

ถ้าทำการสกัดฟีนาเซตินโดยอาศัยหลักการตามหัวข้อ 3.3.3 จะได้ฟีนาเซตินออกมาหรือไม่ ทำการทดลองได้ดังนี้

(1) การเตรียมคอลัมน์

ใช้คอลัมน์ขนาด 250 x 25 มม. ซึ่งด้านล่างปิดไว้ด้วยใยแก้ว นำ celite acid-washed หนัก 3 กรัมผสมกับกรดซัลฟุริกเข้มข้น 6 N จำนวน 2 ซม^3 pack ลงในคอลัมน์อัดให้แน่น ด้านบนปิดด้วยกระดาษกรอง แล้วนำ celite มาอีก 3 กรัม ซึ่งผสมกับโซเดียม ไบคาร์บอเนตเข้มข้น 1 M ที่เตรียมขึ้นมาใหม่ ๆ จำนวน 2 ซม^3 pack ลงในคอลัมน์ ด้านบนปิดด้วยกระดาษกรอง ผ่านคอลัมน์ด้วยคลอโรฟอร์มจำนวน 25 ซม^3 และตามด้วยอีเทอร์จำนวน 50 ซม^3

(2) การทดลอง

ปิเปตสารละลายผสม (sample 1) 1 ซม^3 ละลายในอีเทอร์จำนวน 30 ซม^3 แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ หลังจากสารผ่านคอลัมน์หมดแล้วจึงชะ (elute) ด้วยอีเทอร์จำนวน 50 ซม^3 นำ eluate ที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก นำ residue ที่ได้ละลายในเอธานอลให้มีปริมาตรครบ 50 ซม^3 ในขวดปริมาตร ปิเปตสารละลายนี้มา 2 ซม^3 ทำให้มีปริมาตรครบ 25 ซม^3 ในขวดวัดปริมาตร นำมาศึกษา absorption spectrum โดยวัดการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบกับเอธานอล จะได้ absorption spectrum ดังรูป 3.5 ข. ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับspectrum ในรูป 3.5 ก. จะเห็นความแตกต่างคือ ในรูป 3.5 ข. จะมี absorption peak เพียงที่เดียวคือ ที่ความยาวคลื่น 252 nm และเมื่อเปรียบเทียบกับ spectrum ในรูป 3.4 จะพบว่ามีลักษณะ absorption spectrum เหมือนกัน และมีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 252 nm เช่นเดียวกัน แสดงว่าสารที่ได้จากการให้สาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผสมผ่านคอลัมน์คือ ฟีนาเซติน มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 252 nm ซึ่งในการทดลองต่อไปจะศึกษาที่ความยาวคลื่นนี้

3.3.4.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง

ในการทำปริมาณวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้ ต้องทำแยกฟีนาเซตินออกจากสารผสมให้ได้มากที่สุด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่อาจจะมีผลต่อการแยกสกัด ซึ่งทำการทดลองได้ดังนี้

(ก) อิทธิพลของขนาดคอลัมน์

ขนาดของคอลัมน์อาจมีผลต่อการแยกสกัดฟีนาเซตินออกจากสารผสม ซึ่งทำการทดลองได้โดยใช้สารผสม (sample 1) 1 ซม^3 ดำเนินขั้นตอนการทดลองตามหัวข้อ 3.3.4.3 โดยใช้คอลัมน์ขนาด 250 x 25 มม, 250 x 20 มม, และ 250 x 10 มม. นำสารที่ได้วัดการดูดกลืนแสงโดยวัดเทียบกับเอธานอล ที่ความยาวคลื่น 252 nm ปรากฏผลดังตาราง 3.12

ตาราง 3.12 ค่าการดูดกลืนแสงของฟีนาเซติน โดยใช้คอลัมน์ขนาดต่างกัน

ขนาดของคอลัมน์ (มม)	ค่าการดูดกลืนแสง
250 x 10	0.09
250 x 20	0.25
250 x 25	0.21

จากผลการทดลอง ขนาดของคอลัมน์มีผลต่อการแยกสกัดฟีนาเซตินออกจากสารผสม เพราะได้ค่าดูดกลืนแสงต่างกัน โดยคอลัมน์ขนาด 250 x 20 มม. จะแยกฟีนาเซตินได้มากที่สุด และขนาด 250 x 10 มม. จะแยกได้น้อยที่สุด เพราะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่าดูดกลืนแสงน้อยที่สุด ในการทดลองต่อไปจึงใช้คอลัมน์ขนาด 250 x 20 มม. ในการแยกฟีนาเซตินออกจากสารผสม

(ข) อิทธิพลของความเข้มข้นของกรดซัลฟุริก

คอลัมน์ชั้นที่มีกรดซัลฟุริกจะเป็นตัวจับแคฟฟีอินไว้ ความเข้มข้นของกรดซัลฟุริกอาจจะมีผลต่อการแยกฟีนาเซตินออกจากสารผสม ซึ่งทำการทดลองได้โดยนำสารผสม (sample) 1 ซม^3 ดำเนินการทดลองตามขั้นตอนในหัวข้อ 3.3.4.3 โดยใช้ celite ผสมกับกรดซัลฟุริกเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0.1, 2, 4, 6 และ 8 N นำสารที่ได้วัดการดูดกลืนแสงโดยเปรียบเทียบกับเอธานอลที่ความยาวคลื่น 252 nm ได้ผลดังตาราง 3.13

ตาราง 3.13 ค่าการดูดกลืนแสงของฟีนาเซตินที่แยกได้ โดยความเข้มข้นของกรดซัลฟุริกเปลี่ยนไป

ความเข้มข้นของกรดซัลฟุริก (N)	ค่าการดูดกลืนแสง
0.1	0.10
2.0	0.18
4.0	0.29
6.0	0.25
8.0	0.12

จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของกรดซัลฟุริกมีผลต่อการแยกสกัดฟีนาเซตินออกจากสารผสมเพราะได้ค่าการดูดกลืนแสงต่างกัน เมื่อใช้กรดซัลฟุริกเข้มข้น 0.1 M จะได้ค่าดูดกลืนแสงต่ำสุด ซึ่งอาจเป็นเพราะความเข้มข้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของกรดซัลฟุริกมีไม่มากพอที่จะแยกแคฟฟีอินออกจากฟีนาเซติน จึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำ กรดซัลฟุริกเข้มข้น 4 N จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ซึ่งจะใช้ความเข้มข้นนี้ในการทดลองต่อไป

(ค) ผลของความเข้มข้นของโซเดียม ไบคาร์บอเนต

แอสไพรินในสารผสมจะถูกแยกออกเมื่อผ่านสารผสมไปในช่วงที่มีโซเดียม ไบคาร์บอเนต ซึ่งความเข้มข้นของโซเดียม ไบคาร์บอเนตจะมีผลต่อปริมาณฟีนาเซตินที่แยกได้หรือไม่ ทำการทดลองได้โดยใช้สารผสม (sample 1) 1 ซม^3 ผ่านคอลัมน์ขนาด 250 x 20 มม ซึ่งมีกรดซัลฟุริกเข้มข้น 4 N และโซเดียม ไบคาร์บอเนต ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0.1, 0.5, 1, 1.5 และ 2 M ดำเนินการทดลองตามหัวข้อ 3.3.4.3 วัดการดูดกลืนแสงของสารเปรียบเทียบกับเอธานอลที่ความยาวคลื่น 252 nm ได้ผลดังตาราง 3.14

ตาราง 3.14 ค่าการดูดกลืนแสงของฟีนาเซตินที่แยกได้ โดยใช้โซเดียม ไบคาร์บอเนต ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้นของโซเดียม ไบคาร์บอเนต (M)	ค่าการดูดกลืนแสง
0.1	0.20
0.5	0.31
1.0	0.23
1.5	0.18
2.0	0.17

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของโซเดียม ไบคาร์บอเนต เปลี่ยนไปจะได้ค่าการดูดกลืนแสงแตกต่างกันที่เป็นเช่นนี้เพราะปริมาณฟีนาเซตินที่แยกสกัดได้ไม่เท่ากัน ความเข้มข้นของโซเดียม ไบคาร์บอเนตที่ทำให้ได้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 252 nm สูงสุดคือ 0.5 M ซึ่งในการทดลองต่อไปจะใช้ความเข้มข้นนี้

(ง) ผลของการใช้อีเทอร์ปริมาณต่างกันผ่านคอลัมน์

แอสไพรินและแคฟฟีอินจะค้างอยู่ในคอลัมน์ เมื่อผ่านอีเทอร์ลงในคอลัมน์ ฟีนาเซตินจะถูกแยกออกมา ซึ่งปริมาณของอีเทอร์ที่ใช้น่าจะมีผลต่อการแยกฟีนาเซตินออกจากสารผสม ทำการทดลองได้โดยใช้สารผสม (sample 1) ดำเนินขั้นตอนการทดลองตามหัวข้อ 3.3.4.3 ซึ่งกำหนดภาวะการทดลองดังนี้

- คอลัมน์ขนาด 250 x 20 มม.
- กรดซัลฟุริก 4 N ผสมกับ celite 3 กรัม
- โซเดียม ไบคาร์บอเนต 0.5 M ผสมกับ celite 3 กรัม
- อีเทอร์ 25, 50 และ 75 ซม^3

ตาราง 3.15 ค่าการดูดกลืนแสงของฟีนาเซตินเมื่อใช้อีเทอร์ปริมาณต่างกัน

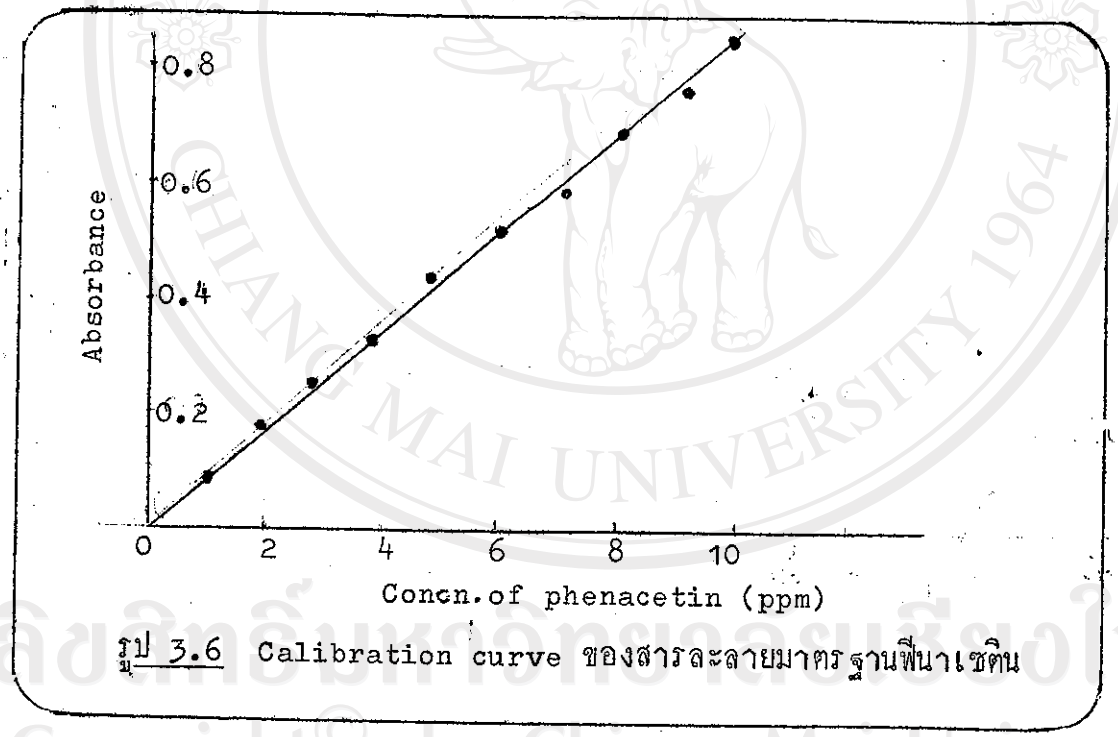
จำนวนอีเทอร์ (ซม^3)	ค่าการดูดกลืนแสง
25	0.08
50	0.23
75	0.28

จากผลการทดลองพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้อีเทอร์ปริมาณมากขึ้น นั่นคือปริมาณของอีเทอร์จะมีผลต่อการแยกสกัดฟีนาเซตินออกจากคอลัมน์ ดังนั้นในการทดลองโดยเทคนิคนี้จะใช้อีเทอร์จำนวน 75 ซม^3 ชะคอลัมน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.4.5 การทำ calibration curve

ทำ calibration curve โดยนำสารละลายมาตรฐานฟีนาเซตินในเอธานอล ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (1-10 ppm) วัดการดูดกลืนแสงโดยเปรียบเทียบกับเอธานอลที่ความยาวคลื่น 252 nm แล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายมาตรฐานฟีนาเซติน ดังรูป 3.6 จะเห็นว่า calibration graph จะผ่านจุดศูนย์และเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของฟีนาเซติน 0-10 ppm ซึ่งจะใช้ calibration curve นี้ในการศึกษาความแม่นยำ การหาปริมาณฟีนาเซตินในยาและความถูกต้องของการวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้



รูป 3.6 Calibration curve ของสารละลายมาตรฐานฟีนาเซติน

3.3.4.6 การหาความแม่นยำของการวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้

การสกัดฟีนาเซตินออกจากสารผสมโดยให้ผ่านคอลัมน์ ในการทดลองแต่ละครั้งจะมีความแม่นยำเพียงใดศึกษาได้โดยนำสารผสมที่เตรียมขึ้นคือ sample 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1 ซม^3 ซึ่งมีฟีนาเซตินเข้มข้น 3 ppm มาทำการทดลองภายใต้ภาวะการทดลองที่เหมาะสม (ตามหัวข้อ 3.3.4.4 ง) นำสารที่ได้วัดการดูดกลืนแสงโดยเปรียบเทียบกับเอธานอลที่ความยาวคลื่น 252 nm ทำการทดลอง 5 ครั้ง ได้ผลดังตาราง 3.16

ตาราง 3.16 ปริมาณฟีนาเซตินที่ได้จากการแยกสกัดสารผสมที่เตรียมขึ้น คือ sample 1

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง	ความเข้มข้นของฟีนาซีตินจาก calibration curve(ppm)
1	0.24	2.50
2	0.27	2.90
3	0.28	3.00
4	0.30	3.20
5	0.31	3.30

จากข้อมูลในตาราง 3.16 คำนวณค่าต่าง ๆ ได้ดังนี้

1. ค่าเฉลี่ย = 2.98 ppm
2. ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน = $\pm$0.32 ppm
3. ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ = $\pm$10.74 %

จากผลการทดลองการแยกสกัดฟีนาเซตินออกจากสารผสมและนำไปหาปริมาณโดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรีมีค่าเฉลี่ย 2.98 ppm ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน $\pm$ 0.32 และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ $\pm$10.74 % ซึ่งจะเห็นว่ามีความแม่นยำไม่ดีนัก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทดลองบางขั้นตอนมีโอกาสทำให้ข้อมูล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คลาดเคลื่อนได้ในการทดลองแต่ละครั้ง เช่น การ pack celite ลงในคอลัมน์ ซึ่งต้องทำให้แน่นสม่ำเสมอกัน

3.3.4.7 การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซตินในยาแก้ปวด

ในยาแก้ปวดที่นำมาศึกษาประกอบด้วยตัวยาหลายชนิด ซึ่งโดยมากเป็น แอสไพริน, แคฟฟีอีน และฟีนาเซติน ดังนั้นการหาปริมาณของฟีนาเซตินในยาแก้ปวดโดยเทคนิคนี้ จึงทำได้โดยนำสารละลายยาตัวอย่าง 5 ซม^3 (เตรียมจากหัวข้อ 3.3.2.3 ข้อ 8) มาดำเนินการทดลองภายใต้ภาวะการทดลองที่เหมาะสม แล้วนำฟีนาเซตินที่แยกได้ละลายในเอซานอลจนครบ 50 ซม^3 ไปวัดการดูดกลืนแสงโดยเปรียบเทียบกับเอซานอลที่ความยาวคลื่น 252 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปหาปริมาณฟีนาเซตินโดยอ่านเทียบจาก calibration curve ได้ผลดังตาราง 3.17

ตาราง 3.17 ค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณฟีนาเซตินที่ได้จากการแยกสกัด

ชื่อยา	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย	ปริมาณของฟีนาเซตินอ่านจาก calibration curve (ppm)	ปริมาณของฟีนาเซตินในยา (มก/1 กรัม)
ซาลาไพริน	0.56	6.05	302.50
ตราไก่	0.58	6.25	312.50
ประสะบอแรด	0.37	4.00	200.00
หัวสิงห์	0.55	5.95	297.50
ไวกุล	0.56	6.05	302.50

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.4.8 การหาความถูกต้องของการวิเคราะห์

การทำปริมาณวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้จะมีความถูกต้องเพียงไรนั้นศึกษาได้โดยการหาความถูกต้องของการวิเคราะห์ในรูปของ percentage recovery ซึ่งทำได้โดยนำสารละลายผสม (เตรียมจากหัวข้อ 3.3.2.3 ข้อ 9) ทั้ง 4 sample 1 ซม^3 มาหาปริมาณของฟีนาเซตินโดยเทคนิคนี้ตามภาวะการทดลองที่เหมาะสมและคำนวณหาค่า % recoveryและ % error (วิธีการคำนวณเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.2.4.8 และ 2.2.4.9) ได้ผลดังตาราง 3.18

จากผลการทดลองจะเห็นว่าปริมาณของฟีนาเซตินที่แยกออกจากสารละลายผสมที่มีแอสไพริน, แคฟฟีอินและฟีนาเซติน โดยเทคนิคนี้ ในแต่ละ sample จะหาปริมาณฟีนาเซตินกลับคืนมาได้มากกว่าที่เติมลงไป เพราะมี % recovery เกินกว่า 100 ทั้งสิ้น และมี % error เฉลี่ย 11.45 สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากมีสารอื่นออกมาด้วยนอกจากฟีนาเซติน ซึ่งอาจมีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นใกล้เคียงกับฟีนาเซตินทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น ปริมาณฟีนาเซตินที่วิเคราะห์ได้จึงมากกว่าที่เติมลงไปในสารละลายผสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.18 ปริมาณของฟีนาเซตินในสารละลายยาผสม 4 samples

sample	ค่าการดูดกลืนแสง	ปริมาณฟีนาเซตินอ่านจาก calibration curve (ppm)	ปริมาณฟีนาเซตินที่พบ มก/100 ซม^3	ปริมาณฟีนาเซตินที่ใส่ มก/100 ซม^3	% recovery	% error
1	0.28	2.98	372.50	350.0	106.43	- 6.43
2	0.25	2.65	331.25	300.0	110.42	-10.42
3	0.21	2.20	275.00	250.0	110.00	-10.00
4	0.13	1.35	168.75	150.0	112.50	-12.50
				เฉลี่ย	109.84	11.45

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การหา % label amount ของฟีนาเซติน

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนาเซตินในยาแก้ปวดโดยวิธี colprimetry และวิธีแยกสกัดร่วมกับ spectrophotometry จะได้ผลดังตาราง 3.6 และ 3.17 เมื่อนำค่านี้มาคำนวณหา % label amount ของฟีนาเซติน โดยการคำนวณเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.4 ได้ผลดังตาราง 3.19

ตาราง 3.19 ค่า % label amount ของฟีนาเซตินในยาตัวอย่าง 5 ชนิด ที่ได้จากการวิเคราะห์โดย 2 เทคนิค

ชื่อยาตัวอย่าง	% label amount of phenacetin	
	Colorimetry	Seperation และ Spectrophotometry
ซาลาไพริน	79.80	96.56
ตราไก่	77.88	81.13
ประสะบอแรด	127.28	175.56
หัวสิงห์	94.35	114.57
ไวกุล	86.99	105.26

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved