การพัฒนาและการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟรีน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ได้พร้อมกัน ในยาเม็ดลดไข้ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง โดยใช้สารละลายไอออนิกเป็นตัวชะ

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF QUANTIFICATION OF PARACETAMOL, PHENYLEPHRINE HCL AND CHLORPHENIRAMINE MALEATE IN COLD TABLETS BY USING THE IONIC SOLUTION AS THE ELUENT

ยุพดี หนูสาย

YUPPADEE NUSAI

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2549

ISBN 974-8303-21-9

การพัฒนาและการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ พาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ได้พร้อมกัน ในยาเม็ดลดไข้ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบ-สมรรถนะสูง โดยใช้สารละลายไอออนิกเป็นตัวชะ

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF QUANTIFICATION OF PARACETAMOL, PHENYLEPHRINE HCL AND CHLORPHENIRAMINE MALEATE IN COLD TABLETS BY USING THE IONIC SOLUTION AS THE ELUENT

ยุพดี หนูสาย

YUPPADEE NUSAI

ขหมู่.....
ชทะเบียน 69065
น,เดือน,ปี - 7 ก.พ. 2550

.b.....
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2549

ISBN 974-8308-21-9

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF QUANTIFICATION OF PARACETAMOL, PHENYLEPHRINE HCL AND CHLORPHENIRAMINE MALEATE IN COLD TABLETS BY USING THE IONIC SOLUTION AS THE ELUENT

YUPPADEE NUSAI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN CHEMISTRY

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2006

ISBN 974-8308-21-9

COPYRIGHT 2006

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาและการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ได้พร้อมกันในยาเม็ดลดไข้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงโดยใช้สารละลายไอออนิกเป็นตัวชะ

Development and Validation of HPLC for Simultaneous Determination of Quantification of Paracetamol, Phenylephrine HCl and Chlorpheniramine Maleate in Cold Tablet by Using the Ionic Solution as the Eluent

ชื่อนักศึกษา นางสาวยุพดี หนูสาย

รหัสประจำตัว 46064003

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.คณิตา ตังคณานุรักษ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ดร.วิบูลย์	ประดิษฐ์เวียงคำ	
ผศ.คณิตา	ตังคณานุรักษ์	
ผศ.นงนุช	ศิวภิญโญยศ	
รศ.ดร.อรวรรณ	ชัยลภากุล	

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 18 ตุลาคม 2549 เวลา 09.30 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1 ห้อง 612

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ผศ.ดร.จารุวัตร เจริญสุข)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 30 **เดือน** พฤศจิกายน **พ.ศ.** 2549

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาและการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ได้พร้อมกันในยาเม็ดคลดไข้ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงโดยใช้สารละลายไอออนิกเป็นตัวชะ
นักศึกษา	นางสาวยุพดี หนูสาย
รหัสประจำตัว	46064003
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เคมี(เคมีวิเคราะห์)
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ.คณิตา ดังคณานุรักษ์

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาศักยภาพและข้อจำกัดของการใช้สารละลายไอออนิกเป็นตัวชะเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ได้พร้อมกันด้วยเทคนิค HPLC โดยงานวิจัยนี้ได้คิดค้นนำสารละลายไอออนิกมาเป็นตัวชะแทนตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อลดปัญหาทางมลพิษและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกและวิเคราะห์ และนับเป็นครั้งแรกที่สามารถใช้สารละลายไอออนิกในการวิเคราะห์ตัวยา 3 ชนิดนี้ได้พร้อมกัน การทดลองใช้คอลัมน์ C_{18} ขนาด 150 mm. x 3.9 mm. i.d. เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 20 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต (1-butyl-3-methylimidazolium 2-(2-methoxy ethoxy) ethyl sulfate) pH 3.0 และอัตราการไหล 1 $mLmin^{-1}$ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 260 nm และได้มีการทดสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยใช้สารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่างที่ถูกเติม(spiked) ด้วยสารละลายมาตรฐาน ค่าความเป็นเส้นตรงของระบบ(System linearity)ของสารละลายมาตรฐานคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล จากการวิเคราะห์ 5 ระดับความเข้มข้น ในช่วง 25 – 200% ของความเข้มข้นของสารที่ต้องการวัดในตัวอย่าง มีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ(R^2) เท่ากับ 0.9996 0.9999 และ 1 ตามลำดับ ค่าความเป็นเส้นตรงของวิธีทดสอบ(Method linearity)ของสารตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล จากการวิเคราะห์ 3 ระดับความเข้มข้น ในช่วง 50 – 150% ของความเข้มข้นของสารที่ต้องการวัดในตัวอย่าง มีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ(R^2) เท่ากับ 1 1 และ 1 ตามลำดับ ค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบได้และรายงานอย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ(Limit of Quantitation ; LOQ) ของคลอเฟ-นิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เท่ากับ 5.08 ppm 50.83 ppm

และ 19.78 ppm ตามลำดับ ค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจได้ (Limit of detection ; LOD) ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เท่ากับ 1.52 ppm 12.47 ppm และ 5.37 ppm ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ไม่พบสารรบกวนที่เวลาการคงไว้ที่ตรวจวัด ความถูกต้องของวิธีในการวิเคราะห์แสดงด้วยค่า %Recovery ซึ่งคลอเฟนิรามีน มาลีเอท มี % Recovery อยู่ในช่วง 96.35 – 99.61%(n = 6) สำหรับตัวอย่างที่ถูกเติม(spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น (10 20 และ 30 ppm) ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ มี %Recovery อยู่ในช่วง 98.65 - 99.24% (n = 6) สำหรับตัวอย่างที่ถูกเติม(spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น(50 100 และ 150 ppm) พาราเซตามอล มี %Recovery อยู่ในช่วง 99.10-101.10% (n = 6) สำหรับตัวอย่างที่ถูกเติม(spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น (60 120 และ 180 ppm) ความเที่ยงของการวิเคราะห์แสดงด้วยค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) พบว่ามีค่าไม่เกิน10% และได้วิเคราะห์หาปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ พาราเซตามอล ในยาเม็ดลดไข้ 2 ยี่ห้อ แต่ละยี่ห้อ ได้จากการเก็บตัวอย่างมา 20 เม็ด ทำ 2 ชุด และแต่ละชุดวิเคราะห์ซ้ำ 6 ครั้ง โดยในยายี่ห้อดีคอลเจน ได้ปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท เท่ากับ 1.93±0.10(mg/tablet);1.93±0.10(mg/tablet) ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ เท่ากับ 9.99±0.10(mg/tablet);9.92±0.32(mg/tablet) พาราเซตามอล เท่ากับ 498.06±4.56(mg/tablet); 491.44±8.33(mg/tablet) ส่วนในยายี่ห้อทิฟฟี่ได้ปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท เท่ากับ 1.92±0.11 (mg/tablet);1.90±0.11(mg/tablet) ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ เท่ากับ 7.49±0.11(mg/tablet) ;7.46±0.22(mg/tablet) พาราเซตามอลเท่ากับ 500.66±4.27(mg/tablet);494.61±5.89(mg/tablet) ซึ่งเมื่อนำผลการวิเคราะห์มาเปรียบเทียบกับปริมาณยาบนฉลากพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัย-สำคัญที่ระดับความมั่นใจ 95 %

Thesis Title	Development and Validation of HPLC for Simultaneous Determination of Quantification of Paracetamol, Phenylephrine HCl and Chlorpheniramine Maleate in Cold Tablet by Using the Ionic Solution as the Eluent
Student	Miss.Yuppadee Nusai
ID.Code	46064003
Degree	Master of Science
Program	Chemistry(Analytical Chemistry)
Advisor	Assist. Prof. Kanita Tungkananuruk

ABSTRACT

This research was aimed to study the potential and limitation of using ionic solution as the eluent for simultaneous determination of paracetamol, phenylephrine HCl and chlorpheniramine maleate using HPLC. This research developed method using ionic solution as the eluent to replace organic solvent for decreasing the environmental problems and increasing the efficiency of the separation and analysis. This is the first time that ionic solution was used for simultaneous separation of 3 active compounds. The separation was performed on a C_{18} analytical column(150 mm. x 3.9 mm. i.d); the mobile phase consisted of 20 mM 1-butyl-3-methylimidazolium 2-(2-methoxy ethoxy) ethyl sulfate pH 3.0 and flow rate was 1 $mLmin^{-1}$. The UV detector was operated at 260 nm. The proposed analytical methodology was validated by employing the standard solutions and spiked samples. The system linearity test was performed using five concentration levels, from 25 to 200% of the target analyte concentration. The regression coefficient(R^2) found were 0.9996, 0.9999 and 1 for chlorpheniramine maleate phenylephrine HCl and paracetamol, respectively. The method linearity test was performed using three concentration levels, from 50 to 150% of the target analyte concentration. The regression coefficient(R^2) found were 1, 1 and 1 for chlorpheniramine maleate phenylephrine HCl and paracetamol, respectively. The limits of quantitation (LOQ) found were 5.08 ppm, 50.83 ppm and 19.78 ppm for chlorpheniramine maleate phenylephrine HCl and paracetamol, respectively. The limits of detection(LOD) found were 1.52 ppm, 12.47 ppm and 5.37 ppm for chlorpheniramine maleate phenylephrine HCl and paracetamol, respectively. No interferences were presented at their retention times. Accuracy expressed in term of recoveries was in the range of 96.35-99.61%(n = 6) for chlorpheniramine maleate(spiked sample at the 3 concentration, 10, 20 and 30

ppm), recoveries was in the range of 98.65 – 99.24% (n = 6) for phenylephrine HCl (spiked sample at the 3 concentration, 50, 100 and 150 ppm), recoveries was in the range of 99.10-101.10%(n = 6) for paracetamol (spiked sample at the 3 concentration, 60, 120 and 180 ppm). Precision of method in term of the relative standard deviation was less than 10%. This figures of merit indicated the validity of this method. The proposed method was applied to the determination of chlorpheniramine maleate phenylephrine HCl and paracetamol in two different brands of cold tablet. Twenty tablets of each brand was determined by sampling two times(n = 6). For the first brand, the mean values of the quantity obtained were 1.93±0.10(mg/tablet);1.93±0.10 (mg/tablet) for chlorpheniramine maleate, 9.99±0.10(mg/tablet);9.92±0.32(mg/tablet) for phenylephrine HCl and 498.06±4.56(mg/tablet);491.44±8.33(mg/tablet) for paracetamol. For the second brand, the mean values of the quantity obtained were 1.92±0.11(mg/tablet);1.90±0.11 (mg/tablet) for chlorpheniramine maleate, 7.49±0.11(mg/tablet);7.46±0.22(mg/tablet) for phenylephrine HCl and 500.66±4.27 (mg/tablet);494.61±5.89(mg/tablet) for paracetamol. The results were compared with label;no significantly differences were presented at $P = 0.05$.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้อย่างดีด้วยคำแนะนำและคำปรึกษาจาก ผศ.คณิตา ตังคณานุรักษ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. อรวรรณ ชัยลภากุล ผศ. นงนุช ศิวะภิญโญยศ และ ดร. วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านอาจารย์ทั้งสี่ท่าน และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุก ๆ ท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ ในภาควิชาเคมี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกคนที่ให้คำแนะนำต่างๆ และคอยให้กำลังใจเสมอมา

ขอขอบคุณบัณฑิตศึกษาและบัณฑิตวิทยาลัยคณะวิทยาศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือ ในเรื่องต่างๆ

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนในทุกเรื่องๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ยุพดี หนูสาย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....V

สารบัญ.....VI

สารบัญตาราง.....IX

สารบัญรูป.....XV

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญของวิทยานิพนธ์.....1

1.2 จุดประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 ไอออนิก ลิควิด.....4

2.2 พาราเซตามอล.....7

2.3 คลอเฟนิรามีน มาลีเอท.....9

2.4 ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์.....10

2.5 เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟ.....10

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....42

บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย.....44

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....44

3.2 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย.....45

3.3 วิธีการวิจัย.....45

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....51

4.1 ศึกษาหาชนิดของสารละลายไอออนิกและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวชะในเทคนิค HPLC เพื่อแยกสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย พาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ได้พร้อมกัน.....51

4.1.1 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารละลายไอออนิก.....51

4.1.2 ผลการศึกษาการเลือกความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัด.....65

4.1.3 ผลการศึกษา pH ของตัวชะ.....66

4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการแยกสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย พาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท.....69

4.3 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์.....71

4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาเม็ดลดไข้ตามท้องตลาด โดยใช้สารละลายไอออนิกเป็นตัวชะและเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้กับปริมาณยาบนฉลาก.....72

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....76

5.1 สรุปผลการวิจัย.....76

5.2 ข้อเสนอแนะ.....77

เอกสารอ้างอิง.....8

ภาคผนวก.....81

ภาคผนวก ก. การคำนวณค่าทางโครมาโทกราฟี.....82

ภาคผนวก ข. การคำนวณค่าความเป็นเส้นตรง(System Linearity).....93

ภาคผนวก ค. การคำนวณค่าความเป็นเส้นตรง(Method Linearity).....105

ภาคผนวก ง. การคำนวณค่า LOD และ estimated LOQ.....116

ภาคผนวก จ. การคำนวณค่าความถูกต้อง(Accuracy)และความเที่ยง(Precision).....120

ภาคผนวก ฉ. การคำนวณหาปริมาณยาในตัวอย่างจริง.....129

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ช การคำนวณค่าความเที่ยง(Precision).....141
ภาคผนวก ซ การคำนวณการพิสูจน์ค่า LOQ.....161

ประวัติผู้เขียน.....163

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงการเปรียบเทียบค่า k′ 23

2.2 แสดงค่าคงที่ a จากการวัดความกว้างของพีกโดยวิธีต่างๆ 26

2.3 แสดงชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการเก็บคอลัมน์ 40

3.1 แสดงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้น 47

3.2 แสดงความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้น 48

4.1 แสดงผลของความเข้มข้นของสารละลาย 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ไนเทรต pH 3.0 กับค่าแฟกเตอร์ความจุของ ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท และพาราเซตามอล ที่ความเข้มข้น 150 ppm 54

4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า N ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอทและพาราเซตามอล กับความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัด 65

4.3 แสดงผลการศึกษา pH ของตัวชะ 68

4.4 แสดงประสิทธิภาพในการแยกสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วยพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ซึ่งสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดมีความเข้มข้นเท่ากับ 150 ppm 70

4.5 แสดงผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ 71

4.6 แสดงผลการวิเคราะห์ในตัวอย่างจริง 72

ก.1 แสดงการคำนวณค่าแฟกเตอร์ความจุของสารละลายมาตรฐานผสมเมื่อใช้ตัวชะที่มีความเข้มข้นของ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ไนเตรท แตกต่างกัน ที่ pH 3.0 82

ก.2 แสดงการคำนวณค่าแฟกเตอร์ความจุของสารละลายมาตรฐานผสมเมื่อใช้ตัวชะที่มีความเข้มข้นของ1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซีเอทอกซี)เอทิลซัลเฟต แตกต่างกันที่pH 3.0 83

ก.3 แสดงการคำนวณค่าซิเล็คติวิตี้ของสารละลายมาตรฐานผสมเมื่อใช้ตัวชะที่มีความเข้มข้นของ1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซีเอทอกซี)เอทิลซัลเฟต แตกต่างกันที่pH 3.0 85

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ก.4 แสดงการคำนวณค่าความสามารถในการแยกของสารละลายมาตรฐานผสมเมื่อใช้ตัวชะ ที่มีความเข้มข้นของ1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซีเอทอกซี)เอทิลซัลเฟต แตกต่างกันที่pH 3.0....86
ก.5 แสดงการคำนวณค่าจำนวนเพลท(N)ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท และพาราเซตามอล ที่ความยาวคลื่นต่างๆ....88
ก.6 แสดงการคำนวณค่าแฟกเตอร์ความจุของสารละลายมาตรฐานผสมเมื่อใช้ 20 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ที่ pH ต่างๆกันเป็นตัวชะ....89
ก.7 แสดงการคำนวณค่าความาสามารถในการแยกของสารละลายมาตรฐานผสมเมื่อใช้ตัวชะ ที่มีความเข้มข้นของ1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซีเอทอกซี)เอทิลซัลเฟต แตกต่างกันที่pH 3.0....90
ก.8 แสดงการคำนวณค่าเทลลิ่ง แฟกเตอร์ของสารละลายมาตรฐานผสมเมื่อใช้ตัวชะ ที่มีความเข้มข้นของ1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซีเอทอกซี)เอทิลซัลเฟต แตกต่างกันที่pH 3.0....91
ก.9 แสดงการคำนวณค่าประสิทธิภาพการแยกของสารละลายมาตรฐานผสม เมื่อใช้ 20 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ....92
ข.1 แสดงผลการศึกษา System linearity ของสารละลายมาตรฐานคลอเฟนิรามีน มาลีเอท....93
ข.2 แสดงผลการศึกษา System linearity ของสารละลายมาตรฐานฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์....97
ข.3 แสดงผลการศึกษา System linearity ของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล....101
ค.1 แสดงผลการศึกษา Method linearity ของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐาน คลอเฟนิรามีน มาลีเอท....105
ค.2 แสดงผลการศึกษา Method linearity ของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐาน ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์....108
ค.3 แสดงผลการศึกษา Method linearity ของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐาน พาราเซตามอล....112
จ.1 แสดงเกณฑ์การยอมรับค่าความถูกต้อง....123

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

จ.2 แสดงเกณฑ์การยอมรับค่าความเที่ยง....123
จ.3 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ที่ระดับความเข้มข้น 10 ppm....124
จ.4 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ที่ระดับความเข้มข้น 20 ppm....124
จ.5 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ที่ระดับความเข้มข้น 30 ppm....125
จ.6 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm....125
จ.7 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm....126
จ.8 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm....126
จ.9 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของพาราเซตามอล ที่ระดับความเข้มข้น 60 ppm....127
จ.10 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของพาราเซตามอล ที่ระดับความเข้มข้น 120 ppm....127
จ.11 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของพาราเซตามอล ที่ระดับความเข้มข้น 180 ppm....128
ฉ.1 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอทในยาขี่ห้อดีคอลเจนชุดที่ 1....129
ฉ.2 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอทในยาขี่ห้อทิฟฟี่ชุดที่ 1....129
ฉ.3 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอทในยาขี่ห้อดีคอลเจนชุดที่ 2....129
ฉ.4 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอทในยาขี่ห้อทิฟฟี่ชุดที่ 2....130
ฉ.5 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอทในยาขี่ห้อดีคอลเจนชุดที่ 1 กับปริมาณบนฉลาก....130
ฉ.6 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอทในยาขี่ห้อทิฟฟี่ชุดที่ 1 กับปริมาณบนฉลาก....131

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ฉ.7 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท
ในยายี่ห้อดีคอลเจนชุดที่ 2 กับปริมาณบนฉลาก....131
ฉ.8 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท
ในยายี่ห้อทิฟฟี่ชุดที่ 2 กับปริมาณบนฉลาก....132
ฉ.9 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์
ในยายี่ห้อดีคอลเจนชุดที่ 1....133
ฉ.10 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์
ในยายี่ห้อทิฟฟี่ชุดที่ 1....133
ฉ.11 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์
ในยายี่ห้อดีคอลเจนชุดที่ 2....133
ฉ.12 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์
ในยายี่ห้อทิฟฟี่ชุดที่ 2....134
ฉ.13 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์
ในยายี่ห้อดีคอลเจนชุดที่ 1 กับปริมาณบนฉลาก....134
ฉ.14 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์
ในยายี่ห้อทิฟฟี่ชุดที่ 1 กับปริมาณบนฉลาก....135
ฉ.15 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์
ในยายี่ห้อดีคอลเจนชุดที่ 2 กับปริมาณบนฉลาก....135
ฉ.16 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์
ในยายี่ห้อทิฟฟี่ชุดที่ 2 กับปริมาณบนฉลาก....136
ฉ.17 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยายี่ห้อดีคอลเจนชุดที่ 1....137
ฉ.18 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยายี่ห้อทิฟฟี่ชุดที่ 1....137
ฉ.19 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยายี่ห้อดีคอลเจนชุดที่ 2....137
ฉ.20 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยายี่ห้อทิฟฟี่ชุดที่ 2....137
ฉ.21 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยายี่ห้อดีคอลเจน
ชุดที่ 1 กับปริมาณบนฉลาก....138
ฉ.22 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยายี่ห้อทิฟฟี่
ชุดที่ 1 กับปริมาณบนฉลาก....138

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ฉ.23 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ในยาขี้ห้อดีคอลเจน ชุดที่ 2 กับปริมาณบนฉลาก....139

ฉ.24 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ในยาขี้ห้อทิฟฟี่ ชุดที่ 2 กับปริมาณบนฉลาก....140

ช.1 แสดงการคำนวณค่า RSD_r และ RSD_R ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาดีคอลเจนและทิฟฟี่ ชุดที่ 1 และ ชุดที่ 2....142

ช.2 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาดีคอลเจนชุดที่ 1....143

ช.3 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาดีคอลเจนชุดที่ 2....143

ช.4 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาดีคอลเจน ชุดที่ 1และชุดที่ 2....144

ช.5 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาทิฟฟี่ชุดที่ 1....145

ช.6 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาทิฟฟี่ชุดที่ 2....146

ช.7 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาทิฟฟี่ชุดที่ 1,2....147

ช.8 แสดงการคำนวณค่า RSD_r และ RSD_R ของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ในยาดีคอลเจน และ ทิฟฟี่ ชุดที่ 1 และ ชุดที่ 2....148

ช.9 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ในยาดีคอลเจนชุดที่ 1....149

ช.10 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ในยาดีคอลเจนชุดที่ 2....150

ช.11 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ในยาดีคอลเจน ชุดที่ 1, 2....151

ช.12 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ในยาทิฟฟี่ชุดที่ 1....152

ช.13 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ในยาทิฟฟี่ชุดที่ 2....153

ช.14 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ในยาทิฟฟี่ชุดที่ 1,2....154

ช.15 แสดงการคำนวณค่า RSD_r และ RSD_R ของพาราเซตามอลในยาดีคอลเจนและทิฟฟี่ ชุดที่ 1 และ ชุดที่ 2....155

ช.16 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของพาราเซตามอลในยาดีคอลเจน ชุดที่ 1....155

ช.17 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของพาราเซตามอลในยาดีคอลเจน ชุดที่ 2....156

ช.18 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของพาราเซตามอลในยาดีคอลเจน ชุดที่ 1,2....157

ช.19 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของพาราเซตามอลในยาทิฟฟี่ ชุดที่ 1....158

ช.20 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของพาราเซตามอลในยาทิฟฟี่ ชุดที่ 2....158

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ช.21 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของพาราเซตามอลในยาทิฟฟี่ ชุดที่ 1,2.....159

ซ.1 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ที่ระดับความเข้มข้น 5 ppm.....161

ซ.2 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 48 ppm.....161

ซ.3 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของพาราเซตามอล ที่ระดับความเข้มข้น 20 ppm.....162

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 แสดงตัวอย่างไอออนบวก(Cation) และไอออนลบ(Anion) ที่เป็นส่วนประกอบ ในโครงสร้างของไอออนิกลิควิด.....4

2.2 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไอออนิก ลิควิด วิธีที่ 1.....5

2.3 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไอออนิก ลิควิด วิธีที่ 2.....5

2.4 แสดงสูตรโครงสร้างของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต.....6

2.5 แสดงสูตรโครงสร้างของ1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต.....7

2.6 แสดงสูตรโครงสร้างของ1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ไนเตรท.....7

2.7 แสดงสูตรโครงสร้างของพาราเซตามอล.....8

2.8 แสดงสูตรโครงสร้างของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท.....9

2.9 แสดงสูตรโครงสร้างของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์.....10

2.10 แสดงส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟ.....11

2.11 วัสดุที่บรรจุใน HPLC column.....13

2.12 แสดงลักษณะของซิลิกาเจล 13

2.13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของหมู่อัลเคนและการคงไว้ของสาร.....14

2.14 (ก) แสดงกระบวนการแยกของสาร A และ B โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ข) แสดงโครมาโทแกรมที่ได้จากการแยก.....15

2.15 แสดง Differential migration.....16

2.16 แสดงUltraviolet detector cell สำหรับเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟ.....18

2.17 Photodiode array ที่ใช้ใน HPLC detectors.....19

2.18 แสดงโครมาโทแกรมของการหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ.....21

2.19 แสดงโครมาโทแกรมของการแยกสารสองชนิด.....24

2.20 แสดงโครมาโทแกรมสำหรับคำนวณจำนวนเพลทของคอลัมน์ (N).....26

2.21 แสดงโครมาโทแกรมสำหรับคำนวณค่าการแยก(Resolution, R_S).....27

2.22 โครมาโทแกรมแสดงผลของการปรับค่า k , α และ Nที่มีต่อ resolution (R_S).....28

2.23 แสดงความไม่สมมาตรของพีก(asymmetrical peak).....31

2.24 แสดงการวิเคราะห์พีกด้วยเทคนิคการเติม(spiking).....32

2.25 การวัดความสูงของพีก.....33

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

2.26 แสดงการคำนวณพื้นที่ของพีก....34
2.27 (a) แสดงโครมาโทแกรมของสารตัวอย่าง (b) แสดงโครมาโทแกรมของสารตัวอย่าง ที่เติมสารมาตรฐาน....36
2.28 แสดงการหาปริมาณ unknown โดยวิธี Standard addition calibration curve....37
4.1 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล เมื่อใช้ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต ความเข้มข้น 2 mM pH 3.0 เป็นตัวชะ....52
4.2 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม เมื่อใช้ตัวชะที่มีความเข้มข้นของ1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ไนเตรท แตกต่างกัน ที่ pH 3.0 (ก) 0 (ข) 2 (ค) 4 mM....54
4.3 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมเมื่อใช้ตัวชะที่มีความเข้มข้นของ1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต แตกต่างกัน ที่ pH 3.0 (ก) 0 (ข) 2 (ค) 4 (ง) 6 (จ) 8 (ฉ) 10 (ช) 12 (ซ) 14 (ฌ) 16 (ญ) 18 (ฎ) 20 และ (ฏ) 24 mM....60
4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 กับ ค่าแฟกเตอร์ความจุ....62
4.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 กับค่าความสามารถในการแยก....63
4.6 แสดงอันตรกริยาของอิมมิดาโซเลียมแคทไอออนในคอลัมน์ C_{18}....64
4.7 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมเมื่อใช้ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดา-โซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ความเข้มข้น 20 mM เป็นตัวชะ (ก) pH 2.0 (ข) pH 3.0 (ค) pH 6.0 (ง)pH 7.0 และ (จ)pH 8.0....68

บทที่1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของวิทยานิพนธ์

โรคหวัดเป็นโรคที่เกิดขึ้นมากที่สุดในชีวิตของมนุษย์ ซึ่งอัตราในการเกิดโรคหวัดนั้นขึ้นอยู่กับช่วงอายุของมนุษย์ จากการรายงานพบว่าเด็กจะเป็นโรคหวัด 4-6 ครั้งต่อปี วัยรุ่นจะเป็นโรคหวัด 3-5 ครั้งต่อปี และผู้ใหญ่จะเป็นโรคหวัด 1 ครั้งต่อปี และอาการของโรคหวัดจะเป็นระยะเวลานาน 7-10 วัน ต่อ 1 ครั้ง ซึ่งเป็นผลมาจากจำนวนของไวรัสที่แตกต่างกัน[1] พาราเซตามอล (Paracetamol) ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์(Phenylephrine HCl) และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท (Chlorpheniramine maleate) ถูกนำมาใช้เป็นองค์ประกอบในยาแก้หวัด พาราเซตามอล เป็นตัวยาที่บรรเทาอาการปวดและลดไข้ ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ เป็นตัวยาที่บรรเทาอาการคัดจมูก และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท เป็นตัวยาที่ลดและบรรเทาอาการแพ้ เช่น การระคายเคืองจมูก การคั่งของโลหิต[2] มีวิธีการวิเคราะห์มากมายที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของตัวยาเหล่านี้ ทั้งที่เป็นแบบสามตัวยาพร้อมกันและแบบแยกวิเคราะห์แต่ละชนิด คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ถูกวิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง(High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ในยาที่มีขายตามท้องตลาด[3] คลอเฟนิรามีน มาลีเอท โคดีอีน ฟอสเฟส(Codeine phosphate) และ อีพีดีน ไฮโดรคลอไรด์(Ephedrine HCl) ถูกวิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงในยาแก้ไข้แบบน้ำเชื่อม[4] คลอเฟนิรามีน มาลีเอท พาราเซตามอล และ ซูโดอีพีดีน ไฮโดรคลอไรด์(Pseudoephedrine HCl) ถูกวิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงในยาเม็ดแก้ไข้[5] คลอเฟนิรามีน มาลีเอท และพาราเซตามอล ถูกวิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้เทคนิคไมเซลล์ลาร์ อีเล็คโทรไคเนติค โครมาโทกราฟี(Micellar electrokinetic chromatography)[6] ฟีนิลเอฟฟริน ไฮโดรคลอไรด์ พาราเซตามอล คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ถูกวิเคราะห์หาปริมาณพร้อมกันโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงในเภสัชกรรม[2] พาราเซตามอล แอสไพริน และคาเฟอีน ถูกวิเคราะห์หาปริมาณพร้อมกันโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงในยา [7] ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นตัวชะในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงทั้งหมดซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวชะนั้นมีคุณสมบัติเป็นสารระเหยได้ ไวไฟ เกิดอาการระคายเคืองต่อดวงตา และระบบการหายใจซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม และถ้าหากมีการจัดการห้องปฏิบัติการที่ไม่เหมาะสมมีรายงานจาก ศ.ดร.เบลา เทอร์ไน ราชบัณฑิตทางเคมีประเทศอังกฤษและออสเตรเลีย เปิดเผยผลการสำรวจสภาพห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ว่าผู้ที่ทำงานในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์มีโอกาสเป็นมะเร็ง

หรือเนื้องอกมากกว่าผู้ที่ทำงานในสำนักงานถึง 30 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งมีความบกพร่องของระบบสืบพันธุ์มากกว่า 16 เปอร์เซ็นต์ และมีอายุขัยสั้นกว่าถึง 10 ปี เนื่องจากมีความบกพร่องในเรื่องต่างๆมากมาย เช่น การถ่ายเทอากาศ ส่วนมากมีไม่เพียงพอ ทำให้มีกลิ่นเหม็นและมีสารพิษสะสมอยู่ในห้องนั้น เป็นอันตรายผ่อนส่ง บางทีก็มีความเข้าใจผิดคิดว่ามีเครื่องปรับอากาศก็ใช้ได้แต่ความจริงเครื่องปรับอากาศเป็นการ หมุนเวียนอากาศไม่ใช่ถ่ายเทอากาศ[8] และนอกจากนี้ตัวยาเหล่านี้เป็นสารประกอบที่มีสมบัติเป็นเบสเป็นเหตุให้เกิดพีคที่มีหาง(tail) พีคกว้าง และจำนวนเพลทต่ำ[1] ซึ่งก่อนหน้านี้ไม่นานนักได้มีงานวิจัยหนึ่งได้นำ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตระฟูออโรโบเรท (1-butyl-3-methylimi-dazolium tetrafluoroborate) ซึ่งเป็นของเหลวไอออนิกมาใช้เป็นตัวชะในการแยกสารตระกูลอีพีดริน(Ephedrine) โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง[9] ในที่นี้ผู้วิจัยมีความสนใจในคุณสมบัติของของเหลวไอออนิก จึงได้มีการศึกษาคุณสมบัติของของเหลวไอออนิกชนิดต่างๆ และหาของเหลวไอออนิกชนิดที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้เป็นตัวชะในการแยกและวิเคราะห์หาปริมาณ พาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาเม็ดลดไข้ที่มีขายตามท้องตลาดเพื่อลดปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกและวิเคราะห์พร้อมทั้งช่วยลดมลพิษที่มาจากการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นตัวชะได้อีกด้วย และนอกจากนี้นับเป็นครั้งแรกที่มีการนำ C_{18} คอลัมน์ มาใช้ในการแยกและวิเคราะห์ตัวยาทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวข้างต้นได้พร้อมกัน

1.2 จุดประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาชนิดของสารละลายไอออนิกและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวชะในการแยกและวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ได้พร้อมกัน
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการแยกสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท
3. ศึกษาการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์
4. เพื่อศึกษาการแยกและวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาเม็ดลดไข้ตามท้องตลาดที่สะดวกรวดเร็วและให้ผลที่น่าเชื่อถือ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาหาชนิดของสารละลายไอออนิกและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวชะในการแยกและวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วยพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท

2. ศึกษาหาประสิทธิภาพในการแยกสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย พาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท โดยพารามิเตอร์ที่ทำการศึกษา คือ แฟกเตอร์ความจุ จำนวนเพลทตามทฤษฎี เทลลิ่ง แฟกเตอร์ ความจำเพาะเจาะจง และความสามารถในการแยก

3. ทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ โดยศึกษาข้อมูลเชิงสถิติเพื่อบ่งบอกถึงความถูกต้อง ความเที่ยง ความไว ความเป็นเส้นตรง ช่วงความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ และความเลือกจำเพาะ

4. วิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาเม็ดลดไข้ตามท้องตลาด โดยใช้สารละลายไอออนิกเป็นตัวชะและเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้กับปริมาณยาบนฉลาก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถใช้สารละลายไอออนิกชนิดที่เหมาะสมเป็นตัวชะในการแยกและวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาเม็ดลดไข้ตามท้องตลาด ทดแทนตัวทำละลายอินทรีย์ได้

2. เพิ่มประสิทธิภาพในการแยกและวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ได้พร้อมกัน ในยาเม็ดลดไข้ตามท้องตลาด

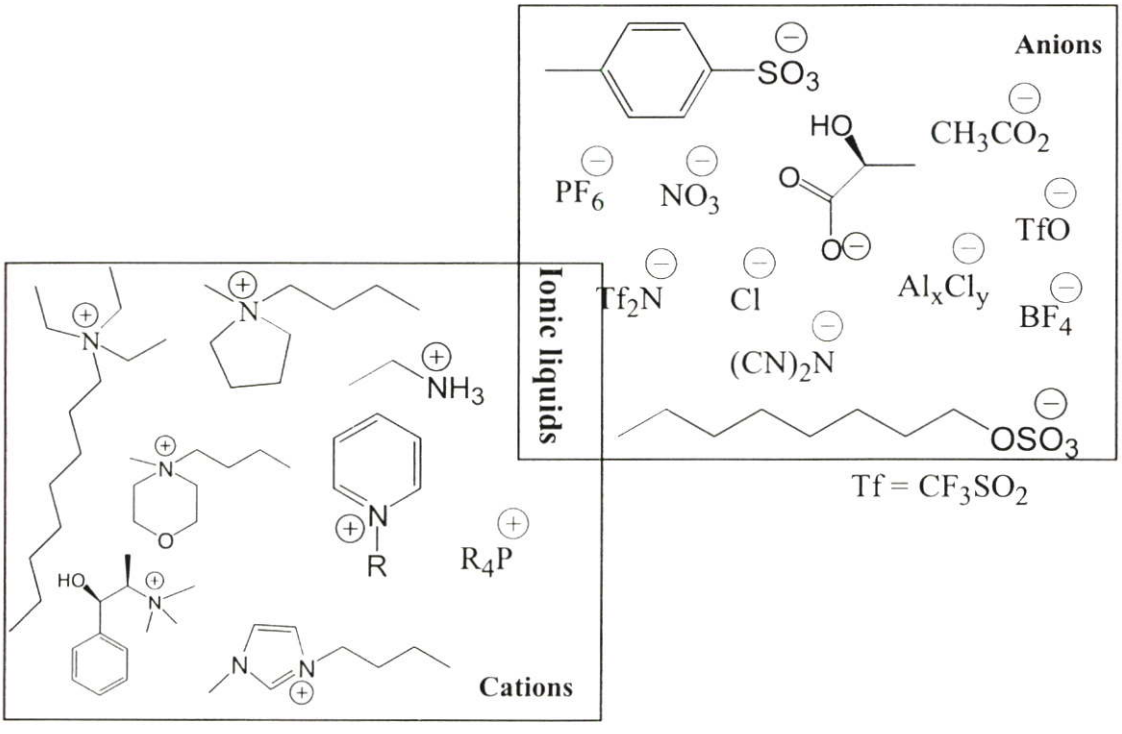
3. สามารถนำวิธีการวิเคราะห์นี้ไปประยุกต์ใช้ในงานประจำได้

4. ลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไอออนิก ลิควิด(Ionic liquid)

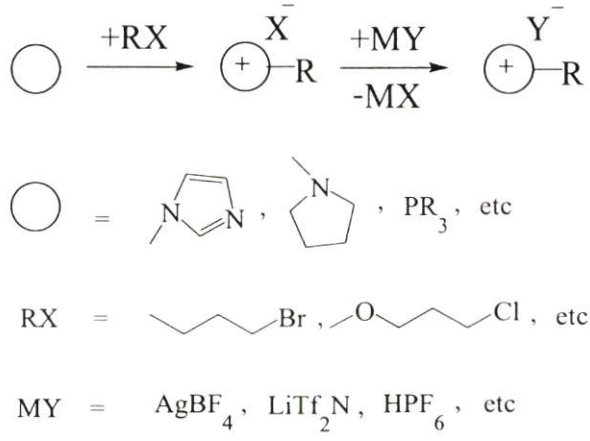
ไอออนิก ลิควิด เป็นเกลือกึ่งอินทรีย์(Semi-organic salts) ซึ่งมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 100 ^{0}C หรือต่ำกว่า เอทิลแอมมิเนียมไนเตรท([$EtNH_3$][NO_3]) เป็นไอออนิกตัวแรกที่ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1914 ซึ่งมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 12 ^{0}C ตัวอย่างไอออนบวก(Cation) และไอออนลบ(Anion) ที่เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างของไอออนิก ลิควิด แสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ตัวอย่างไอออนบวก(Cation) และไอออนลบ(Anion) ที่เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างของไอออนิก ลิควิด

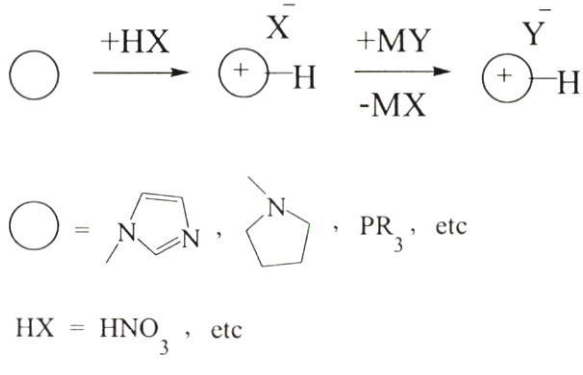
วิธีการเตรียมไอออนิก ลิควิด มี 2 วิธี

1. นำเอมีน(Amine) หรือสารประกอบฟอสฟอรัสมาทำปฏิกิริยาอัลคิลเลชัน(Alkylation) กับฮาโลอัลเคน(Haloalkane) เกิดเป็นเกลือเฮไลด์(Halide salts) หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาเมทาทีซิส (Metathesis) กับโลหะหมู่ 1A (Group 1A metal) , แอมโมเนียม(Ammonium) หรือ เกลือของเงิน (Silver salt) ได้เป็นไอออนิก ลิควิด ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไอออนิกลิควิดวิธีที่ 1

2. นำเอมีน(Amine) หรือสารประกอบฟอสฟอรัสมาทำปฏิกิริยาการสะเทินด้วยกรด-เบส(Acid-base neutralization)ได้เป็นไอออนิก ลิควิด ดังแสดงในรูปที่ 2.3



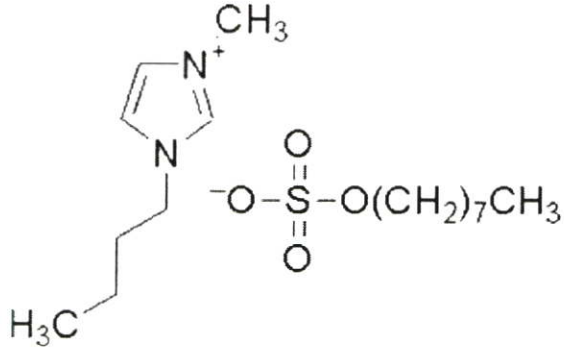
รูปที่ 2.3 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไอออนิกลิควิดวิธีที่ 2

ไอออนิก ลิควิด ได้รับการรับรองว่าเป็นตัวทำละลายที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม เป็นตัวทำละลายที่ดีทั้งในสารประกอบอินทรีย์และสารประกอบอนินทรีย์ มีสภาพขั้วสูง ไม่เกิดการโคออนิเนต(Non-coordinating) ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ไม่ระเหย(Nonvolatile) สามารถใช้ในระบบที่เป็นสูญญากาศสูงได้ ทนต่อความร้อนสูง มีช่วงที่เป็นของเหลวกว้าง ไม่ไวไฟ(Nonflammable) ไม่สามารถวัดความดันไอได้ ไอออนิก ลิควิด ได้ชื่อว่าเป็นตัวทำละลายผู้ออกแบบ(Designer solvent) หมายความว่าคุณสมบัติของไอออนิก ลิควิด สามารถปรับเปลี่ยนให้เหมาะกับความต้องการในการใช้งานได้ เช่น จุดหลอมเหลว ความหนืด ความหนาแน่น และความสามารถในการละลายสามารถปรับเปลี่ยนโดยการเปลี่ยนไอออนที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของไอออนิก ลิควิด ตัวอย่างเช่น จุดหลอมเหลวของ 1-อัลคิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียมเตตระฟูออโรบอเรท(1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate)และเฮกซะฟูออโรฟอสเฟต

(Hexafluorophos phate) ขึ้นอยู่กับความยาวของหมู่อัลคิล(Alkyl group) และความสามารถในการละลายน้ำของ1-อัลคิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียมเตตระฟูโอโรบอเรท(1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate) พบว่าสามารถละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิ 25 ^{0}C เมื่อหมู่อัลคิลมีจำนวนคาร์บอนน้อยกว่า 6 อะตอม แต่เมื่อมีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 6 หรือมากกว่าก็จะไม่สามารถละลายน้ำได้ ซึ่งพฤติกรรมนี้เป็นประโยชน์อย่างมากในการสกัดด้วยตัวทำละลายหรือในการแยกผลิตภัณฑ์ เนื่องจากสามารถปรับเปลี่ยนเพื่อให้เกิดการแยกผลิตภัณฑ์ออกได้ง่ายขึ้น จากคุณสมบัติของไอออนิก ลิควิดดังกล่าวข้างต้นจึงได้มีการนำไอออนิก ลิควิด มาประยุกต์ใช้ในงานด้านเคมีต่างๆมากมาย เช่น การสังเคราะห์(Synthesis), คะตะไลซิส(Catalysis), เคมีไฟฟ้า(Electrochemistry), แก๊สโครมาโทกราฟี(Gas chromatography), แคปปิลลารี อีเล็คโทรโฟรีซิส (Capillary electrophoresis,CE) และลิควิด โครมาโทกราฟี(Liquids chromatography)

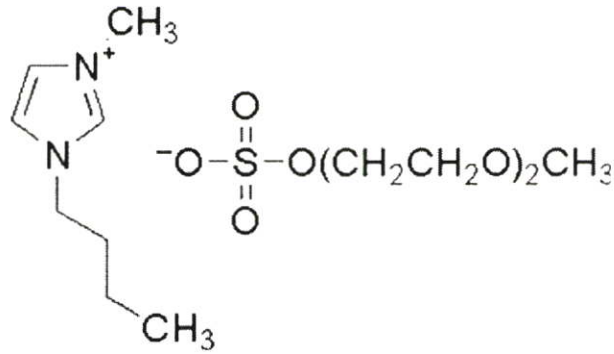
ไอออนิก ลิควิด ที่นำมาศึกษาคุณสมบัติเพื่อใช้เป็นตัวชะในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถณะสูง ในงานวิจัยนี้ มี 3 ชนิด ได้แก่ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต (1-butyl-3-methylimidazolium octyl sulfate) 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต (1-butyl-3-methylimidazolium 2-(2-methoxy ethoxy) ethyl sulfate) และ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ไนเตรท (1-ethyl-3-methylimidazolium nitrate)

1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต (1-butyl-3-methylimidazolium octyl sulfate) สูตรโมเลกุล $C_{16}H_{32}N_2O_4S$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 348.50 มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.4



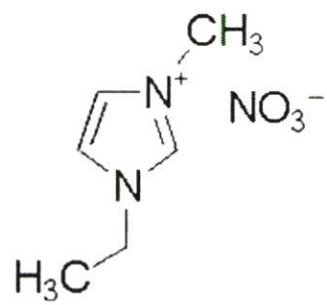
รูปที่ 2.4 แสดงสูตรโครงสร้างของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต

1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต (1-butyl-3-methylimidazolium 2-(2-methoxy ethoxy) ethyl sulfate) หรือ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ไดเอทิลลีน ไกลคอล โมโนเมทิล อีเธอร์ ซัลเฟต (1-Butyl-3-methylimidazolium (diethylene glycol monomethyl ether) sulfate) สูตรโมเลกุล $C_{13}H_{26}N_2O_6S$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 338.42 มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 แสดงสูตรโครงสร้างของ1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต

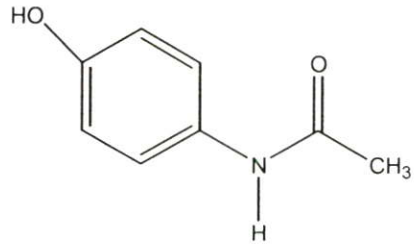
1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ไนเทรต (1-ethyl-3-methylimidazolium nitrate) สูตรโมเลกุล $C_6H_{11}N_3O_3$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 173.17 มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 แสดงสูตรโครงสร้างของ1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ไนเทรต

2.2 พาราเซตามอล (Paracetamol)

พาราเซตามอลมีชื่อทางเคมีหลายชื่อ ได้แก่ *N*-acetyl-*p*-aminophenol acetaminophen *p*–acetamidophenol *p*-hydroxyacetanilide *p*-acetylaminophenol ชื่อสามัญ พาราเซตามอล คุณสมบัติทางเคมี เป็นของแข็งสีขาว ไม่มีกลิ่น จุดหลอมเหลว 168 ^{0}C ละลายได้เล็กน้อยในน้ำและอีเธอร์ ละลายในแอลกอฮอล์ มวลโมเลกุลเท่ากับ 151.17 ค่า pKa 9.5 มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 แสดงสูตรโครงสร้างของพาราเซตามอล

พาราเซตามอล เป็นยาลดไข้ แก้ปวด ที่ใช้กันแพร่หลายมากที่สุด ใช้ลดไข้และแก้ปวด เช่น ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ ปวดประจำเดือน เป็นต้น ยาตัวนี้ถือว่ามีความปลอดภัย ไม่ระคายเคืองต่อกระเพาะอาหารเหมือนแอสไพริน ยาชนิดนี้มีขายอยู่ในท้องตลาดทั้งชนิดเม็ดสำหรับผู้ใหญ่ และชนิดน้ำเชื่อมสำหรับเด็ก ในผู้ใหญ่แนะนำให้ใช้ ยาพาราเซตามอลขนาด 500 mg 1-2 เม็ด ทุกๆ 4-6 ชั่วโมง แต่ไม่ควรกินยาเกิน 8 เม็ดต่อวัน สำหรับเด็กเนื่องจากยาที่มีจำหน่ายมีหลายขนาดตามอายุ จึงควรใช้ยาตามขนาดที่แจ้งอยู่ในฉลากยา แต่ทั้งนี้ขนาดที่แนะนำใช้ในเด็กจะเป็น 10-15 mg ต่อน้ำหนักตัวเด็ก 1 kg แต่อย่างไรก็ตามหากไม่แน่ใจในขนาดยาที่ใช้ หรือเด็กอายุน้อยกว่า 3 ปี ก็ควรปรึกษาแพทย์ หรือเภสัชกรก่อนใช้ยา และหากใช้ยานี้แล้วอาการไม่ดีขึ้นหรือไข้ไม่ลด ก็ควรพบแพทย์ ข้อควรระวังก็คือ ถ้าใช้ยาเกินขนาดมากๆ เช่น 20 เม็ด ก็จะเป็นพิษต่อตับ หรือตับวายถึงตายได้

กลไกการเกิดพิษ

ในขนาดรักษาพาราเซตามอลกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ จะถูกเมตาโบไลซ์ที่ตับด้วยกระบวนการคอนจูเกชัน (conjugation) กลายเป็นสารที่ไม่เป็นพิษ แล้วถูกขับออกจากร่างกาย อีก 5 เปอร์เซ็นต์ถูกเมตาโบไลซ์ โดยเอนไซม์ไซโทโครม พี-450(cytochrome P-450) ได้เป็นเมตาโบไลต์ที่มีพิษ แต่จะถูกกำจัดโดย กลูตาไธโอน(glutathione) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์(reducing agent)จะจับกับสารพิษนี้และขับออกทางปัสสาวะ แต่ในภาวะที่ได้รับพาราเซตามอลเกินขนาด เมตาโบไลต์ที่มีพิษนี้จะมีปริมาณมากเกินความสามารถของกลูตาไธโอนที่จะกำจัดได้ จึงเกิดความเป็นพิษต่ออวัยวะต่างๆของร่างกาย เช่น ตับ และ ไต มีการศึกษาพบว่าร่างกายคนเรามีกลูตาไธโอนที่จะทำลายพาราเซตามอลที่รับประทานเข้าไปไม่เกิน 7.5 g หรือ 150 mg/kg ในคนปกติ ค่าครึ่งชีวิตของพาราเซตามอล ประมาณ 4 ชั่วโมง แต่ในภาวะที่ได้รับยาเกินขนาด ค่าครึ่งชีวิตอาจยาวเป็น 12 ชั่วโมงได้ ปกติพาราเซตามอลจะถูกดูดซึมอย่างรวดเร็วแต่ในภาวะเป็นพิษการดูดซึมจะลดลงอาจนานกว่า 4 ชั่วโมง โดยเฉพาะถ้ารับประทานยาอื่นร่วมด้วย[10]

ผู้ที่ควรระวังในการใช้ยานี้

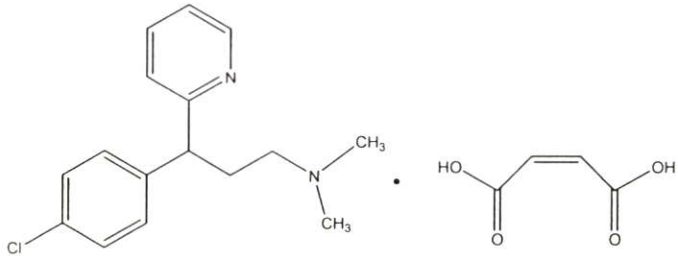
ผู้ที่ขาดเอ็นไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟส ดีไฮโดรจีเนส (Glucose-6-phosphate Dehydrogenase, G-6-PD) ผู้ที่เป็นโรคตับ หรือกำลังรับประทานยาที่มีผลต่อตับ ผู้ป่วยโรคต้อหิน กล้ามเนื้ออ่อนแรง ต่อมลูกหมากโต ไม่ควรใช้ยานี้ เด็กและสตรีมีครรภ์ ควรปรึกษาแพทย์หรือเภสัชกรก่อนใช้ยานี้ ผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือด โรคไต มีแผลในกระเพาะหรือลำไส้ ควรปรึกษาแพทย์หรือเภสัชกรก่อนใช้ยานี้

ผลข้างเคียง

ยานี้อาจทำให้เกิดอาการง่วงนอน มึนงง ตาพร่า มองภาพไม่ชัด ร้อนวูบวาบที่หน้า มีผื่นแดงตามผิวหนัง คลื่นไส้ อาเจียน ท้องผูก หัวใจเต้นเร็ว กล้ามเนื้ออ่อนแรง หนังตาตก คัดจมูก[11]

2.3 คลอเฟนิรามีน มาลีเอท (Chlorpheniramine maleate)

ชื่อทางเคมี ได้แก่ คลอโพรฟีนไพริดามีน มาลีเอท(Chlorprophenpyridamine maleate) 1-พารา-คลอโรฟีนิล-1-2-ไพริดิล-3-ไดเมทิลอะมิโนโพรเพน มาลีเอท (1-(p-chlorophenyl)-1-(2-pyridyl)3-dimethylaminopropane maleate) คุณสมบัติทางเคมี เป็นของแข็งสีขาว ไม่มีกลิ่น จุดหลอมเหลว 130-135 ^{0}C ละลายได้เล็กน้อยในอีเธอร์ ละลายได้ในแอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม และน้ำ มวลโมเลกุลเท่ากับ 390.9 ค่า pKa 9.1 มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.8 [12]



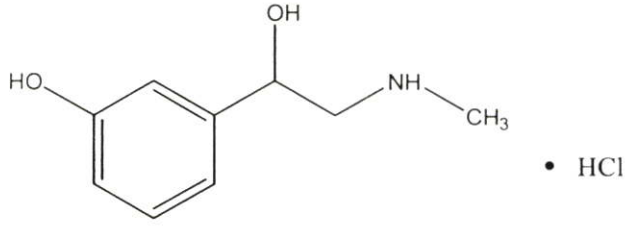
รูปที่ 2.8 แสดงสูตรโครงสร้างของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท

คลอเฟนิรามีน มาลีเอท เป็นยาแอนทิฮีสตามีน(antihistamine) ใช้รักษาอาการแพ้ เช่น แพ้อากาศ (ในโรคหวัด หืด หลอดลม และ โพรงจมูกอักเสบ) ใช้ลดน้ำมูกใสๆ และบรรเทาอาการแพ้ต่างๆ เช่น เยื่อจมูกอักเสบจากการขยายตัวของหลอดเลือด อาการคัดจมูกน้ำมูกไหลเนื่องจากหวัด ผื่น แพ้ตามผิวหนังเนื่องมาจากแพ้ยา แพ้อาหารทะเล แพ้ละอองเกสรหญ้า และดอกไม้ หรืออาการคัน มีจำหน่ายทั้งชนิดเม็ด และชนิดน้ำ รับประทานตามขนาดที่ระบุไว้ โดยปกติครั้งละ 1 เม็ด วันละ 2-3 ครั้ง ข้อควรระวังคือ ยานี้มักทำให้ง่วงนอน มึนงง หากต้องขับรถ หรือทำงาน

เกี่ยวกับเครื่องจักร ควรระมัดระวังเป็นอย่างยิ่ง อาจมีอาการปากคอแห้ง ใจสั่น และอาจทำให้เสมหะเหนียว ขับออกยาก จึงไม่ควรใช้ในผู้ป่วยที่มีอาการไอมีเสมหะร่วมด้วย ผู้ป่วยต้อหินไม่ควรใช้ นอกจากนี้หากน้ำมูกข้น หรือมีสีเหลือง เขียว ไม่ควรใช้ยานี้ [13]

2.4 ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ (Phenylephrine HCl)

คุณสมบัติทางเคมี เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลวประมาณ 143 ^{0}C ละลายได้เล็กน้อยในแอลกอฮอล์ และน้ำ มวลโมเลกุลเท่ากับ 203.7 ค่า pKa 8.9 มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.9

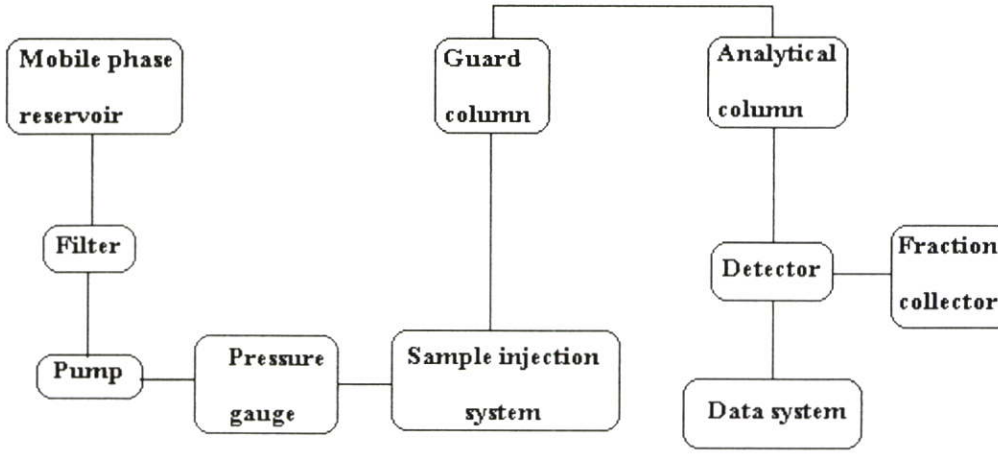


รูปที่ 2.9 แสดงสูตรโครงสร้างของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์

เป็นตัวยาที่บรรเทาอาการคัดจมูก[14]

2.5 เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟ(High Performance Liquid Chromatograph; HPLC)

เป็นเครื่องมือที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ในการวิเคราะห์และแยกสารเกือบทุกชนิด เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟเป็นเครื่องมือที่มีความไว(Sensitivity) สูง สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณได้อย่างรวดเร็วแม่นยำและมีประสิทธิภาพโดยเฉพาะสารที่ไม่ระเหยและไม่คงตัวต่อความร้อน ส่วนประกอบที่สำคัญของ เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิ-ควิดโครมาโทกราฟ แสดงในรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 แสดงส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟ

2.5.1 ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่(Mobile phase reservoir)

โดยทั่วไปภาชนะที่ใช้บรรจุเฟสเคลื่อนที่ หรือตัวทำละลาย มักทำด้วยแก้วหรือสแตนเลสสทิล(Stainless steel)ใช้บรรจุตัวทำละลายได้อย่างน้อย 500 mL นอกจากนี้ยังมีเครื่องกรองที่ช่วยกรองฝุ่นละอองหรือสิ่งสกปรกก่อนเข้าสู่ปั๊ม เนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้ในงานโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงต้องปราศจากฟองอากาศซึ่งอาจเข้าไปรบกวนการทำงานหรือความเสียหายแก่ปั๊มหรือตัวตรวจวัด(Detector)จึงมีเครื่องมือที่ใช้ขจัดฟองอากาศ (Degasser) วิธีที่สะดวกและนิยมใช้คือ การกรองตัวทำละลายที่ต้องการใช้ผ่านมิลลิพอร์ ฟิวเตอร์ (Millipore filter) ภายใต้สูญญากาศ วิธีนี้จะช่วยขจัดอนุภาคซึ่งแขวนลอยอยู่

2.5.2 ปั๊ม(Pump)

เนื่องจากการแยกสารในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงต้องอาศัยการไหลของเฟสเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ที่มีขนาดอนุภาคเล็กมาก ทำให้เกิดความต้านทานการไหล ระบบปั๊มจึงมีความสำคัญมากในการที่จะทำให้เกิดความดันสูงเพื่อที่จะเอาชนะแรงต้านทานดังกล่าว ปั๊มที่ใช้ควรทำให้เกิดความดันได้สูงถึงประมาณ 6000 Psi และมีอัตราการไหล(Flow rate) อยู่ในระหว่าง 0.1 –10 $mL.min^{-1}$

2.5.3 ระบบการฉีดสารตัวอย่าง(Sample injection system)

ความแม่นยำในการวัดโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงขึ้นกับความเที่ยงของการนำสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ การฉีดสารปริมาณมากเกินไปทำให้เกิดพีกกว้าง ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้จึงควรใช้ให้น้อยที่สุด(ประมาณ 0.2-500 µL)และการนำสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์จะต้องไม่ทำให้ความดันของระบบลดลง

2.5.4 คอลัมน์(Column)

คอลัมน์จัดเป็นหัวใจของเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟในการแยกสาร คอลัมน์ซึ่งใช้ในโครมาโทกราฟีแบบของเหลวมักเป็นท่อเรียบทำด้วยสแตนเลส สตีล อาจมีส่วนน้อยที่ใช้ท่อแก้วอย่างหนาซึ่งจะทนต่อความดันได้น้อยกว่า 600 Psi ส่วนปลายมีลักษณะเป็นตาข่ายเล็กๆ ทำด้วยสแตนเลส สตีลเพื่อป้องกันการรั่วของวัสดุที่เป็นเฟสอยู่กับที่

การ์ดคอลัมน์(Guard column)

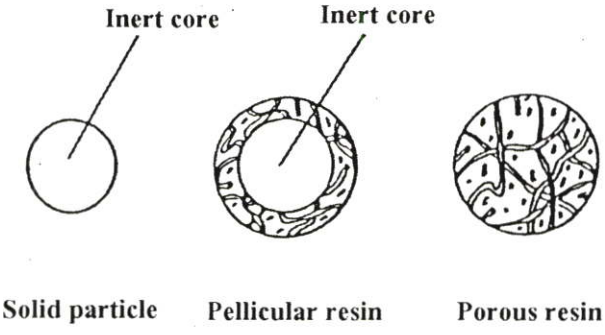
การ์ดคอลัมน์นิยมใช้ต่อก่อนเข้าคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์(analytical column) เพื่อช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์เนื่องจากการ์ดคอลัมน์จะทำหน้าที่กรองอนุภาคหรือสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนมากับตัวทำละลาย นอกจากนี้การ์ดคอลัมน์ยังใช้ในการทำให้เฟสเคลื่อนที่อิ่มตัวด้วยเฟสอยู่กับที่เพื่อลดการสูญเสียของตัวทำละลายในคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์ ส่วนประกอบของวัสดุบรรจุของการ์ดคอลัมน์จะคล้ายคลึงกับคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์แต่มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่าและราคาไม่แพงมากนัก

คอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์(Analytical column)

คอลัมน์ที่ใช้กันส่วนใหญ่มีความยาว 10 – 30 cm อาจเพิ่มความยาวของคอลัมน์ได้ โดยใช้คอลัมน์มากกว่าหนึ่งคอลัมน์ในคราวเดียวกัน เส้นผ่าศูนย์กลางภายในคอลัมน์ มีขนาด 4 – 10 mm วัสดุที่บรรจุในคอลัมน์ มีขนาดอนุภาค 3 , 5 และ 10 μm คอลัมน์ที่ใช้ในงานทั่วไปมักมีความยาว 25 cm เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4.6 mm และขนาดอนุภาคของวัสดุบรรจุ 5 μm คอลัมน์ชนิดนี้มี 40,000 – 60,000 plate/m ปัจจุบันได้มีการพัฒนาคอลัมน์ชนิดความเร็วสูง และคอลัมน์ประสิทธิภาพสูง ซึ่งมีขนาดเล็กลงมีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเพียง 1 – 4.6 mm และขนาดอนุภาคของวัสดุบรรจุ 3 หรือ 5 μm มีความยาวเพียง 3 –7.5 cm แต่มี 100,000 plate/m นอกจากนี้คอลัมน์ชนิดนี้ยังมีความเร็วสูงขึ้นและสิ้นเปลืองตัวทำละลายน้อยลง ซึ่งประการหลังมีความสำคัญมากเนื่องจากตัวละลายที่ใช้ในเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มแมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟต้องมีความบริสุทธิ์สูงจึงมีราคาค่อนข้างแพง

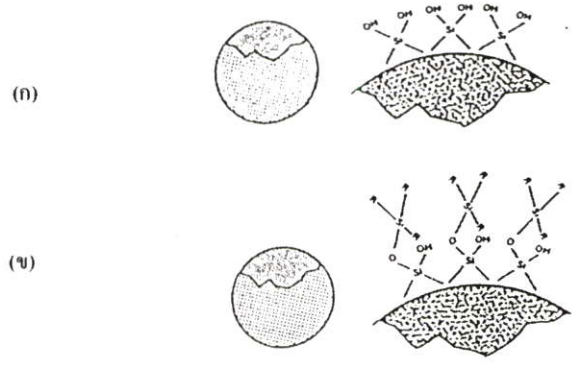
ชนิดของเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase)

การคงไว้(Retention)ของสารในเฟสอยู่กับที่ ซึ่งมีผลต่อการแยกของสารจะเป็นไปตามหลักของ “like attracts like” ลักษณะของเฟสอยู่กับที่ ที่ใช้กันมีสามชนิด ดังแสดงในรูปที่ 2.11 ชนิดแรก(solid particle) เป็นวัสดุแข็ง สารอื่นไม่สามารถซึมผ่านผิวนอกได้ มีพื้นที่ผิวน้อยจึงใช้กับสารจำนวนน้อย ชนิดที่สอง (pellicular resin) มีพื้นที่ผิวมากกว่าใช้กับสารจำนวนมากกว่าและแยกได้ดีกว่า ชนิดที่สาม (porous resin) มีลักษณะเป็นรูพรุน ให้ประสิทธิภาพในการแยกสูงแต่อาจใช้เวลามากขึ้น

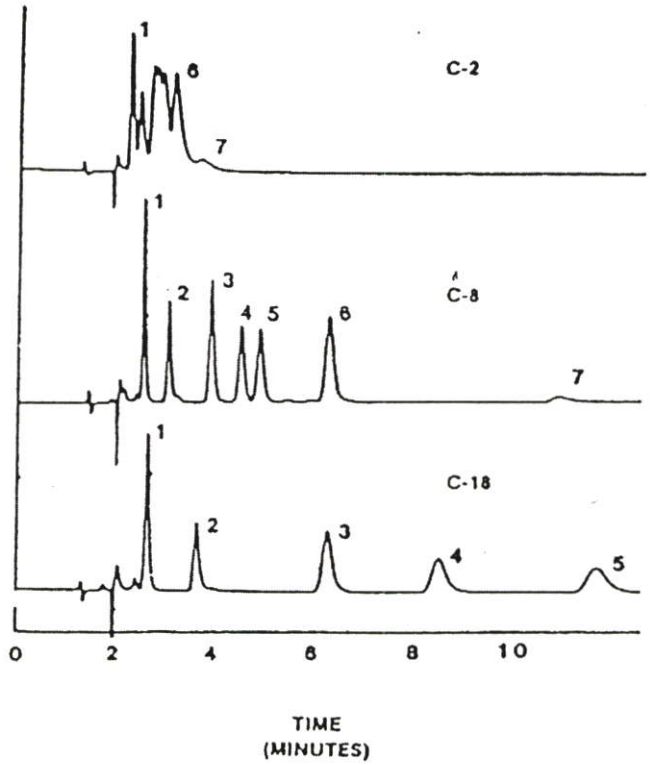


รูปที่ 2.11 วัสดุที่บรรจุใน HPLC column

วัสดุที่นิยมใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ คือซิลิกาเจล(silica gel) มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 2.12(ก) ประกอบด้วยหมู่ไซลานอล(Si – OH) มีสภาพขั้วสูง(polarity)สูง ในสมัยแรกๆ นิยมใช้ซิลิกาเจลชนิดธรรมดาที่ไม่มีการดัดแปลง แต่เนื่องจากซิลิกาเจลชนิดนี้มีข้อเสียหลายประการ เช่น ไม่มีความเที่ยง จึงดัดแปลงเป็นชนิดบอนด์เฟส(bonded phase)จัดเป็นเฟสอยู่กับที่ชนิดพาร์ทิชัน (partition type stationary phase) ซึ่งมีความเที่ยงสูงกว่าโดยทำการบดบังหมู่ไซลานอลด้วยหมู่ที่ทำปฏิกิริยากับหมู่ไซลานอลได้ สภาพขั้วของบอนด์เฟสจะขึ้นกับหมู่ R ในกรณีที่หมู่ R เป็นหมู่ที่ไม่มีขั้ว เช่น อัลเคน(alkane)ได้แก่ C_2, C_3, C_6, C_8 และC_{18} การจับกับสารที่สนใจจะขึ้นกับจำนวนและชนิดของหมู่อัลเคนที่ใช้ ดังตัวอย่างในรูปที่ 2.13 หมู่อัลเคนที่นิยมใช้ คือ C_{18}(Octadecylislane ,ODS) ข้อควรระวังในการใช้ ซิลิกาเจลเป็นเฟสอยู่กับที่ คือสามารถละลายได้ใน pH ที่เป็นด่าง ดังนั้นจึงไม่ควรใช้ในกรณีใช้งานที่ pH มากกว่า 7.5

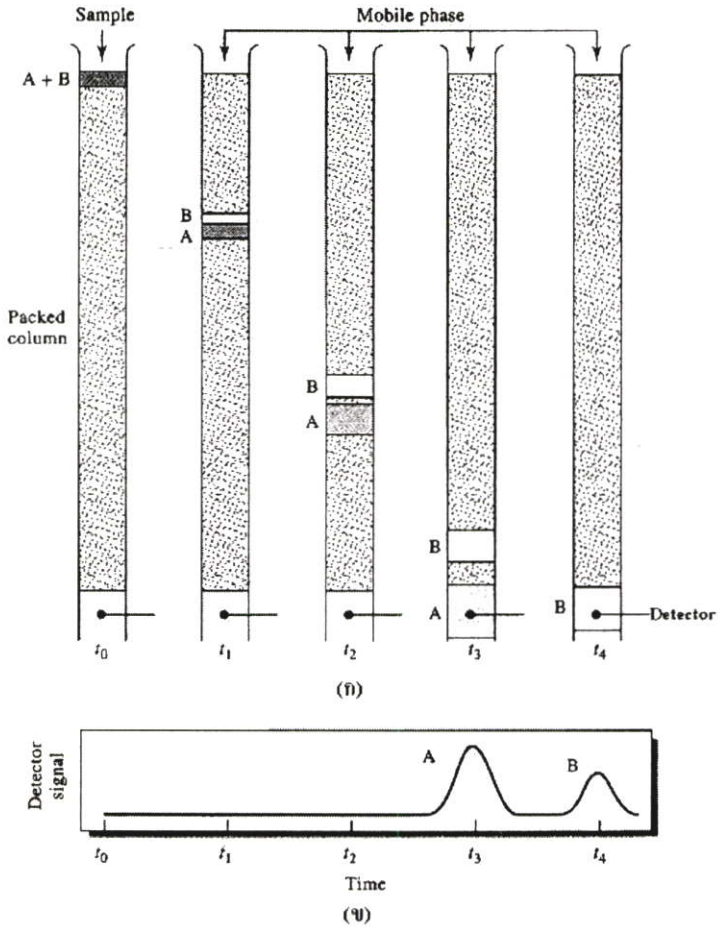


รูปที่ 2.12 ลักษณะของซิลิกาเจล ชนิด (ก) ชนิดธรรมดาที่ไม่มีการดัดแปลง(unmodified) และ(ข) ชนิดบอนด์เฟส(bonded phase)



รูปที่ 2.13 ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของหมู่อัลเคนและการคงไว้ของสาร(Solute retention)

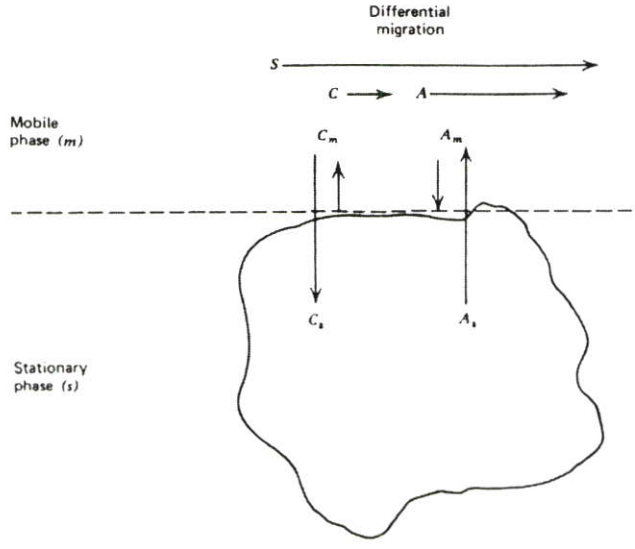
กระบวนการแยกสารโดยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟี มีขั้นตอนต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.14(ก) ตัวอย่างการแยกสารละลายผสมของสาร 2 ชนิด คือสาร A และ สาร B ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี จุดเริ่มต้น (t_0) เป็นการใส่หรือฉีดสารละลายตัวอย่างไปบนส่วนต้นของคอลัมน์ จะเห็นแถบแคบๆเมื่อเฟสเคลื่อนที่เคลื่อนผ่านคอลัมน์จะทำหน้าที่พาโมเลกุลของสารตัวอย่างเคลื่อนไปตามความยาวของคอลัมน์ และมีการแยกออกจากกันบางส่วน (t_1 และ t_2) หากเติมหรือให้เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ไปเรื่อยๆ โมเลกุลของสาร A และ B จะแยกออกจากกันอย่างสมบรูณ์ (t_3 และ t_4) และถ้าต่อส่วนปลายของคอลัมน์เข้ากับเครื่องตรวจวัด สาร A และ B จะถูกตรวจวัดและถูกบันทึกเป็นพีกบนโครมาโทแกรม ดังแสดงในรูปที่ 2.14(ข)



รูปที่ 2.14 (ก) แสดงกระบวนการแยกของสาร A และ B โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี
(ข) โครมาโทแกรมที่ได้จากการแยก

การที่สารแต่ละชนิดจะแยกออกจากกันได้ ดังแสดงในรูปที่ 2.14 เกิดจาก

1.ความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่หรือการกระจายตัวของสารชนิดต่างๆในสารตัวอย่างในลิควิดโครมาโทกราฟี หมายถึง อัตราการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันของสารแต่ละชนิดที่เคลื่อนผ่านคอลัมน์ ซึ่งเกิดจากการสมดุลของการกระจายตัวของสารชนิดต่างๆระหว่างสองเฟส การที่สารจะกระจายไปในเฟสใดเฟสหนึ่งได้ดีกว่านั้นขึ้นกับแรงหน่วงเหนี่ยวของโมเลกุลของสารกับเฟสทั้งสอง ถ้าแรงหน่วงเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของสารกับเฟสอยู่กับที่แรงกว่าสารนั้นจะถูกแยกออกมาทีหลัง ตรงกันข้ามกับสารที่มีแรงหน่วงเหนี่ยวกับเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่าจะถูกแยกออกมาก่อน กลไกของการหน่วงเหนี่ยวให้สารตัวอย่างถูกจับไว้ในเฟสใดเฟสหนึ่งนั้นเป็นผลจากอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของสารตัวอย่างกับโมเลกุลของสารในแต่ละเฟสนั้น



รูปที่ 2.15 แสดง Differential migration

รูปที่ 2.15 แสดงความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสาร A และสาร B กำหนดให้ S เป็นโมเลกุลของเฟสเคลื่อนที่ ลูกศรแสดงทิศทางของการเคลื่อนที่ จากรูปที่จุดสมดุลของการกระจายตัว โมเลกุลส่วนใหญ่ของสาร C จะอยู่ในเฟสอยู่กับที่ และส่วนน้อยจะอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งตรงกันข้ามกับสาร A โมเลกุลส่วนใหญ่ของสาร A จะอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ เพราะฉะนั้นสาร C จะเคลื่อนผ่านคอลัมน์หรือถูกชะล้างพาออกจากคอลัมน์ได้ช้ากว่าสาร A ตัวแปรที่มีผลต่อการกระจายตัวของสารระหว่างเฟสทั้งสองคือ องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ องค์ประกอบของเฟสอยู่กับที่ และอุณหภูมิของการทดลอง การปรับเปลี่ยนอัตราการเคลื่อนที่ของสารเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีขึ้น ควรปรับตัวแปรใดตัวแปรหนึ่งในแต่ละการทดลอง ถ้าผลที่ได้ไม่เป็นที่พอใจ จึงปรับเปลี่ยนตัวปปแปรอื่นๆ ต่อไป

2. การแพร่กระจายของโมเลกุลของสารชนิดเดียวกันในเฟสอยู่กับที่ทำให้เกิดพีกที่แคบหรือกว้างในการแยกสารโดยวิธีโครมาโทกราฟี การใส่หรือฉีดสารหลายตัวอย่างลงบนคอลัมน์หรือเฟสอยู่กับที่ ไม่สามารถควบคุมให้ทุกๆโมเลกุลของสารชนิดเดียวกันอยู่ในตำแหน่งเดียวกัน โมเลกุลของสารจะกระจายไปในคอลัมน์ โดยอยู่ในลักษณะแคบๆ และในขณะที่โมเลกุลของสารเคลื่อนผ่านคอลัมน์ แถบแคบๆนี้จะค่อยๆขยายกว้างขึ้น เนื่องจากอัตราการกระจายตัวหรืออัตราการเคลื่อนที่ที่ไม่เท่ากันของโมเลกุลของสารชนิดเดียวกัน คือบางโมเลกุลเคลื่อนที่เร็ว บางโมเลกุลเคลื่อนที่ช้า ซึ่งความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารชนิดเดียวกันนี้ ไม่ได้เกิดจากความแตกต่างของการสมดุลของการกระจายตัวของสารแต่ละชนิดดังที่กล่าวมาแล้ว แต่เกิดจากกระบวนการทางกายภาพ ที่เป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เกิดพีกกว้าง

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.5.5 Pulse damper

ใช้กับ reciprocating pump ต่ออยู่ระหว่างปั๊ม และ sample injector ทำด้วยท่อ สแตนเลสสตีล เนื่องจากข้อเสียของ reciprocating pump คือ เกิดการไหลเป็นพัลส์ทำให้เกิดสัญญาณรบกวนที่เบสไลน์ และมีผลต่อการทำงานของเครื่องตรวจวัด pulse damper ช่วยลดข้อเสียนี้ลงได้

2.5.6 Column thermostat

ใช้ในกรณี เช่น ต้องการแยกด้วยการแลกเปลี่ยนไอออน(ion – exchange), การคัดขนาด (size – exclusion) หรือ รีเวิร์สเฟสคอลัมน์(reverse – phase column) ที่อุณหภูมิสูงและต้องการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ ลักษณะของ column thermostat ใน HPLC จะคล้ายกับใน GC คือ ประกอบด้วยพัดลมที่มีความเร็วสูง และ thermostat ซึ่งควบคุมด้วยระบบไฟฟ้า หรือในบางกรณีคอลัมน์จะถูกควบคุมโดยตัวให้ความร้อนหรือโดยการไหลเวียนของของเหลวที่บรรจุอยู่ในอ่างซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้

2.5.7 เครื่องตรวจวัด (Detector)

หลังจากสารตัวอย่างถูกแยกผ่านคอลัมน์ออกมาแล้ว จะต้องผ่านเครื่องตรวจวัดปริมาณซึ่งจะต้องมีความไวสูง และวัดได้อย่างต่อเนื่อง

คุณสมบัติที่ต้องการสำหรับเครื่องตรวจวัดของเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟมีดังนี้

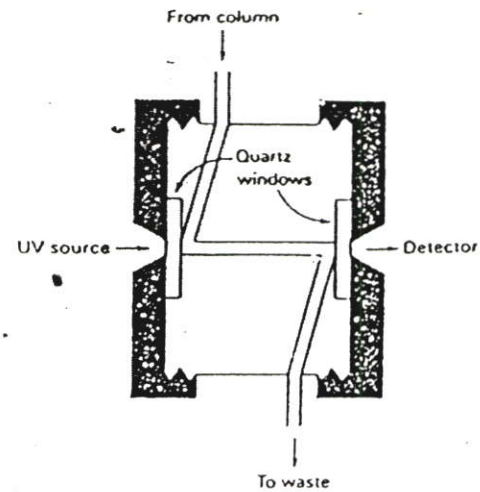
1. มีความไวเพียงพอ เครื่องตรวจวัดของเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟที่ใช้ในปัจจุบันมีความไวอยู่ในช่วง 10^{-8} ถึง 10^{-15} g ของสารที่วิเคราะห์ต่อวินาที
2. สัญญาณตอบรับมีความเที่ยงที่ดีและไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่และอุณหภูมิ
3. เชื่อถือได้และง่ายต่อการใช้งาน
4. ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นและสัญญาณตอบรับเป็นเส้นตรงในช่วงกว้าง
5. ไม่ทำลายสารตัวอย่าง
6. เซลล์ของดีเทคเตอร์ ควรมีปริมาตรตาย(dead volume) น้อยๆ เพื่อลดปัญหาพีกกว้าง

69065

เครื่องตรวจวัดสำหรับเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่

1. Ultraviolet – visible absorbance detectors

เป็นเครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้กันมากในเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟ หลักการทำงานอาศัยการดูดกลืนของสารตัวอย่าง โดยจะประกอบด้วย flow – through cell ซึ่งรูปร่างเหมือนตัวอักษร "Z" cell ดังแสดงในรูปที่ 2.16 ดังกล่าวออกแบบให้มีปริมาตรน้อยที่สุด(1-10 μL) และยาว 2 – 10 mm ปกติเซลล์ดังกล่าวจะทนความดันได้ประมาณ 600 PSi



รูปที่ 2.16 Ultraviolet detector cell สำหรับเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟ

เครื่องตรวจวัดนี้ อาจเป็นชนิดลำแสงเดี่ยว หรือชนิดลำแสงคู่

เครื่องตรวจวัดชนิดนี้มีข้อดี คือไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

เครื่องตรวจวัดชนิดนี้ แบ่งเป็นชนิดย่อยๆ ได้ ดังนี้

1.1 Fixed – wavelength detectors

เป็นเครื่องตรวจวัดที่วัดการดูดกลืนแสงได้ในบางช่วงคลื่น แบ่งเป็น

(1) Single wavelength detectors นิยมใช้หลอดปรอทชนิดความดันต่ำ ซึ่งจะเหมาะกับการวัดการดูดกลืนแสงที่ 254 nm เครื่องตรวจวัดชนิดนี้เป็นที่นิยมมากในสมัยก่อน เนื่องจากราคาถูกและใช้ได้ดีกับสารเคมีอินทรีย์ทั่วๆ ไป

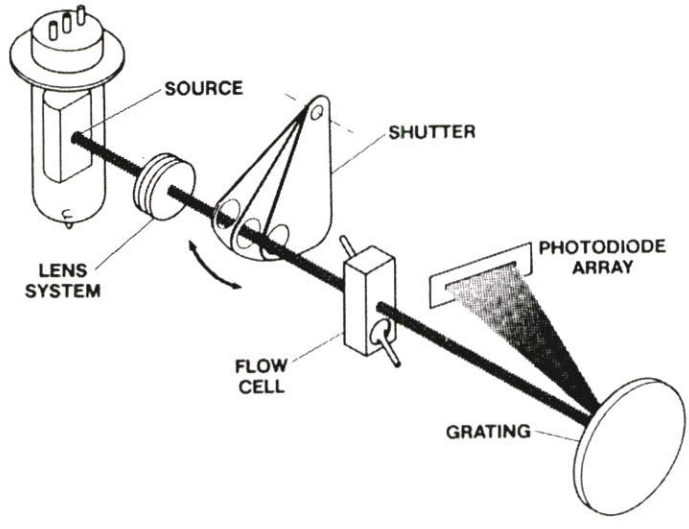
(2) Multi – wavelength detectors ใช้หลอดปรอทร่วมกับแหล่งกำเนิดแสงอื่น เช่น หลอดสังกะสี(206 nm) และหลอดตะกั่วทำให้เลือกวัดการดูดกลืนแสงได้หลายช่วงความยาวคลื่น

1.2 Variable – wavelength detectors

เป็นเครื่องตรวจวัดที่สามารถเลือกวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ต้องการในช่วงอัลตร้าไวโอเลท และวิสิเบิลเครื่องตรวจวัดนี้ประกอบด้วย หลอดดิวเทอเรียมและใช้เกรตติ่งโมโนโครมาเตอร์เพื่อให้เลือกความยาวคลื่นที่ต้องการได้ ในช่วง 190 – 400 nm หรืออาจใช้หลอดดิวเทอเรียมร่วมกับหลอดทังสเตนเพื่อให้เลือกความยาวคลื่นที่ต้องการได้ในช่วง 190 – 900 nm

1.3 Diode array detectors

ประกอบด้วย photodiode array spectrophotometers หลายตัว (256– 1024 ตัว) แสงจากแหล่งกำเนิดแสงจะผ่าน flow cell ไปยัง polychromator เช่น เกรตติ่งซึ่งจะกระจายแสงไปยังแผงของ photodiodes แต่ละ diode จะวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นหนึ่งๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.17



รูปที่ 2.17 Photodiode array ที่ใช้ใน HPLC detectors

เครื่องตรวจวัดนี้สามารถสแกนยูวี-วิสิเบิล สเปกตรัม(UV – Vis spectrum)ได้รวดเร็วมาก (ประมาณ 10 msec ต่อ 1 สเปกตรัม) และสามารถเปรียบเทียบสเปกตรัมที่เป็น 3 มิติ ซึ่งแสดงค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ความยาวคลื่นและเวลา โดยสามารถเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานได้ เนื่องจากข้อมูลต่างๆ เก็บไว้ในคอมพิวเตอร์ได้

การพัฒนาวิธีการแยก(Developing a separation)

การพัฒนาวิธีทางโครมาโทกราฟี เพื่อให้มีการแยกเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และใช้เวลาน้อย ดังนั้นเพื่อที่จะอธิบายและหาสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการแยกสารจึงจำเป็นต้องเข้าใจพารามิเตอร์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแยกทางโครมาโทกราฟี

พารามิเตอร์พื้นฐาน ได้แก่

1. Partition ratio (Partition Coefficient, K) เป็นค่าคงที่ที่อธิบายถึงการสมดุลของการกระจายตัวของสารตัวอย่างไประหว่างเฟสทั้งสองคือเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ ค่า K หาได้จากอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารในเฟสอยู่กับที่กับความเข้มข้นของสารในเฟสเคลื่อนที่ภายหลังกระจายตัวไประหว่างเฟสทั้งสองหรืออัตราส่วนของเวลาที่สารอยู่ในเฟสอยู่กับที่กับเวลาที่สารอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ ดังนี้

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

หรือ

$$K = \frac{t_s}{t_m}$$

เมื่อ C_s = ความเข้มข้นของสารในเฟสอยู่กับที่

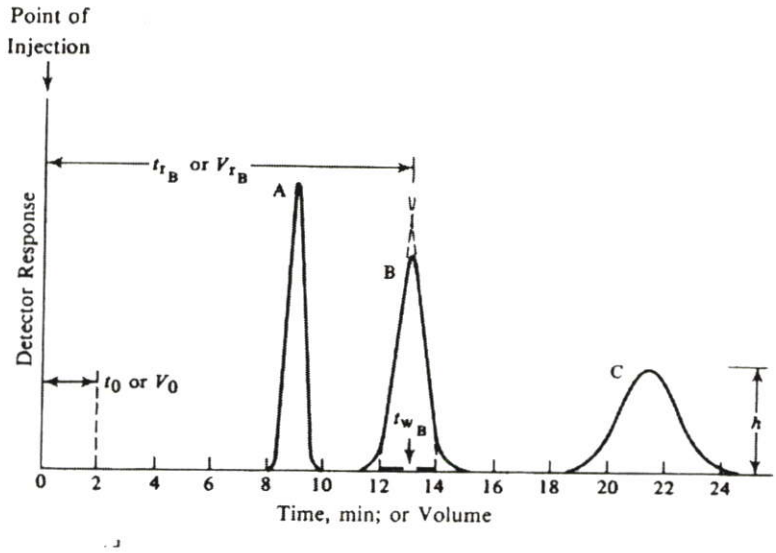
C_m = ความเข้มข้นของสารในเฟสเคลื่อนที่

t_s = เวลาที่สารอยู่ในเฟสอยู่กับที่

t_m = เวลาที่สารอยู่ในเฟสเคลื่อนที่

สารแต่ละชนิดจะมีค่า K คงที่เฉพาะในแต่ละสภาวะของการทดลองเท่านั้น ค่า K แปรผันตามอุณหภูมิของการทดลองและส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ แต่ไม่ขึ้นกับจำนวนสารที่นำมาทำการตรวจวิเคราะห์ สามารถนำมาใช้งานด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ แต่การที่จะวัดค่า K จากโคร-มาโทแกรมโดยตรงนี้ทำได้ยาก จึงไม่นิยมใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร มีพารามิเตอร์ตัวอื่นที่สามารถวัดค่าจากโครมาโทแกรมโดยตรงได้ง่ายกว่าและสามารถใช้ในการพิสูจน์เอก-ลักษณ์ของสารได้ เช่น เวลาการคงไว้(retention time), เวลาการคงไว้สัมพัทธ์(relative retention time) เป็นต้น

2. เวลาการคงไว้(Retention time, t_R) เป็นระยะเวลาที่เฟสเคลื่อนที่พาหรือชะล้างสารตัวอย่างเคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่ คือเวลาตั้งแต่เริ่มฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์จนกระทั่งถึงเวลาที่ตำแหน่งจุดยอดของพีกบนโครมาโทแกรม ดังแสดงในรูปที่ 2.18



รูปที่ 2.18 แสดงโครมาโทแกรมของการหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ

เวลาการคงไว้(t_R) เป็นพารามิเตอร์ที่วัดหรือหาค่าได้ง่ายจากโครมาโทแกรมสามารถใช้ในด้านการวิเคราะห์คุณภาพหรือพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารแต่เนื่องจากมักมีการเปลี่ยนแปลงอย่างใดอย่างหนึ่งของสภาวะการทดลอง เช่น อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่ เฟสอยู่กับที่หรือความดันที่ทำให้ค่าเวลาการคงไว้ไม่คงที่ มีผลทำให้การพิสูจน์เอกลักษณ์ผิดพลาดได้ จึงนิยมใช้พารามิเตอร์ตัวอื่น เช่น เวลาการคงไว้สัมพัทธ์ ซึ่งให้ผลถูกต้องกว่า

3. Corrected retention time ($t_R^{'}$) คือระยะเวลาตั้งแต่ตำแหน่งจุดยอดของพีกของสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวบนเฟสอยู่กับที่ถึงเวลาที่ตำแหน่งจุดยอดของพีกของสารตัวอย่างบนโครมาโทแกรม หรือระยะเวลาที่สารตัวอย่างถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่ในเฟสอยู่กับที่ ดังแสดงในรูป 2.18

$$t_R^{'} = t_R - t_0$$

t_O = เวลาที่สารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวบนเฟสอยู่กับที่(unretained compound) เคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่ หรือเวลาที่โมเลกุลของเฟสเคลื่อนที่(mobile phase) เคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่หรือคอลัมน์จากปลายด้านหนึ่งไปยังปลายอีกด้านหนึ่ง

4. Retention Volume (V_R) เป็นปริมาตรทั้งหมดของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการชะล้างหรือพาสารตัวอย่างออกจากเฟสอยู่กับที่ โดยวัดจากตำแหน่งที่เริ่มฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์จนถึงตำแหน่งจุดยอดของพีกของสาร หาได้จากความสัมพันธ์ของอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (flow rate ,F) กับเวลาการคงไว้(t_R) ดังนี้

$$V_R = Ft_R$$

V_R = retention volume

F = อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (flow rate, ml/min)

t_R = เวลาการคงไว้ของสารตัวอย่าง

5. Corrected retention volume (V'_R) ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการชะล้างหรือพาสารตัวอย่างออกจากเฟสอยู่กับที่ โดยวัดจากตำแหน่งจุดยอดของพีกของสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวบนเฟสอยู่กับที่จนถึงตำแหน่งจุดยอดของสารตัวอย่าง หาค่าได้จาก

$$V'_R = V_R - V_0 = Ft_0$$

Vo = ปริมาตรตาย(dead volume) หรือ ปริมาตรว่าง(void volume) หรือปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ที่เคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่ หรือผ่านคอลัมน์จากปลายด้านหนึ่งไปยังอีกปลายด้านหนึ่ง

6. แฟกเตอร์ความจุ(Capacity factor,k') เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าสารตัวอย่างหน่วงเหนี่ยวอยู่ในคอลัมน์ได้ดีเพียงใด ขณะทำการแยกโดยใช้การชะแบบไอโซเครติก ค่า k' นี้หาได้จาก corrected retention time ของสารที่วิเคราะห์ (t'_R) หารด้วยเวลาของสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวหรือเวลาที่เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนผ่านคอลัมน์ (t_o) ดังนี้

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

k' เป็นพารามิเตอร์ที่บอกถึงลักษณะการทำงานของคอลัมน์ ปัจจัยที่มีผลต่อค่า k' คือ องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ เฟสอยู่กับที่ และอุณหภูมิของการทดลอง โดยทั่วไปค่า k' ของสารควรอยู่ระหว่าง 2-5 ทั้งนี้เพราะเวลาที่ใช้และการแยกสมดุลกันดี และค่า k' ที่เหมาะสมของการแยกสารที่ซับซ้อนควรมีค่าระหว่าง$1 \leq k' \leq 16$ ในการปฏิบัติควรหาค่า k' ของพีกของสารที่ต้องการวิเคราะห์อย่างน้อย 1 พีก คือพีกแรกเพื่อให้แน่ใจว่าพีกของสารที่ต้องการวิเคราะห์แยกออกจากพีกของตัวทำละลายหรือพีกของสารปนเปื้อน ซึ่งมักจะถูกชะออกมาใกล้หรือที่เดียวกับ t_o พีกของสารที่ทำการวิเคราะห์ไม่ควรมีค่า k' สูงเกิน 10-15 เพราะจะใช้เวลานานและทำให้พีกที่ได้กว้างและการแยกไม่ดี ทำให้การตรวจวัดลำบาก ค่า k' บอกให้ทราบถึงเวลาที่สารถูกชะออกมาจากคอลัมน์ บอกลักษณะของพีกกว้างหรือแคบ การตรวจวัดยากหรือง่าย ความแรงของเฟสเคลื่อนที่แรงหรือ

อ่อน ดังแสดงในตารางที่ 2.1 จากข้อมูลนี้สามารถนำมาปรับค่า k' ให้เหมาะสมเพื่อให้การแยกสารได้ดีที่สุด

ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบค่า k'

ข้อมูล	k' ต่ำ	k' สูง
เวลาที่สารถูกพาออกจากคอลัมน์	น้อย	มาก
ลักษณะของพีก	แหลมสูง	กว้างเตี้ย
การตรวจวัด	ง่าย	ยาก
ความแรงของเฟสเคลื่อนที่	แรง	อ่อน

การปรับหรือควบคุมค่า k'

ในกรณีที่ค่า k' ที่ได้จากการทดลองไม่เหมาะสม อาจสูงไปหรือต่ำไปทำให้การแยกไม่ดี มีวิธีการปรับหรือควบคุมค่า k'หรือเวลาของการชะเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีขึ้นหรือดีที่สุดได้ดังนี้

6.1 ปรับเปลี่ยนสัดส่วนผสมหรือความแรงของตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่ เป็นการปรับเปลี่ยนสัดส่วนหรือความแรงของตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่โดยไม่เปลี่ยนคุณสมบัติทางเคมีของตัวทำละลาย ในทางปฏิบัติการเลือกเฟสเคลื่อนที่ให้เหมาะสมนั้นจะต้องพิจารณาจากคุณสมบัติของสารตัวอย่างเป็นหลักและการเลือกความแรงของเฟสเคลื่อนที่ให้เหมาะสมทำโดยการแยกสารที่ต้องการแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ 1-2 ครั้ง แล้วดูค่า k' ที่ได้ หลังจากนั้นจึงปรับความแรงของเฟสเคลื่อนที่ให้แรงขึ้นหรืออ่อนลงเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีขึ้น วิธีที่ง่ายและสะดวกในการปรับความแรง คือปรับความเข้มข้นของตัวทำละลาย, pH, ความมีขั้ว โดยไม่เปลี่ยนคุณสมบัติทางเคมีหรือชนิดของตัวทำละลายที่เป็นส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ โดยทั่วไปมักจะใช้ตัวทำละลายผสมที่ให้ค่า $1 \le k' \le 10$ เพื่อให้การแยกเกิดขึ้น และเวลาในการแยกไม่นานเกินไป ถ้าต้องการเปลี่ยนค่า k' ให้ใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีความแรงน้อย ในทางตรงข้ามถ้าต้องการลดค่า k' ให้ใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีความแรงมาก

6.2 เพิ่มหรือลดปริมาณของเฟสอยู่กับที่

ในกรณีที่เป็นโครมาโทกราฟีแบบแยกขนาดจำเพาะ(size exclusion chromatography)ทำได้โดยการเพิ่ม หรือลดปริมาตรของรูพรุน และพื้นที่ผิวของสารบรรจุในคอลัมน์ ในกรณีที่เป็นโครมาโทกราฟีแบบกระจาย(partition chromatography) ทำโดยการเพิ่มหรือลดปริมาณเฟสของเหลวบนสารช่วยพยุงและในกรณีที่เป็นโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน(ion-exchange chromatography) ทำโดยเพิ่มหรือลดความหนาแน่นประจุ หรือ ความแรงไอออนบนสารบรรจุ

6.3 ปรับเปลี่ยนปัจจัยที่มีผลต่อค่า K

อุณหภูมิและอัตราความเร็วของการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็นปัจจัยที่มีผลต่อความผันแปรของค่า K ดังนั้นจึงมีผลต่อค่า k' ด้วย

7. ค่าซีเล็คติวิตี้(selectivity factor,α) เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีกของสารสองชนิดที่อยู่แยกออกจากกันดีเพียงใด การแยกออกจากกันนี้ขึ้นกับค่าเวลาการคงไว้หรือค่า k' เท่านั้น โดยไม่คำนึงถึงความกว้างของพีก และค่านี้เกี่ยวข้องกับ relative partition coeffcient ของสารสองชนิด หาได้จากอัตราส่วนของ partition coefficient หรืออัตราส่วนของแฟกเตอร์ความจุของสารสองชนิดที่มีพีกติดกัน ดังนี้

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} = \frac{t_{R2}'}{t_{R1}'}$$

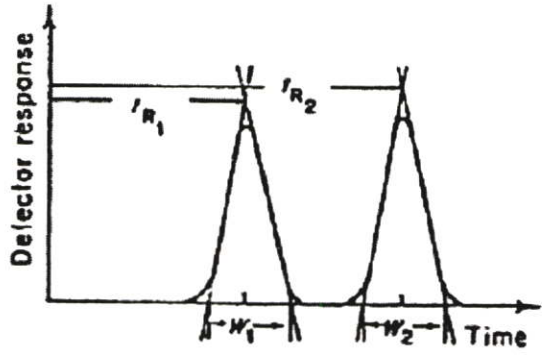
α = ค่าซีเล็คติวิตี้

k_1' = ค่าแฟกเตอร์ความจุของพีกแรก

k_2' = ค่าแฟกเตอร์ความจุของพีกที่สอง

t_{R1}' = corrected retention time ของพีกแรก

t_{R2}' = corrected retention time ของพีกที่สอง



รูปที่ 2.19 แสดงโครมาโทแกรมของการแยกสารสองชนิด

ค่าซีเล็คติวิตี้(α) เป็นค่าที่มีความสำคัญมาก คือเป็นตัวบอกให้ทราบว่าคอลัมน์หรือเฟสอยู่กับที่นั้นอยู่ในสภาวะที่มีการทำงานดีเพียงใด ค่านี้ขึ้นกับองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ พื้นที่ผิวของเฟสอยู่กับที่ และอุณหภูมิ ในการแยกสาร α จะต้องมีค่ามากกว่า 1 จึงจะมีการแยกเกิดขึ้น ถ้า $\alpha = 1$ แสดงว่าพีกทั้งสองทับกัน เนื่องจากพีกทั้งสองมีเวลาการคงไว้เท่ากัน ค่า α เหมาะสมคืออยู่ในช่วง 1.5 - 4.0

การควบคุมหรือปรับเปลี่ยนค่าซีเล็คติวิตี้(α)

เพื่อให้สารสองชนิดที่อยู่ใกล้กันแยกออกจากกันได้ดีขึ้นเท่านั้น ทำโดยวิธีต่างๆดังนี้

7.1 ปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ เป็นการปรับความแรงของเฟสเคลื่อนที่โดยการเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายที่เป็นองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่คือเปลี่ยนคุณสมบัติทางเคมีของตัวทำละลาย

7.2 เปลี่ยน pH ของเฟสเคลื่อนที่ วิธีนี้นิยมใช้กับการแยกสารที่มีการแตกตัวเป็นอิออน เช่นพวกกรดหรือเบส การปรับเปลี่ยน pH ของเฟสเคลื่อนที่มักจะทำให้ค่า α เปลี่ยนแปลง แต่ค่า k' เปลี่ยนแปลงไม่มากนัก ส่วนมากใช้ในวิธีการแลกเปลี่ยนไอออน(ion–exchange),ไอออนแพร์ (ion– pair)

7.3 เปลี่ยนเฟสอยู่กับที่ ทำโดยการเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์วิธีนี้ไม่สะดวก เสียค่าใช้จ่ายสูงกว่าการปรับเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่ จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยม แต่ให้ผลดีมาก ถ้ามีการเปลี่ยนคอลัมน์ใหม่เฟสเคลื่อนที่ก็ต้องมีการปรับเปลี่ยนให้มีความแรงพอที่จะทำให้ได้ค่า k' ที่เหมาะสม

7.4 เปลี่ยนอุณภูมิของคอลัมน์ โดยทั่วๆไปการเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้ค่า k' ลดลง ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์ จำเป็นต้องลดความแรงของเฟสเคลื่อนที่ เพื่อเป็นการชดเชยให้ค่า k' อยู่ในช่วงที่เหมาะสม การเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า α เพียงเล็กน้อย

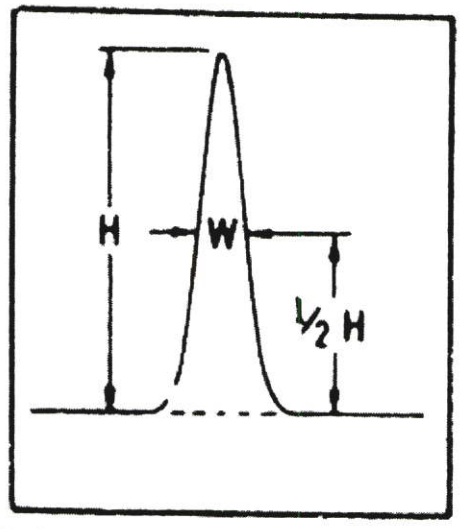
7.5 ใช้ปฏิกิริยาพิเศษทางเคมี ปฏิกิริยาที่นิยมใช้คือคอมแพล็กเซชัน(complexation) โดยการเติมซิลเวอร์ไนเตรท(silver nitrate) ลงในเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งซิลเวอร์ไอออนนี้จะเป็นตัวที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ t_R และ α ทำให้การแยกดีขึ้น

8. ประสิทธิภาพของคอลัมน์พิจารณาได้จากความกว้างของพีกที่ถูกชะออกมา ประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ดี พีกแต่ละพีกที่ถูกชะออกมาจะต้องมีฐานที่แคบและแยกออกจากกันได้ ค่าที่ใช้วัดประสิทธิภาพของคอลัมน์คือ จำนวนเพลทของคอลัมน์ (number of theoretical plates, N) และความสูงของเพลทแต่ละเพลทในคอลัมน์(Height equivalent to a theoretical plate, H หรือ HETP)

จำนวนเพลทของคอลัมน์ (N) เป็นตัวบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ว่า คอลัมน์นั้นมีการบรรจุดีเพียงใด พิจารณาจากความกว้างของพีกขณะเคลื่อนผ่านคอลัมน์ โดยเปรียบเทียบความกว้างของพีกกับเวลาที่สารเคลื่อนผ่านคอลัมน์ สามารถคำนวนได้จากโครมาโทรแกรมดังนี้

$$N = a\left(\frac{t_R}{W}\right)^2$$

N	=	จำนวนเพลท (number of theoretical plates)
t_R	=	เวลาการคงไว้ของสาร
W	=	ความกว้างของพีกที่ตำแหน่งของความสูงที่กำหนด
a	=	ค่าคงที่ขึ้นกับวิธีการวัดความกว้างของพีก ตามตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.20 แสดงโครมาโทแกรมสำหรับคำนวณจำนวนเพลทของคอลัมน์ (N)

ตารางที่ 2.2 แสดงค่าคงที่ a จากการวัดความกว้างของพีกโดยวิธีต่างๆ

วิธี	a
ความกว้างของพีกที่ครึ่งหนึ่งของความสูง	5.54
ความกว้างของพีกที่ 4.4 % ของความสูง(5σ)	25
Tangent	16

9. ค่าความสามารถในการแยก(Resolution,R_S)

เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีกของสารสองชนิดที่อยู่ติดกันแยกออกจากกันดีเพียงใด ซึ่งการแยกนี้จะต้องพิจารณาทั้งระยะเวลาที่สารเคลื่อนผ่านคอลัมน์และความกว้างของพีกทั้งสอง คำนวนได้จากระยะห่างกันระหว่างตำแหน่งจุดสูงสุดของพีกทั้งสองหารด้วยความกว้างเฉลี่ยของพีกทั้งสอง ดังแสดงในรูปที่ 2.21

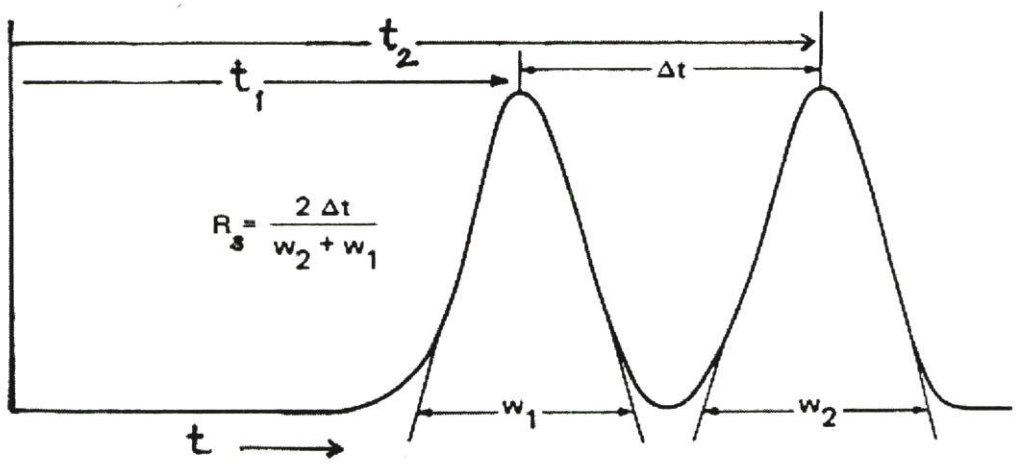
$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)} = \frac{2\Delta t_R}{W_1 + W_2}$$

R_s = ค่าความสามารถในการแยก(Resolution)

t_{R1} และ t_{R2} = เวลาการคงไว้ของพีกที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

W_1 และ W_2 = ความกว้างของพีกที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

Δt_R = ระยะห่างระหว่างจุดสูงสุดของพีกทั้งสอง



รูปที่ 2.21 แสดงโครมาโทแกรมสำหรับคำนวณค่าการแยก(Resolution, R_S)

ถ้าพีกสมมาตร R_S มีค่าเท่ากับ 1.5 แสดงว่าการแยกของพีกทั้งสองลงถึงเบสไลน์จะมีการทับกันเพียงประมาณ 0.3% ถือเป็นการแยกอย่างสมบูรณ์ ถ้า R_S มีค่าเท่ากับ 1.0 พีกทั้งสองจะทับกันบางส่วนคือประมาณ 2% และการแยกนี้สามารถนำมาใช้งานด้านการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ ถ้า R_S มีค่าเท่ากับ 0.75 พีกทั้งสองจะทับกันมาก ไม่สามารถใช้งานด้านวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ ถ้า R_S มีค่าสูงเกินไป พีกทั้งสองจะห่างกันมาก ทำให้เสียเวลาและสิ้นเปลืองตัวทำละลายโดยไม่จำเป็น ดังนั้นการแยกควรปรับสภาวะของการแยกเพื่อให้ได้ค่า R_S ที่เหมาะสม

จะเห็นว่าค่าความสามารถในการแยกเกี่ยวข้องกับเวลาการคงไว้และความกว้างของพีก คือ เวลาการคงไว้เกี่ยวข้องกับ แฟกเตอร์ความจุ(k') และค่าซีเล็คติวิตี้ (α) ส่วนความกว้างของพีกเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของคอลัมน์(N) ค่า R_S จะเพิ่มเมื่อ Δt เพิ่ม และความกว้างของพีกต้องลดลง จากความสัมพันธ์ของค่าความสามารถในการแยกกับพารามิเตอร์ดังกล่าวสามารถเขียนเป็นสมการความสัมพันธ์ได้ดังนี้

$$R = \frac{1}{4}\sqrt{N}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{k'}{1 + k'}\right)$$

(1) (2) (3)

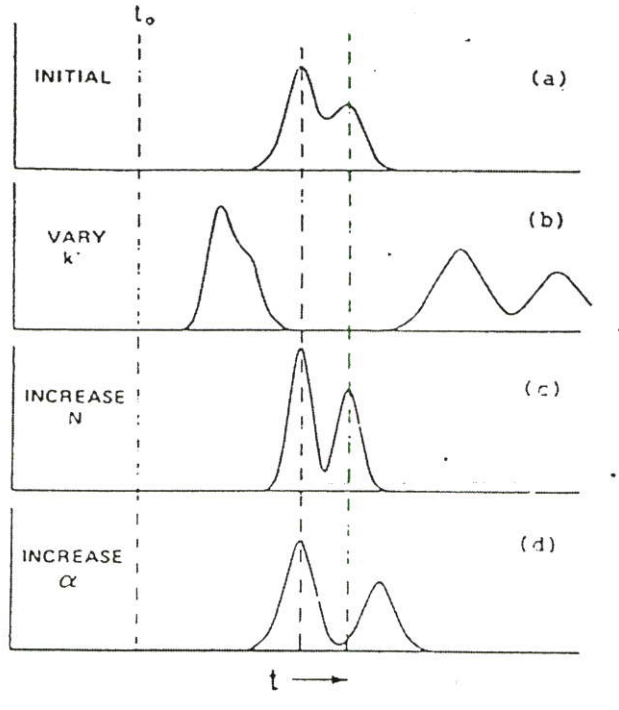
จากสมการสามารถใช้เป็นแนวทางในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีที่สุดและใช้เวลาน้อย ได้สามวิธี คือการปรับค่าแฟกเตอร์ความจุ(k'), ค่าซีเล็คติวิตี้(α) และ จำนวนเพลท(N) ในการทำงานจะต้องพิจารณาดูว่า ควรปรับพารามิเตอร์ตัวใดก่อน-หลังเพื่อให้การแยกดี

ขึ้น สิ่งที่ง่ายและสะดวกคือ ควรปรับค่าแฟกเตอร์ความจุ และ ค่าซีเล็คติวิตี้ก่อน ถ้าการแยกยังไม่ดีจึงปรับค่าจำนวนเพลท ซึ่งไม่สะดวกและเสียค่าใช้จ่ายสูง

จากสมการ เทอมที่ 1 ประสิทธิภาพของคอลัมน์(Efficiency) เกี่ยวข้องกับอิทธิพลทางไคเนติค(kinetic effect) ที่มีผลต่อความกว้างของพีกคือ $\sqrt{N}$ เทอมที่ 2 ค่าซีเล็คติวิตี้ (selectivity) และเทอมที่ 3 ค่าแฟกเตอร์ความจุ(capacity) เกี่ยวกับเทอร์โมไดนามิกส์ของสารที่ทำการแยก คือขึ้นกับค่าการกระจายตัวของสาร (distribution coefficient, K) และปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ พารามิเตอร์ในเทอมที่ 2 คือ ค่าซีเล็คติวิตี้(selectivity,α) เกี่ยวข้องเฉพาะกับคุณสมบัติของสารทั้งสองชนิดเท่านั้น ส่วนพารามิเตอร์ในเทอมที่ 3 คือ ค่าแฟกเตอร์ความจุ (capacity,k')เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทั้งของสารและคอลัมน์

การปรับค่าประสิทธิภาพของคอลัมน์(column efficiency,N) การปรับค่า N เพื่อให้ความสามารถในการแยกดีขึ้นนั้นเป็นทางเลือกสุดท้ายเพราะเสียค่าใช้จ่ายสูงและไม่สะดวก การเพิ่มค่า N ทำโดยการเพิ่มความยาวของคอลัมน์ ทำให้พีกแคบลง โดยทั่วๆ ไปมักจะลดค่า H (height equivalent of a theoretical plate) ซึ่งค่า H นี้มีความสัมพันธ์กับค่า N คือค่า H ต่ำ ค่า N จะสูง การลดค่า H ทำโดยการเปลี่ยนอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ลดขนาดของอนุภาคของสารบรรจุในคอลัมน์ ลดความหนืดของเฟสเคลื่อนที่ (เพื่อเพิ่มอัตราการกระจายตัวของสารในเฟสเคลื่อนที่ ทำให้พีกแคบลง) และเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์

ตัวอย่างแสดงผลของการปรับค่า k', α และ N ที่มีต่อ resolution ดังในรูปที่ 2.22



รูปที่ 2.22 โครมาโทแกรมแสดงผลของการปรับค่า k', α และ Nที่มีต่อ resolution (R_S)

จากรูปที่ 2.22 สามารถอธิบายผลของการปรับค่า k', α และ N ที่มีต่อความสามารถในการแยกได้ดังนี้ เช่น การแยกสารสองชนิด ด้วยรีเวิร์สเฟสคอลัมน์ ใช้ส่วนผสมของน้ำและเมทานอล เป็นเฟสเคลื่อนที่ เริ่มด้วยใช้เมทานอลกับน้ำในอัตราส่วน 50:50 สารทั้งสองจะแยกดังในรูป (a) ค่า k' ที่ได้อยู่ในช่วง $0.5 < k' < 2$ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงทำการปรับค่า k' ก่อน เพราะสะดวก ถ้าต้องการลดค่า k' จะต้องเพิ่มความแรงของเฟสเคลื่อนที่ คือเพิ่มสัดส่วนของเมทานอลต่อน้ำเป็น 70:30 ผลการแยกไม่ดี พีกทับกันดังในรูป (b) ด้านซ้าย เพราะฉะนั้นต้องเพิ่มค่า k' เพื่อให้การแยกดีขึ้น โดยลดความแรงของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 35:65 การแยกดีขึ้น แต่ความสูงของพีกลดลงมาก และใช้เวลานาน ดังในรูป (b) ด้านขวา รูป (c) เป็นการปรับค่า N โดยการเพิ่มจำนวนเพลท เช่นความยาวของคอลัมน์จาก 10 เซนติเมตร เป็น 15 เซนติเมตร ผลของการแยกพีกแคบลง ความสูงเพิ่มขึ้น เวลาไม่เปลี่ยนไปจากเริ่มแรก (โดยทั่วไปการเพิ่มค่า N หรือความยาวของคอลัมน์เวลาจะเปลี่ยน แต่ในกรณีนี้เข้าใจว่าอัตราส่วนของน้ำหนักของสารตัวอย่างต่ออนุภาคของคอลัมน์ไม่เปลี่ยนแปลง) รูป (d) เป็นการปรับค่า α โดยการเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่จากเมทา-นอลเป็นอะซิโตรไนไทล์ เช่นใช้ 40% อะซิโตรไนไทล์ในน้ำ ผลการแยกดีขึ้นเวลาการคงไว้และความสูงของพีกเปลี่ยนไม่มากนัก

การตรวจสอบระบบที่ใช้วิเคราะห์(System suitability)

เป็นการตรวจสอบให้แน่ใจว่าระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์นั้นเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ ซึ่งการตรวจสอบนี้ เป็นการตรวจสอบเกี่ยวกับเครื่องมือ ระบบไฟฟ้า วิธีการและสภาวะของการทดลอง พารามิเตอร์ที่ใช้เพื่อทำการตรวจสอบ ได้แก่ ความเที่ยง หาได้จากค่า Relative Standard Deviation (S_R) และ ค่าการแยก หาได้จากจำนวนเพลททางทฤษฎี(Plate count or column efficiency,N) เทลลิ่ง แฟกเตอร์(tailing factor,T) และค่าความสามารถในการแยก (Resolution ,R_S)

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์(Relative standard deviation ,S_R) เป็นการตรวจสอบความแม่นยำของเครื่องมือ ทำโดยการฉีดสารละลายของสารมาตรฐาน ที่ใช้ในการวิเคราะห์ซ้ำๆ กัน ในกรณีที่กำหนด ค่า S_R ไม่เกิน 2% ต้องคำนวณจากข้อมูลที่ได้จากการฉีดสาร 5 ครั้ง และถ้ากำหนดค่า S_R เกิน 2% ต้องคำนวณจากข้อมูลที่ได้จากการฉีด 6 ครั้ง

ค่า S_R คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ได้จากสูตร

$$S_R\,(\%) = \frac{100}{\overline{X}}\left[\frac{\sum_{i=1}^{N}\left(X_i - \overline{X}\right)^2}{N-1}\right]^{\frac{1}{2}}$$

X_i = ค่าการตอบสนอง(Response) อาจเป็นความสูงของพีก(Peak height) พื้นที่ของพีก(Peak area) หรือ เวลาในการคงไว้ (Retention time) ของการฉีดสารแต่ละครั้ง

N = จำนวนครั้งในการฉีดสาร

$\overline{X}$ = ค่าเฉลี่ยของการตอบสนอง

ค่า S_R ขึ้นกับความแม่นยำของเครื่องมือ ไม่สามารถที่จะแก้ให้ดีขึ้นด้วยการปรับสภาวะของการทดลอง

จำนวนเพลททางทฤษฎี(Plate count or column efficiency ,N)

เป็นการวัดประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ มักจะใช้ค่านี้ตรวจสอบระบบที่ใช้วิเคราะห์(System suitability)ในกรณีที่ทำการวิเคราะห์สารชนิดเดียวเป็นการบอกถึงความแหลมของพีก ค่านี้มีความสำคัญในกรณีที่ทำการวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยๆ

ค่า N หาได้จากสูตร

$$N = 16\left(\frac{t}{w}\right)^2$$

ค่าความสามารถในการแยก(Resolution, R_S)

เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีกสองพีกที่อยู่ติดกันแยกออกจากกันดีเพียงใด ซึ่งการแยกนี้จะต้องพิจารณาทั้งระยะเวลาที่สารเคลื่อนผ่านคอลัมน์และความกว้างของพีกทั้งสอง ค่านี้บอกถึงประสิทธิภาพของระบบการแยกเพื่อให้แน่ใจว่า สารมาตรฐานภายในแยกออกจากสารที่ต้องการวิเคราะห์ การแยกที่สมบูรณ์ มีค่า R_S = 1.5 แต่ค่า R_S = 1 ก็สามารถใช้สำหรับงานวิเคราะห์ได้ ในการวิเคราะห์ยาตาม USP มักจะกำหนดตัวยาที่ใช้ในการหาค่า R_S

ค่า R_S หาได้จากสูตร

$$R_S = \frac{2\left(t_{R2} - t_{R1}\right)}{W_2 + W_1}$$

เทลลิ่ง แฟกเตอร์(Tailing Factor,T)

เป็นค่าที่วัดหรือบอกถึงความสมมาตรของพีก ถ้าพีกสมมาตร ค่า T มีค่า = 1 ถ้าค่า T มีค่ามากกว่า 1 พีกจะไม่สมมาตร คือพีกเป็นหางทำให้การตรวจวัดและผลการวิเคราะห์ไม่น่าเชื่อถือ ถ้า T > 2.0 แสดงว่าคอลัมน์มีประสิทธิภาพต่ำ

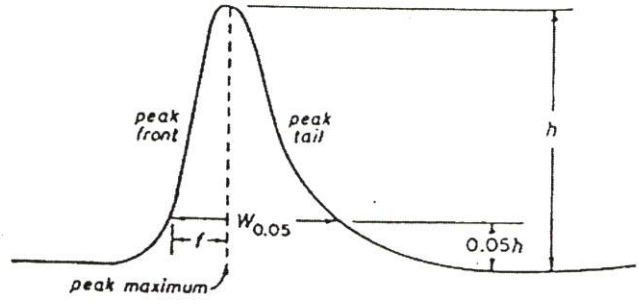
ค่า T หาได้จากสูตร

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

T = เทลลิ่ง แฟกเตอร์(tailing factor)

$W_{0.05}$ = ความกว้างของพีกที่ความสูง 5% จากเบสไลน์

f = ระยะทางระหว่างจุดสูงสุดของพีกไปยังส่วนลาดของพีกด้านหน้า ค่านี้วัดที่ 5 % ของความสูงจากเบสไลน์



รูปที่2.23 แสดงความไม่สมมาตรของพีก(asymmetrical peak)

การตรวจสอบเหล่านี้ หาได้จากการรวบรวมข้อมูลจากการฉีดสารละลายมาตรฐาน หรือสารละลายของสารอื่นๆ ที่กำหนด หรือหาค่าระบบที่ใช้วิเคราะห์(System suitability) ได้จากสารที่ทำการวิเคราะห์ บางครั้งในการวิเคราะห์อาจจะไม่ได้ค่าระบบที่ใช้วิเคราะห์ตามที่กำหนด ซึ่งสามารถที่จะปรับปรุงแก้ไขค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้ เช่นค่า T ทำโดยการเปลี่ยนส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ เป็นต้น

การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ(Qualitative Analysis)

HPLC เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารเพื่อตรวจเอกลักษณ์ วัดปริมาณและสามารถแยกเก็บสารแต่ละชนิดที่แยกออกมาได้ การตรวจเอกลักษณ์ของสารที่แยกออกมาได้ ทำได้โดยเปรียบเทียบค่าเวลาการคงไว้กับสารมาตรฐานโดยสารตัวอย่างและสารมาตรฐานจะต้องทำการวิเคราะห์โดยมีสภาวะต่างๆ เหมือนกัน เช่น อุณหภูมิ ชนิดของคอลัมน์ ชนิดและอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็นต้น สารที่ให้ค่าเวลาการคงไว้ต่างกันภายใต้การวิเคราะห์สภาวะเดียวกัน แสดงว่าเป็นสารต่างชนิดกัน อย่างไรก็ดี สารที่ให้ค่าเวลาการคงไว้เท่ากันอาจเป็นสารต่างชนิดกันก็ได้ จะต้องวิเคราะห์เพิ่มเติม เพื่อเพิ่มความมั่นใจ โดยวิธีการดังนี้

1. ทำการวิเคราะห์ใหม่โดยเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์ หรือ ชนิดของเฟสเคลื่อนที่
2. ทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างเดิมโดยใช้เทคนิคอื่น
3. นำส่วนที่แยกได้จาก HPLC ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่น

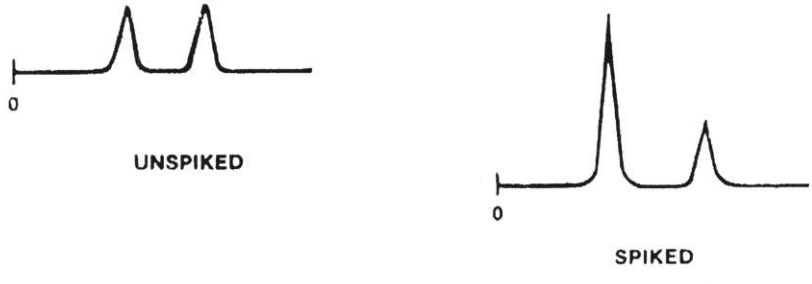
เทคนิคที่ใช้ในการตรวจเอกลักษณ์ของสาร

1. เปรียบเทียบเวลาการคงไว้รายละเอียดดังกล่าวมาแล้วข้างต้น

2. เปรียบเทียบปริมาตรการคงไว้ ถ้าสารตัวอย่างให้ปริมาตรการคงไว้ต่างจากสารมาตรฐานเมื่อทำการวิเคราะห์ภายใต้สภาวะเดียวกัน ก็แสดงว่าเป็นสารต่างชนิดกัน แต่ถ้าปริมาตรการคงไว้เท่ากัน สารตัวอย่างก็อาจเป็นสารชนิดเดียวกับสารมาตรฐาน

3. เปรียบเทียบเวลาการคงไว้สัมพัทธ์กับสารมาตรฐานชนิดอื่นที่ให้ค่าเวลาการคงไว้ไม่ตรงกัน เช่น ต้องการตรวจเอกลักษณ์ของสารตัวอย่างว่าเป็นโคเคอีนหรือไม่ ก็อาจใช้ โคดีอีนเป็นสารมาตรฐานชนิดที่สอง โดยเติมโคเดอีนลงในสารมาตรฐานโคเคอีนและลงในสารตัวอย่างด้วย ฉีดสารผสมทั้งสองเข้า HPLC สารผสมละ 1 – 2 ครั้ง เปรียบเทียบอัตราส่วนเวลาการคงไว้ของโคเคอีนกับโคเดอีน และของสารตัวอย่างกับโคเดอีน ถ้าอัตราส่วนทั้งสองต่างกัน แสดงว่าสารตัวอย่างไม่ใช่โคเคอีน แต่ถ้าเท่ากันสารตัวอย่างอาจเป็นโคเคอีนต้องเพิ่มความมั่นใจโดยวิธีต่างๆ ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

4. การเติม(Spiking) ในกรณีนี้วิเคราะห์ด้วย HPLC แล้วแยกได้ 2 พีก ถ้าทราบว่าสารตัวอย่างเป็นสารผสมของ A และ B แต่อยากทราบว่าพีกใดเป็นของ A พีก ใดเป็นของ B ก็ทำได้โดยเติมสารมาตรฐาน A หรือ B ลงไป เช่น ถ้าเติมสาร A ลงไป พีกที่มีพื้นฐานมากหรือสูงขึ้นก็แสดงว่าเป็นพีกของสาร A ดังรูป 2.24



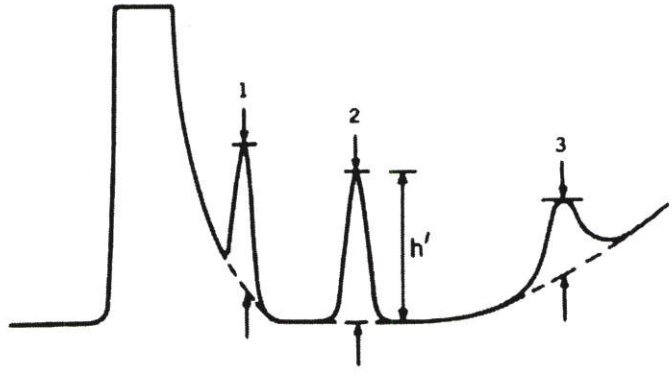
รูปที่ 2.24 แสดงการวิเคราะห์พีกด้วยเทคนิคการเติม(spiking)

การวิเคราะห์เชิงปริมาณ(Quantitative Analysis)

หลังจาก HPLC แยกสารออกมาเป็นพีกต่างๆ ปริมาณของสารในแต่ละพีกก็สามารถคำนวณได้ดังนี้

1. โดยวัดความสูงของพีก เทียบกับความสูงของพีกของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่ฉีดเข้าไป เนื่องจากความสูงของพีกจะแปรตามปริมาณของสารที่ผ่านเข้าไปในเครื่องตรวจวัด

ความสูงของพีก(H) วัดระยะจากเบสไลน์ถึงจุดสูงสุดของพีก ดังแสดงที่พีกที่ 2 ในรูปที่ 2.25 การวัด H ทำได้ง่ายและสะดวกโดยใช้ไม้บรรทัดหรือนับช่องตารางในกระดาษ หรือได้จากคอมพิวเตอร์ซึ่งต่อกับเครื่องตรวจวัด กรณีที่ เบสไลน์ดริฟสามารถแก้ไขโดยลากเส้นเบสไลน์จากจุดที่เริ่มต้นถึงจุดสิ้นสุดของพีก ดังแสดงที่พีก 1 และ 3 ในรูปที่ 2.25 อย่างไรก็ดี ถ้าต้องการให้ค่าที่วิเคราะห์ได้มีความเที่ยงดี เบสไลน์ควรอยู่ในแนวราบ ดังแสดงที่พีก 2



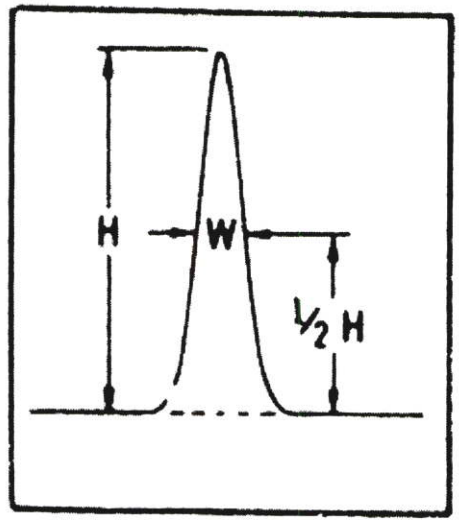
รูปที่ 2.25 การวัดความสูงของพีก

เมื่อใช้วิธีนี้ต้องควบคุมไม่ให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เปลี่ยนเนื่องจากจะมีผลต่อการเปลี่ยนรูปร่างของพีก ซึ่งทำให้ความสูงของพีกเปลี่ยนไป นอกจากนี้วิธีนี้ห้ามใช้กับพีกที่มีหาง พีกที่มีลักษณะกว้าง เพราะจะทำให้ที่คำนวณได้ไม่ถูกต้อง

2. โดยวัดพื้นที่พีก ของสารตัวอย่างกับพื้นที่พีกของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่ฉีดเข้าไป วิธีนี้ให้ผลแม่นยำกว่าวิธีแรก

การหาพื้นที่พีกทำได้หลายวิธี ดังนี้

1. คำนวณจากความสูงของพีก(H) ความกว้างของพีกที่ครึ่งหนึ่งของความสูง (W) วิธีนี้เหมาะสำหรับพีกที่มีรูปร่างใกล้เคียงกับการกระจายแบบเกาส์เซียนดังแสดงในรูปที่ 2.26



รูปที่ 2.26 การคำนวณพื้นที่ของพีก โดยใช้ความสูงของพีก(H) คูณกับความกว้างของพีกที่ครึ่งหนึ่งของความสูง(W)

2. ตัดพีกแล้วชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด เทียบกับน้ำหนักของพีกของสารมาตรฐาน วิธีนี้ไม่ค่อยนิยมใช้

3. ใช้เครื่องคอมพิวเตอร์คำนวณ วิธีนี้ให้ผลแม่นยำกว่า 2 วิธีข้างต้น และประหยัดเวลา แต่ต้องเสียค่าใช้จ่ายสำหรับเครื่องมือดังกล่าว

เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารตัวอย่าง

เมื่อผู้วิเคราะห์ทราบความสูงหรือพื้นที่พีกของสารมาตรฐานแล้ว ต้องนำมาทำกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณของสารตัวอย่าง เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารตัวอย่างมีดังนี้

1. Internal standard technique

การวิเคราะห์วิธีนี้ทำโดยเติมสารที่ต่างชนิดกับสารตัวอย่าง(internal standard) ลงไปในสารตัวอย่างและสารมาตรฐานในปริมาณที่เท่ากันก่อนนำไปฉีด ปริมาณที่ใช้ควรให้พีกที่มีขนาดใกล้เคียงกับสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ในสารตัวอย่าง

สารมาตรฐานภายใน(Internal standard) ต้องมีคุณสมบัติดังนี้

(1) ไม่ใช่สารที่เป็นองค์ประกอบของสารตัวอย่าง

(2) เป็นสารบริสุทธิ์จะไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เป็นองค์ประกอบของสารตัวอย่าง

(3) ให้พีกที่ไม่ซ้อนกับพีกจากสารตัวอย่างและมีเวลาการคงไว้ ไม่มากเกินไป

(4) เป็นสารที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ในสารตัวอย่าง และสามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดเดียวกัน

เทคนิคนี้มีข้อดีที่สารต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของสารตัวอย่างไม่จำเป็นที่จะต้องถูกชะออกมาหมดทุกตัว เพียงแต่สารที่ต้องการจะวิเคราะห์และสารมาตรฐานภายในที่เติมลงไปถูกชะออกมาหมดก็พอแล้ว

2. External standard technique

การวิเคราะห์วิธีนี้ทำโดยฉีดสารละลายสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ กันโดยปริมาตรต้องเท่ากันและแม่นยำ วัดพื้นที่ใต้พีก และนำพื้นที่ใต้พีกที่กล่าวมาพลอตกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานจะได้กราฟมาตรฐานจากนั้นฉีดสารตัวอย่างปริมาตรที่เท่ากับที่ฉีดสารมาตรฐาน วัดพื้นที่ใต้พีกนำมา หาค่าที่กราฟมาตรฐานทราบปริมาณในสารตัวอย่าง

วิธีนี้ไม่ถูกต้องเท่า Internal standard technique และจะให้ผลดีต่อเมื่อมีปัจจัยดังนี้

(1) ปริมาตรสารมาตรฐาน และสารตัวอย่างที่ฉีดในแต่ละครั้งต้องเท่ากันและต้อง แม่นยำ

(2) เวลาการคงไว้ของสารแต่ละตัวมีค่าคงที่

(3) การทำงานของคอลัมน์ และการตอบสนองของดีเทคเตอร์ต้องคงที่ตลอดการวิเคราะห์

(4) การหาค่าพื้นที่ใต้พีกของสารตัวอย่างต้องใช้กราฟมาตรฐานช่วงที่เป็นเส้นตรง

วิธีนี้สะดวกกว่า Internal standard technique ตรงที่ไม่ต้องหาสารมาตรฐานภายในซึ่งการหาชนิดที่เหมาะสมทำได้ยากถ้ามีพีกหลายพีกในสารตัวอย่าง

3. Area percent technique

วิธีนี้ไม่ต้องทำกราฟมาตรฐานใช้ในกรณีที่ต้องการทราบอัตราส่วนของสารแต่ละอย่างในของผสม เช่น ในการวิเคราะห์หาสารปนเปื้อนในสารตัวอย่างในธรรมชาติเทียบกับองค์ประกอบหลักหรือ วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทางปิโตรเคมี ซึ่งมีไฮโดรคาร์บอนด์หลายชนิด วิธีนี้จะใช้ในกรณีดังนี้

(1) สารแต่ละอย่างในของผสมตอบสนองเครื่องตรวจวัดเท่าๆ กัน

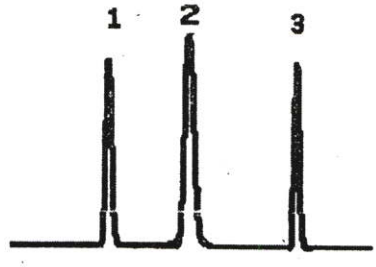
(2) สารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบมีจำนวนจำกัด

การวิเคราะห์วิธีนี้ทำโดยฉีดสารตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC วัดพื้นที่ของแต่ละพีก นำผลรวมของทั้งหมดมาใช้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารตัวอย่าง

4. **Standard addition technique** แบ่งเป็น 2 วิธี

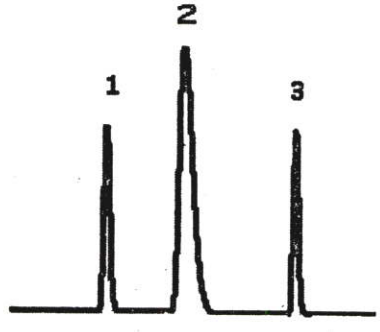
4.1 เป็นเทคนิคระหว่าง internal standard กับ External standard จะใช้ต่อเมื่อดีเทคเตอร์ตอบสนองเป็นเส้นตรง ใช้วิเคราะห์เมื่อสารตัวอย่างมีเพียง 2-3 ตัวอย่าง โดยมีขั้นตอนในการวิเคราะห์ดังนี้

(1) นำสารตัวอย่างมาวิเคราะห์



รูปที่ 2.27 (a) แสดงโครมาโทแกรมของสารตัวอย่าง

(2) นำสารตัวอย่างมาเติมสารมาตรฐานตัวที่ต้องการวิเคราะห์โดยทราบปริมาณที่แน่นอน แล้วนำไปวิเคราะห์



รูปที่ 2.27 (b) แสดงโครมาโทแกรมของสารตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

เช่น ถ้าต้องการหาปริมาณของพีก 2 และ 3 ก็ให้เติมสารมาตรฐานของตัวที่ 2 และ 3 ลงไป

$$X_a = \frac{Height - of - 2a}{Height - of - 1a}$$

$$X_b = \frac{Height - of - 2b}{Height - of - 1b}$$

$$X_b - X_a = X_{added}$$

โดยความสูงจะสัมพันธ์กับความเข้มข้น

$$\frac{X_a}{X_{added}} = \frac{[C_2]_a}{[C_2]_{added}}$$

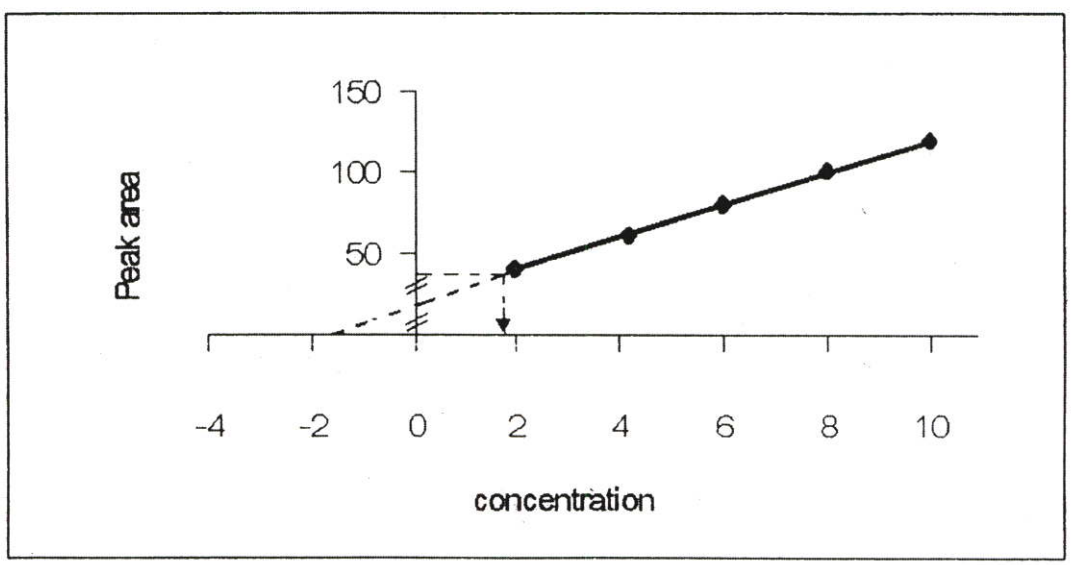
$$[C_2]_a = \left[\frac{X_a}{X_{added}}\right] x [C_2]_{added}$$

ในทำนองเดียวกัน unknown 3 ก็สามารถหาได้เช่นกัน จะเห็นว่าวิธีการนี้ สารตัวที่ 1 ทำหน้าที่คล้ายสารมาตรฐานภายใน

4.2 Standard addition calibration curve ใช้สารมาตรฐานของ unknown เตรียมหลายๆ ความเข้มข้น แล้วทุกๆความเข้มข้นเติม unknown ลงไปปริมาณที่เท่ากัน เมื่อนำไปวิเคราะห์แล้วให้พลอตกราฟระหว่างพื้นที่พีกกับปริมาณสารมาตรฐาน จากนั้นหาปริมาณ unknown ได้ 2 วิธี คือ

4.2.1 ลากเส้นตรงต่อจากเคอร์ฟมาตัดแกน –x ขนาดที่อ่านได้ที่แกน –x คือ ปริมาณของ unknown (คิดค่าเป็นบวก)

4.2.2 จากจุดตัดแกน y ให้นำค่าที่เท่ากันทบขึ้นไปทางด้านบนของแกน y แล้วลากมาตัดกับเส้นเคอร์ฟมาตรฐาน จากนั้นอ่านค่าที่ได้บนแกน x



รูปที่ 2.28 การหาปริมาณ unknown โดยวิธี Standard addition calibration curve

การเตรียมเฟสเคลื่อนที่ ปัญหาที่เกิดเกี่ยวกับเฟสเคลื่อนที่คือ การมีสารปนเปื้อน สารที่เติมในตัวทำละลาย(additive) มีฝุ่นผง หรือการละลายของอากาศ

สิ่งสำคัญในการเตรียมเฟสเคลื่อนที่คือจะต้องพิจารณาถึงคุณภาพของตัวทำละลายและของเกลืออินทรีย์ที่ใช้เตรียมบัฟเฟอร์จะต้องปราศจากสารปนเปื้อน เพราะสารปนเปื้อนเหล่านี้จะไปติดตรงส่วนต้นของคอลัมน์หรือบนพื้นผิวของคอลัมน์ ทำให้เบสไลน์ไม่เรียบ เกิดพีกที่ไม่ต้องการ และ เวลาการคงไว้ของสารเปลี่ยนไป หรือในกรณีที่ต้องการเก็บสารละลายที่ถูกพาออกมาไปทำการวิเคราะห์วิธีอื่น จะต้องแยกสารปนเปื้อนออก มิฉะนั้นจะทำให้ตัวกรองในปั๊มและท่อต่างๆ ตันได้

ปัญหาหลักที่เกิดใน HPLC คือฟองอากาศในเฟสเคลื่อนที่ ฟองอากาศอาจเข้าไปในปั๊ม ในเซลล์ของเครื่องตรวจวัด หรือส่วนอื่นๆ ของเครื่อง ถ้าเข้าไปในปั๊มจะทำให้การไหลของเฟสเคลื่อนที่ไม่สม่ำเสมอ และถ้าเป็นฟองขนาดใหญ่ จะทำให้เฟสเคลื่อนที่หยุดไหล ถ้าฟองอากาศเข้าไปในเซลล์ของเครื่องตรวจวัด ทำให้ เบสไลน์ไม่เรียบ หรืออาจให้ค่าการดูดกลืนรังสีสูง ในกรณีที่ใช้เครื่องตรวจวัดแบบยูวีออกซิเจนที่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ จะรบกวนการตรวจวัดค่าดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่นสั้นเนื่องจากออกซิเจนดูดกลืนรังสีได้ดีในช่วงความยาวคลื่นต่ำกว่า 200 nm การขจัดฟองอากาศทำโดยการไล่ด้วยสูญญากาศ(vacuum), เครื่องอัลตร้าโซนิค, กรองด้วยเมมแบรน หรือผ่านก๊าซเฉื่อย เช่น ฮีเลี่ยม เป็นต้น ในทางปฏิบัติเมื่อบรรจุเฟสเคลื่อนที่ลงในภาชนะบรรจุจะสัมผัสกับอากาศอีก ดังนั้นในกรณีที่ฟองอากาศหรือออกซิเจนในเฟสเคลื่อนที่มีผลต่อการวิเคราะห์มาก จะต้องทำการไล่อากาศทุกชั่วโมงหรือผ่านก๊าซฮีเลียมช้าๆ ไปในเฟสเคลื่อนที่ขณะทำการวิเคราะห์ ข้อควรระวังในการไล่อากาศคือต้องไม่ทำให้ส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่เปลี่ยน

ตัวทำละลายชนิดรีเอเจนท์เกรด(reagent grade) จะมีสารปนเปื้อนในหลายระดับ ซึ่งไม่เหมาะที่จะใช้กับงาน HPLC ในระยะยาว สารปนเปื้อนบางอย่างอาจมาจากการเติมสารแอนติออกซิเดนท์(antioxidants) ดังนั้นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ควรเป็นเกรด HPLC

น้ำกลั่นหรือน้ำ ปราศจากไอออนมักจะมีสารอินทรีย์ปนเปื้อนอยู่ด้วย เมื่อใช้ในระยะยาวจะมีปัญหาเกิดขึ้นกับคอลัมน์ชนิดรีเวิร์สเฟสเพราะเฟสอยู่กับที่เป็นพวกไม่มีขั้วจะจับสารอินทรีย์เหล่านี้ไว้บนพื้นผิว ทำให้ลักษณะของเฟสอยู่กับที่เปลี่ยนไป และบางครั้งทำให้เกิดพีกที่ไม่ต้องการ การทำน้ำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่นหรือโดยการกรองผ่าน Millipore system ซึ่งประกอบด้วย carbon filters, mixed – bed, ion – exchange และกระดาษกรองขนาด 0.2 μm ตามลำดับ วิธีนี้เป็นการแยกของสารปนเปื้อนชนิดอินทรีย์ อนินทรีย์ และอนุภาคออกจากน้ำ

สารปนเปื้อนในตัวทำละลายอื่นๆ นอกจากน้ำมักจะมีผลต่อการแยกและการตรวจวัดหรือทั้งสองอย่าง ตัวทำละลายประเภท คลอริเนเตท ไฮโดรคาร์บอน(chlorinated hydrocarbon) เช่น ไดคลอโรมีเทน(dichloromethane) และ ไตรคลอโรมีเทน(trichloromethane) มักจะเติมเมทานอลหรือ เอทานอลเป็นตัวกลางป้องกันการเกิดออกซิเดชัน ซึ่งอัลกอฮอล์นี้จะเพิ่มความมีขั้ว

ให้กับเฟสเคลื่อนที่ ทำให้ เวลาการคงไว้ของสารลดลงและความเข้มข้นของ อัลกอฮอล์ที่เติมนี้มักจะไม่เท่ากันในแต่ละครั้ง ดังนั้นทำให้ผลวิเคราะห์ไม่คงที่ ซึ่งสามารถแยกตัวกลางออกโดยการกรองผ่านคอลัมน์อะลูมินาหรือสกัดออกด้วยน้ำแล้วทำให้ปราศจากน้ำก่อนนำไปใช้ ส่วนตัวทำละลาย คลอริเนเตท ไฮโดรคาร์บอนที่ไม่เติมตัวกลางจะมีการสลายตัว อย่างช้าๆ เกิดกรดไฮโดร-คลอริก ซึ่งจะทำลายท่อสแตนเลสต่างๆของเครื่อง และอัตราการสลายตัวจะเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่รวมกับตัวทำละลายอื่น

ในกรณีที่ใช้ ยูวี ดีเทคเตอร์ จะต้องพิจารณาค่าการดูดกลืนรังสีในช่วงยูวีของเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งค่าการดูดกลืนรังสีจะเพิ่มขึ้น เมื่อความยาวคลื่นลดลง โดยพิจารณาจากค่า UV cut-off ของตัวทำละลาย ที่เป็นตัวบอกให้ทราบว่า ที่ความยาวคลื่นต่ำกว่านี้ ตัวทำละลายจะให้ค่าการดูดกลืนรังสีเท่ากับ 1 หรือสูงกว่า 1 AU เมื่อใช้เซลล์ขนาด 1 cm ตัวทำละลายพวกอะลิฟาติก ไฮโดรคาร์บอน จะมี UV cut-off ที่ความยาวคลื่นประมาณ 210 nm ตัวทำละลายชนิดมีขั้วที่ดีที่สุดสำหรับใช้ในช่วงความยาวคลื่นต่ำ ได้แก่ เมทานอล และ อะซิโตรไนไทล์ ซึ่งมี UV cut off ที่ 205 และ 190 nm ตามลำดับ นอกจากนี้ยังต้องพิจารณาคุณสมบัติอย่างอื่นของตัวทำละลาย เช่น ความหนืด, ค่าดัชนีการหักเหของแสง, ค่าความดันไอ, จุดวาบไฟ กลิ่นและความเป็นพิษ

การผสมตัวทำละลายเพื่อใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ทำโดยการแยกกันตวงปริมาตรของตัวทำละลายแต่ละชนิด แล้วมาผสมรวมกัน เนื่องจากเมื่อผสมกันแล้วปริมาตรจะเปลี่ยนไป เช่น ถ้าผสมเมทานอล 50 mL กับน้ำ 50 mL ปริมาตรรวมจะได้เพียง 96 mL ซึ่งเป็นส่วนผสมในอัตรา 1 : 1 แต่ถ้าเตรียมเฟสเคลื่อนที่ โดยการตวงปริมาตรของตัวทำละลายเมทานอลลงในขวดตวง แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ เฟสเคลื่อนที่ที่ได้จะไม่ใช่ส่วนผสมในอัตรา 1 : 1 การไล่อากาศของเฟสเคลื่อนที่ที่มีตัวทำละลายที่ระเหยได้ อาจทำให้ส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่เปลี่ยนไป ดังนั้นเมื่อใช้ ดีเทค-เตอร์ชนิดวัดดัชนีการหักเหของแสง จะต้องทำการตรวจสอบและควบคุมส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่ให้คงที่

การวัด pH ของเฟสเคลื่อนที่ ให้วัดค่า pH ที่แท้จริงของสารละลายที่เป็นน้ำ การเตรียมเฟสเคลื่อนที่มักจะละลายพวกเกลือของบัฟเฟอร์ในน้ำตามความเข้มข้นที่ต้องการ ปรับ pH แล้วผสมให้เข้ากันกับตัวทำละลายอินทรีย์ในสัดส่วนปริมาตร : ปริมาตร

ถ้าวัด pH ในสารละลายผสมของน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์ เรียกว่า “appearance pH” ซึ่งค่านี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มขึ้น

การรักษาคอลัมน์ที่ใช้ใน HPLC

อายุการใช้งานของคอลัมน์จะยาวนานขึ้นถ้ารู้จักวิธีใช้และรักษา คือ

1. ไม่ควรใช้ตัวทำละลายที่กัดกร่อน เลือก pH ของเฟสเคลื่อนที่ให้เหมาะสม เกลือและตัวทำละลายที่ใช้จะต้องมีความบริสุทธิ์สูง
2. ไม่ควรเปลี่ยนอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่หรือความดันอย่างรวดเร็วโดยต้องค่อยๆ เพิ่มจากน้อยไปหามาก
3. ไม่ควรปล่อยให้เฟสเคลื่อนที่ที่มีพวกเกลืออนินทรีย์เหลือค้างอยู่ในคอลัมน์ ต้องล้างออกด้วยน้ำเพื่อป้องกันการตกตะกอน การเกิดเชื้อรา หรือแบคทีเรียในคอลัมน์
4. ไม่ควรทำคอลัมน์ตก หรือกระเทือนอย่างแรง หรือเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์อย่างรวดเร็ว
5. ควรให้เฟสเคลื่อนที่ไหลไปตามทิศทางของการบรรจุคือตามลูกศร และไม่ควรล้างคอลัมน์ในทิศทางกลับการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เพราะจะทำให้คอลัมน์เสียได้
6. ในกรณีที่เก็บคอลัมน์โดยทำให้ชุ่มด้วยเมทานอลเมื่อจะใช้บัฟเฟอร์เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะต้องล้างคอลัมน์ด้วยน้ำก่อน จึงจะใช้บัฟเฟอร์
7. สารละลายตัวอย่างที่จะฉีดเข้าคอลัมน์จะต้องกรองให้ใสก่อนฉีด

การเก็บรักษาคอลัมน์

ในกรณีที่จะเก็บคอลัมน์ไว้นานๆ จะต้องล้างคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม และต้องให้ปลายคอลัมน์ทั้งสองด้านเปียกชุ่มด้วยตัวทำละลาย เพื่อป้องกันคอลัมน์แห้ง ไม่ควรเก็บคอลัมน์ที่ทำให้ชุ่มด้วยน้ำ เพราะจะทำให้เกิดเชื้อรา ควรเก็บใน 50 % ตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อป้องกันเชื้อรา ไม่ควรเก็บคอลัมน์โดยทำให้เปียกชุ่มด้วยบัฟเฟอร์ เพราะจะตกตะกอนทำให้เกิดการอุดตันในคอลัมน์ ส่วนมากบริษัทที่จำหน่ายคอลัมน์มักจะให้ข้อแนะนำในการเก็บรักษาคอลัมน์ซึ่งแนวทางการเก็บคอลัมน์ในตัวทำละลายที่เหมาะสมดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการเก็บคอลัมน์

ชนิดของคอลัมน์	ตัวทำละลายที่ใช้เก็บ
Reversed Phase	Acetonitrile, Methanol or Methanol / Water mixtures
Normal Phase	Hexane
Ion Exchange	50% Methanol / Water
Non aqueous SEC	Normal Eluent
Aqueous SEC	0.01 M Sodium Azide

การเตรียมและทำความสะอาดสารตัวอย่าง

สารตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วย HPLC มาจากหลายแหล่ง และสารตัวอย่างส่วนมากไม่ใช่สารบริสุทธิ์มันจะมีสารปนเปื้อนต่างๆ กัน เช่น สารตัวอย่างยามีพวกสารช่วยที่มีการละลายแตกต่างกัน สารตัวอย่างจากของเหลวในร่างกาย มีพวกโปรตีน เกลือ และพวกสารอินทรีย์ ที่มีสภาพขั้วต่างๆ กัน จึงจำเป็นต้องแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากสิ่งปนเปื้อนต่างๆ

การเตรียมสารตัวอย่าง เพื่อให้สารที่ต้องการวิเคราะห์ละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม ไม่มีสารรบกวนและมีความเข้มข้นพอเหมาะที่จะตรวจวัดได้ เหตุผลที่ต้องเตรียมสารตัวอย่าง เนื่องจาก

1. สารตัวอย่างละลายในตัวทำละลายที่มีความแรงกว่าเฟสเคลื่อนที่ ทำให้การแยกไม่ดี หรืออาจทำลายคอลัมน์
2. การวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยๆ จำเป็นต้องเตรียมให้มีความเข้มข้นพอเหมาะที่จะตรวจวัดได้
3. ตัวอย่างที่ซับซ้อน เช่น สารตัวอย่างจากของเหลวในร่างกาย มักจะมีโปรตีนและสารอินทรีย์ต้องแยกสารเหล่านี้ออกก่อน เพื่อป้องกันพีกของสารเหล่านี้ทับกับพีกของสารที่ต้องการวิเคราะห์
4. ในสารตัวอย่าง อาจมีสารที่ทำลายคอลัมน์ต้องแยกออกก่อน เพื่อให้อายุการใช้งานของคอลัมน์นานขึ้น

วิธีการเตรียมสารละลายตัวอย่าง ควรละลายตัวอย่างในเฟสเคลื่อนที่ ถ้าใช้ตัวทำละลายอื่นที่ไม่เฟสเคลื่อนที่ จะต้องทดสอบว่าเมื่อฉีดสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์แล้ว จะไม่ตกตะกอนในเฟสเคลื่อนที่ ทำการทดสอบโดยการฉีดสารละลายตัวอย่างในปริมาตรเท่าที่จะฉีดเข้าคอลัมน์ลงในเฟสเคลื่อนที่ที่บรรจุหลอดแก้ว สังเกตดูว่ามีตะกอนเกิดหรือไม่ ถ้ามีการตกตะกอนไม่สามารถฉีดสารละลายตัวอย่างนั้นเข้าคอลัมน์เพราะจะทำให้เกิดการอุดตันตรงส่วนต้นของคอลัมน์ต้องเปลี่ยนตัวทำละลาย ถ้าตัวทำละลายที่ใช้ละลายตัวอย่างมีความแรงมากกว่าเฟสเคลื่อนที่ ควรฉีดปริมาตรน้อยๆ มิฉะนั้นจะทำให้การแยกไม่ดี อาจเกิดพีกที่มีไหล่ และจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอื่นละลายตัวอย่าง ควรเลือกตัวทำละลายที่มีความแรงอ่อนกว่าเฟสเคลื่อนที่เหมาะสำหรับสารตัวอย่างที่เจือจางและสามารถฉีดปริมาตรมากได้[15],[16]

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. Trevor M. Letcher และคณะ [17] ได้หาค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตี้ที่ความเจือจางอนันต์ (Activity coefficients at infinite dilution, γ_{13}^{∞} ; เมื่อ 1 คือตัวถูกละลาย และ 3 คือตัวทำละลาย) ของตัวถูกละลายที่มีขั้วและไม่มีขั้วใน 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต โดยใช้เทคนิคแก๊สลิควิดโครมาโทกราฟี ได้มีการตรวจสอบอันตรกิริยาที่บริเวณรอยต่อของของเหลวกับแก๊สระหว่างตัวถูกละลายและตัวทำละลาย โดยการปรับเปลี่ยนปริมาณของเหลวที่เป็นตัวทำละลายบนคอลัมน์ ได้มีการหาค่าการคงไว้จากตัวถูกละลายและแก๊สตัวพา เพื่อใช้ในการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตี้ที่ความเจือจางอนันต์ ในงานวิจัยนี้ได้มีการหาค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตี้ที่ความเจือจางอนันต์ของอัลเคน(Alkane), อัลคีน(Alk-1-enes), อัลไคน์(Alk-1-ynes) ไซโคลอัลเคน(Cycloalkanes), อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน(Aromatic hydrocarbon) คาร์บอนเตตระคลอไรด์(Carbon tetrachloride) และเมทานอล(Methanol) ในไอออนิก ลิควิด ที่อุณหภูมิ 298.15, 303.15 และ 308.15 K ซึ่งงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้ทำมาก่อนหน้านี้ แต่ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ใช้ไอออนิก ลิควิด 4 ชนิด ได้แก่ 1-เมทิล-3-ออกทิลอิมมิดาโซเลียม คลอไรด์(1-methyl-3-octylimidazolium chloride), 1-เฮกซิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เตตระฟูออโรบอเรท(1-hexyl-3-methylimidazolium tetrafluorborate), 1-เฮกซิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม เฮกซะฟูออโรฟอสเฟต(1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate) และ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียมบิสไตรฟูออโรเมทิลซัลโฟนิลอิมไมด์[1-ethyl-3-methylimidazolium bis (trifluoromethylsulfonyl)imide] ผลที่ได้ถูกใช้ในการทำนายศักยภาพของตัวทำละลายสำหรับการแยกเฮกเซน (Hexane)และเบนซีน(Benzene)จากค่าจำเพาะที่คำนวณได้ ค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตี้ที่ความเจือจางอนันต์ที่ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบกับค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตี้ที่ความเจือจางอนันต์ที่ได้จากระบบอื่น เพื่อให้เข้าใจถึงอิทธิพลของไอออนบวกและไอออนลบที่มีต่ออันตรกิริยาของตัวทำละลายและตัวถูกละลาย ค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตี้ที่ความเจือจางอนันต์ที่ได้จากอุณหภูมิต่างๆถูกใช้ในการคำนวณค่าmolar excess enthalpies ที่ความเจือจางอนันต์ ($\Delta H_1^{E\infty}$)

2. Fabrice Mutelet และคณะ [18] ได้หาค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตี้ที่ความเจือจางอนันต์ของสารประกอบอินทรีย์ 29 ชนิด ในไอออนิก ลิควิด ที่เป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง 2 ชนิด โดยใช้เทคนิคอินเวิร์สแก๊สโครมาโทกราฟี(Inverse gas chromatography) โดยวัดที่อุณหภูมิ 323.15 และ 343.15 K จากผลการทดลองพบว่าตัวถูกละลายส่วนใหญ่ถูกคงไว้โดยการแบ่งส่วน(Partition)และมีส่วนน้อยที่เกิดการดูดซับ(Adsorption)บน 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต และนอร์มอล อัลเคน ถูกคงไว้โดยการดูดซับบน 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียมโทซิลเลท

3. Zsombor Miskolczy และคณะ [19] ได้ศึกษาคุณสมบัติของไอออนิก ลิควิดที่ประกอบด้วย นอร์มอล ออกทิล ในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายโดยการวัดค่าการนำไฟฟ้าและค่าความขุ่น จากการทดลองพบว่า 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต ประพฤติตัวเป็นสารลดแรงตึงผิว(Surfactant) ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.031 M ส่วน 1-เมทิล-3-ออกทิลอิม-

มิดาโซเลียม คลอไรด์ ให้สารละลายที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกันในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ แต่จะสามารถละลายน้ำได้มากขึ้นเมื่อเติมโซเดียม โดเดซิล ซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate) มากกว่า 2 เท่า เนื่องจากมีการสร้างไมเซลล์แบบผสมขึ้น ไอออนิก ลิควิดที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 10 mM สามารถลดความมีขั้วของส่วนหางของไมเซลล์ของโซเดียม โดเดซิล ซัลเฟตได้

4. A. Vicent Orchilles และคณะ [20] ได้วัดค่าความหนาแน่นของสารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำและ 1-โพรพานอล ที่อุณหภูมิระหว่าง 278.15 จนถึง 328.15 K จากค่าความหนาแน่นที่หาได้ถูกใช้ในการคำนวณหาค่า molar volumes (V_ϕ) และค่า molar volume ที่ความเจือจางอนันต์ (V_ϕ^0) จากการทดลองพบว่าค่า V_ϕ^0 ของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต ในน้ำมีค่าสูงกว่าใน 1-โพรพานอล และจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น แต่ในทางกลับกันค่า V_ϕ^0 ของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต ใน 1-โพรพานอล ลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น

5. Enrique G. Yanes และคณะ [21] ได้นำ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ไนเตรท มาเป็นสารละลายอิเล็กโทรไลท์ในการแยกสารประกอบโพลีฟีนอลจากสารสกัดจากเมล็ดองุ่นโดยใช้เทคนิคแคปปิลลารี อีเล็คโทรโฟรีซิส ซึ่งกลไกการแยกนั้นเกี่ยวกับอิมมิดาโซเลียมแคทไอออนและโพลีฟีนอล

6. A.Garcia และคณะ [22] ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล, ฟีนิล-เอฟพริน และคลอเฟนิรามีน ในยาแก้หวัดโดยใช้เทคนิคโครมาโกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ใช้คอลัมน์ชนิดโพลีเอทิลลีน ไกลคอล [Poly(ethylene glycol)] ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.46 cm ยาว 15 cm ขนาดอนุภาค 5 μm ใช้ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 20 mM pH 7.0 และอะซิโตไนไตล์ ในอัตราส่วน 90 ต่อ 10 เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 $mL.min^{-1}$ และใช้ระบบการชะล้างแบบไอโซเครติกใช้ยูวี-ดีเทคเตอร์ โดยที่ฟีนิลเอฟพรินและคลอเฟนิรามีน ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 215 nm ส่วนพาราเซตามอลตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 nm

7. A.Marin และคณะ [23] ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล, ฟีนิล-เอฟพริน และคลอเฟนิรามีน ในยาแก้หวัดที่เป็นแคปซูล โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงและเทคนิคแคปปิลลารี อีเล็คโทรโฟรีซิส และเปรียบเทียบผลที่ได้จาก 2 เทคนิค ในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงนั้นจะใช้คอลัมน์ชนิดโพลีเอทิลลีนไกลคอล ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.46 cm ยาว 15 cm ขนาดอนุภาค 5 μm ใช้ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 20 mM pH 7.0 และอะซิโตไนไตล์ ในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 $mL.min^{-1}$ และใช้ระบบการชะล้างแบบไอโซเครติก ใช้ยูวี-ดีเทคเตอร์ โดยที่ฟีนิล-เอฟพรินและคลอเฟนิรามีน ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 nm ส่วนพาราเซตามอลตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 305 nm ส่วนเทคนิคแคปปิลลารี อีเล็คโทรโฟรีซิสใช้ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 40 mM pH 6.20 กับโซเดียม โดเดซิล ซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0.5 mM ที่ 30 kV ในหลอดซิลิกาแคปปิลลารีที่ไม่มีการเคลือบ

บทที่ 3
การดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 สารเคมี

1.โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) > 99.0%(w/w),A.R.grade ของ บริษัท Analytical Science (LAB-SCAN)

2.กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl) 37% (w/v),A.R. grade ของ บริษัท Analytical Science(LAB-SCAN)

3.เมทานอล (Methanol,CH_3OH) HPLC grade ของบริษัท Fisher Scientific

4.อะซิโตรไนไทล์ (Acetronitrile, CH_3CN) HPLC grade ของบริษัท Fisher Scientific

5.กรดฟอสฟอริค (Phosphoric acid, H_3PO_4) A.R. grade ของบริษัท Analytical Science(LAB-SCAN)

6.พาราเซตามอล(Paracetamol,$C_8H_9NO_2$) 99.0%ของบริษัท Sigma

7.ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ (Phenylephrine HCl, $C_9H_{13}NO_2.HCl$) 99.22% ของบริษัท Sigma

8.คลอเฟนิรามีน มาลีเอท (Chlorpheniramine maleate, $C_{16}H_{19}ClN_2.C_4H_4O_4$) ของ บริษัท Sigma

9.กรดมาลีอิก (Maleic acid,$C_4H_4O_4$) ของบริษัท Sigma

10.1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต (1-butyl-3-methylimidazolium octyl sulfate) ของบริษัท Fluka

11.1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต (1-butyl-3-methylimidazolium 2-(2-methoxy ethoxy) ethyl sulfate)ของบริษัท Fluka

12.1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ไนเตรท (1-ethyl-3-methylimidazolium nitrate)$\geq$99.0%ของบริษัท Fluka

13. น้ำปราศจากไอออน(Deionized water)

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1.เครื่องโครมาโทกราฟแบบของเหลวสมรรถนะสูง(High Performance Liquid Chromatograph; HPLC) บริษัท Water; 515 HPLC Pump; waters 486 Tunable Absorbance Detector

2.เครื่อง pH meter , บริษัท Danver Instrument Model 215

3.เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP2103 บริษัท Scientific Promotion

4.เครื่อง Fisher Stirring Hotplate บริษัท Fisher Scientific

5.เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis Spectrophotometer) บริษัท Jenway รุ่น 6405

6.ครกบด

3.2 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาหาชนิดของสารละลายไอออนิกและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวชะในการแยกสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาหาประสิทธิภาพการแยกสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท

ขั้นตอนที่ 3 ทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ขั้นตอนที่ 4 วิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาเม็ดลดไข้ตามท้องตลาด โดยใช้สารละลายไอออนิกเป็นตัวชะ และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้กับปริมาณยาบนฉลาก

ขั้นตอนที่ 5 สรุปผลการทดลองและรายงานผล

3.3 วิธีการวิจัย

3.3.1 การเตรียมสารละลาย

3.3.1.1 สารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลเข้มข้น 1,000 ppm จำนวน 25.0 mL

ชั่งสารมาตรฐานพาราเซตามอลมาจำนวน 0.02500 g เติมเมทานอลจำนวน 1 หยด แล้วปรับปริมาตรจนครบ 25.0 mL ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

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

ชั่งสารมาตรฐานฟีนิลเอฟฟริน ไฮโดรคลอไรด์ มาจำนวน 0.02500 g เติมเมทานอล จำนวน 1 หยด แล้วปรับปริมาตรจนครบ 25.0 mL ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.1.3 สารละลายมาตรฐานคลอเฟนิรามีน มาลีเอท เข้มข้น 1,000 ppm จำนวน 25.0 mL

ชั่งสารมาตรฐานคลอเฟนิรามีน มาลีเอท มาจำนวน 0.02500 g เติมเมทานอลจำนวน 1 หยด แล้วปรับปริมาตรจนครบ 25.0 mL ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.1.4 สารละลายมาตรฐานกรดมาลีอิก เข้มข้น 1,000 ppm จำนวน 25.0 mL

ชั่งสารมาตรฐานกรดมาลีอิก มาจำนวน 0.02500 g เติมเมทานอลจำนวน 1 หยด แล้วปรับปริมาตรจนครบ 25.0 mL ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.1.5 สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 150 ppm จำนวน 10.0 mL

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

3.3.1.6 เตรียมสารละลาย1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต ที่ความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 2, 4, 6 mM โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย และปรับ pH เป็น 3 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.01 M

3.3.1.7 เตรียมสารละลาย1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24 mM โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย และปรับ pH เป็น 3 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.01 M

3.3.1.8 เตรียมสารละลาย1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ไนเตรท ที่ความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 2, 4 mM โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย และปรับ pH เป็น 3 โดยใช้ กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.01 M

3.3.2 ศึกษาหาชนิดของสารละลายไอออนิกและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวชะในการแยกสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

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

3.3.3 ศึกษาหาประสิทธิภาพการแยกสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท

3.3.3.1 เมื่อได้ชนิดและสภาวะที่เหมาะสมของสารละลายไอออนิกซึ่งใช้เป็นตัวชะแล้ว ให้ทำการหาประสิทธิภาพการแยกสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ซึ่งทำการหาค่าต่างๆดังต่อไปนี้

1. แฟกเตอร์ความจุ(Capacity factor , k')

2. จำนวนเพลทตามทฤษฎี(Number of theoretical plates of the column,N)

3. เทลลิ่ง แฟกเตอร์ (Tailing factor,T)

4. ความจำเพาะเจาะจง(Separation factor,α)

5. ความสามารถในการแยก(Resolution,R_s)

6. R.S.D of peak area(n=6)

3.3.4 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

3.3.4.1 ความจำเพาะ(Selectivity)

นำสารละลายตัวอย่างและสารประกอบอื่นที่ไม่มีตัวยา(Placebo)ที่เตรียมที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน มาทำการวิเคราะห์ โดยใช้สภาวะในการทดลองเดียวกัน เปรียบเทียบโครมาโทแกรมที่ได้จากสารละลายตัวอย่างและPlacebo

3.3.4.2 ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)

1. System linearity

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

ตารางที่ 3.1 แสดงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้น

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

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

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

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

2. Method linearity

นำตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน(Spiked sample) 3 ระดับความเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้น

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

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

3.3.4.3 สภาพไว(Sensitivity)

1. ขีดจำกัดของการตรวจหา(Limit of Detection, LOD)

สามารถหาได้โดยใช้ข้อมูลจากการทำ System linearity โดยใช้สูตร

$$y = y_B + 3s_B$$

เมื่อ y_B = จุดตัดแกน y (a) ที่คำนวณได้จากสมการเส้นถดถอย

S_B = ค่า standard error of estimate, $s_{y/x}$

(หมายเหตุ โดยอธิบายวิธีการคำนวณอย่างละเอียดไว้ในภาคผนวก ง)

2. Limit of Quantitation, LOQ

สามารถหาได้โดยใช้ข้อมูลจากการทำ System linearity โดยใช้สูตร

$$y = y_B + 10s_B$$

เมื่อ y_B = จุดตัดแกน y (a) ที่คำนวณได้จากสมการเส้นถดถอย

S_B = ค่า standard error of estimate, $s_{y/x}$

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

3.3.4.4 ความถูกต้อง(Accuracy)

สามารถหาได้โดยใช้ข้อมูลจากการทำ Method linearity โดยใช้สูตร

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

C_1 = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน

C_2 = ความเข้มข้นของตัวอย่าง(Unfortified sample)

C_3 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติม

3.3.4.5 ความเที่ยง(Precision)

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

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

หมายเหตุ $\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบ

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบ

3.3.5 วิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาเม็ดลดไข้ตามท้องตลาด

3.3.5.1 นำตัวอย่างยา 20 เม็ด มาบดให้ละเอียดและเป็นเนื้อเดียวกันด้วยครกบดยา ชั่งตัวอย่างยามาเท่ากับน้ำหนักยา 1 เม็ด บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนไว้ ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50.0 mL เติมเมทานอล 37.5 mL นำสารละลายตัวอย่างไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่องอัลทราโซนิค แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนให้ถึงขีดบอกปริมาตร เขย่าให้สารละลายผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จะมีตะกอนที่ก้นขวด กรองสารละลายด้วยเครื่องกรองสารตัวอย่าง โดยผ่านเมมแบรนที่มีขนาดของรู 0.45 μm เก็บสิ่งกรองไว้ในขวดแก้วขนาดเล็กปิดฝาให้สนิท

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

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

3.3.6 สรุปผลการทดลองและรายงานผล

บทที่ 4

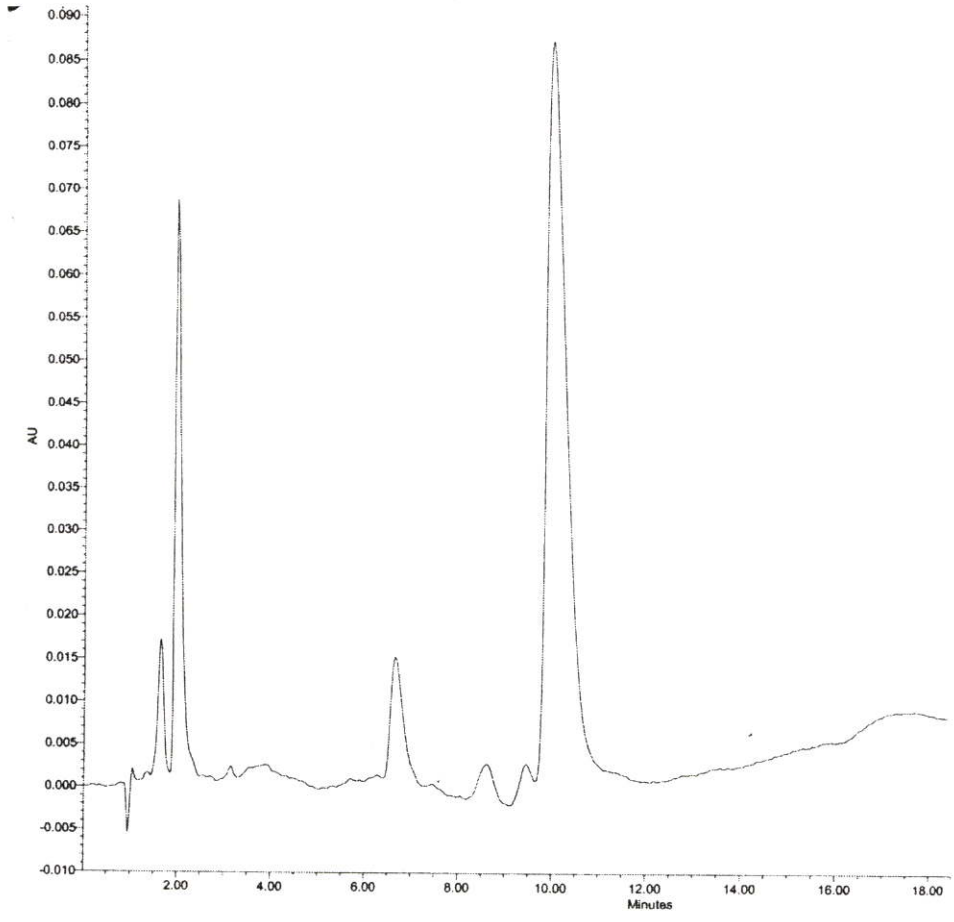
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ศึกษาหาชนิดของสารละลายไอออนิกและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวชะในเทคนิค HPLC เพื่อแยกสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย พาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ได้พร้อมกัน

4.1.1 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารละลายไอออนิก

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

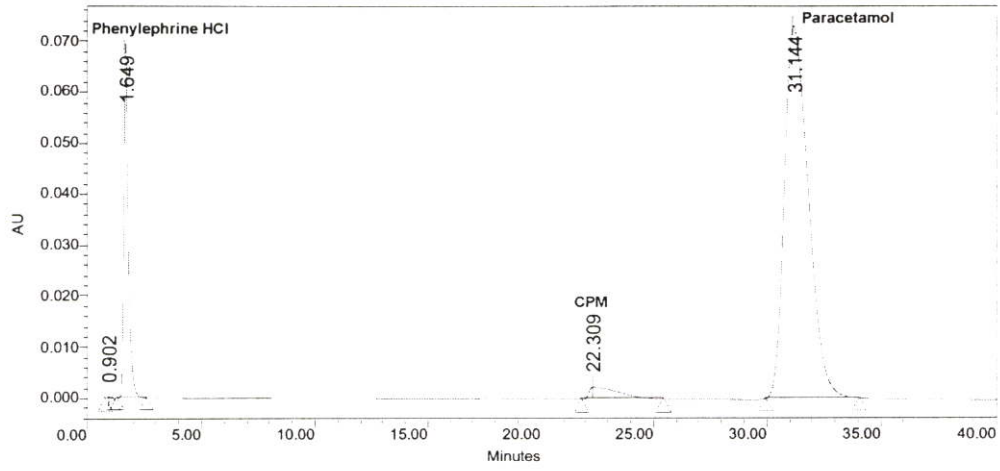
4.1.1.1 เมื่อนำสารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต ความเข้มข้น 2 mM pH 3.0 มาใช้เป็นตัวชะในเทคนิค HPLC อัตราการไหลเท่ากับ 1 $mLmin^{-1}$ โดยใช้คอลัมน์ C_{18} ขนาด 150 x 3.9 mm. i.d.; 5 μm ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 252 nm ปริมาตรสารละลายมาตรฐานที่ฉีด เท่ากับ 40 μL โดยฉีดสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ความเข้มข้น 150 ppm ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 4.1



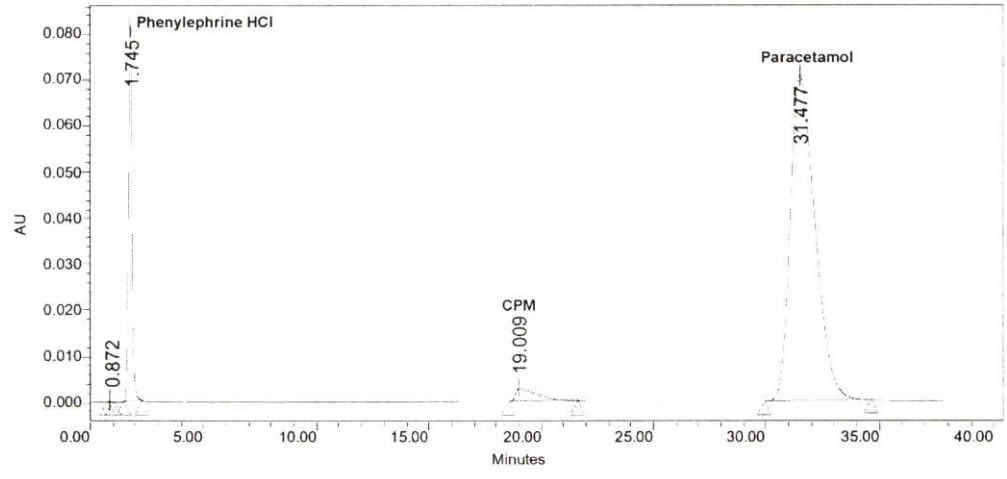
รูปที่ 4.1 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล เมื่อใช้ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต ความเข้มข้น 2 mM pH 3.0 เป็นตัวชะ

จากโครมาโทแกรมที่แสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าการฉีดสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลเพียงตัวเดียวแต่ให้พีกหลายพีก ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่าพีกที่ตำแหน่งใดเป็นพีกของพาราเซตามอล และนอกจากนี้ยังมีปัญหาเรื่องฟอง ทำให้ไม่สามารถนำสารละลายไอออนิกชนิดนี้มาเป็นตัวชะได้

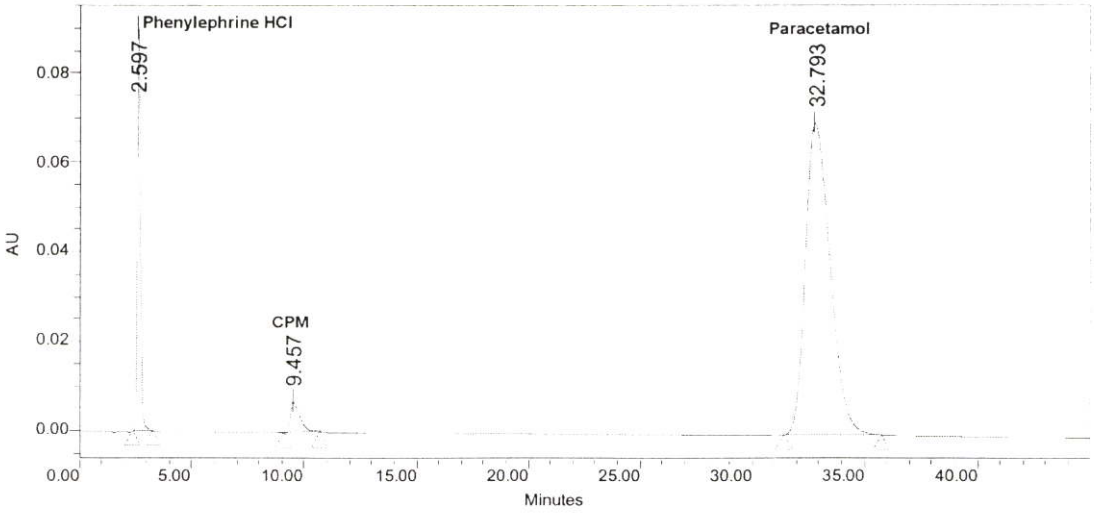
4.1.1.2 เมื่อนำสารละลาย 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ไนเตรท ความเข้มข้น 2 และ 4 mM pH 3.0 มาใช้เป็นตัวชะในเทคนิค HPLC อัตราการไหลเท่ากับ 1 $mLmin^{-1}$ โดยใช้คอลัมน์ C_{18} 150 x 3.9 mm. i.d.; 5 μm ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 252 nm ปริมาตรสารละลายมาตรฐานที่ฉีด เท่ากับ 40 μL โดยฉีดสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย พาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ความเข้มข้น 150 ppm แสดงผลดังรูปที่ 4.2 และสรุปค่าพารามิเตอร์ทางการแยกดังตารางที่ 4.1



(ก) น้ำปราศจากไอออน ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ



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



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

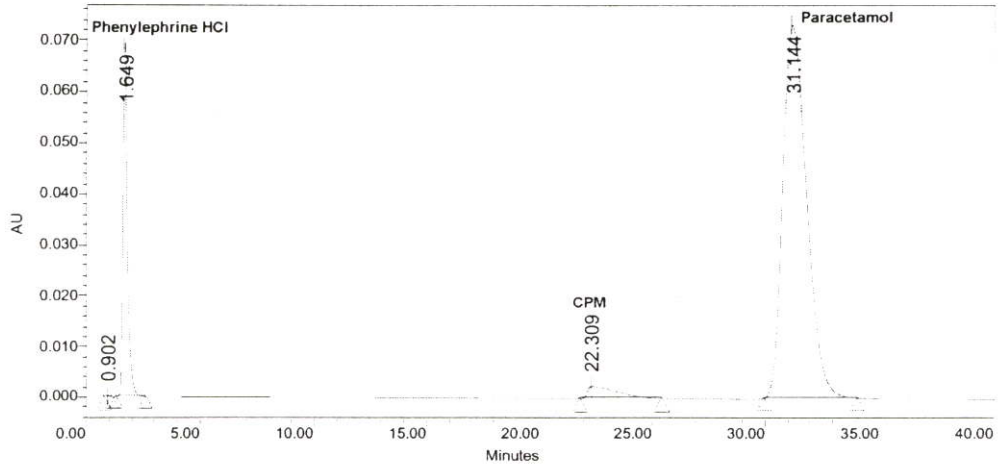
รูปที่ 4.2 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วยคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ พาราเซตามอล ที่ความเข้มข้น 150 ppm เมื่อใช้ตัวชะที่มีความเข้มข้นของ1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ไนเตรท แตกต่างกัน ที่ pH 3.0 (ก) 0 (ข) 2 (ค) 4 mM โดยใช้สภาวะ : คอลัมน์ C_{18}(150 x 3.9 mm. i.d.; 5 μm); อัตราการไหล 1.0 $mLmin^{-1}$; ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 252 nm; ปริมาตรที่ฉีด 40 μL

ตารางที่ 4.1 แสดงผลของความเข้มข้นของสารละลาย 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ไนเทรต pH 3.0 กับค่าแฟกเตอร์ความจุของ ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท และพาราเซตามอล ที่ความเข้มข้น 150 ppm

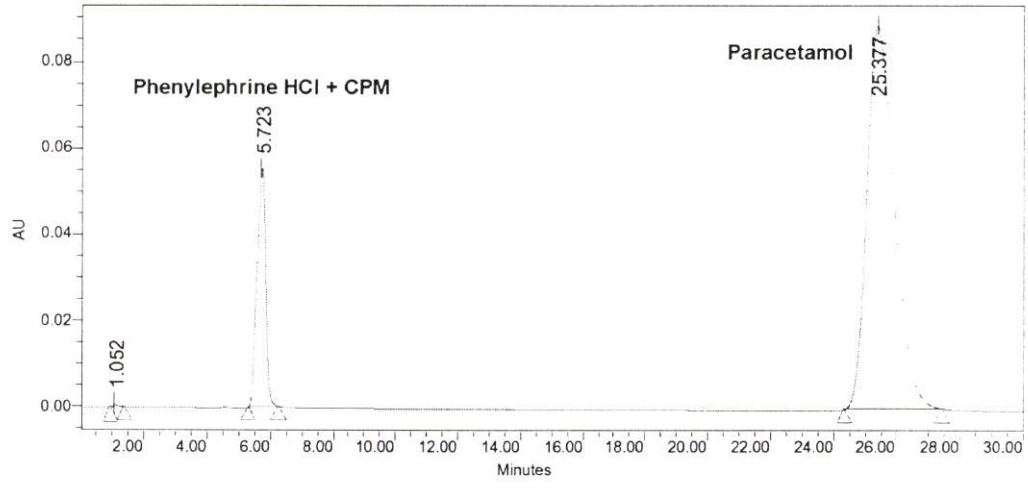
ความเข้มข้นของไอออนิกลิควิด (mM)	ค่าแฟกเตอร์ความจุ		
	PE	CPM	PARA
0	0.83	24.51	33.85
2	1.00	19.74	35.25
4	1.55	8.46	31.20

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

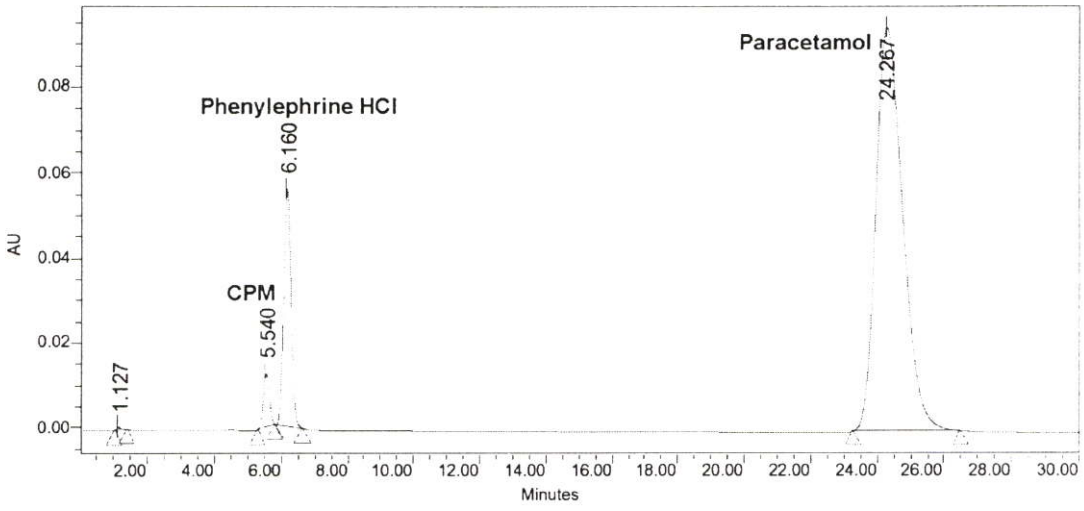
4.1.1.3 เมื่อนำสารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 และ 24 mM pH 3.0 มาใช้เป็นตัวชะในเทคนิค HPLC โดยใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1 $mLmin^{-1}$ คอลัมน์ C_{18} 150 x 3.9 mm. i.d.; 5 μm ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 252 nm ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานที่ฉีด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



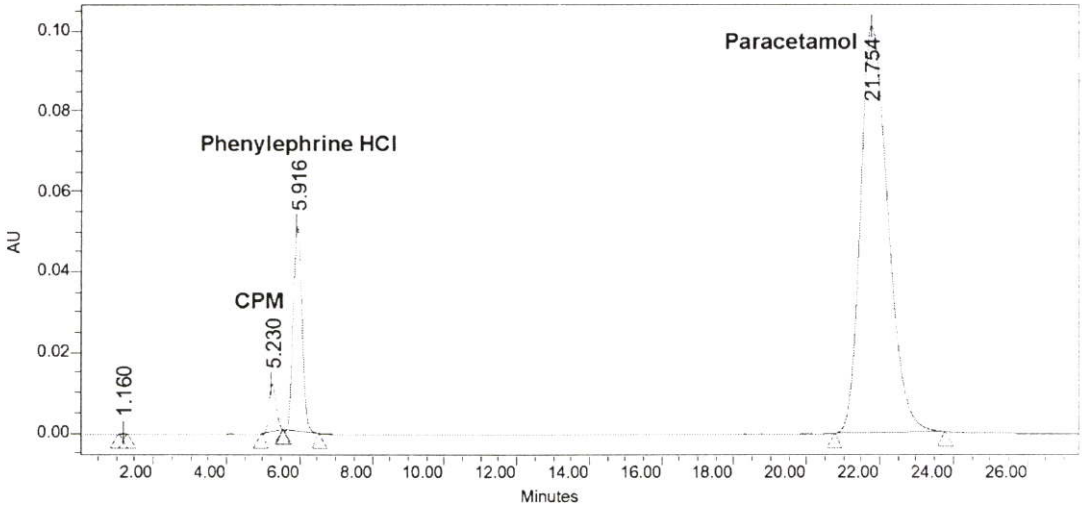
(ก) น้ำปราศจากไอออน ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ



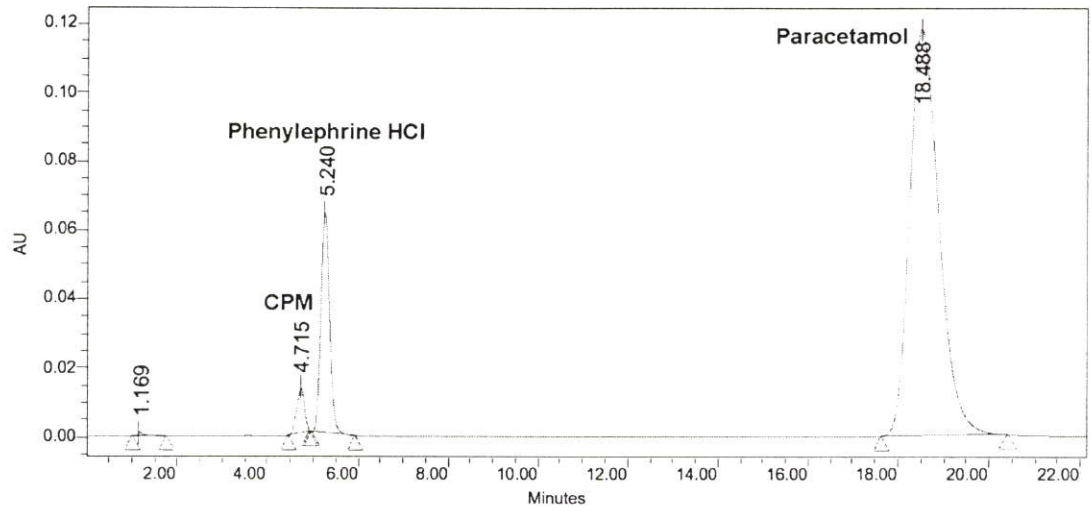
(ข) 2 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ



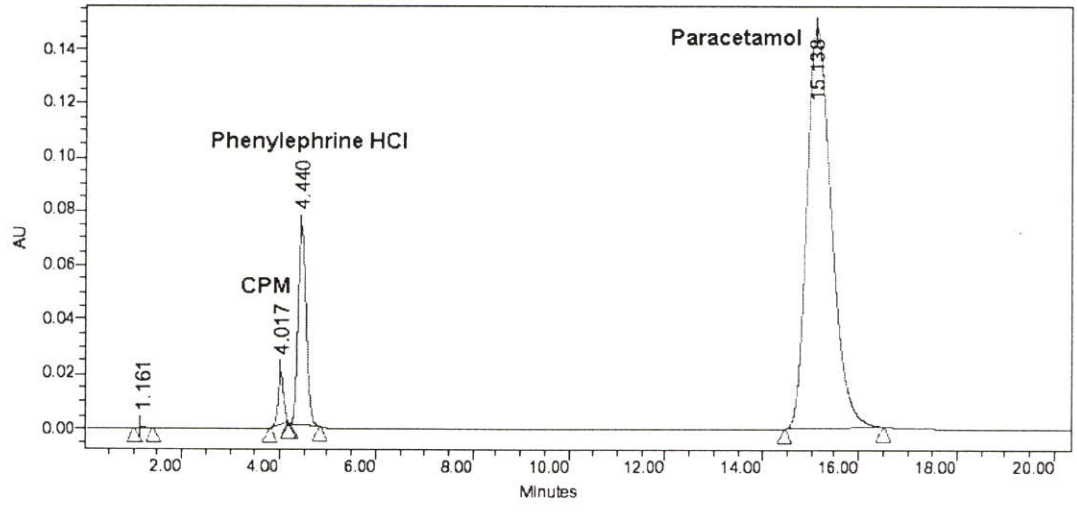
(ค) 4 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ



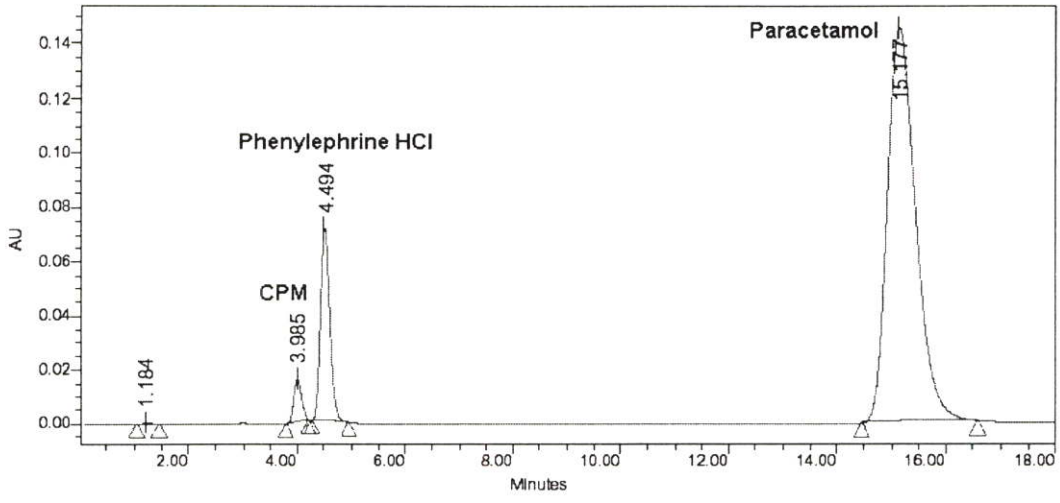
(ง) 6 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ



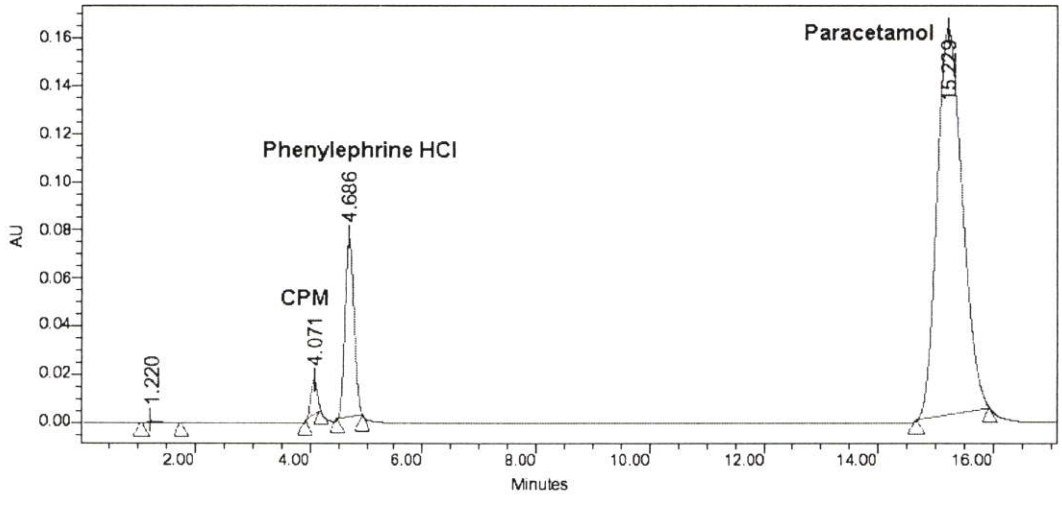
(จ) 8 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ



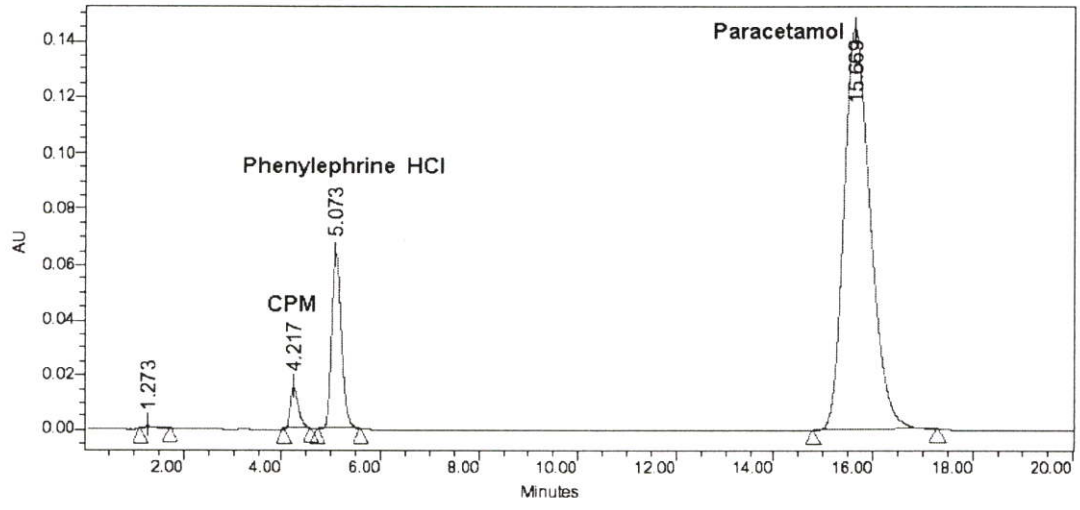
(ฉ) 10 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ



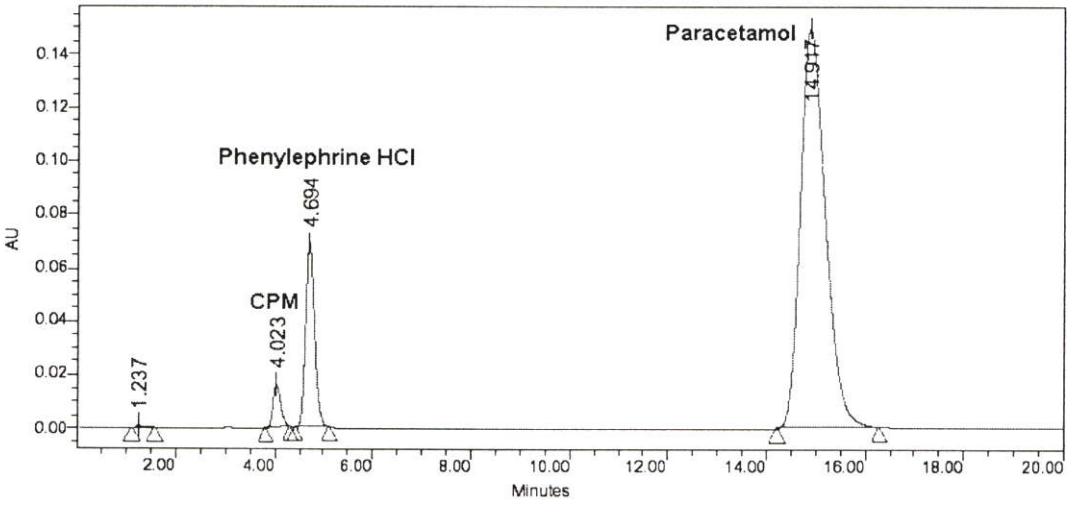
(ช) 12 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ



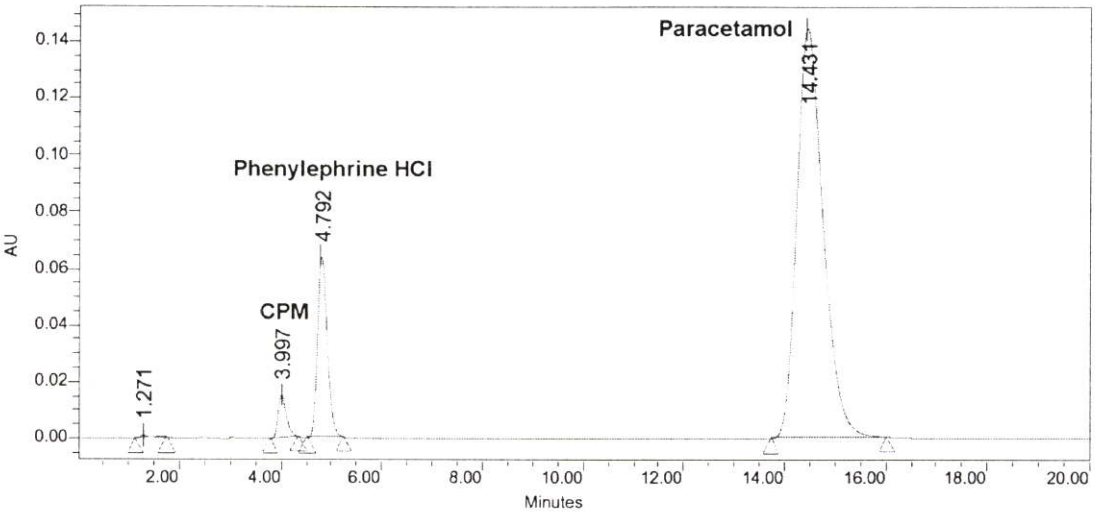
(ซ) 14 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ



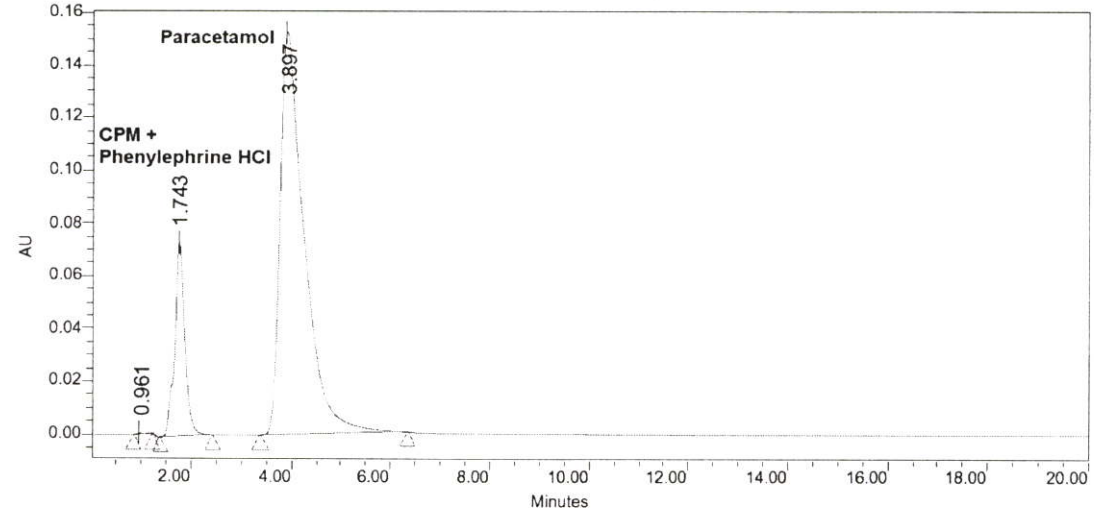
(ฌ) 16 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ



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



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



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

รูปที่ 4.3 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิล-เอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ พาราเซตามอล ที่ความเข้มข้น 150 ppm เมื่อใช้ตัวชะที่มีความเข้มข้นของ1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต แตกต่างกัน ที่ pH 3.0 (ก) 0 (ข) 2 (ค) 4 (ง) 6 (จ) 8 (ฉ) 10 (ช) 12 (ซ) 14 (ฌ) 16 (ญ) 18 (ฎ) 20 และ (ฏ) 24 mM โดยใช้สภาวะ คอลัมน์ C_{18}(150 x 3.9 mm. i.d.; 5 μm) อัตราการไหล 1.0 $mLmin^{-1}$ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 252 nm และปริมาตรที่ฉีดเท่ากับ 40 μL

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

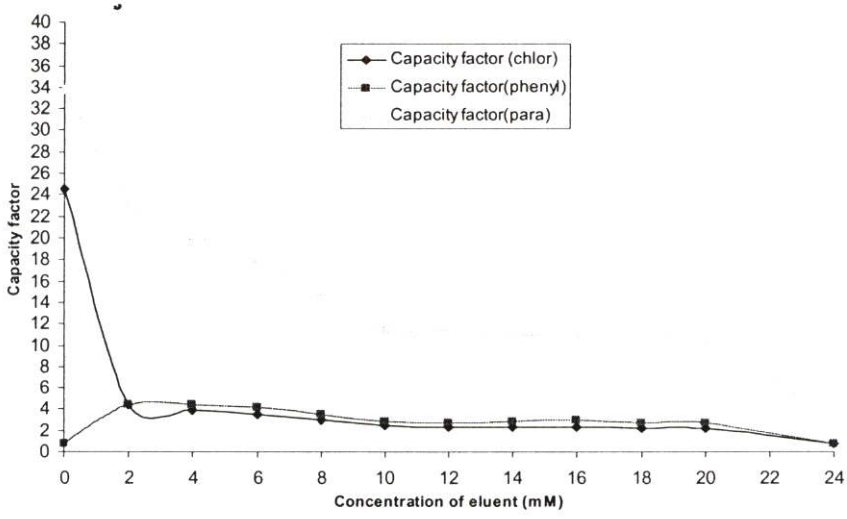
แต่เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต เป็น 4 mM ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 4.3 (ค) พบว่าสามารถแยกสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดได้ แต่ค่าแฟกเตอร์ความจุของพีกพาราเซตามอลยังมีค่าสูงเกินไปทำให้สิ้นเปลืองตัวชะ เวลา และการตรวจวัดทำได้ยาก

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

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต เป็น 20 mM ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 4.3 (ฎ) พบว่าสามารถแยกสารผสมทั้ง 3 ชนิดได้ โดยคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล มีค่าแฟก-เตอร์ความจุเท่ากับ 2.16 2.80 และ 10.41 ตามลำดับ ค่าความสามารถในการแยกระหว่างพีกของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท กับฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ เท่ากับ 1.90 ค่าความสามารถในการแยกระหว่างพีกของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เท่ากับ 11.26 ค่าความเลือกจำเพาะระหว่างพีกของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท กับฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ เท่ากับ 1.30 ค่าความเลือกจำเพาะระหว่างพีกของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เท่ากับ 3.71 ค่า tailing factor ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ พาราเซตามอล เท่ากับ 1.38 1.10 และ 1.05 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

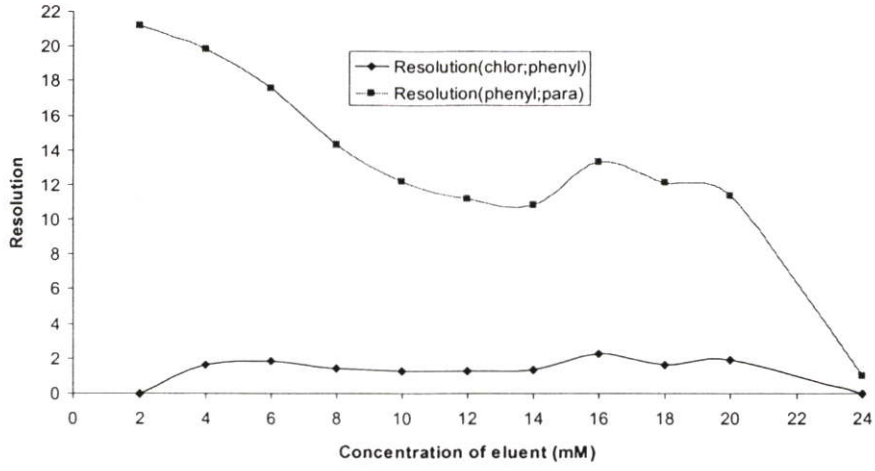
แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต เป็น 24 mM ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 4.3 (ฏ) พบว่าไม่สามารถแยกฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ได้ เพราะฉะนั้นจึงเลือกสารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต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

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



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

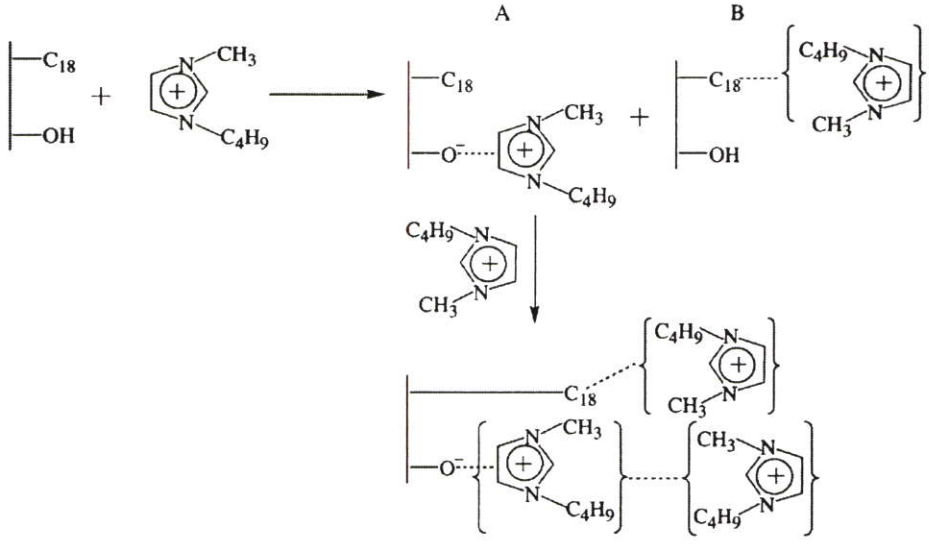
จากกราฟรูปที่ 4.4 พบว่า เมื่อใช้สารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต เป็นตัวชะ pH 3.0 พบว่าค่าแฟกเตอร์ความจุของพาราเซตามอล และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ลดลง อย่างรวดเร็วในตอนแรก จากนั้นค่อยๆ คงที่ จนกระทั่งความเข้มข้นเท่ากับ 20 mM แต่เมื่อความเข้มข้นเท่ากับ 24 mM ค่าแฟกเตอร์ความจุลดลง จนค่าแฟกเตอร์ความจุของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท และฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ มีค่าเท่ากัน และพิจารณาจากกราฟรูปที่ 4.5 จะเห็นว่าค่าความสามารถในการแยกที่ความเข้มข้นของสารละลาย1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต เท่ากับ 24 mM ค่าความสามารถในการแยกมีค่า < 1.5 ทำให้ไม่สามารถแยกพีกของสารทั้งสองได้



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

Yanes และคณะ [21] อธิบายว่า หมู่อิมมิดาโซเลียม(Imidazolium group) ที่มีประจุเป็นบวกจะไม่อยู่เฉพาะในสารละลาย(bulk solution) เท่านั้น แต่มันถูกเคลือบบนผนังแคปปิลลารีเมื่อไอออนิกลิควิดถูกใช้เป็นตัวเติมในสารละลายอิเล็กโตรไลต์(Electrolytes additive) ในเทคนิคแคปปิลลารี อิเล็คโทรโฟริซิส ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า เมื่อไอออนิกลิควิดถูกใช้เป็นตัวเติมในเฟสเคลื่อนที่(Mobile phase additive) ในเทคนิค HPLC มันจะอยู่ทั้งในสารละลายและถูกเคลือบบน C_{18} คอลัมน์ด้วยเช่นกัน

อิมมิดาโซเลียมแคทไอออน(Imidazolium cation) สามารถเกิดอันตรกริยากับหมู่ไซลานอล(Silanol group) บนผิวอัลคิลซิลิกา(Alkylsilica surface) ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ดังนั้นมันสามารถป้องกันหมู่ไซลานอลที่เหลือในคอลัมน์(Residual silanol) ได้อย่างมีประสิทธิภาพและปรับปรุงรูปร่างของพีกพร้อมกับลดเวลาการคงไว้(Retention time)ของสารที่เราสนใจจะวิเคราะห์ได้อีกด้วย



รูปที่ 4.6 แสดงอันตรกริยาของอิมมิดาโซเลียมแคทไอออนในคอลัมน์ C_{18} [9]

ซึ่งจากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต จะทำให้เวลาการคงไว้ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท และพาราเซตามอลลดลง ส่วนเวลาการคงไว้ของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ จะเพิ่มขึ้นในตอนแรกแล้วค่อยลดลงในตอนหลังเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งที่ความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต เท่ากับ 24 mM พบว่าไม่สามารถแยกฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ได้ ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า การที่ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ มีเวลาการคงไว้เพิ่มขึ้นในตอนแรก เนื่องจากเมื่อเริ่มเพิ่มความเข้มข้นของ1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ทำให้อิมมิดาโซเลียมแคทไอออนเกิดอันตรกิริยากับหมู่ไซลานอลบนผิวอัลคิลซิลิกาแบบไฟฟ้าสถิตย์(Electrostatic interaction;Aในรูปที่ 4.6) หรือด้วยหมู่อัลคิลของอิมมิดาโซเลียมแคทไอออนโดยเกิดอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิค (Hydrophobic interaction;Bในรูปที่ 4.6) ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณคาร์บอนบนเฟสอยู่กับที่ทำให้เวลาการคงไว้ของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ เพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ขึ้นเรื่อยๆ อิมมิดาโซเลียมแคทไอออนจะเกิดอันตรกิริยาแบบ A และผลิตโครงสร้างอิเล็กโทรนิกแบบสองชั้น(Bilayer electronic structure) แบบอ่อนๆที่ขับไล่สารที่เราสนใจจะวิเคราะห์ที่มีสมบัติเป็นเบส พร้อมกับเกิดอันตรกิริยาแบบ B ด้วย(แต่เกิดแบบ A ได้ดีกว่า) ดังนั้นเวลาการคงไว้ของสารที่เราสนใจจะวิเคราะห์จึงลดลงภายใต้อันตรกิริยาแบบขับไล่(Repulsive interaction) และอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิค (Hydrophobic interaction)

4.1.2 ศึกษาการเลือกความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัด

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

ตารางที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า N ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท และพาราเซตามอล กับความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัด

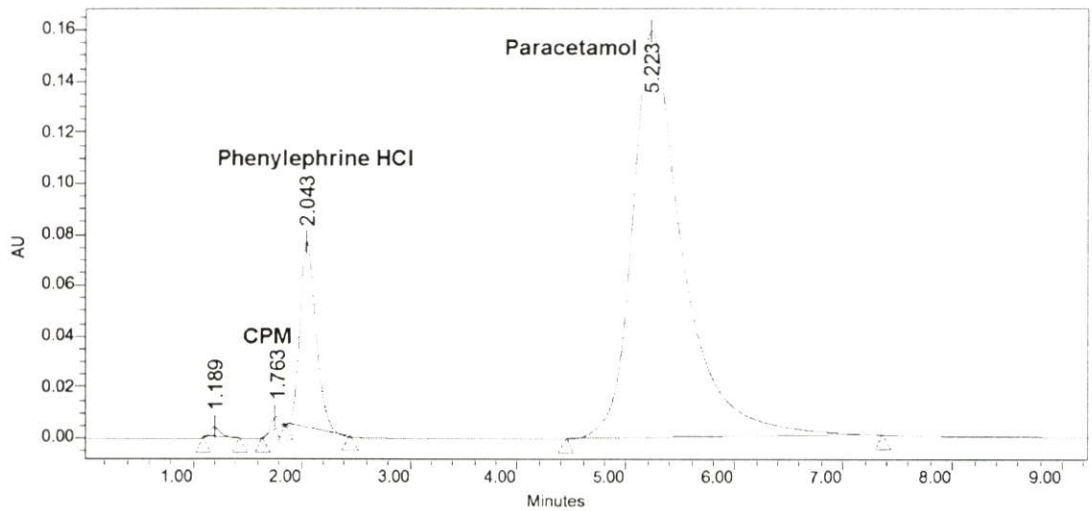
ความยาวคลื่น (nm)	N(CPM)	N(Paracetamol)
230	ND	Overload
240	311.17	Overload
250	322.29	Overload
255	361.24	4977.36
260	378.16	4662.35
262	273.66	4728.6
265	268.24	4915.12
270	224.42	4686.81
275	316.63	4829.69

หมายเหตุ ND = Non detect

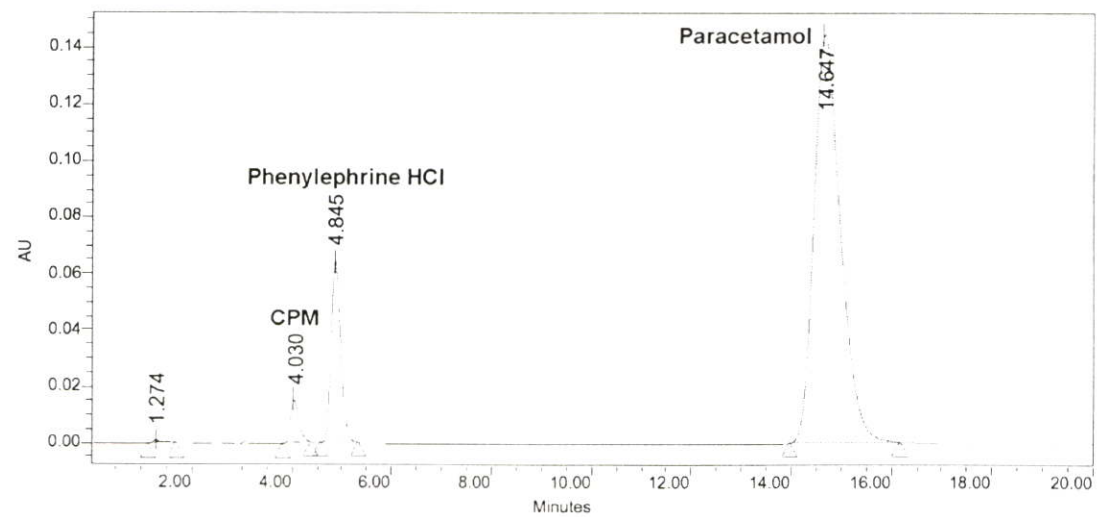
จากตารางที่ 4.2 จะเห็นว่าที่ความยาวคลื่น 260 nm ค่า N ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท สูงที่สุด และพีกของพาราเซตามอลไม่ overload ด้วย ดังนั้นในการตรวจวัดจึงเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมเท่ากับ 260 nm

4.1.3 ผลการศึกษา pH ของตัวชะ

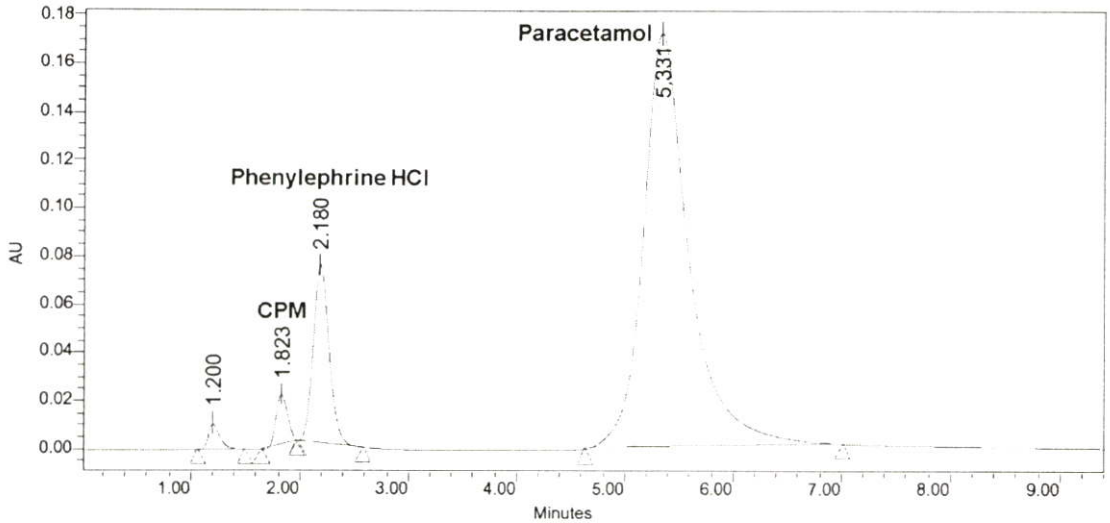
ทำการศึกษาที่ pH ของตัวชะ ต่างๆ กัน ดังนี้ คือ 2, 3, 6, 7 และ 8 ขณะที่ตัวแปรอื่นๆคงที่ คือ สารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต เข้มข้น 20 mM, ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 260 nm, อัตราการไหลเท่ากับ 1 $mLmin^{-1}$ ปริมาตรสารที่ฉีดเท่ากับ 40 µL ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 4.7



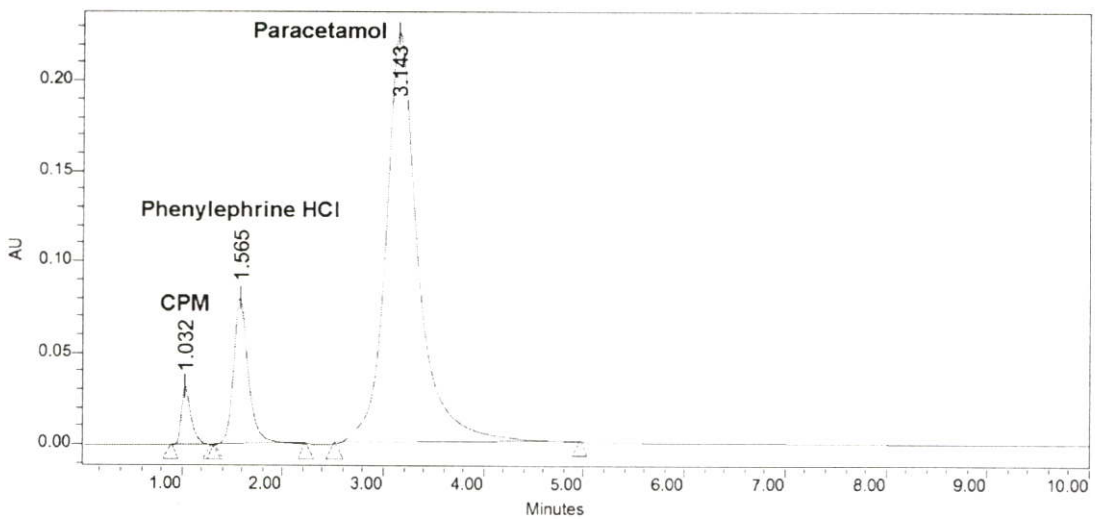
(ก) 20 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต pH 2.0 เป็นตัวชะ



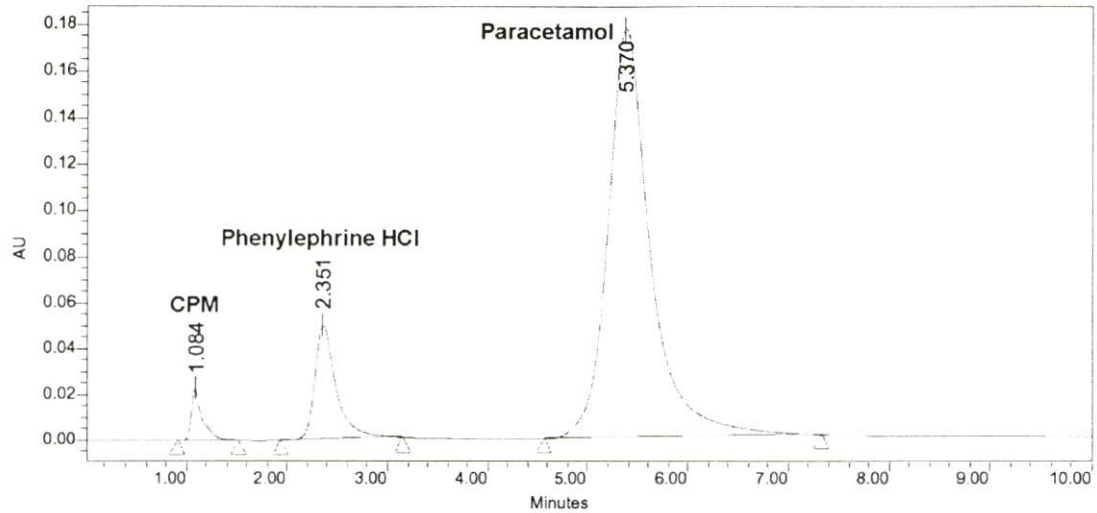
(ข) 20 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต pH 3.0 เป็นตัวชะ



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



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



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

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

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

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

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

จากการศึกษาหาชนิดของสารละลายไอออนิกและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวชะในการแยกสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง พบว่า สภาวะที่เหมาะสม คือ

1.ชนิดและความเข้มข้นของสารละลายไอออนิกที่เหมาะสม คือ สารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต 20 mM

2.ความยาวคลื่นในการตรวจวัดที่เหมาะสมเท่ากับ 260 nm

3.ค่า pH ของตัวชะที่เหมาะสมเท่ากับ 3.0

4.อัตราการไหลของตัวชะที่เหมาะสมเท่ากับ 1 $mLmin^{-1}$(ไม่ได้มีการปรับเปลี่ยนทำตามงานวิจัยเดิม เนื่องจากที่อัตราการไหลนี้ ให้ค่าทางการแยกดีแล้วและค่าความดันอยู่ในช่วง 2000-2300 psi ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูง จึงไม่ทำการเพิ่มอัตราการไหลเนื่องจากจะทำให้ความดันของคอลัมน์เพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้อายุการใช้งานของคอลัมน์น้อยลง)

5.ปริมาตรของสารที่ฉีด เท่ากับ 40 μL(ไม่ได้มีการปรับเปลี่ยนเนื่องจากขนาดของ Sample loop เท่ากับ 20 μL จึงทำการฉีดให้ล้น loop เพื่อให้แน่ใจว่าสารตัวอย่างเข้าไปใน loop เท่ากับ 20 μL เนื่องจากอาจเกิดฟองอากาศในเข็มฉีดขณะทำการฉีดซึ่งจะทำให้ปริมาตรของสารที่ฉีดเข้าระบบผิดพลาดและรบกวนการตรวจวัดสัญญาณของดีเทคเตอร์ส่งผลทำให้ผลการทดลองที่ได้ผิดพลาดด้วย)

4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการแยกสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วยพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท

สภาวะที่ใช้ในการทดลอง คือ คอลัมน์ C_{18} 150 x 3.9 mm. i.d.; 5 μm ตัวชะ คือ สารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ความเข้มข้น 20 mM pH 3.0, อัตราการไหลเท่ากับ 1 $mLmin^{-1}$, ปริมาตรสารที่ฉีด 40 μL ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 260 nm และสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วยพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ซึ่งสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดมีความเข้มข้นเท่ากับ 150 ppm แสดงผลดังในตารางที่ 4.4 (แสดงการคำนวณในภาคผนวก ก; ตารางที่ ก.9 ; หน้า 92)

ตารางที่ 4.4 แสดงประสิทธิภาพในการแยกสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วยพาราเซตา-มอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอทซึ่งสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดมีความเข้มข้นเท่ากับ 150 ppm

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

ซึ่งเกณฑ์การยอมรับค่าของพารามิเตอร์ต่างๆมีดังต่อไปนี้

1. ค่าแฟกเตอร์ความจุ ในกรณีที่ระบบการชะเป็นแบบไอโซเครติกค่าแฟกเตอร์ความจุควรมีค่าอยู่ในช่วง $1 \le k' \le 10$ จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าค่าแฟกเตอร์ความจุของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท และฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ เท่ากับ 2.16 และ 2.81 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แต่ค่าแฟกเตอร์ความจุของพาราเซตามอล เท่ากับ 10.50 ซึ่งเป็นค่าที่เกินเกณฑ์กำหนดมาเล็กน้อยซึ่งจัดเป็นค่าที่ยังยอมรับได้

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

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

4. ค่าซีเลคติวิตี้(Selectivity; α) ควรมีค่าอยู่ในช่วง 1.5 – 4.0 จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าค่าซีเลคติวิตี้ของพีกคลอเฟนิรามีน มาลีเอทกับฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ เท่ากับ 1.30 แสดงให้เห็นว่าพีกทั้งสองสามารถแยกออกจากกันได้ แต่เป็นค่าที่น้อยกว่าเกณฑ์อยู่เล็กน้อย ซึ่งค่าซีเล็คติวิตี้นี้เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีกของสารสองชนิดที่อยู่ใกล้กันแยกออกจากกันดีเพียงใดซึ่งการแยกออกจากกันนี้ขึ้นกับค่าเวลาการคงไว้เท่านั้นโดยไม่คำนึงถึงความกว้างของพีก ในทางปฏิบัติเราจะพิจารณาจากค่าความสามารถในการแยก(R_s)ร่วมด้วย ส่วนค่าซีเลคติวิตี้ของพีกฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์กับพาราเซตามอล เท่ากับ 3.74 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

5. ค่าความสามารถในการแยก(R_s) ควรมีค่า $\ge$ 1 จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าค่าความสามารถในการแยกของพีกคลอเฟนิรามีน มาลีเอทกับฟีนิลเอฟพริน

ไฮโดรคลอไรด์ เท่ากับ 1.88 ส่วนค่าความสามารถในการแยกของพีกฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์กับพาราเซตามอล เท่ากับ 11.38 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

4.3 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

นำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากหัวข้อ 4.2 มาใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ โดยข้อมูลในการคำนวณนั้นแสดงไว้ในภาคผนวก สามารถสรุปผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังตาราง ที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

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

หมายเหตุ System linearity แสดงการคำนวณในภาคผนวก ข หน้า 93 - 101

Method linearity แสดงการคำนวณในภาคผนวก ค หน้า 105 - 112

Accuracy แสดงการคำนวณในภาคผนวก จ หน้า 124 - 128

LOD แสดงการคำนวณในภาคผนวก ง หน้า 116 - 119

LOQ แสดงการคำนวณในภาคผนวก ซ หน้า 161 - 162

4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาเม็ดลดไข้ตามท้องตลาด โดยใช้สารละลายไอออนิกเป็นตัวชะและเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้กับปริมาณยาบนฉลาก

นำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากหัวข้อ 4.2 มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาเม็ดลดไข้ตามท้องตลาด 2 ยี่ห้อ คือ ดีคอลเจน และ ทิฟฟี่ แต่ละยี่ห้อได้จากการเก็บตัวอย่างมา 20 เม็ด ทำ 2 ชุด แต่ละชุดวิเคราะห์ซ้ำ 6 ครั้ง แสดงผลดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการวิเคราะห์ในตัวอย่างจริง

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

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

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

หมายเหตุ การวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาในตัวอย่างจริง แสดงการคำนวณในภาคผนวก ฉ หน้า 152 - 164

ค่าความเที่ยง(Repeatability, Reproducibility) แสดงการคำนวณในภาคผนวก ช หน้า 165 - 183

จากตารางที่ 4.6 สามารถสรุปได้ว่า

1. ในยาขี่ห้อทิฟฟี่จากการทำการวิเคราะห์ชุดที่ 1 พบปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เท่ากับ 1.92±0.11(mg/Tablet), 7.49±0.11(mg/Tablet) และ 500.66±4.27(mg/Tablet) ตามลำดับ นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับปริมาณยาบนฉลากโดยใช้หลักสถิติ Paired-t-test เป็นตัวทดสอบ ได้ค่า t จากการคำนวณ เท่ากับ 1.85, 0.27 และ 0.38 ตามลำดับ โดยค่า t จากตารางที่ระดับขั้นความเสรี(n – 1 ; 6-1 = 5) และที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่าเท่ากับ 2.57 พบว่าค่า t ที่ได้จากการคำนวณน้อยกว่าค่า t จากตาราง แสดงว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

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

3. ในยาขี่ห้อทิฟฟี่จากการทำการวิเคราะห์ชุดที่ 2 พบปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ พาราเซตามอล เท่ากับ 1.90±0.11(mg/Tablet), 7.46±0.22 (mg/Tablet) และ494.61±5.89(mg/Tablet) ตามลำดับ นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับปริมาณยาบนฉลากโดยใช้หลักสถิติ Paired-t-test เป็นตัวทดสอบ ได้ค่า t จากการคำนวณ เท่ากับ 2.27, 0.43 และ 2.24 ตามลำดับ โดยค่า t จากตารางที่ระดับขั้นความเสรี(n – 1 ; 6-1 = 5) และที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่าเท่ากับ 2.57 พบว่าค่า t ที่ได้จากการคำนวณน้อยกว่าค่า t จากตาราง แสดงว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

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

5. ค่าความเที่ยง(Repeatability, Reproducibility)

ในยาขี่ห้อดีคอลเจนจากการเก็บตัวอย่างมา 20 เม็ด ทำ 2 ชุด แต่ละชุดวิเคราะห์ซ้ำ 6 ครั้ง ชุดที่ 1 (n = 6) ได้ค่า %RSD(Repeatability)ของ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เท่ากับ 5.31 0.98 และ 0.91 ตามลำดับ ชุดที่ 2 (n = 6) ได้ค่า %RSD(Repeatability)ของ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตา-มอล เท่ากับ 5.09 3.23 และ 1.70 ตามลำดับ เมื่อนำผลการวิเคราะห์ชุดที่ 1 และชุดที่ 2 รวมกันเพื่อหาค่า%RSD(Reproducibility; n = 12)ของ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล มีค่าเท่ากับ 4.96 2.29 และ 1.47 ตามลำดับ และนำค่าความเที่ยงที่ได้มาประเมินว่าค่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้หรือไม่ โดยใช้ Horwitz equation เพื่อหาค่า Horrat จากการคำนวณดังแสดงไว้ในภาคผนวก ช พบว่า ค่า Horrat มีค่าน้อยกว่า 2 แสดงว่าค่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเที่ยงที่ยอมรับได้

ในยายี่ห้อทิฟฟี่จากการเก็บตัวอย่างมา 20 เม็ด ทำ 2 ชุด แต่ละชุดวิเคราะห์ซ้ำ 6 ครั้ง ชุดที่ 1 (n = 6)ได้ค่า%RSD(Repeatability) ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เท่ากับ 5.58 1.42 และ 0.85 ตามลำดับ ชุดที่ 2(n = 6)ได้ค่า% RSD(Repeatability) ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตา-มอล เท่ากับ 5.87 2.92 และ 1.19 ตามลำดับ เมื่อนำผลการวิเคราะห์ชุดที่ 1 และชุดที่ 2 รวมกันเพื่อหาค่า%RSD (Reproduci- bility; n = 12) ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอ-ไรด์ และพาราเซตามอล มีค่าเท่ากับ 5.49 2.19 และ 1.17 ตามลำดับ และนำค่าความเที่ยงที่ได้มาประเมินว่าค่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้หรือไม่ โดยใช้ Horwitz equation เพื่อหาค่า Horrat จากการคำนวณดังแสดงไว้ในภาคผนวก ช พบว่าค่า Horrat มีค่าน้อยกว่า 2 แสดงว่าค่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนา ขึ้นนี้มีความเที่ยงที่ยอมรับได้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากงานวิจัยพบว่า สามารถใช้สารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซีเอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต 20 mM pH 3.0 เป็นตัวชะในเทคนิค HPLC เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณพารา-เซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ได้พร้อมกันในยาเม็ดลดไข้และบรรเทาอาการหวัดที่มีขายตามท้องตลาด หลักในการแยกสารคืออาศัยการแข่งขันระหว่างอิมมิดาโซเดียม แคทไอออน(Imidazolium cation) และหมู่ที่มีขั้ว(Polar group) ของสารที่ต้องการจะวิเคราะห์(Analytes) กับหมู่ไซลานอล(Silanol group) บนผิวอัลคิลซิลิกา(Alkylsilica surface) ทำให้เกิดการแยกขึ้น ซึ่งจากงานวิจัยพบว่าการใช้สารละลายไอออนิกเป็นตัวชะนั้นให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและเที่ยงตรงในเกณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับได้ โดยสภาวะที่ใช้คือ อัตราการไหล 1 ml/min; ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 260 nm; คอลัมน์ชนิด C_{18} ขนาด 150 mm. x 3.9 mm. โดยที่การวิเคราะห์คลอเฟนิรามีน มาลีเอท มี % recovery อยู่ในช่วง 96.35 – 99.61% (n = 6) สำหรับตัวอย่างที่ถูกเติม(spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น(10, 20 และ 30 ppm) มีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจได้ (Limit of detection ; LOD) เท่ากับ 1.52 ppm และมีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบได้และรายงานอย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ(Limit of Quantitation ; LOQ) เท่ากับ 5.08 ppm มีค่า system linearity อยู่ในช่วง 5 – 40 ppm (R^2 = 0.9996) และมีค่า Method linearity อยู่ในช่วง 10 – 30 ppm(R^2 = 1) ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์มี % recovery อยู่ในช่วง 98.65 – 99.24% (n = 6) สำหรับตัวอย่างที่ถูกเติม(spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น(50, 100 และ 150 ppm) มีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจได้ (Limit of detection ; LOD) เท่ากับ 12.47 ppm และมีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบได้และรายงานอย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ(Limit of Quantitation ; LOQ) เท่ากับ 50.83 ppm มีค่า system linearity อยู่ในช่วง 25 – 200(R^2 = 0.9999) และมีค่า Method linearity อยู่ในช่วง 51 – 152 ppm(R^2 = 1) พาราเซตามอล มี % recovery อยู่ในช่วง 99.10 – 101.10% (n = 6) สำหรับตัวอย่างที่ถูกเติม(spiked) ที่ 3 ความเข้มข้น(60, 120 และ 180 ppm) มีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถตรวจได้ (Limit of detection ; LOD) เท่ากับ 5.37 ppm และมีค่าขีดต่ำสุดที่วิธีทดสอบได้และรายงานอย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ(Limit of Quantitation ; LOQ) เท่ากับ 19.78 ppm มีค่า system linearity อยู่ในช่วง 40 – 240 ppm (R^2 = 1) และมีค่า Method linearity อยู่ในช่วง 61 – 180 ppm (R^2 = 1) และได้วิเคราะห์หาปริมาณตัวยาในตัวอย่างจริง ในยา 2 ยี่ห้อ แต่ละยี่ห้อได้จากการเก็บตัวอย่างมา 20 เม็ด ทำ 2 ชุด แต่ละชุดวิเคราะห์ซ้ำ 6 ครั้ง โดยในยายี่ห้อดี-คอลเจนได้ปริมาณ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท เท่ากับ 1.93±0.10(mg/tablet); 1.93±0.10(mg/tablet)

ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ เท่ากับ 9.99±0.10(mg/tablet); 9.92±0.32(mg/tablet) และพาราเซ-ตามอลเท่ากับ 498.06±4.56(mg/tablet); 491.44±8.33(mg/tablet) ส่วนในยายี่ห้อทิฟฟี่ได้ปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท เท่ากับ 1.92±0.11(mg/tablet);1.90±0.11(mg/tablet) ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ เท่ากับ7.49±0.11(mg/tablet); 7.46±0.22(mg/tablet) และพาราเซตามอล เท่ากับ 500.66±4.27(mg/tablet); 494.61±5.89 (mg/tablet) ซึ่งเมื่อนำผลการวิเคราะห์มาเปรียบเทียบกับปริมาณยาบนฉลาก พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความมั่นใจ 95% นอกจากนี้การใช้สารละลายไอออนิกเป็นตัวชะนั้นยังเป็นการลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพ ซึ่งโดยทั่วไปการวิเคราะห์ตัวยากลุ่มนี้จะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นตัวชะในเทคนิค HPLC และนอกจากนี้ใช้ระบบการชะเป็นแบบไอโซเครติกซึ่งง่ายในการปฏิบัติงาน

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยที่พัฒนาขึ้นนี้นับเป็นครั้งแรกที่มีการใช้สารละลายไอออนิกเป็นตัวชะในการวิเคราะห์ตัวยาดังกล่าวข้างต้น ควรจะมีการหาสารละลายไอออนิกชนิดใหม่มาใช้แทนหรืออาจจะใช้สภาวะที่ใช้ในการวิจัยนี้กับการวิเคราะห์ตัวยาอื่นแทน

เอกสารอ้างอิง

[1] A.I. Gasco-Lopez, R. Izquierdo-Hornillos, A. Jiminez, "**Development and validation of a high performance liquid chromatography method for the determination of cold relief ingredients in chewing gum**", Journal of Chromatography A. 775 (1997) 179-185

[2] A. Marin, E. Garcia, A. Garcia, C. Barbas, "**Validation of a HPLC quantification of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations : capsules and sachets**", Journal of Pharmaceutacal and Biomedical Analysis 29 (2002) 701-714

[3] Susumu Yamato, Masaharu Nakajima, Kenji Shimada,"**Simultaneous determination of chlorpheniramine and maleate by High performance liquid chromatography using tetra-*n*-butylammonium phosphate as an ion-pair reagent**", Journal of Chromatography A, 731 (1996) 346-350

[4] Darryl J. Hood, H.Y. Cheung, "**A chromatographic method for rapid and simultaneous analysis of codeine phosphate, ephedrine HCl and chlorpheniramine maleate in cough-cold syrup formulation**.", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30(2003) 1595-1601

[5] Thomas A. Biemer., "**Simultaneous analysis of acetaminophen, pseudoephedrine HCl and chlorpheniramine maleate in a cold tablet using an isocratic, mixed micellar high performance liquid chromatography mobile phase**"., Journal of Chromatography, 410(1987) 206-210

[6] Leena Suntornsuk, Ongart Pipitharome, Prapin Wilairat.,"**Simultaneous determination of paracetamol and chlorpheniramine maleate by micellar electrokinetic chromatography**", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 33(2003)441-449

[7] Krishna K. Verma, Sunil K. Sanghi, Archana Jain and Dayashanker Gupta., "**Determination of aspirin by pre-column transacetylation reaction of 3-aminophenol and reversed phase high performance liquid chromatography : Simultaneous determination of aspirin, acetaminophen and caffeine**", Journal of Pharmaceutical Sciences Vol.76, No.7, July (1987) 551-553

[8] http://www.Science.manager200online.htm.

[9] Lijun He, Wenzhu Zhang, Liang Zhao, Xia Liu, Shengxiang Jiang., " **Effect of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids as the eluent on the separation of ephrines by liquid chromatography**", Journal of Chromatography A, 1007(2003)39-45

[10] สมิงเก่า เจริญ "สารพิษ" หมอชาวบ้าน, 2541, 298-302

[11] สัมมน โฉมฉาย, สุรจิต สุนทรธรรม " Non-Narcotic Analgesics and NSAIDs Overdose" เวชศาสตร์ฉุกเฉิน,2542; 847-854

[12] Richard J. Lewis,Sr. Hawley's Condensed Chemical Dictionary; 13th edition

[13] http://www.derlarrubiz.com

[14] http://www.keepkidshealthy.com/adolescent/adolescent/adolescent.html

[15] พวงแก้ว ลัคนทินพร "ความรู้พื้นฐานทางลิควิดโครมาโทกราฟี" คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2540

[16] คณิตา ตังคณานุรักษ์ "เทคนิคการแยกสารทางเคมี" โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, พฤษภาคม, 2542

[17] Trevor M. Letcher, Urszula Domanska, Malgorzata Marciniak, Andrzej Marciniak, **" Activity coefficients at infinite dilution measurements for organic solutes in the ionic liquid 1-butyl-3-methyl-imidazolium 2-(2-methoxyethoxy) ethyl sulfate using g.l.c. at T = (298.15, 303.15, and 308.15) K,"** J. Chem. Thermodynamics 37 (2005) 587– 593

[18] Fabrice Mutelet, Jean-Noel Jaubert, **"Accurate measurements of thermodynamic properties of solutes in ionic liquids using inverse gas chromatography,"** Journal of Chromatography A, 1102 (2006) 256–267

[19] Zsombor Miskolczy, Krisztina Sebok-Nagy, Laszlo Biczok, Sinem Gokturk, **"Aggregation and micelle formation of ionic liquids in aqueous solution,"** Chemical Physics Letters 400 (2004) 296–300

[20] A. Vicent Orchilles, Vicenta Gonzalez-Alfaro, Pablo J. Miguel,Ernesto Vercher, Antoni Martinez-Andreu, **"Volumetric properties of binary mixtures of ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium octylsulfate with water or propanol in the temperature range of 278.15 K to 328.15 K,"** J. Chem. Thermodynamics 38 (2006) 1124–1129

[21] Enrique G. Yanes, Samuel R. Gratz, Michael J. Baldwin, Sara E. Robison, and Apryll M. Stalcup, " **Capillary Electrophoretic Application of 1-Alkyl-3-methylimidazolium-Based Ionic Liquids,"** Anal. Chem.(2001)73 3838-3844

[22] A. Garcia , F.J. Ruperez , A. Marin , A. de la Maza , C. Barbas, **"Poly(ethyleneglycol) column for the determination of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations"** Journal of Chromatography B, 785 (2003) 237–243

[23] A. Marin, C. Barbas, **"CE versus HPLC for the dissolution test in a pharmaceutical formulation containing acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine",** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 35 (2004) 769–777

[24] B. Olmo, A. Garcia, A. Marin, C. Barbas,**"New approaches with two cyano columns to the separation of acetaminophen, phenylephrine, chlorpheniramine and related compounds",** Journal of Chromatography B, 817 (2005) 159–165

[25] J.C. Miller and J.N miller, " statistics for analytical chemistry" 3rd edition,1993, 58, 104 – 117

[26] Werner Funk, Vera Dammann Gerhild Donnevert, " Quality Assurance in Analytical Chemistry" , 1995,29

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การคำนวณค่าทางโครมาโทกราฟี

ก.1 การคำนวณค่าแฟกเตอร์ความจุของสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วยคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เมื่อใช้ตัวชะที่มีความเข้มข้นของ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ไนเตรท แตกต่างกัน ที่ pH 3.0

ตารางที่ ก.1 แสดงการคำนวณค่าแฟกเตอร์ความจุของสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เมื่อใช้ตัวชะที่มีความเข้มข้นของ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ไนเตรท แตกต่างกัน ที่ pH 3.0

[IL] (mM)	PE				CPM				PARA			
	t_o	t_R	k'	k' เฉลี่ย	t_o	t_R	k'	k' เฉลี่ย	t_o	t_R	k'	k' เฉลี่ย
0	0.902	1.649	0.83	0.83	0.902	22.309	23.73	24.51	0.902	31.144	33.53	33.85
	0.892	1.626	0.82		0.892	23.440	25.28		0.892	31.367	34.16	
2	0.872	1.745	1.00	1.00	0.872	19.009	18.009	19.74	0.872	31.477	35.10	35.25
	0.873	1.737	0.99		0.873	19.623	21.48		0.873	31.769	35.39	
4	1.000	2.597	1.597	1.55	1.000	9.457	8.454	8.46	1.000	32.793	31.793	31.20
	1.000	2.511	1.511		1.000	9.465	8.465		1.000	31.608	30.608	

หมายเหตุ [IL] = ความเข้มข้นของ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม ไนเตรท

t_o = เวลาการคงไว้ของตัวชะ(min)

t_R = เวลาการคงไว้ของสารที่เราสนใจ(min)

k' = แฟกเตอร์ความจุ; สูตรการคำนวณคือ $k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$

ก.2 การคำนวณค่าแฟกเตอร์ความจุของสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เมื่อใช้ตัวชะที่มีความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซีเอทอกซี) เอทิลซัลเฟต แตกต่างกัน ที่ pH 3.0 ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 252 nm

ตารางที่ ก.2 แสดงการคำนวณค่าแฟกเตอร์ความจุของสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เมื่อใช้ตัวชะที่มีความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซีเอทอกซี) เอทิลซัลเฟต แตกต่างกัน ที่ pH 3.0

[IL] (mM)	CPM				PE				PARA			
	t_o	t_R	k'	k' เฉลี่ย	t_o	t_R	k'	k' เฉลี่ย	t_o	t_R	k'	k' เฉลี่ย
0	0.902	22.309	23.73	24.51	0.902	1.649	0.83	0.83	0.902	31.144	33.53	33.85
	0.892	23.440	25.28		0.892	1.626	0.82		0.892	31.367	34.16	
2	1.052	5.723	4.44	4.44	1.052	5.723	4.44	4.44	1.052	25.377	23.12	23.02
	1.051	5.716	4.44		1.051	5.716	4.44		1.051	25.361	23.13	
	1.050	5.698	4.43		1.050	5.698	4.43		1.050	24.985	22.80	
4	1.127	5.540	3.92	3.90	1.127	6.160	4.47	4.42	1.127	24.267	20.53	20.31
	1.128	5.524	3.90		1.128	6.113	4.42		1.128	24.010	20.29	
	1.126	5.480	3.87		1.126	6.034	4.36		1.126	23.777	20.12	
6	1.160	5.230	3.51	3.54	1.160	5.916	4.10	4.15	1.160	21.754	17.75	18.02
	1.166	5.291	3.54		1.166	6.000	4.15		1.166	22.268	18.10	
	1.163	5.327	3.58		1.163	6.051	4.20		1.163	22.350	18.22	
8	1.169	4.715	3.03	3.04	1.169	5.240	3.48	3.49	1.169	18.488	14.82	14.85
	1.169	4.728	3.04		1.169	5.261	3.50		1.169	18.558	14.88	
	1.171	4.730	3.04		1.171	5.263	3.49		1.171	18.560	14.85	
10	1.161	4.017	2.46	2.46	1.161	4.440	2.82	2.83	1.161	15.138	12.04	11.90
	1.160	4.025	2.47		1.160	4.466	2.85		1.160	14.821	11.78	
	1.164	4.009	2.44		1.164	4.434	2.81		1.164	14.998	11.88	

ตารางที่ ก.2 (ต่อ)

[IL] (mM)	CPM				PE				PARA			
	t_o	t_R	k'	k' เฉลี่ย	t_o	t_R	k'	k' เฉลี่ย	t_o	t_R	k'	k' เฉลี่ย
12	1.183	3.973	2.36	2.37	1.183	4.477	2.78	2.80	1.183	15.295	11.93	11.87
	1.184	3.985	2.37		1.184	4.494	2.80		1.184	15.177	11.82	
	1.185	4.005	2.38		1.185	4.523	2.82		1.185	15.227	11.85	
14	1.220	4.071	2.34	2.34	1.220	4.686	2.84	2.84	1.220	15.229	11.48	11.76
	1.219	4.060	2.33		1.219	4.670	2.83		1.219	15.672	11.86	
	1.221	4.088	2.35		1.221	4.710	2.86		1.221	15.800	11.94	
16	1.273	4.217	2.31	2.29	1.273	5.073	2.99	2.95	1.273	15.669	11.31	11.40
	1.273	4.198	2.30		1.273	5.033	2.95		1.273	15.850	11.45	
	1.273	4.167	2.27		1.273	4.972	2.91		1.273	15.824	11.43	
18	1.237	4.023	2.25	2.26	1.237	4.694	2.79	2.80	1.237	14.917	11.06	10.96
	1.237	4.023	2.25		1.237	4.692	2.79		1.237	14.590	10.79	
	1.239	4.048	2.27		1.239	4.731	2.82		1.239	14.919	11.04	
20	1.271	3.997	2.14	2.16	1.271	4.792	2.77	2.80	1.271	14.431	10.35	10.41
	1.276	4.036	2.16		1.276	4.847	2.80		1.276	14.649	10.48	
	1.278	4.072	2.19		1.278	4.910	2.84		1.278	14.574	10.40	
24	0.961	1.743	0.81	0.74	0.961	1.743	0.81	0.74	0.961	3.897	3.06	2.88
	0.958	1.736	0.81		0.958	1.736	0.81		0.958	3.880	3.05	
	1.090	1.728	0.59		1.090	1.728	0.59		1.090	3.860	2.54	

หมายเหตุ [IL] = ความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมท-อกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต

t_o = เวลาการคงไว้ของตัวชะ(min)

t_R = เวลาการคงไว้ของสารที่เราสนใจ(min)

k' = แฟกเตอร์ความจุ; สูตรการคำนวณคือ $k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$

ตารางที่ ก.3 แสดงการคำนวณค่าซีเล็คติวิตี้ของสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วยคลอเฟนิ-รามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เมื่อใช้ตัวชะที่มีความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซีเอทอกซี)เอทิลซัลเฟต แตกต่างกัน ที่ pH 3.0

[IL]	CPM : PE				PE : PARA			
(mM)	k'_1	k'_2	α	α เฉลี่ย	k'_2	k'_3	α	α เฉลี่ย
2	4.44	4.44	1	1	4.44	23.12	5.21	5.19
	4.44	4.44	1		4.44	23.13	5.21	
	4.43	4.43	1		4.43	22.80	5.15	
4	3.92	4.47	1.14	1.13	4.47	20.53	4.59	4.60
	3.90	4.42	1.13		4.42	20.29	4.59	
	3.89	4.36	1.13		4.36	20.12	4.61	
6	3.51	4.1	1.17	1.17	4.1	17.75	4.33	4.34
	3.54	4.15	1.17		4.15	18.10	4.36	
	3.58	4.20	1.17		4.20	18.22	4.34	
8	3.03	3.48	1.15	1.15	3.48	14.82	4.26	4.26
	3.04	3.50	1.15		3.50	14.88	4.25	
	3.04	3.49	1.15		3.49	14.85	4.26	
10	2.46	2.82	1.15	1.15	2.82	12.04	4.26	4.21
	2.47	2.85	1.15		2.85	11.78	4.13	
	2.44	2.81	1.15		2.81	11.88	4.23	
12	2.36	2.78	1.18	1.18	2.78	11.93	4.29	4.24
	2.37	2.80	1.18		2.80	11.82	4.22	
	2.38	2.82	1.18		2.82	11.85	4.20	
14	2.34	2.84	1.21	1.21	2.84	11.48	4.04	4.13
	2.33	2.83	1.21		2.83	11.86	4.19	
	2.35	2.86	1.22		2.86	11.94	4.17	
16	2.31	2.99	1.29	1.28	2.99	11.31	3.78	3.86
	2.30	2.95	1.28		2.95	11.45	3.88	
	2.27	2.91	1.28		2.91	11.43	3.93	
18	2.25	2.79	1.24	1.24	2.79	11.06	3.96	3.91
	2.25	2.79	1.24		2.79	10.79	3.87	
	2.27	2.82	1.24		2.82	11.04	3.91	

ตารางที่ ก.3 (ต่อ)

[IL]	CPM : PE				PE : PARA			
(mM)	k'_1	k'_2	α	α เฉลี่ย	k'_2	k'_3	α	α เฉลี่ย
20	2.14	2.77	1.29	1.30	2.77	10.35	3.74	3.71
	2.16	2.80	1.30		2.80	10.48	3.74	
	2.19	2.84	1.30		2.84	10.40	3.66	
24	0.81	0.81	1	1	0.81	3.06	3.78	4.13
	0.81	0.81	1		0.81	3.05	3.77	
	0.59	0.59	1		0.59	2.86	4.85	

หมายเหตุ [IL] = ความเข้มข้นของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต

k'_1, k'_2 และ k'_3 = แฟกเตอร์ความจุของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ พาราเซตามอล ตามลำดับ

α = ค่าซีเล็คติวิตี้; สูตรคำนวณคือ $\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$

ตารางที่ ก.4 แสดงการคำนวณค่าความสามารถในการแยกของสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบ ด้วยคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล เมื่อใช้ตัวชะที่มีความเข้มข้นของ1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต แตกต่างกัน ที่ pH 3.0

[IL]	CPM : PE					PE : PARA				
(mM)	t_{R1} (min)	t_{R2} (min)	W_1+W_2 (Cm)	R_s	R_s เฉลี่ย	t_{R2} (min)	t_{R3} (min)	W_2+W_3 (Cm)	R_s	R_s เฉลี่ย
2	5.723	5.723	0.90	0	0	5.723	25.377	1.85	21.25	21.29
	5.716	5.716	0.90	0		5.716	25.361	1.85	21.24	
	5.698	5.698	0.90	0		5.698	24.985	1.81	21.38	
4	5.540	6.160	0.75	1.65	1.64	6.160	24.267	1.80	20.12	19.91
	5.524	6.113	0.70	1.68		6.113	24.010	1.80	19.89	
	5.480	6.034	0.70	1.58		6.034	23.777	1.80	19.71	
6	5.230	5.916	0.75	1.83	1.84	5.916	21.754	1.80	17.60	17.48
	5.291	6.000	0.80	1.77		6.000	22.268	1.90	17.12	
	5.327	6.051	0.76	1.91		6.051	22.350	1.84	17.72	

ตารางที่ ก.4 (ต่อ)

[IL] (mM)	CPM : PE					PE : PARA				
	t_{R1} (min)	t_{R2} (min)	W_1+W_2 (Cm)	R_s	R_s เฉลี่ย	t_{R2} (min)	t_{R3} (min)	W_2+W_3 (Cm)	R_s	R_s เฉลี่ย
8	4.715	5.240	0.75	1.40	1.41	5.240	18.488	1.85	14.32	14.36
	4.728	5.261	0.75	1.42		5.261	18.558	1.85	14.38	
	4.730	5.263	0.75	1.42		5.263	18.560	1.85	14.38	
10	4.017	4.440	0.66	1.28	1.28	4.440	15.138	1.61	13.29	12.73
	4.025	4.466	0.70	1.26		4.466	14.821	1.65	12.55	
	4.009	4.434	0.66	1.29		4.434	14.998	1.71	12.36	
12	3.973	4.477	0.80	1.26	1.25	4.477	15.295	1.76	12.29	11.83
	3.985	4.494	0.80	1.27		4.494	15.177	1.80	11.87	
	4.005	4.523	0.85	1.22		4.523	15.227	1.89	11.33	
14	4.071	4.686	0.90	1.37	1.34	4.686	15.229	1.83	11.52	11.87
	4.060	4.670	0.91	1.34		4.670	15.672	1.81	12.16	
	4.088	4.710	0.95	1.31		4.710	15.800	1.86	11.92	
16	4.217	5.073	0.70	2.45	2.32	5.073	15.669	1.48	14.32	14.37
	4.198	5.033	0.75	2.23		5.033	15.850	1.50	14.42	
	4.167	4.972	0.71	2.27		4.972	15.824	1.51	14.37	
18	4.023	4.694	0.81	1.66	1.66	4.694	14.917	1.75	11.68	12.26
	4.023	4.692	0.82	1.63		4.692	14.590	1.60	12.37	
	4.048	4.731	0.81	1.69		4.731	14.919	1.60	12.74	
20	3.997	4.792	0.88	1.81	1.90	4.792	14.431	1.72	11.21	11.26
	4.036	4.847	0.85	1.91		4.847	14.649	1.70	11.53	
	4.072	4.910	0.85	1.97		4.910	14.574	1.75	11.04	
24	1.743	1.743	1.1	0.00	0	1.743	3.897	3.75	1.15	0.92
	1.736	1.736	1.4	0.00		1.736	3.880	5.30	0.81	
	1.728	1.728	1.4	0.00		1.728	3.860	5.40	0.78	

หมายเหตุ $$R_s = \frac{2\Delta t_R}{W_2 + W_1}$$

เมื่อ Δt_R = ระยะห่างระหว่างจุดสูงสุดของพีกทั้งสองที่อยู่ติดกัน

t_{R1} , t_{R2} และ t_{R3} = เวลาการคงไว้ของพีกคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิล-เอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ พาราเซตามอล ตามลำดับ

W_1 , W_2 และ W_3= ความกว้างของพีกคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิล-เอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ พาราเซตามอล ตามลำดับ

ตารางที่ ก.5 แสดงการคำนวณค่าจำนวนเพลท(Number of theoretical plates; N) ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท และพาราเซตามอล ที่ความยาวคลื่นต่างๆ เมื่อใช้ 20 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ

ความยาวคลื่น	CPM			PARA		
	t_R(min)	W_h(cm)	N(min^2/cm)	t_R(min)	W_h(cm)	N(min^2/cm)
230	ND	ND	ND	Overload	Overload	Overload
240	4.122	0.55	311.17	Overload	Overload	Overload
250	4.195	0.55	322.29	Overload	Overload	Overload
255	4.199	0.52	361.24	14.987	0.50	4977.36
260	4.131	0.50	378.16	14.505	0.50	4662.35
262	4.217	0.60	273.66	15.192	0.52	4728.60
265	4.175	0.60	268.24	14.893	0.50	4915.12
270	4.137	0.65	224.42	14.543	0.50	4686.81
275	4.158	0.55	316.63	14.763	0.50	4829.69

หมายเหตุ $N = 5.54\left(\frac{t_R}{W_h}\right)^2$ (W_h = ความกว้างของพีกที่ครึ่งหนึ่งของความสูง;Cm)

ก.3 แสดงการคำนวณค่าแฟกเตอร์ความจุ ค่าความสามารถในการแยก และ ค่าเทลลิ่งแฟกเตอร์(Tailing factor; T) ของสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย คลอเฟนิรา-มีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล ที่ความเข้มข้น 150 ppm เมื่อใช้ 20 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ที่ pH ต่างๆกัน เป็นตัวชะ

ตารางที่ ก.6 แสดงการคำนวณค่าแฟกเตอร์ความจุของสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล ที่ความเข้มข้น 150 ppm เมื่อใช้ 20 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ที่ pH ต่างๆกัน เป็นตัวชะ

pH	CPM				PE				PARA			
	t_o	t_R	k'	k' เฉลี่ย	t_o	t_R	k'	k' เฉลี่ย	t_o	t_R	k'	k' เฉลี่ย
2	1.241	1.815	0.46	0.48	1.241	2.137	0.72	0.72	1.241	5.637	3.54	3.42
	1.189	1.763	0.48		1.189	2.043	0.72		1.189	5.223	3.39	
	1.175	1.749	0.49		1.175	2.014	0.71		1.175	5.096	3.34	
3	1.271	3.997	2.14	2.16	1.271	4.792	2.77	2.81	1.271	14.431	10.35	10.50
	1.274	4.030	2.16		1.274	4.845	2.80		1.274	14.647	10.50	
	1.276	4.070	2.19		1.276	4.908	2.85		1.276	14.874	10.66	
6	1.177	1.846	0.57	0.54	1.177	2.220	1.22	0.95	1.177	5.506	3.68	3.48
	1.200	1.823	0.52		1.200	2.180	0.82		1.200	5.331	3.44	
	1.048	1.601	0.53		1.048	1.909	0.82		1.048	4.520	3.31	
7	1.033	1.033	0	0	1.033	1.564	0.51	0.52	1.033	3.143	2.04	2.05
	1.032	1.032	0		1.032	1.565	0.52		1.032	3.143	2.05	
	1.031	1.031	0		1.031	1.569	0.52		1.031	3.157	2.06	
8	1.086	1.086	0	0	1.086	2.262	1.08	1.14	1.086	5.018	3.62	3.84
	1.084	1.084	0		1.084	2.351	1.17		1.084	5.370	3.95	
	1.082	1.082	0		1.082	2.349	1.17		1.082	5.365	3.96	

หมายเหตุ k' = แฟกเตอร์ความจุ; สูตรการคำนวณคือ $k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$

ตารางที่ ก.7 แสดงการคำนวณค่าความสามารถในการแยกของสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบ ด้วยคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล ที่ความ-เข้มข้น 150 ppm เมื่อใช้ 20 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ที่ pH ต่างๆกัน เป็นตัวชะ

pH	CPM : PE					PE : PARA				
	t_{R1} (min)	t_{R2} (min)	W_1+W_2 (Cm)	R_s	R_s เฉลี่ย	t_{R2} (min)	t_{R3} (min)	W_2+W_3 (Cm)	R_s	R_s เฉลี่ย
2	1.815	2.137	1.40	0.46	0.42	2.137	5.637	2.90	2.41	2.38
	1.763	2.043	1.30	0.43		2.043	5.223	2.60	2.45	
	1.749	2.014	1.39	0.38		2.014	5.096	2.69	2.29	
3	3.997	4.792	0.88	1.81	1.88	4.792	14.431	1.72	11.21	11.38
	4.030	4.845	0.85	1.92		4.845	14.647	1.70	11.53	
	4.070	4.908	0.88	1.90		4.908	14.874	1.75	11.39	
6	1.846	2.220	1.20	0.62	0.55	2.220	5.506	2.70	2.43	2.21
	1.823	2.180	1.15	0.62		2.180	5.331	2.45	2.57	
	1.601	1.909	1.53	0.40		1.909	4.520	3.20	1.63	
7	1.033	1.564	1.07	0.99	0.99	1.564	3.143	1.95	1.62	1.61
	1.032	1.565	1.09	0.98		1.565	3.143	1.97	1.60	
	1.031	1.569	1.08	1.00		1.569	3.157	1.99	1.60	
8	1.086	2.262	1.05	2.24	2.22	2.262	5.018	2.49	2.21	2.35
	1.084	2.351	1.15	2.20		2.351	5.370	2.50	2.42	
	1.085	2.353	1.14	2.22		2.353	5.375	2.50	2.42	

หมายเหตุ $$R_s = \frac{2\Delta t_R}{W_2 + W_1}$$

เมื่อ Δt_R = ระยะห่างระหว่างจุดสูงสุดของพีกทั้งสองที่อยู่ติดกัน

t_{R1} , t_{R2} และ t_{R3} = เวลาการคงไว้ของพีกคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิล-เอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ พาราเซตามอล ตามลำดับ

W_1 , W_2 และ W_3 = ความกว้างของพีกคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิล-เอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ พาราเซตามอล ตามลำดับ

ตารางที่ ก.8 แสดงการคำนวณค่าเทลลิ่งแฟกเตอร์ของสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วย คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และพาราเซตามอล ที่ความเข้มข้น 150 ppm เมื่อใช้ 20 mM 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ที่ pH ต่างๆกัน เป็นตัวชะ

pH	CPM				PE				PARA			
	$W_{0.05}$ (Cm)	2f (Cm)	T	$T_{เฉลี่ย}$	$W_{0.05}$ (Cm)	2f (Cm)	T	$T_{เฉลี่ย}$	$W_{0.05}$ (Cm)	2f (Cm)	T	$T_{เฉลี่ย}$
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.00	2.82	1.06	1.30
	ND	ND	ND		ND	ND	ND		2.80	2.30	1.22	
	ND	ND	ND		ND	ND	ND		3.70	2.30	1.61	
3	0.51	0.40	1.28	1.40	0.50	0.52	0.96	1.12	1.30	1.30	1	1.01
	0.50	0.30	1.67		0.50	0.44	1.14		1.31	1.40	0.94	
	0.50	0.40	1.25		0.50	0.40	1.25		1.30	1.20	1.08	
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.85	2.50	1.14	1.17
	ND	ND	ND		ND	ND	ND		2.70	2.24	1.21	
	ND	ND	ND		ND	ND	ND		3.35	2.90	1.16	
7	0.60	0.40	1.50	1.48	1.00	0.90	1.11	1.05	2.40	2.30	1.04	1.06
	0.60	0.42	1.43		0.90	0.98	0.92		2.40	2.20	1.09	
	0.60	0.40	1.50		1.00	0.90	1.11		2.40	2.30	1.04	
8	0.60	0.40	1.50	1.41	1.40	1.00	1.40	1.40	2.50	2.30	1.09	1.07
	0.60	0.50	1.20		1.40	1.00	1.40		2.40	2.30	1.04	
	0.60	0.39	1.54		1.40	1.00	1.40		2.50	2.30	1.09	

หมายเหตุ $$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

เมื่อ T = tailing factor

$W_{0.05}$ = ความกว้างของพีกที่ความสูง 5% จากเบสไลน์

f = ระยะทางระหว่างจุดสูงสุดของพีกไปยังส่วนลาดของพีกด้านหน้า ค่านี้วัดที่ 5% ของความสูงจากเบสไลน์

ตารางที่ ก.9 แสดงการคำนวณการหาค่าประสิทธิภาพในการแยกสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วยพาราเซตามอล ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ และ คลอเฟนิรามีน มาลีเอท ซึ่งสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดมีความเข้มข้นเท่ากับ 150 ppm เมื่อใช้ 20 mM 1-บิวทิล-3-เมทิล-อิมมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต ที่ pH 3.0 เป็นตัวชะ

พารามิเตอร์	CPM				PE				PARA			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
k	2.14	2.16	2.19	2.16	2.77	2.80	2.85	2.81	10.35	10.50	10.66	10.50
N	3933.65	3998.87	4078.65	4003.72	3524.00	3602.39	3336.25	3487.55	4805.19	4754.09	4902.59	4820.62
T	1.28	1.67	1.25	1.4	0.96	1.14	1.25	1.12	1	0.94	1.08	1.01
α	1.30				3.74							
R_s	1.88				11.38							

ภาคผนวก ข

การคำนวณค่าความเป็นเส้นตรง(System Linearity)

ข.1 การคำนวณค่า System linearity ของสารละลายมาตรฐานคลอเฟนิรามีน มาลีเอท

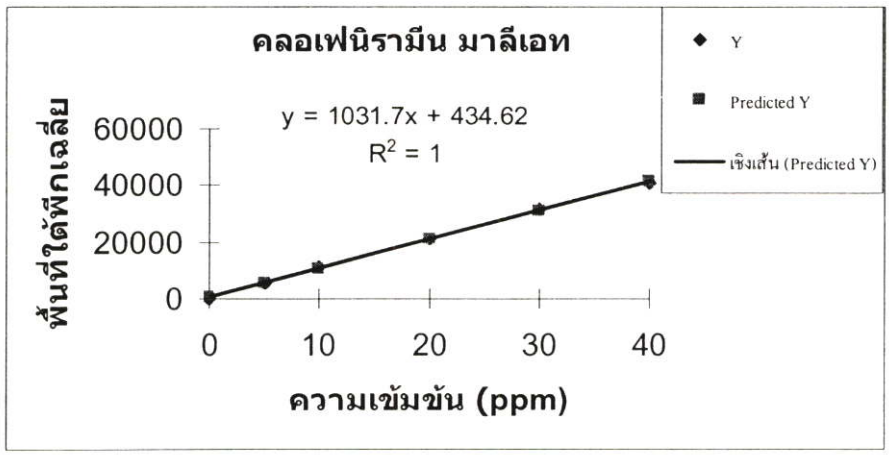
ตารางที่ ข.1 แสดงผลการศึกษา System linearity ของสารละลายมาตรฐานคลอเฟนิรามีน มาลีเอท

ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้พีกเฉลี่ย
0	0 ± 0
5	5575 ± 173
10	11003 ± 362
20	21467 ± 1011
30	31634 ± 637
40	41255 ± 1155

หมายเหตุ n = 5

Regression Statistics	
Multiple R	0.999733837
R Square	0.999467745
Adjusted R Square	0.999334681
Standard Error	410.2097826
Observations	6

	Coefficients	*Standard Error*	*t Stat*	*P-value*
Intercept	434.6182456	267.2860348	1.626041727	0.179267842
X Variable 1	1031.677053	11.90389819	86.66716027	1.06255E-07
	Lower 95%	*Upper 95%*	*Lower 95.0%*	*Upper 95.0%*
	-307.4882945	1176.724786	-307.4882945	1176.724786
	998.6264643	1064.727641	998.6264643	1064.727641



รูปที่ ข.1 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานคลอเฟนิรามีน มาลีเอท อันดับที่ 1

จากข้อมูลข้างต้นได้สมการเส้นตรง คือ y = 1031.7 X + 434.62

จากนั้นพิสูจน์ว่า จุดตัดแกน y (a) มีค่าแตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญหรือไม่โดยใช้ t-test

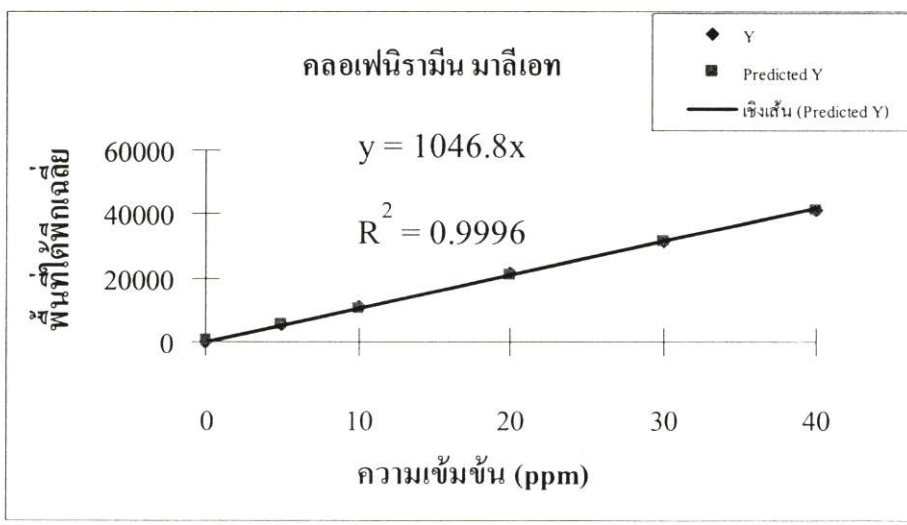
ซึ่งมีสูตรดังนี้ $t_{cal} = (a) / sa$; $t_{cal} = (434.62) / (267.29) = \left| 1.63 \right|$

โดยค่า t จากตาราง($t_{critical}$) ที่ระดับขั้นความเสรี(degree of freedom; d.f (n-2);6-2 = 4)

ที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่า = 2.78

จะเห็นได้ว่าค่า $t_{cal} < t_{crit}$ หมายความว่า จุดตัดแกน y (a) ไม่แตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญ

เพราะฉะนั้นค่า a จะไม่อยู่ในสมการเส้นตรง จะได้สมการเส้นตรงเป็น y = 1046.8x



รูปที่ ข.2 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานคลอเฟนิรามีน มาลีเอท อันดับที่ 2

ซึ่งค่าความชัน(b)อาจจะเกิดความคลาดเคลื่อน เพราะฉะนั้นเราต้องรายงานค่าความเชื่อมั่น โดยมีสูตรการคำนวณ ดังต่อไปนี้

$$s_{y/x} = \left\{ \frac{\sum i(yi - \hat{y}_i)^2}{n-2} \right\}^{1/2} \quad \text{.....(1)}$$

คำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความชัน(s_b)จากสูตรต่อไปนี้

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\left\{ \sum i(x_i - \bar{x})^2 \right\}^{1/2}} \quad \text{.....(2)}$$

ดังนั้น ช่วงความเชื่อมั่นของความชัน คือ b $\pm$ t s_b (เมื่อ t-value เลือกที่ระดับความมั่นใจ 95% และระดับขั้นความเสรีเท่ากับ n-2 ; 6-2 = 4 ซึ่งมีค่า = 2.78)

	x_i	x_i^2	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	y_i	$\hat{y}_i$	$\lvert y_i - \hat{y}_i \rvert$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
	0	0	-17.5	306.25	0	0	0	0
	5	25	-12.5	156.25	5575.2	5234	341.2	116417.44
	10	100	-7.5	56.25	11002.6	10468	534.6	285797.16
	20	400	2.5	6.25	21467.4	20936	531.4	282385.96
	30	900	12.5	156.25	31633.6	31404	229.6	52716.16
	40	1600	22.5	506.25	41255	41872	617	380689
ผลรวม	105	3025		1187.5	110933.8			1118005.7
ค่าเฉลี่ย	17.5							

$S_{y/x}$ = 528.68

S_b = 15.34

S_b*2.78 = 42.65

สมการเส้นตรง คือ y = 1046.8 X

โดยที่ b ± tsb ; 1046.8 ± 42.65

a = 0

การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยใช้ Residual analysis จากสูตร

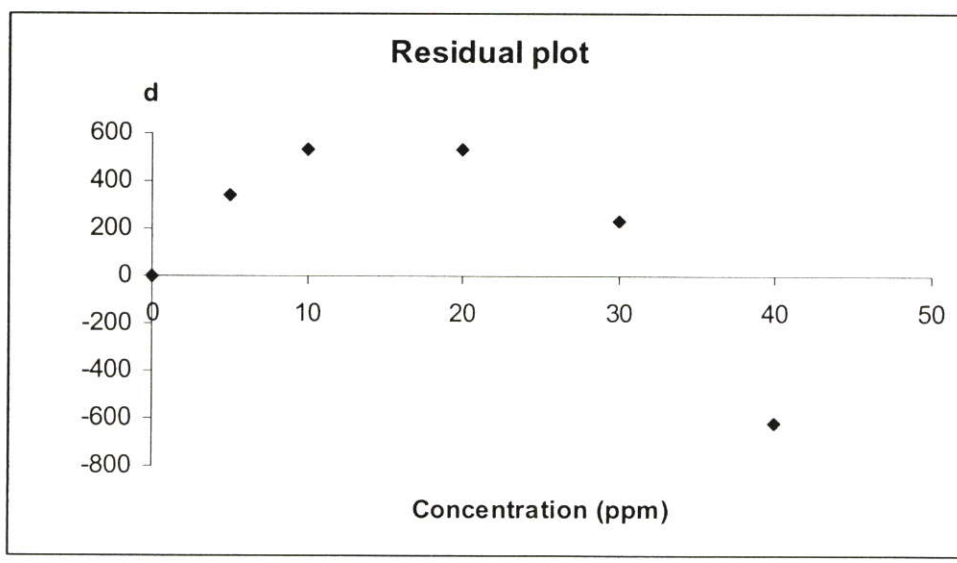
$$d_i = y_i - \hat{y}_i \qquad \text{.....(3)}$$

เมื่อ i = 1,....,n

y_i = ค่าที่ได้จากการทดลอง

$\hat{y}_i$ = ค่าที่ได้จากสมการเส้นตรง(Regression line; y = 1046.8x + 0)

x_i	y_i	$\hat{y}_i$	$y_i - \hat{y}_i$
0	0	0	0
5	5575.2	5234	341.2
10	11002.6	10468	534.6
20	21467.4	20936	531.4
30	31633.6	31404	229.6
40	41255	41872	-617



รูปที่ ข.3 แสดง Residual plot ของสารละลายมาตรฐานคลอเฟนิรามีน มาลีเอท

จากรูปที่ ข.3 พบว่า residual (d_i) มีการกระจายตัวแบบปกติ หมายความว่ากราฟมาตรฐานนี้มีความเป็นเส้นตรงที่ยอมรับได้ในช่วงความเข้มข้น 5 - 40 ppm

ข.2 การคำนวณค่า System linearity ของสารละลายมาตรฐานฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์

ตารางที่ ข.2 แสดงผลการศึกษา System linearity ของสารละลายมาตรฐานฟีนิลเอฟพริน ไฮโดร-คลอไรด์

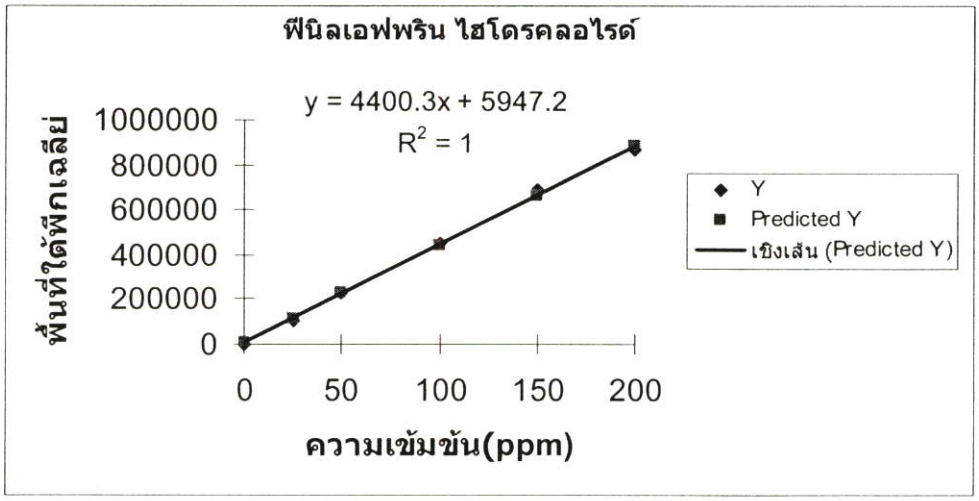
ความเข้มข้น(ppm)	พื้นที่ใต้พีกเฉลี่ย
0	0 ± 0
25	110014 ± 857
50	231051 ± 3465
100	447163 ± 3874
150	692946 ± 4015
200	864677 ± 6607

หมายเหตุ n = 5

Regression Statistics	
Multiple R	0.998888944
R Square	0.997779122
Adjusted R Square	0.997223902
Standard Error	17884.88497
Observations	6

	Coefficients	*Standard Error*	*t Stat*	*P-value*	*Lower 95%*
Intercept	5947.247719	11653.5007	0.510340015	0.636685927	-26408.12426
X Variable 1	4400.319074	103.8004743	42.39209026	1.85098E-06	4112.122158

Upper 95%	*Lower 95.0%*	*Upper 95.0%*
38302.6197	-26408.12426	38302.6197
4688.515989	4112.122158	4688.515989



รูปที่ ข.4 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ อันดับที่1

จากข้อมูลข้างต้นได้สมการเส้นตรง คือ y = 4400.3X + 5947.2

จากนั้นพิสูจน์ว่า จุดตัดแกน y (a) มีค่าแตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญหรือไม่โดยใช้ t-test

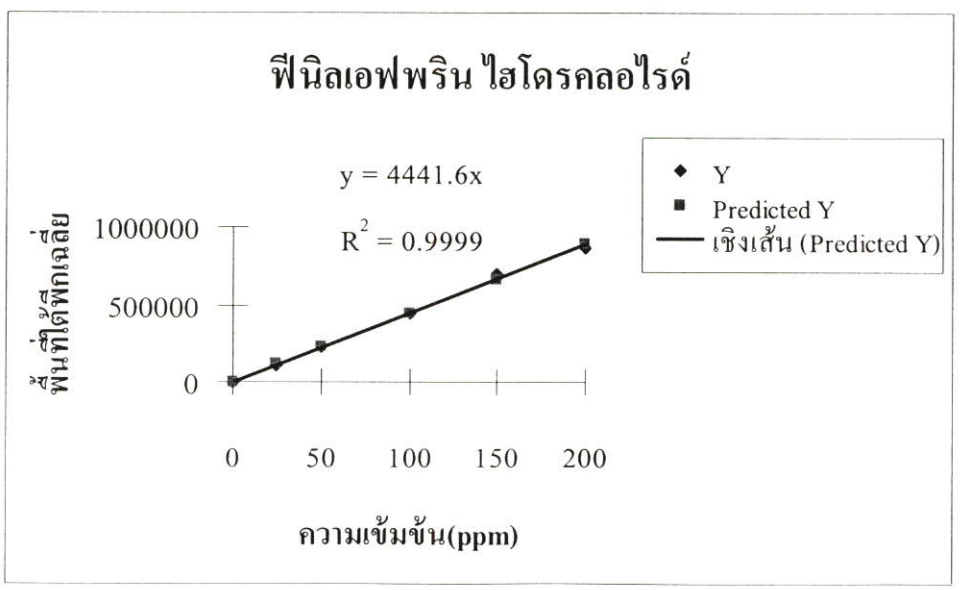
ซึ่งมีสูตรดังนี้ $t_{cal} = (a) / sa$; $t_{cal} = (5947.2) / (11653.5) = \left| 0.51 \right|$

โดยค่า t จากตาราง($t_{critical}$) ที่ระดับขั้นความเสรี(degree of freedom;d.f (n-2); 6- 2 = 4)

ที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่า = 2.78

จะเห็นได้ว่าค่า $t_{cal} < t_{crit}$ หมายความว่า จุดตัดแกน y (a) ไม่แตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญ

เพราะฉะนั้นค่า a จะไม่อยู่ในสมการเส้นตรง จะได้สมการเส้นตรงเป็น y = 4441.6 X



รูปที่ ข.5 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ อันดับที่2

ซึ่งค่าความชัน(b)อาจจะเกิดความคลาดเคลื่อน เพราะฉะนั้นเราต้องรายงานค่าความเชื่อมั่น โดยมีสูตรการคำนวณ ดังต่อไปนี้

$$s_{y/x} = \left\{ \frac{\sum i(yi - \hat{y}_i)^2}{n-2} \right\}^{1/2}$$

คำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความชัน(s_b) จากสูตรต่อไปนี้

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\left\{ \sum i(x_i - \bar{x})^2 \right\}^{1/2}}$$

ดังนั้น ช่วงความเชื่อมั่นของความชัน คือ b $\pm$ t s_b (เมื่อ t-value เลือกที่ระดับความมั่นใจ 95% และระดับขั้นความเสรีเท่ากับ n-2; ซึ่งมีค่า = 2.78)

	x_i	x_i^2	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	y_i	$\hat{y}_i$	$\lvert y_i - \hat{y}_i \rvert$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
	0	0	-87.5	7656.25	0	0	0	0
	25	625	-62.5	3906.25	110014.2	111040	1025.8	1052265.6
	50	2500	-37.5	1406.25	231051.4	222080	8971.4	80486018.0
	100	10000	12.5	156.25	447162.6	444160	3002.6	9015606.8
	150	22500	62.5	3906.25	692946.2	666240	26706.2	713221118.4
	200	40000	112.5	12656.25	864676.6	888320	23643.4	559010363.6
ผลรวม	525	75625		29687.5	2345851			1362785372
ค่าเฉลี่ย	87.5							

$S_{y/x}$ = 18457.96

S_b = 107.13

S_b*2.78 = 297.81

สมการเส้นตรง คือ y = 4441.6 X

โดยที่ b $\pm$ tS_b ; 4441.6 $\pm$ 297.81

a = 0

การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยใช้ Residual analysis จากสูตร

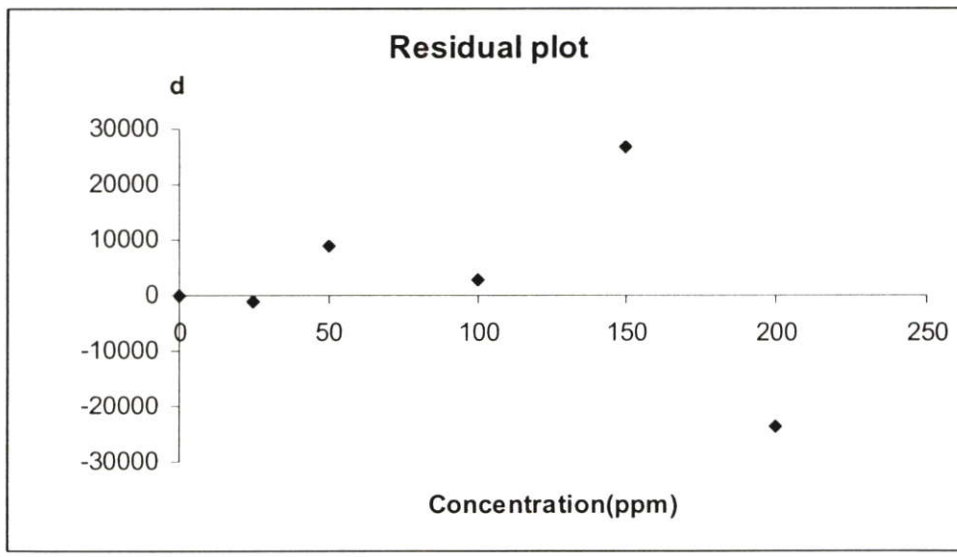
$$d_i = y_i - \hat{y}_i$$

เมื่อ i = 1,....,n

y_i = ค่าที่ได้จากการทดลอง

$\hat{y}_i$ = ค่าที่ได้จากสมการเส้นตรง(Regression line; y = 4441.6 X)

x_i	y_i	$\hat{y}_i$	$y_i - \hat{y}_i$
0	0	0	0
25	110014.2	111040	-1025.8
50	231051.4	222080	8971.4
100	447162.6	444160	3002.6
150	692946.2	666240	26706.2
200	864676.6	888320	-23643.4



รูปที่ ข.6 แสดง Residual plot ของสารละลายมาตรฐานฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์

จากรูปที่ ข.6 พบว่า residual (d_i) มีการกระจายตัวแบบปกติ หมายความว่า กราฟมาตรฐานนี้มีความเป็นเส้นตรงที่ยอมรับได้ในช่วงความเข้มข้น 25 - 200 ppm

ข.3 การคำนวณค่า System linearity ของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล

ตารางที่ ข.3 แสดงผลการศึกษา System linearity ของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล

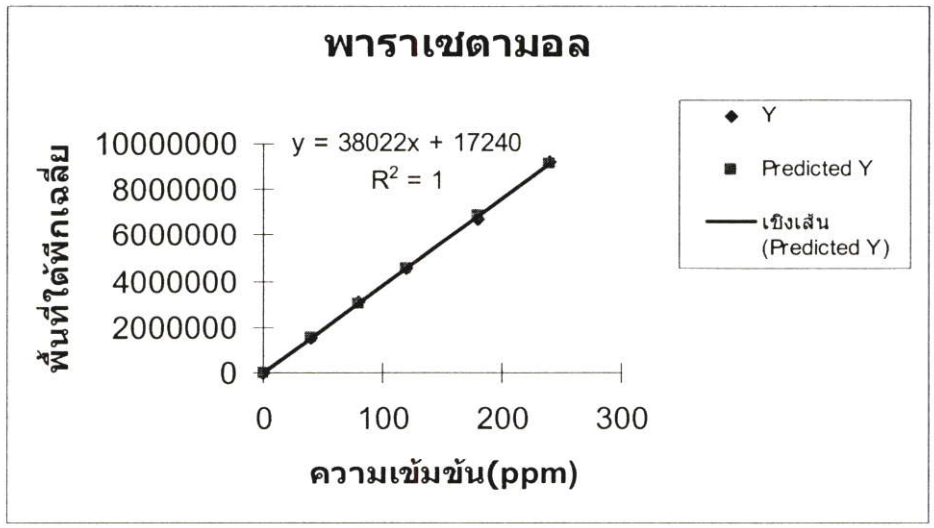
ความเข้มข้น(ppm)	พื้นที่ใต้พีกเฉลี่ย
0	0 ± 0
40	1515752 ± 11045
80	3133189 ± 20003
120	4601557 ± 52652
180	6763559 ± 51204
240	9183931 ± 93637

หมายเหตุ n = 5

Regression Statistics	
Multiple R	0.999843444
R Square	0.999686912
Adjusted R Square	0.99960864
Standard Error	67119.45075
Observations	6

	Coefficients	*Standard Error*	*t Stat*	*P-value*	*Lower 95%*
Intercept	17239.65427	46048.38341	0.374381314	0.7271223	-110611.4193
X Variable 1	38022.04769	336.4394063	113.0130626	3.67629E-08	37087.94021

Upper 95%	*Lower 95.0%*	*Upper 95.0%*
145090.7278	-110611.4193	145090.7278
38956.15517	37087.94021	38956.15517



รูปที่ ข.7 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล อันดับที่ 1

จากข้อมูลข้างต้นได้สมการเส้นตรง คือ y = 38022X + 17240

จากนั้นพิสูจน์ว่า จุดตัดแกน y (a) มีค่าแตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญหรือไม่โดยใช้ t-test

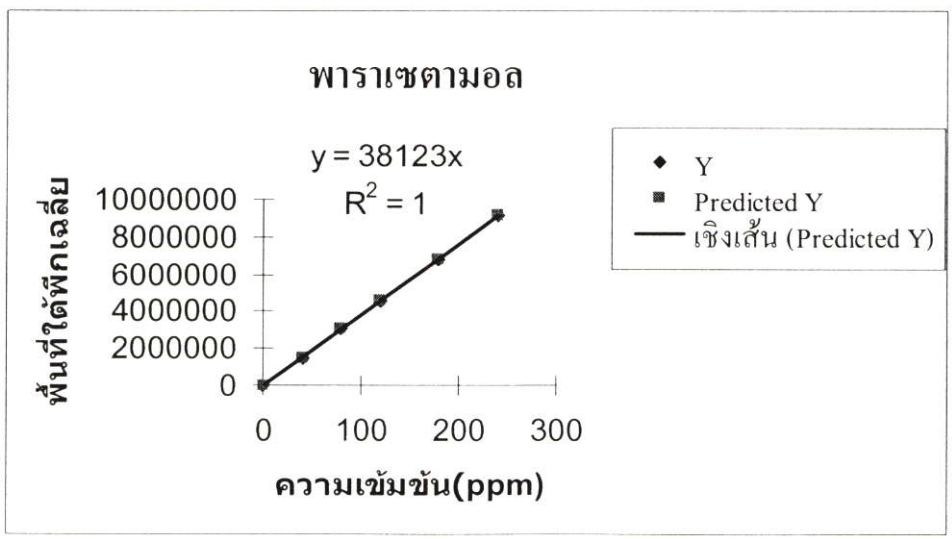
ซึ่งมีสูตรดังนี้ t_{cal} = (a) / sa ; t_{cal} = (17240) / (46048.4) = $\left| 0.37 \right|$

โดยค่า t จากตาราง($t_{critical}$) ที่ระดับขั้นความเสรี(degree of freedom;d.f (n-2);6-2 = 4)

ที่ระดับความมั่นใจ 95% = 2.78

จะเห็นได้ว่าค่า $t_{cal} < t_{crit}$ หมายความว่า จุดตัดแกน y (a) ไม่แตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญ

เพราะฉนั้นค่า a จะไม่อยู่ในสมการเส้นตรง จะได้สมการเส้นตรงเป็น y = 38123 X



รูปที่ ข.8 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลอันดับที่ 2

ซึ่งค่าความชัน(b)อาจจะเกิดความคลาดเคลื่อน เพราะฉะนั้นเราต้องรายงานค่าความเชื่อมั่น โดยมีสูตรการคำนวณ ดังต่อไปนี้

$$s_{y/x} = \left\{ \frac{\sum i(yi - \hat{y}_i)^2}{n-2} \right\}^{1/2}$$

คำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความชัน(s_b) จากสูตรต่อไปนี้

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\left\{ \sum i(x_i - \bar{x})^2 \right\}^{1/2}}$$

ดังนั้น ช่วงความเชื่อมั่นของความชัน คือ $b \pm t\ s_b$ (เมื่อ t-value เลือกที่ระดับความมั่นใจ 95% และระดับขั้นความเสรีเท่ากับ n-2; ซึ่งมีค่า = 2.78)

	x_i	x_i^2	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	y_i	$\hat{y}_i$	$\lvert y_i - \hat{y}_i \rvert$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
	0	0	-110	12100	0	0	0	0
	40	1600	-70	4900	1515752	1524920	9168	84052224.0
	80	6400	-30	900	3133189	3049840	83349.2	6947089140.6
	120	14400	10	100	4601557	4574760	26797.4	718100646.8
	180	32400	70	4900	6763559	6862140	98580.6	9718134696
	240	57600	130	16900	9183931	9149520	34411.4	1184144450
ผลรวม	660	112400		39800	25197989			18651521158
ค่าเฉลี่ย	110							

$S_{y/x}$ = 68285.29

S_b = 342.28

S_b*2.78 = 951.55

สมการเส้นตรง คือ y = 38123 X

โดยที่ $b \pm tS_b$; 38123 ± 951.55

a = 0

การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยใช้ Residual analysis จากสูตร

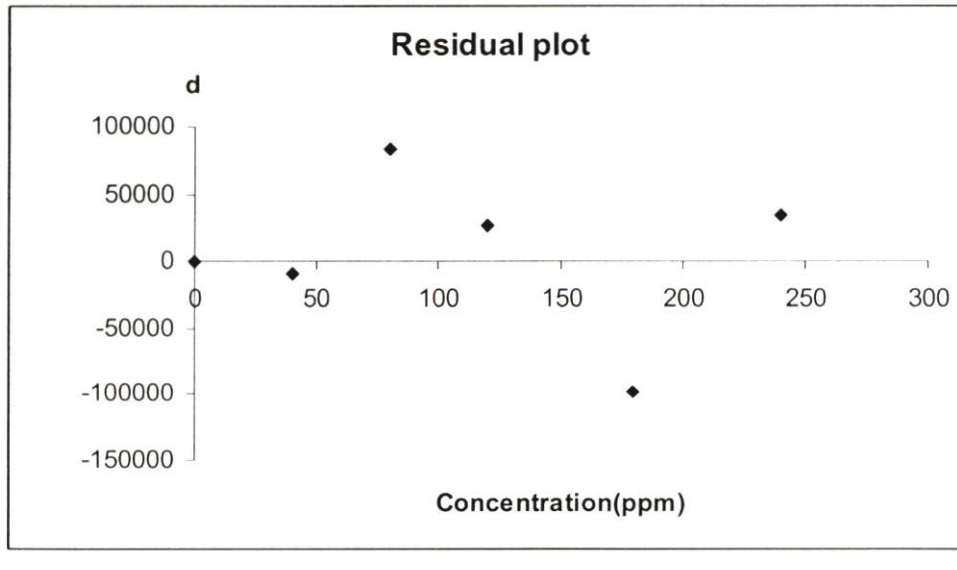
$$d_i = y_i - \hat{y}_i$$

เมื่อ i = 1,....,n

y_i = ค่าที่ได้จากการทดลอง

$\hat{y}_i$ = ค่าที่ได้จากสมการเส้นตรง(Regression line; y = 38123 X)

x_i	y_i	$\hat{y}_i$	$y_i - \hat{y}_i$
0	0	0	0
40	1515752	1524920	-9168
80	3133189.2	3049840	83349.2
120	4601557.4	4574760	26797.4
180	6763559.4	6862140	-98580.6
240	9183931.4	9149520	34411.4



รูปที่ ข.9 แสดง Residual plot ของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล

จากรูปที่ ข.9 พบว่า residual (d_i) มีการกระจายตัวแบบปกติ หมายความว่ากราฟมาตรฐานนี้มีความเป็นเส้นตรงที่ยอมรับได้ในช่วงความเข้มข้น 40 - 240 ppm

ภาคผนวก ค

การคำนวณค่าความเป็นเส้นตรง(Method Linearity)

ค.1 การคำนวณค่า Method linearity ของตัวอย่างที่ถูกเติม(spiked)ด้วยสารละลายมาตรฐานคลอเฟนิรามีน มาลีเอท

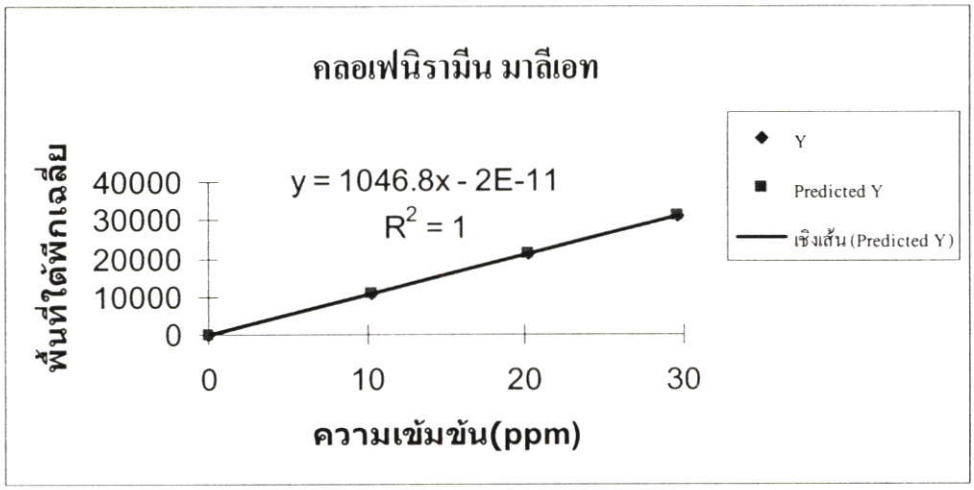
ตารางที่ ค.1 แสดงผลการศึกษา Method linearity ของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานคลอเฟนิรามีน มาลีเอท

ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานคลอเฟนิรามีน มาลีเอท (ppm)	พื้นที่ใต้พีกเฉลี่ย
0	0 ± 0
10	10745 ± 258
20	21166 ± 362
30	31015 ± 696

หมายเหตุ n = 6

Regression Statistics	
Multiple R	1
R Square	1
Adjusted R Square	1
Standard Error	1.03544E-11
Observations	4

	Coefficients	*Standard Error*	*t Stat*	*P-value*	*Lower 95%*
Intercept	-1.16197E-11	8.73811E-12	-1.32977608	0.314976411	-4.92168E-11
X Variable 1	1046.8	4.68405E-13	2.2348E+15	2.00224E-31	1046.8
	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%		
	2.59774E-11	-4.92168E-11	2.5977E-11		
	1046.8	1046.8	1046.8		



รูปที่ ค.1 แสดงกราฟมาตรฐานของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานคลอเฟนิรามีน มาลีเอท อันดับที่ 1

จากข้อมูลข้างต้นได้สมการเส้นตรง คือ y = 1046.8 X - 2E-11

จากนั้นพิสูจน์ว่า จุดตัดแกน y (a) มีค่าแตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญหรือไม่โดยใช้ t-test

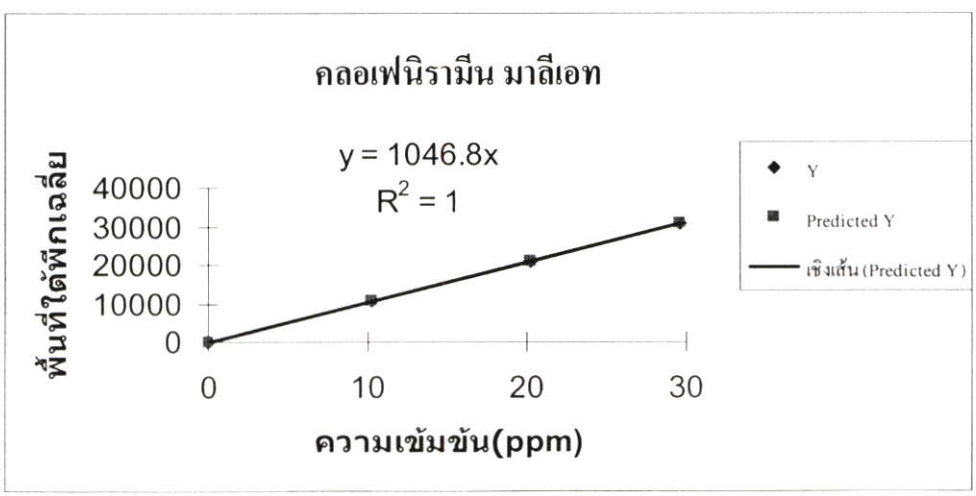
ซึ่งมีสูตรดังนี้ $t_{cal} = (a) / sa$; $t_{cal} = (-2E-11) / (8.7E-12) = \left| -1.33 \right|$

โดยค่า t จากตาราง(t critical) ที่ระดับขั้นความเสรี(degree of freedom;d.f (n-2); 4-2 = 2)

ที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่า = 4.30

จะเห็นได้ว่าค่า $t_{cal} < t_{crit}$ หมายความว่า จุดตัดแกน y (a) ไม่แตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญ

เพราะฉะนั้นค่า a จะไม่อยู่ในสมการเส้นตรง จะได้สมการเส้นตรงเป็น y = 1046.8x



รูปที่ ค.2 แสดงกราฟมาตรฐานของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานคลอเฟนิรามีน มาลีเอท อันดับที่ 2

ซึ่งค่าความชัน(b)อาจจะเกิดความคลาดเคลื่อน เพราะฉะนั้นเราต้องรายงานค่าความเชื่อมั่น โดยมีสูตรการคำนวณ ดังต่อไปนี้

$$s_{y/x} = \left\{ \frac{\sum i(yi - \hat{y}_i)^2}{n-2} \right\}^{1/2}$$

คำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความชัน(s_b) จากสูตรต่อไปนี้

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\left\{ \sum i(x_i - \bar{x})^2 \right\}^{1/2}}$$

ดังนั้น ช่วงความเชื่อมั่นของความชัน คือ b $\pm$ t s_b (เมื่อ t-value เลือกที่ระดับความมั่นใจ 95% และระดับขั้นความเสรีเท่ากับ n-2; 4-2 = 2 ; ซึ่งมีค่า = 4.30)

	x_i	x_i^2	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	y_i	$\hat{y}_i$	$\lvert y_i - \hat{y}_i \rvert$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
	0	0	-15.03	225.85	0	0	0	0
	10	105.4	-5	22.69	10745	10744.83	0	0
	20	408.8	5	26.95	21166	21165.83	0	0
	30	877.9	15	213.17	31015	31015.17	0	0
ผลรวม	60.11			488.66				0
ค่าเฉลี่ย	15.03							

$S_{y/x}$ = 0

S_b = 0

S_b*4.30 = 0

สมการเส้นตรง คือ y = 1046.8x

โดยที่ b $\pm$ tS_b ; 1046.8 $\pm$ 0

a = 0

การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยใช้ Residual analysis จากสูตร

$$d_i = y_i - \hat{y}_i$$

เมื่อ i = 1,....,n

y_i = ค่าที่ได้จากการทดลอง

$\hat{y}_i$ = ค่าที่ได้จากสมการเส้นตรง(Regression line; y = 1046.8x)

x_i	y_i	$\hat{y}_i$	$y_i - \hat{y}_i$
0	0	0	0
10	10745	10745	0
20	21166	21166	0
30	31015	31015	0

จากการคำนวณข้างต้นพบว่า residual (d_i) มีค่าเป็น 0 หมายความว่ากราฟมาตรฐานนี้มีความเป็นเส้นตรงที่ยอมรับได้ในช่วงความเข้มข้น 10-30 ppm และแสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ผลการทดสอบเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่มีอยู่จริงในตัวอย่างเมตริกซ์(Matrix) ในตัวอย่างจริงไม่รบกวนผลการวิเคราะห์

ค.2 การคำนวณค่า Method linearity ของตัวอย่างที่ถูกเติม(spiked)ด้วยสารละลายมาตรฐานฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์

ตารางที่ ค.2 แสดงผลการศึกษา Method linearity ของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์

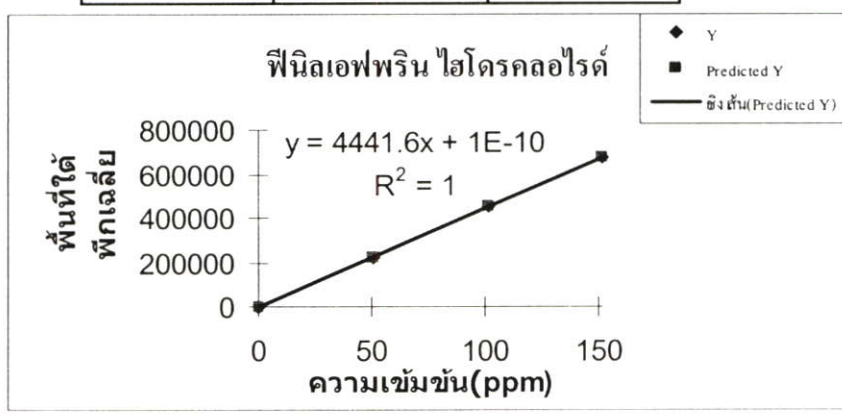
ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ (ppm)	พื้นที่ใต้พีกเฉลี่ย
0	0 ± 0
51	226556 ± 2548
101	450812 ± 6861
152	675680 ± 12518

หมายเหตุ n = 6

Regression Statistics	
Multiple R	1
R Square	1
Adjusted R Square	1
Standard Error	1.77267E-10
Observations	4

	Coefficients	*Standard Error*	*t Stat*	*P-value*	*Lower 95%*
Intercept	1.95662E-10	1.48473E-10	1.317830321	0.3182632	-4.43165E-10
X Variable 1	4441.6	1.56405E-12	2.83981E+15	1.24E-31	4441.6

Upper 95%	*Lower 95.0%*	*Upper 95.0%*
8.34489E-10	-4.43165E-10	8.34489E-10
4441.6	4441.6	4441.6



รูปที่ ค.4 แสดงกราฟมาตรฐานของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ อันดับที่ 1

จากข้อมูลข้างต้นได้สมการเส้นตรง คือ y = 4441.6 X + 1E-10

จากนั้นพิสูจน์ว่า จุดตัดแกน y (a) มีค่าแตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญหรือไม่โดยใช้ t-test

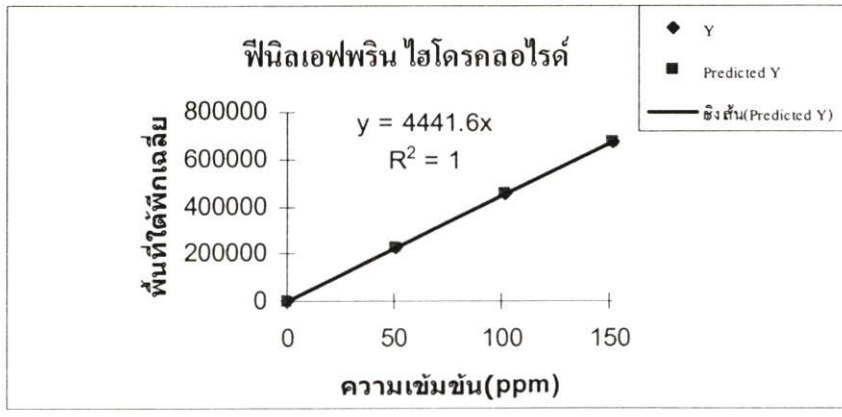
ซึ่งมีสูตรดังนี้ t_{cal} = (a) / sa ; t_{cal} = (1E-10) / (1.48E-10) = | 1.32 |

โดยค่า t จากตาราง(t critical) ที่ระดับขั้นความเสรี(degree of freedom;d.f (n-2);2)

ที่ระดับความมั่นใจ 95% = 4.30

จะเห็นได้ว่าค่า $t_{cal} < t_{crit}$ หมายความว่า จุดตัดแกน y (a) ไม่แตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญ

เพราะฉะนั้นค่า a จะไม่อยู่ในสมการเส้นตรง จะได้สมการเส้นตรงเป็น y = 4441.6 X



รูปที่ ค.5 แสดงกราฟมาตรฐานของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ อันดับที่ 2

ซึ่งค่าความชัน(b)อาจจะเกิดความคลาดเคลื่อน เพราะฉะนั้นเราต้องรายงานค่าความเชื่อมั่น โดยมีสูตรการคำนวณ ดังต่อไปนี้

$$s_{y/x} = \left\{ \frac{\sum i(yi - \hat{y}_i)^2}{n-2} \right\}^{1/2}$$

คำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความชัน(s_b) จากสูตรต่อไปนี้

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\left\{ \sum i(x_i - \bar{x})^2 \right\}^{1/2}}$$

ดังนั้น ช่วงความเชื่อมั่นของความชัน คือ $b \pm t\ s_b$ (เมื่อ t-value เลือกที่ระดับความมั่นใจ 95% และระดับขั้นความเสรีเท่ากับ n-2; 4-2 = 2 ; ซึ่งมีค่า = 4.30)

	x_i	x_i^2	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	y_i	$\hat{y}_i$	$\lvert y_i - \hat{y}_i \rvert$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
	0	0	-76	5800	0	0	0	0
	51	2602	-25	633	226556	226556	0	0
	101	10302	25	642	450812	450812	0	0
	152	23142	76	5771	675680	675680	0	0
ผลรวม	304.63			12845.73				0
ค่าเฉลี่ย	76.16							

$S_{y/x}$ = 0

S_b = 0

S_b*4.30 = 0

สมการเส้นตรง คือ y = 4441.6 x

โดยที่ b ± tS_b ; 4441.6 ± 0

a = 0

การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยใช้ Residual analysis จากสูตร

$$d_i = y_i - \hat{y}_i$$

เมื่อ i = 1,….,n

y_i = ค่าที่ได้จากการทดลอง

$\hat{y}_i$ = ค่าที่ได้จากสมการเส้นตรง(Regression line; y = 4441.6 x)

x_i	y_i	$\hat{y}_i$	$y_i - \hat{y}_i$
0	0	0	0
51	226556	226556	0
101	450812	450812	0
152	675680	675680	0

จากการคำนวณข้างต้นพบว่า residual (d_i) มีค่าเป็น 0 หมายความว่า กราฟมาตรฐานนี้มีความเป็นเส้นตรงที่ยอมรับได้ในช่วงความเข้มข้น 51 – 152 ppm และแสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ผลการทดสอบเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่มีอยู่จริงในตัวอย่าง เมตริกซ์(Matrix) ในตัวอย่างจริงไม่รบกวนผลการวิเคราะห์

ค.3 การคำนวณค่า Method linearity ของตัวอย่างที่ถูกเติม(spiked)ด้วยสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล

ตารางที่ ค.3 แสดงผลการศึกษา Method linearity ของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล

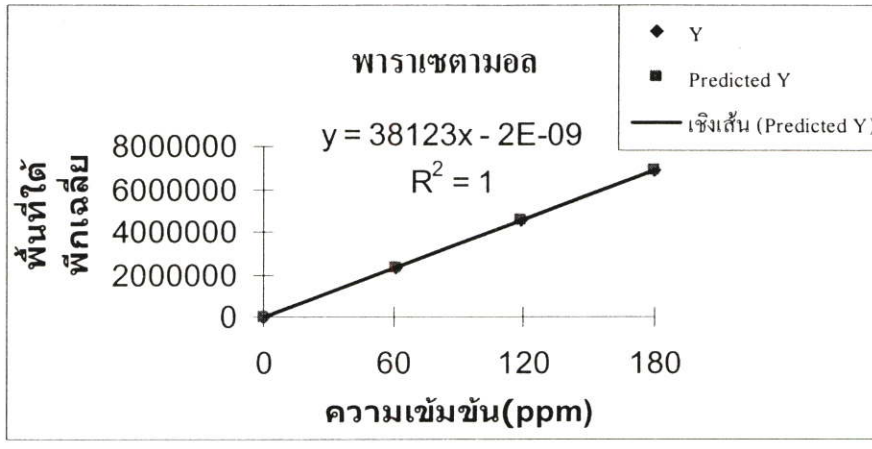
ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล (ppm)	พื้นที่ใต้พีกเฉลี่ย
0	0 ± 0
61	2318169 ± 25333
119	4544532 ± 33287
180	6879220 ± 56259

หมายเหตุ n = 6

Regression Statistics	
Multiple R	1
R Square	1
Adjusted R Square	1
Standard Error	1.31997E-09
Observations	4

	Coefficients	*Standard Error*	*t Stat*	*P-value*	*Lower 95%*
Intercept	1.32285E-09	1.10556E-09	1.196544874	0.35408839	-3.43398E-09
X Variable 1	38123	9.8423E-12	3.87338E+15	6.66529E-32	38123

Upper 95%	*Lower 95.0%*	*Upper 95.0%*
6.07967E-09	-3.43398E-09	6.07967E-09
38123	38123	38123



รูปที่ ค.7 แสดงกราฟมาตรฐานของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล อันดับที่ 1

จากข้อมูลข้างต้นได้สมการเส้นตรง คือ y = 38123 X - 2E-09

จากนั้นพิสูจน์ว่า จุดตัดแกน y (a) มีค่าแตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญหรือไม่โดยใช้ t-test

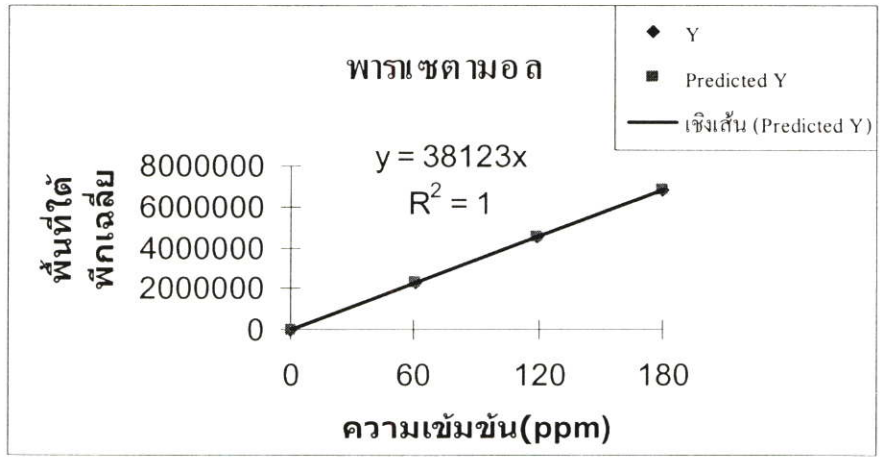
ซึ่งมีสูตรดังนี้ t_{cal} = (a) / sa ; t_{cal} = (-2E-09) / (1.11E-09) = | 1.20 |

โดยค่า t จากตาราง(t critical) ที่ระดับขั้นความเสรี(degree of freedom;d.f (n-2);2)

ที่ระดับความมั่นใจ 95% = 4.30

จะเห็นได้ว่าค่า $t_{cal} < t_{crit}$ หมายความว่า จุดตัดแกน y (a) ไม่แตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญ

เพราะฉะนั้นค่า a จะไม่อยู่ในสมการเส้นตรง จะได้สมการเส้นตรงเป็น y = 38123 X + 0



รูปที่ ค.8 แสดงกราฟมาตรฐานของตัวอย่างที่ถูกเติมด้วยสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล อันดับที่ 2

ซึ่งค่าความชัน(b)อาจจะเกิดความคลาดเคลื่อน เพราะฉะนั้นเราต้องรายงานค่าความเชื่อมั่น โดยมีสูตรการคำนวณ ดังต่อไปนี้

$$s_{y/x} = \left\{ \frac{\sum i(yi - \hat{y}_i)^2}{n-2} \right\}^{1/2}$$

คำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความชัน(s_b) จากสูตรต่อไปนี้

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\left\{ \sum i(x_i - \bar{x})^2 \right\}^{1/2}}$$

ดังนั้น ช่วงความเชื่อมั่นของความชัน คือ $b \pm t\ s_b$ (เมื่อ t-value เลือกที่ระดับความมั่นใจ 95% และระดับขั้นความเสรีเท่ากับ n-2; 4-2 = 2 ; ซึ่งมีค่า = 4.30)

	x_i	x_i^2	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	y_i	$\hat{y}_i$	$\lvert y_i - \hat{y}_i \rvert$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
	0	0	-90	8121	0	0	0	0
	61	3698	-29	859	2318169	2318169	0	0
	119	14210	29	846	4544532	4544532	0	0
	180	32561	90	8160	6879220	6879220	0	0
ผลรวม	360.46			17986				0
ค่าเฉลี่ย	90.12							

$S_{y/x}$ = 0

S_b = 0

S_b*4.30 = 0

สมการเส้นตรง คือ y = 38123 x

โดยที่ $b \pm tS_b$; 38123 ± 0

a = 0

การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยใช้ Residual analysis จากสูตร

$$d_i = y_i - \hat{y}_i$$

เมื่อ i = 1,….,n

y_i = ค่าที่ได้จากการทดลอง

$\hat{y}_i$ = ค่าที่ได้จากสมการเส้นตรง(Regression line; y = 38123 x)

x_i	y_i	$\hat{y}_i$	$y_i - \hat{y}_i$
0	0	0	0
61	2318169	2318169	0
119	4544532	4544532	0
180	6879220	6879220	0

จากการคำนวณข้างต้นพบว่า residual (d_i) มีค่าเป็น 0 หมายความว่ากราฟมาตรฐานนี้มีความเป็นเส้นตรงที่ยอมรับได้ในช่วงความเข้มข้น 51 – 152 ppm และแสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ผลการทดสอบเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่มีอยู่จริงในตัวอย่าง เมตริกซ์(Matrix) ในตัวอย่างจริงไม่รบกวนผลการวิเคราะห์

ภาคผนวก ง

การคำนวณค่า LOD และ estimated LOQ

ง.1 การคำนวณค่า LOD และ estimated LOQ ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท

สามารถหาได้จากข้อมูลการทำ system linearity

LOD หาได้จากสูตร

$$y = y_B + 3s_B \qquad \text{.....(1)}$$

โดยที่ $y_B = a$; = 0

$s_B = s_{y/x}$; = 528.68

แทนค่าลงในสมการที่ 1 จะได้ว่า

y = 0 + (3 x 528.68)

= 1586.04

จากนั้นนำค่า y ที่ได้ไปแทนค่าในสมการเส้นตรงที่ได้จากการทำ system linearity

$$y = 1046.8\,x \qquad \text{.....(2)}$$

$$x = \frac{1586.04}{1046.8}$$

= 1.52 ppm

LOQ หาได้จากสูตร

$$y = y_B + 10s_B \qquad \text{.....(3)}$$

โดยที่ $y_B = a$; = 0

$s_B = s_{y/x}$; = 528.68

แทนค่าลงในสมการที่ 3 จะได้ว่า

$$y = 0 + (10 \times 528.68)$$

$$= 5286.8$$

จากนั้นนำค่า y ที่ได้ไปแทนค่าในสมการเส้นตรงที่ได้จากการทำ system linearity

$$y = 1046.8\ x$$

$$x = \frac{5286.8}{1046.8}$$

$$= 5.05 \text{ ppm}$$

ค.2 การคำนวณค่า LOD และ estimated LOQของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์

LOD หาได้จากสูตร

$$y = y_B + 3s_B$$

โดยที่ $y_B = a$; = 0

$s_B = s_{y\ x}$; = 18457.96

แทนค่าลงในสมการข้างต้น จะได้ว่า

$$y = 0 + (3 \times 18457.96)$$

$$= 55373.88$$

จากนั้นนำค่า y ที่ได้ไปแทนค่าในสมการเส้นตรงที่ได้จากการทำ system linearity

$$y = 4441.6\ x \qquad \text{.....(4)}$$

$$x = \frac{55373.88}{4441.6}$$

= 12.47 ppm

LOQ หาได้จากสูตร

$$y = y_B + 10s_B$$

โดยที่ $y_B = a$; = 0

$s_B = s_{y/x}$; = 18457.96

แทนค่าลงในสมการ จะได้ว่า

y = 0 + (10 x 18457.96)

= 184579.6

จากนั้นนำค่า y ที่ได้ไปแทนค่าในสมการเส้นตรงที่ได้จากการทำ system linearity

y = 4441.6 x

$$x = \frac{184579.6}{4441.6}$$

= 41.56 ppm

ค.3 การคำนวณค่า LOD และ estimated LOQ ของพาราเซตามอล

LOD หาได้จากสูตร

$$y = y_B + 3s_B$$

โดยที่ $y_B = a$; = 0

$s_B = s_{y/x}$; = 68285.29

แทนค่าลงในสมการจะได้ว่า

$$y = 0 + (3 \times 68285.29)$$

$$= 204855.87$$

จากนั้นนำค่า y ที่ได้ไปแทนค่าในสมการเส้นตรงที่ได้จากการทำ system linearity

$$y = 38123\,x \qquad \text{.....(5)}$$

$$x = \frac{204855.87}{38123}$$

$$= 5.37 \text{ ppm}$$

LOQ หาได้จากสูตร

$$y = y_B + 10 s_B$$

โดยที่ $y_B = a$; = 0

$s_B = s_{y/x}$; = 68285.29

แทนค่าลงในสมการ จะได้ว่า

$$y = 0 + (10 \times 68285.29)$$

$$= 682852.9$$

จากนั้นนำค่า y ที่ได้ไปแทนค่าในสมการเส้นตรงที่ได้จากการทำ system linearity

$$y = 38123\,x$$

$$x = \frac{682852.9}{38123}$$

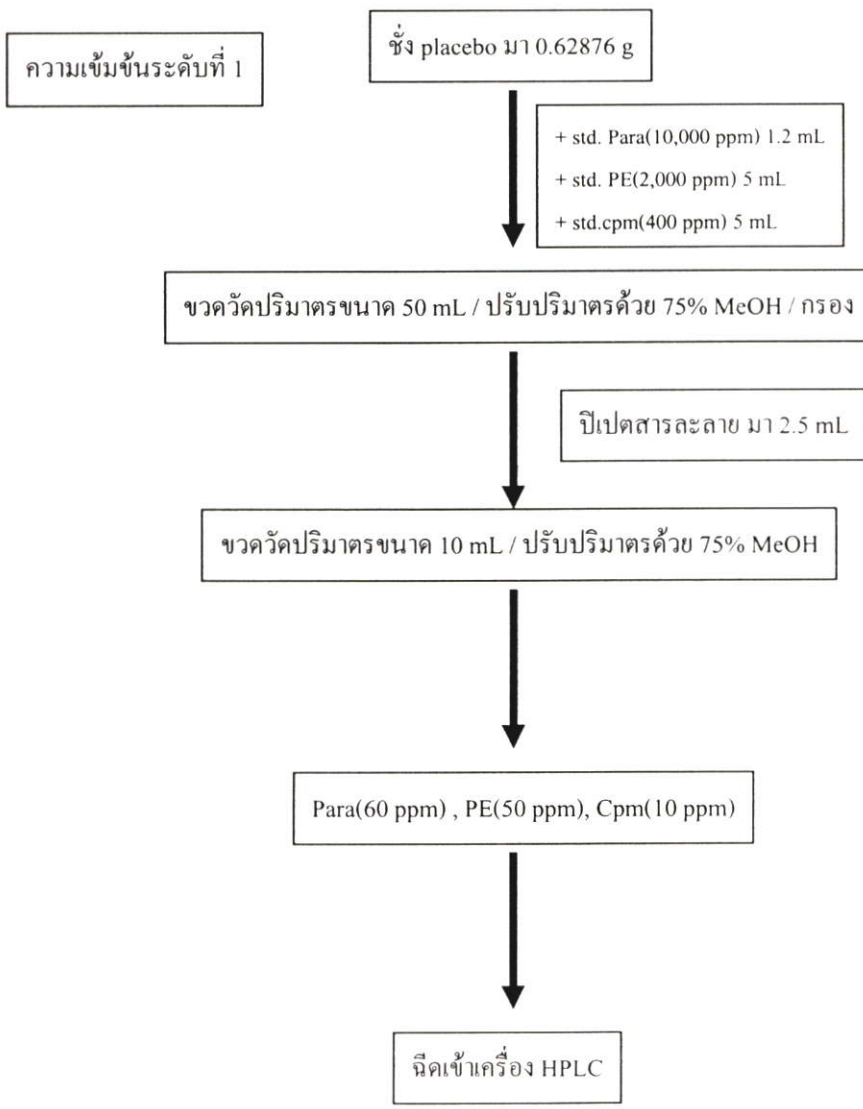
$$= 17.91 \text{ ppm}$$

ภาคผนวก จ

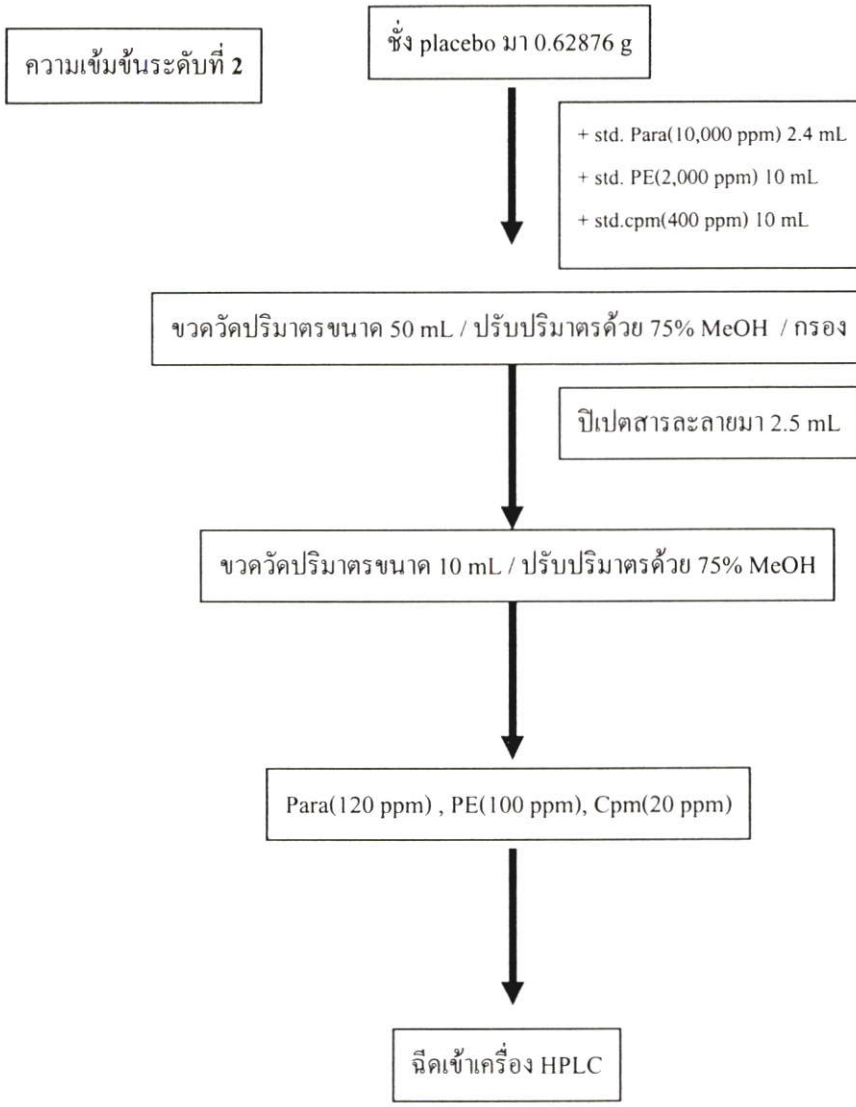
การคำนวณค่าความถูกต้อง(Accuracy)และความเที่ยง(Precision)

ค่าความถูกต้อง คือการแสดงความใกล้ของค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์ ที่ได้จากวิธีที่ศึกษากับค่าอ้างอิง

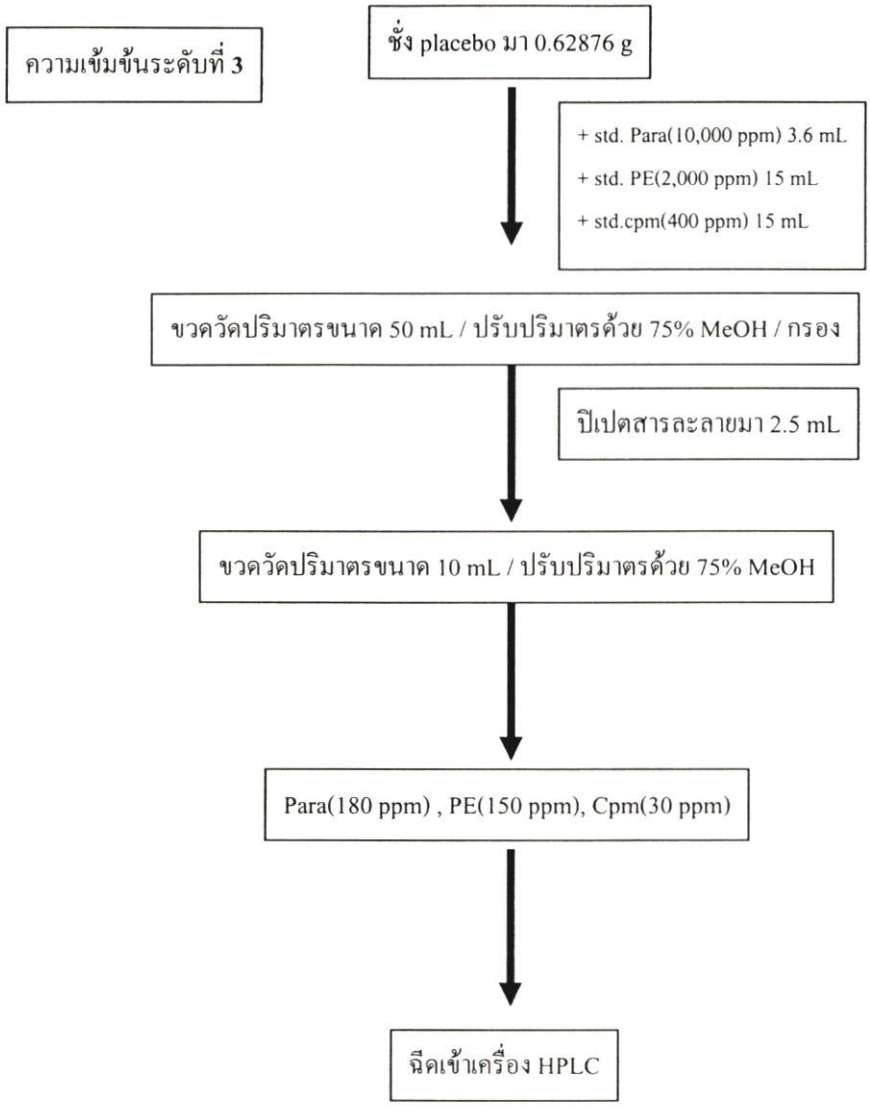
โดยการชั่งตัวอย่างจริงที่ไม่มีตัวยาสำคัญ(Placebo)มาเท่ากับ 0.62876 g เติมสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดลงไป ซึ่งสามารถแสดงวิธีการทดลองดังรูปที่ จ.1 จ.2 และ จ.3



รูปที่ จ.1 แสดงแผนผังการเตรียมตัวอย่างจริงที่เติมสารละลายมาตรฐานเพื่อใช้หาค่าความถูกต้องที่ความเข้มข้นระดับที่ 1



รูปที่ จ.2 แสดงแผนผังการเตรียมตัวอย่างจริงที่เติมสารละลายมาตรฐานเพื่อใช้หาค่าความถูกต้องที่ความเข้มข้นระดับที่ 2



รูปที่ จ.3 แสดงแผนผังการเตรียมตัวอย่างจริงที่เติมสารละลายมาตรฐานเพื่อใช้หาค่าความถูกต้องที่ความเข้มข้นระดับที่ 3

ซึ่งค่าความถูกต้อง หาได้จาก %Recovery โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{Recovery}(\%) = \frac{(C_1 - C_2) \times 100}{C_3} \qquad \text{.....(1)}$$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน

C_2 = ความเข้มข้นของตัวอย่าง(Unfortified sample)

C_3 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติม

ตารางที่ จ.1 แสดงเกณฑ์การยอมรับค่าความถูกต้อง(The AOAC manual for the Peer-Verified Methods Program, 1993)

Concentration of the analyst	Mean Recovery %
10-100%	98-102
≥ 1%(10,000 ppm)	97-103
≥ 0.1%(1,000 ppm)	95-105
100 ppm	90-107
100 ppb, 1 ppm, 10 ppm	80-110
10 ppb	60-115
1 ppb	40-120

ตารางที่ จ.2 แสดงเกณฑ์การยอมรับค่าความเที่ยง(The AOAC manual for the Peer-Verified Methods Program, 1993)

Concentration of the analyst	RSD%
100%	1.3
10%	2.8
1%	2.7
0.1%	3.7
100 ppm	5.3
10 ppm	7.3
1 ppm	11
100 ppb	15
10 ppb	21
1 ppb	30

จ.1 การคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท

ตารางที่ จ.3 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ที่ระดับความเข้มข้น 10 ppm

น.น.Placebo (g)	Area	Conc.from curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50mL (µg)	Conc. found (µg/g)	conc.added (µg)/g	%Recovery
0.62903	10461	9.99	99.93	1998.66	3177.37	3276.47	96.98
0.62842	10830	10.35	103.46	2069.16	3292.64	3279.65	100.40
0.62921	10571	10.10	100.98	2019.68	3209.86	3275.54	98.00
0.62911	10544	10.07	100.73	2014.52	3202.18	3276.06	97.74
0.62798	11103	10.61	106.07	2121.32	3378.01	3281.95	102.93
0.62894	10960	10.47	104.70	2094.00	3329.41	3276.94	101.60
mean	10745	10		**mean**	**3264.91**	**mean**	**99.61**
				sd	**80.44**	**sd**	**2.39**
				%RSD	**2.46**		

เกณฑ์กำหนด % Recovery เฉลี่ย อยู่ในช่วง 95-105 % ; %RSD 3.7 %

สรุป %Recovery เฉลี่ย และ %RSD ของการวิเคราะห์ซ้ำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้เป็นวิธีที่มีความถูกต้องและความเที่ยงที่ยอมรับได้

ตารางที่จ.4 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ที่ระดับความเข้มข้น 20 ppm

น.น.Placebo (g)	Area	Conc.from curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50mL (µg)	Conc. found (µg/g)	conc.added (µg)/g	%Recovery
0.62862	21350	20.40	203.95	4079.10	6488.97	6557.22	98.96
0.62913	21435	20.48	204.77	4095.34	6509.53	6551.91	99.35
0.62875	20959	20.02	200.22	4004.39	6368.82	6555.86	97.15
0.62856	21642	20.67	206.74	4134.89	6578.35	6557.85	100.31
0.62891	20898	19.96	199.64	3992.74	6348.67	6554.20	96.86
0.62932	20711	19.79	197.85	3957.01	6287.76	6549.93	96.00
mean	21166	20		**mean**	**6430.35**	**mean**	**98.11**
				sd	**111.71**	**sd**	**1.68**
				%RSD	**1.74**		

เกณฑ์กำหนด % Recovery เฉลี่ย อยู่ในช่วง 95-105 % ; %RSD 3.7 %

สรุป %Recovery เฉลี่ย และ %RSD ของการวิเคราะห์ซ้ำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้เป็นวิธีที่มีความถูกต้องและความเที่ยงที่ยอมรับได้

ตารางที่จ.5 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ที่ระดับความเข้มข้น 30 ppm

น.น.Placebo (g)	Area	Conc.from curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50mL (µg)	Conc. found (µg/g)	conc.added (µg)/g	%Recovery
0.62875	31909	30.48	304.82	6096.48	9696.20	9833.80	98.60
0.62845	31742	30.32	303.23	6064.58	9650.06	9838.49	98.08
0.62936	30866	29.49	294.86	5897.21	9370.17	9824.27	95.38
0.62928	30252	28.90	289.00	5779.90	9484.94	9825.51	96.53
0.62947	30317	28.96	289.62	5792.32	9201.90	9822.55	93.68
0.62874	31005	29.62	296.19	5923.77	9421.65	9833.95	95.81
mean	31015	30		**mean**	**9470.82**	**mean**	**96.35**
				sd	**183.30**	**sd**	**1.81**
				%RSD	**1.94**		

เกณฑ์กำหนด % Recovery เฉลี่ย อยู่ในช่วง 95-105 % ; %RSD 3.7 %

สรุป %Recovery เฉลี่ย และ %RSD ของการวิเคราะห์ซ้ำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้เป็นวิธีที่มีความถูกต้องและความเที่ยงที่ยอมรับได้

จ.2 การคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์

ตารางที่จ.6 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm

น.น.Placebo (g)	Area	Conc.from curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50mL (µg)	Conc. found (µg/g)	conc.added (µg)/g	%Recovery
0.62903	230106	51.81	518.07	10361.40	16472.03	16342.62	100.79
0.62842	229060	51.57	515.72	10314.30	16413.07	16358.49	100.33
0.62921	226543	51.00	510.05	10200.96	16212.34	16337.95	99.23
0.62911	224710	50.59	505.92	10118.43	16083.71	16340.54	98.43
0.62798	225294	50.72	507.24	10144.72	16154.53	16369.95	98.68
0.62894	223624	50.35	503.48	10069.52	16010.31	16344.96	97.95
mean	226556	51		**mean**	**16224.33**	**mean**	**99.24**
				sd	**183.07**	**sd**	**1.12**
				%RSD	**1.13**		

เกณฑ์กำหนด % Recovery เฉลี่ย อยู่ในช่วง 97-103 % ; %RSD 2.7 %

สรุป %Recovery เฉลี่ย และ %RSD ของการวิเคราะห์ซ้ำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้เป็นวิธีที่มีความถูกต้องและความเที่ยงที่ยอมรับได้

ตารางที่จ.7 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm

น.น.Placebo (g)	Area	Conc.from curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50mL (µg)	Conc. found (µg/g)	conc.added (µg)/g	%Recovery
0.62862	461859	103.98	1039.85	20796.97	33083.52	32706.56	101.15
0.62913	443560	99.86	998.65	19972.98	31746.99	32680.05	97.14
0.62875	455533	102.56	1025.61	20512.11	32623.64	32699.80	99.77
0.62856	450780	101.49	1014.90	20298.09	32293.00	32709.69	98.73
0.62891	447683	100.79	1007.93	20158.64	32053.29	32691.48	98.05
0.62932	445459	100.29	1002.92	20058.49	31873.28	32670.18	97.56
mean	450812	101		**mean**	**32278.95**	**mean**	**98.73**
				sd	**502.96**	**sd**	**1.50**
				%RSD	**1.56**		

เกณฑ์กำหนด % Recovery เฉลี่ย อยู่ในช่วง 97-103 % ; %RSD 2.7 %

สรุป %Recovery เฉลี่ย และ %RSD ของการวิเคราะห์ซ้ำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้เป็นวิธีที่มีความถูกต้องและความเที่ยงที่ยอมรับได้

ตารางที่จ.8 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm

น.น.Placebo (g)	Area	Conc.from curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50mL (µg)	Conc. found (µg/g)	conc.added (µg)/g	%Recovery
0.62875	697518	157.04	1570.42	31408.41	49953.74	49049.70	101.84
0.62845	680716	153.26	1532.59	30651.84	48773.71	49073.12	99.39
0.62936	675523	152.09	1520.90	30418.00	48331.64	49002.16	98.63
0.62928	671993	151.30	1512.95	30259.05	48085.19	49008.39	98.12
0.62947	665289	149.79	1497.86	29957.18	47591.11	48993.60	97.14
0.62874	663043	149.28	1492.80	29856.04	47485.52	49050.48	96.81
mean	675680	152		**mean**	**48370.15**	**mean**	**98.65**
				sd	**910.25**	**sd**	**1.83**
				%RSD	**1.88**		

เกณฑ์กำหนด % Recovery เฉลี่ย อยู่ในช่วง 97-103 % ; %RSD 2.7 %

สรุป %Recovery เฉลี่ย และ %RSD ของการวิเคราะห์ซ้ำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้เป็นวิธีที่มีความถูกต้องและความเที่ยงที่ยอมรับได้

จ.3 การคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของพาราเซตามอล

ตารางที่ จ.9 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของพาราเซตามอลที่ระดับความ-เข้มข้น 60 ppm

น.น.Placebo (g)	Area	Conc.from curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50mL (µg)	Conc. found (µg/g)	conc.added (µg)/g	%Recovery
0.62903	2318061	60.80	608.05	12160.96	19332.87	19123.09	101.10
0.62842	2344014	61.49	614.86	12297.11	19568.30	19141.66	102.23
0.62921	2348216	61.60	615.96	12319.16	19578.77	19117.62	102.41
0.62911	2283822	59.91	599.07	11981.33	19044.90	19120.66	99.60
0.62798	2296762	60.25	602.46	12049.22	19187.27	19155.07	100.17
0.62894	2318139	60.81	608.07	12161.37	19336.29	19125.83	101.10
mean	2318169	61		**mean**	**19341.40**	**mean**	**101.10**
				sd	**209.57**	**sd**	**1.10**
				%RSD	**1.08**		

เกณฑ์กำหนด % Recovery เฉลี่ย อยู่ในช่วง 97-103 % ; %RSD 2.7 %

สรุป %Recovery เฉลี่ย และ %RSD ของการวิเคราะห์ซ้ำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้เป็นวิธีที่มีความถูกต้องและความเที่ยงที่ยอมรับได้

ตารางที่ จ.10 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของพาราเซตามอลที่ระดับความ-เข้มข้น 120 ppm

น.น.Placebo (g)	Area	Conc.from curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50mL (µg)	Conc. found (µg/g)	conc.added (µg)/g	%Recovery
0.62862	4604487	120.78	1207.80	24155.95	38426.96	38271.13	100.41
0.62913	4509952	118.30	1183.00	23660.01	37607.50	38240.11	98.35
0.62875	4543858	119.19	1191.89	23837.88	37913.13	38263.22	99.09
0.62856	4537225	119.02	1190.15	23803.08	37869.23	38274.79	98.94
0.62891	4552339	119.41	1194.12	23882.38	37974.23	38253.49	99.27
0.62932	4519331	118.55	1185.46	23709.21	37674.33	38228.56	98.55
mean	4544532	119		**mean**	**37910.90**	**mean**	**99.10**
				sd	**289.86**	**sd**	**0.73**
				%RSD	**0.76**		

เกณฑ์กำหนด % Recovery เฉลี่ย อยู่ในช่วง 97-103 % ; %RSD 2.7 %

สรุป %Recovery เฉลี่ย และ %RSD ของการวิเคราะห์ซ้ำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้เป็นวิธีที่มีความถูกต้องและความเที่ยงที่ยอมรับได้

ตารางที่ จ.11 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของพาราเซตามอลที่ระดับความ-เข้มข้น 180 ppm

น.น.Placebo (g)	Area	Conc.from curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50mL (µg)	Conc. found (µg/g)	conc.added (µg)/g	%Recovery
0.62875	6969653	182.82	1828.20	36564.03	58153.53	57394.83	101.32
0.62845	6833913	179.26	1792.60	35851.92	57048.16	57422.23	99.35
0.62936	6822925	178.97	1789.71	35794.27	56874.08	57339.20	99.19
0.62928	6850490	179.69	1796.94	35938.88	57111.11	57346.49	99.59
0.62947	6919218	181.50	1814.97	36299.44	57666.67	57329.18	100.59
0.62874	6879119	180.45	1804.45	36089.07	57399.04	57395.74	100.01
mean	6879220	180		**mean**	**57375.43**	**mean**	**100.01**
				sd	**473.10**	**sd**	**0.82**
				%RSD	**0.82**		

เกณฑ์กำหนด % Recovery เฉลี่ย อยู่ในช่วง 97-103 % ; %RSD 2.7 %

สรุป %Recovery เฉลี่ย และ %RSD ของการวิเคราะห์ซ้ำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้เป็นวิธีที่มีความถูกต้องและความเที่ยงที่ยอมรับได้

ภาคผนวก ฉ

การคำนวณหาปริมาณยาในตัวอย่างจริง

ฉ.1 คลอเฟนิรามีน มาลีเอท

ตารางที่ ฉ.1 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอทในยาเม็ดห้อดีคอลเจนชุดที่ 1

Name	Area	น.น ยา (g)	conc. From curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50 mL (µg)	ปริมาณยา (µg/Tablet)	ปริมาณยา (mg/Tablet)
D1	19027	0.62947	18.18	181.76	1817.63	1815.58	1.82
D2	19906	0.62824	19.02	190.16	1901.60	1903.18	1.90
D3	22180	0.62798	21.19	211.88	2118.84	2121.47	2.12
D4	20103	0.63105	19.20	192.04	1920.42	1913.46	1.91
D5	20207	0.62667	19.30	193.04	1930.36	1936.80	1.94
D6	19776	0.62926	18.89	188.92	1889.19	1887.68	1.89

หมายเหตุ D เป็นสัญลักษณ์ใช้แทนยาเม็ดห้อดีคอลเจน

ตารางที่ ฉ.2 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอทในยาเม็ดห้อทิฟฟี่ชุดที่ 1

Name	Area	น.น ยา (g)	conc. From curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50 mL (µg)	ปริมาณยา (µg/Tablet)	ปริมาณยา (mg/Tablet)
T1	22038	0.57468	21.05	210.53	2105.27	2095.57	2.10
T2	20380	0.57424	19.47	194.69	1946.89	1939.39	1.94
T3	18874	0.57432	18.03	180.30	1803.02	1795.83	1.80
T4	20016	0.57383	19.12	191.21	1912.08	1906.08	1.91
T5	20551	0.57461	19.63	196.33	1963.25	1954.44	1.95
T6	19106	0.57252	18.25	182.52	1825.18	1823.62	1.82

หมายเหตุ T เป็นสัญลักษณ์ใช้แทนยาเม็ดห้อทิฟฟี่

ตารางที่ ฉ.3 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอทในยาเม็ดห้อดีคอลเจนชุดที่ 2

Name	Area	น.น ยา (g)	conc. From curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50 mL (µg)	ปริมาณยา (µg/Tablet)	ปริมาณยา (mg/Tablet)
D1	20836	0.62913	19.22	192.18	1921.79	1920.66	1.92
D2	22132	0.62786	20.41	204.13	2041.32	2044.25	2.04
D3	20103	0.62884	18.54	185.42	1854.18	1853.94	1.85
D4	21203	0.62947	19.56	195.56	1955.64	1953.43	1.95
D5	21907	0.62874	20.21	202.06	2020.57	2020.63	2.02
D6	19376	0.62896	17.87	178.71	1787.12	1786.56	1.79

ตารางที่ ฉ.4 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอทในยาขี่ห้อทิฟฟี่ชุดที่ 2

Name	Area	น.น ยา (g)	conc. From curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50 mL (µg)	ปริมาณยา (µg/Tablet)	ปริมาณยา (mg/Tablet)
T1	19787	0.56952	18.25	182.50	1825.03	1833.08	1.83
T2	22780	0.57368	21.01	210.11	2101.09	2095.05	2.10
T3	20274	0.56869	18.70	187.00	1869.95	1880.93	1.88
T4	20010	0.57227	18.46	184.56	1845.60	1844.83	1.84
T5	21151	0.57345	19.51	195.08	1950.84	1946.01	1.95
T6	19206	0.56862	17.71	177.14	1771.44	1782.07	1.78

นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับปริมาณยาบนฉลากโดยใช้หลักสถิติ Paired-t-test เป็นตัวทดสอบ

ตารางที่ ฉ.5 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอทในยาขี่ห้อดีคอลเจนชุดที่ 1 กับปริมาณบนฉลาก

	ปริมาณบนฉลาก(mg/Tablet)	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้(mg/Tablet)	ผลต่าง(xd)
D1	2	1.82	0.18
D2	2	1.90	0.10
D3	2	2.12	-0.12
D4	2	1.91	0.09
D5	2	1.94	0.06
D6	2	1.89	0.11
	mean	1.93	0.07
	sd	0.10	0.10

จากสูตร

$$t_{cal} = \bar{x}_d \times \frac{\sqrt{n}}{s_d} \qquad \text{.....(1)}$$

$$= 0.07 \times \frac{2.45}{0.10}$$

$$= 1.68$$

โดยค่า t จากตารางที่ระดับขั้นความเสรี(n – 1 ; 6-1 = 5;) และที่ระดับความมั่นใจ 95%มีค่าเท่ากับ 2.57

จากการคำนวณข้างต้นพบว่า $t_{cal} < t_{crit}$ แสดงว่าทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เพราะฉะนั้นในยา 1 เม็ด มีปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท เฉลี่ย เท่ากับ 1.93 ± 0.10 mg

ตารางที่ ฉ.6 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอทในยายี่ห้อทิฟฟี่ชุดที่ 1 กับปริมาณบนฉลาก

	ปริมาณบนฉลาก(mg/Tablet)	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้(mg/Tablet)	ผลต่าง(xd)
T1	2	2.10	-0.10
T2	2	1.94	0.06
T3	2	1.80	0.20
T4	2	1.91	0.09
T5	2	1.95	0.05
T6	2	1.82	0.18
	mean	1.92	0.08
	sd	0.11	0.11

จากสูตรการคำนวณในสมการที่ 1 สามารถคำนวณค่า t_{cal} ได้ดังนี้

$$= 0.08 \times \frac{2.45}{0.11}$$
$$= 1.85$$

โดยค่า t จากตารางที่ระดับขั้นความเสรี(n – 1 ; 6-1 = 5;) และที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่าเท่ากับ 2.57 พบว่า $t_{cal} < t_{crit}$ แสดงว่าทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเพราะฉะนั้นในยา 1 เม็ด มีปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท เฉลี่ย เท่ากับ 1.92 ± 0.11 mg

ตารางที่ ฉ.7 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอทในยายี่ห้อดีคอลเจนชุดที่ 2 กับปริมาณบนฉลาก

	ปริมาณบนฉลาก(mg/Tablet)	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้(mg/Tablet)	ผลต่าง(xd)
D1	2	1.92	0.08
D2	2	2.04	-0.04
D3	2	1.85	0.15
D4	2	1.95	0.05
D5	2	2.02	-0.02
D6	2	1.79	0.21
	mean	1.93	0.07
	sd	0.10	0.10

จากสูตรการคำนวณในสมการที่ 1 สามารถคำนวณค่า t_{cal} ได้ดังนี้

$$= 0.07 \times \frac{2.45}{0.10}$$
$$= 1.75$$

โดยค่า t จากตารางที่ระดับขั้นความเสรี(n – 1 ; 6-1 = 5;) และที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่าเท่ากับ 2.57 พบว่า $t_{cal} < t_{crit}$ แสดงว่าทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเพราะฉะนั้นในยา 1 เม็ด มีปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท เฉลี่ย เท่ากับ 1.93 ± 0.10 mg

ตารางที่ ฉ.8 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอทในยาเม็ดฟิฟฟี่ชุดที่ 2 กับปริมาณบนฉลาก

	ปริมาณบนฉลาก(mg/Tablet)	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้(mg/Tablet)	ผลต่าง(xd)
T1	2	1.83	0.17
T2	2	2.10	-0.10
T3	2	1.88	0.12
T4	2	1.84	0.16
T5	2	1.95	0.05
T6	2	1.78	0.22
	mean	1.90	0.10
	sd	0.11	0.11

จากสูตรการคำนวณในสมการที่ 1 สามารถคำนวณค่า t_{cal} ได้ดังนี้

$$= 0.10 \times \frac{2.45}{0.11}$$
$$= 2.27$$

โดยค่า t จากตารางที่ระดับขั้นความเสรี(n – 1 ; 6-1 = 5;) และที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่าเท่ากับ 2.57 พบว่า $t_{cal} < t_{crit}$ แสดงว่าทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเพราะฉะนั้นในยา 1 เม็ด มีปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท เฉลี่ย เท่ากับ 1.90 ± 0.11 mg

ฉ.2 ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์

ตารางที่ ฉ.9 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ในยาขี่ห้อดีคอลเจน ชุดที่ 1

Name	Area	น.น ยา (g)	conc. From curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50 mL (µg)	ปริมาณยา (µg/Tablet)	ปริมาณยา (mg/Tablet)
D1	438201	0.62947	98.66	986.58	9865.84	9854.71	9.85
D2	438400	0.62824	98.70	987.03	9870.32	9878.49	9.88
D3	445856	0.62798	100.38	1003.82	10038.18	10050.65	10.05
D4	445403	0.63105	100.28	1002.80	10027.98	9991.59	9.99
D5	446555	0.62667	100.54	1005.39	10053.91	10087.45	10.09
D6	446877	0.62926	100.61	1006.12	10061.16	10053.17	10.05

ตารางที่ ฉ.10 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ในยาขี่ห้อทิฟฟี่ ชุดที่ 1

Name	Area	น.น ยา (g)	conc. From curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50 mL (µg)	ปริมาณยา (µg/Tablet)	ปริมาณยา (mg/Tablet)
T1	329236	0.57468	74.13	741.26	7412.55	7378.37	7.38
T2	332542	0.57424	74.87	748.70	7486.99	7458.17	7.46
T3	336156	0.57432	75.68	756.84	7568.35	7538.18	7.54
T4	335098	0.57383	75.45	754.45	7544.53	7520.87	7.52
T5	341523	0.57461	76.89	768.92	7689.19	7654.66	7.65
T6	328004	0.57252	73.85	738.48	7384.82	7378.50	7.38

ตารางที่ ฉ.11 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ในยาขี่ห้อดีคอลเจน ชุดที่ 2

Name	Area	น.น ยา (g)	conc. From curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50 mL (µg)	ปริมาณยา (µg/Tablet)	ปริมาณยา (mg/Tablet)
D1	425901	0.62913	95.66	956.59	9565.86	9560.24	9.56
D2	429900	0.62786	96.56	965.57	9655.69	9669.53	9.67
D3	456255	0.62884	102.48	1024.76	10247.62	10246.32	10.25
D4	440902	0.62947	99.03	990.28	9902.79	9891.62	9.89
D5	461554	0.62874	103.67	1036.66	10366.64	10366.97	10.37
D6	436576	0.62896	98.06	980.56	9805.63	9802.51	9.80

ตารางที่ ฉ.12 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ในยาขี่ห้อทิฟฟี่ ชุดที่ 2

Name	Area	น.น ยา (g)	conc. From curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50 mL (µg)	ปริมาณยา (µg/Tablet)	ปริมาณยา (mg/Tablet)
T1	318236	0.56952	71.48	714.77	7147.68	7179.18	7.18
T2	335942	0.57368	75.45	754.54	7545.36	7523.66	7.52
T3	342156	0.56869	76.85	768.49	7684.93	7730.06	7.73
T4	325098	0.57227	73.02	730.18	7301.80	7298.74	7.30
T5	342523	0.57345	76.93	769.32	7693.17	7674.12	7.67
T6	325856	0.56862	73.19	731.88	7318.82	7362.71	7.36

นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับปริมาณยาบนฉลากโดยใช้หลักสถิติ Paired-t-test เป็นตัวทดสอบ

ตารางที่ ฉ.13 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ในยาขี่ห้อดีคอลเจนชุดที่ 1 กับปริมาณบนฉลาก

	ปริมาณบนฉลาก(mg/Tablet)	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้(mg/Tablet)	ผลต่าง(xd)
D1	10	9.85	0.15
D2	10	9.88	0.12
D3	10	10.05	-0.05
D4	10	9.99	0.01
D5	10	10.09	-0.09
D6	10	10.05	-0.05
	mean	9.99	0.01
	sd	0.10	0.10

จากสูตรการคำนวณในสมการที่ 1 สามารถคำนวณค่า t_{cal} ได้ดังนี้

$$= 0.01 \times \frac{2.45}{0.10}$$

$$= 0.35$$

โดยค่า t จากตารางที่ระดับขั้นความเสรี(n – 1 ; 6-1 = 5;) และที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่าเท่ากับ 2.57 พบว่า $t_{cal} < t_{crit}$ แสดงว่าทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเพราะฉะนั้นในยา 1 เม็ด มีปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ เฉลี่ย เท่ากับ 9.99 ± 0.10 mg

ตารางที่ ฉ.14 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ในยายี่ห้อทิฟฟี่ชุดที่ 1 กับปริมาณบนฉลาก

	ปริมาณบนฉลาก(mg/Tablet)	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้(mg/Tablet)	ผลต่าง(xd)
T1	7.5	7.38	0.12
T2	7.5	7.46	0.04
T3	7.5	7.54	-0.04
T4	7.5	7.52	-0.02
T5	7.5	7.65	-0.15
T6	7.5	7.38	0.12
	mean	7.49	0.01
	sd	0.11	0.11

จากสูตรการคำนวณในสมการที่ 1 สามารถคำนวณค่า t_{cal} ได้ดังนี้

$$= 0.01 \times \frac{2.45}{0.11}$$
$$= 0.27$$

โดยค่า t จากตารางที่ระดับขั้นความเสรี(n – 1 ; 6-1 = 5;) และที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่าเท่ากับ 2.57 พบว่า $t_{cal} < t_{crit}$ แสดงว่าทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเพราะฉะนั้นในยา 1 เม็ด มีปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ เฉลี่ย เท่ากับ 7.49 ± 0.11 mg

ตารางที่ ฉ.15 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ในยายี่ห้อดีคอลเจนชุดที่ 2 กับปริมาณบนฉลาก

	ปริมาณบนฉลาก(mg/Tablet)	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้(mg/Tablet)	ผลต่าง(xd)
D1	10	9.56	0.44
D2	10	9.67	0.33
D3	10	10.25	-0.25
D4	10	9.89	0.11
D5	10	10.37	-0.37
D6	10	9.80	0.20
	mean	9.92	0.08
	sd	0.32	0.32

จากสูตรการคำนวณในสมการที่ 1 สามารถคำนวณค่า t_{cal} ได้ดังนี้

$$= 0.08 \times \frac{2.45}{0.32}$$
$$= 0.59$$

โดยค่า t จากตารางที่ระดับขั้นความเสรี(n – 1 ; 6-1 = 5;) และที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่าเท่ากับ 2.57 พบว่า $t_{cal} < t_{crit}$ แสดงว่าทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเพราะฉะนั้นในยา 1 เม็ด มีปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ เฉลี่ย เท่ากับ 9.92 ± 0.32 mg

ตารางที่ ฉ.16 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ในยายี่ห้อทิฟฟี่ชุดที่ 2 กับปริมาณบนฉลาก

	ปริมาณบนฉลาก(mg/Tablet)	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้(mg/Tablet)	ผลต่าง(xd)
T1	7.5	7.18	0.32
T2	7.5	7.52	-0.02
T3	7.5	7.73	-0.23
T4	7.5	7.30	0.20
T5	7.5	7.67	-0.17
T6	7.5	7.36	0.14
	mean	7.46	0.04
	sd	0.22	0.22

จากสูตรการคำนวณในสมการที่ 1 สามารถคำนวณค่า t_{cal} ได้ดังนี้

$$= 0.04 \times \frac{2.45}{0.22}$$
$$= 0.43$$

โดยค่า t จากตารางที่ระดับขั้นความเสรี(n – 1 ; 6-1 = 5;) และที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่าเท่ากับ 2.57 พบว่า $t_{cal} < t_{crit}$ แสดงว่าทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเพราะฉะนั้นในยา 1 เม็ด มีปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ เฉลี่ย เท่ากับ 7.46 ± 0.22 mg

ฉ.3 พาราเซตามอล

ตารางที่ ฉ.17 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยายี่ห้อดีคอลเจนชุดที่ 1

Name	Area	น.น ยา (g)	conc. From curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50 mL (µg)	ปริมาณยา (µg/Tablet)	ปริมาณยา (mg/Tablet)
D1	4564872	0.62947	119.74	1197.41	498919.29	498356.54	498.36
D2	4536574	0.62824	119.00	1189.98	495826.41	496236.81	496.24
D3	4592550	0.62798	120.47	1204.67	501944.36	502567.82	502.57
D4	4502887	0.63105	118.11	1181.15	492144.60	490358.67	490.36
D5	4583386	0.62667	120.23	1202.26	500942.75	502613.43	502.61
D6	4562224	0.62926	119.67	1196.71	498629.87	498233.67	498.23

ตารางที่ ฉ.18 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยายี่ห้อทิฟฟี่ชุดที่ 1

Name	Area	น.น ยา (g)	conc. From curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50 mL (µg)	ปริมาณยา (µg/Tablet)	ปริมาณยา (mg/Tablet)
T1	4624559	0.57468	121.31	1213.06	505442.80	503112.07	503.11
T2	4604198	0.57424	120.77	1207.72	503217.40	501280.74	501.28
T3	4543139	0.57432	119.17	1191.71	496543.94	494564.05	494.56
T4	4643705	0.57383	121.81	1218.08	507535.37	505943.32	505.94
T5	4564011	0.57461	119.72	1197.18	498825.22	496585.49	496.59
T6	4601308	0.57252	120.70	1206.96	502901.57	502471.16	502.47

ตารางที่ ฉ.19 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยายี่ห้อดีคอลเจนชุดที่ 2

Name	Area	น.น ยา (g)	conc. From curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50 mL (µg)	ปริมาณยา (µg/Tablet)	ปริมาณยา (mg/Tablet)
D1	4596911	0.62913	118.78	1187.80	494917.34	494626.27	494.63
D2	4511932	0.62786	116.58	1165.84	485768.24	486464.56	486.46
D3	4623115	0.62884	119.46	1194.57	497738.54	497675.22	497.68
D4	4664846	0.62947	120.54	1205.36	502231.42	501664.94	501.66
D5	4444992	0.62874	114.85	1148.55	478561.28	478576.50	478.58
D6	4549140	0.62896	117.55	1175.46	489774.17	489618.43	489.62

ตารางที่ ฉ.20 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยายี่ห้อทิฟฟี่ชุดที่ 2

Name	Area	น.น ยา (g)	conc. From curve (ppm)	Conc./10 mL (µg)	Conc./50 mL (µg)	ปริมาณยา (µg/Tablet)	ปริมาณยา (mg/Tablet)
T1	4638560	0.56952	119.86	1198.56	499401.39	501602.37	501.60
T2	4627098	0.57368	119.56	1195.60	498167.36	496734.55	496.73
T3	4530048	0.56869	117.05	1170.52	487718.66	490583.11	490.58
T4	4516885	0.57227	116.71	1167.12	486301.50	486097.55	486.10
T5	4654638	0.57345	120.27	1202.72	501132.40	499891.48	499.89
T6	4549756	0.56862	117.56	1175.62	489840.49	492778.05	492.78

นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับปริมาณยาบนฉลากโดยใช้หลักสถิติ Paired-t-test เป็นตัวทดสอบ

ตารางที่ ฉ.21 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยาเม็ดห้อดีคอลเจน ชุดที่ 1 กับปริมาณบนฉลาก

	ปริมาณบนฉลาก(mg/Tablet)	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้(mg/Tablet)	ผลต่าง(xd)
D1	500	498.36	1.6
D2	500	496.24	3.8
D3	500	502.57	-2.6
D4	500	490.36	9.6
D5	500	502.61	-2.6
D6	500	498.23	1.8
	mean	498.06	1.94
	sd	4.56	4.56

จากสูตรการคำนวณในสมการที่ 1 สามารถคำนวณค่า t_{cal} ได้ดังนี้

$$= 1.94 \times \frac{2.45}{4.56}$$
$$= 1.04$$

โดยค่า t จากตารางที่ระดับขั้นความเสรี(n – 1 ; 6-1 = 5;) และที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่าเท่ากับ 2.57 พบว่า $t_{cal} < t_{crit}$ แสดงว่าทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเพราะฉะนั้นในยา 1 เม็ด มีปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ เฉลี่ย เท่ากับ 498.06 ± 4.56 mg

ตารางที่ ฉ.22 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยาเม็ดห้อทิฟฟี่ ชุดที่ 1 กับปริมาณบนฉลาก

	ปริมาณบนฉลาก(mg/Tablet)	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้(mg/Tablet)	ผลต่าง(xd)
T1	500	503.11	-3.1
T2	500	501.28	-1.3
T3	500	494.56	5.4
T4	500	505.94	-5.9
T5	500	496.59	3.4
T6	500	502.47	-2.5
	mean	500.66	-0.66
	sd	4.27	4.27

จากสูตรการคำนวณในสมการที่ 1 สามารถคำนวณค่า t_{cal} ได้ดังนี้

$$= -0.66 \times \frac{2.45}{4.27}$$
$$= |-0.38|$$

โดยค่า t จากตารางที่ระดับขั้นความเสรี(n – 1 ; 6-1 = 5;) และที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่าเท่ากับ 2.57 พบว่า $t_{cal} < t_{crit}$ แสดงว่าทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเพราะฉะนั้นในยา 1 เม็ด มีปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ เฉลี่ย เท่ากับ 500.66 ± 4.27 mg

ตารางที่ ฉ.23 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยาเม็ดห้อดีคอลเจน ชุดที่ 2 กับปริมาณบนฉลาก

	ปริมาณบนฉลาก(mg/Tablet)	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้(mg/Tablet)	ผลต่าง(xd)
D1	500	494.63	5.37
D2	500	486.46	13.54
D3	500	497.68	2.32
D4	500	501.66	-1.66
D5	500	478.58	21.42
D6	500	489.62	10.38
	mean	491.44	8.56
	sd	8.33	8.33

จากสูตรการคำนวณในสมการที่ 1 สามารถคำนวณค่า t_{cal} ได้ดังนี้

$$= 8.56 \times \frac{2.45}{8.33}$$

$$= 2.52$$

โดยค่า t จากตารางที่ระดับขั้นความเสรี(n – 1 ; 6-1 = 5;) และที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่าเท่ากับ 2.57 พบว่า $t_{cal} < t_{crit}$ แสดงว่าทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเพราะฉะนั้นในยา 1 เม็ด มีปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ เฉลี่ย เท่ากับ 491.44 ± 8.33 mg

ตารางที่ ฉ.24 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยายี่ห้อทิฟฟี่ ชุดที่ 2 กับปริมาณบนฉลาก

	ปริมาณบนฉลาก(mg/Tablet)	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้(mg/Tablet)	ผลต่าง(xd)
T1	500	501.60	-1.60
T2	500	496.73	3.27
T3	500	490.58	9.42
T4	500	486.10	13.90
T5	500	499.89	0.11
T6	500	492.78	7.22
	mean	494.61	5.39
	sd	5.89	5.89

จากสูตรการคำนวณในสมการที่ 1 สามารถคำนวณค่า t_{cal} ได้ดังนี้

$$= 5.39 \times \frac{2.45}{5.89}$$

$$= 2.24$$

โดยค่า t จากตารางที่ระดับขั้นความเสรี(n – 1 ; 6-1 = 5;) และที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่าเท่ากับ 2.57 พบว่า $t_{cal} < t_{crit}$ แสดงว่าทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเพราะฉะนั้นในยา 1 เม็ด มีปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ เฉลี่ย เท่ากับ 494.61 ± 5.89 mg

ภาคผนวก ช

การคำนวณค่าความเที่ยง(Precision)

ความเที่ยง เป็นค่าที่แสดงถึงความใกล้เคียงกันของผลทดสอบตัวอย่างที่ทำการทดสอบซ้ำหลายครั้งโดยทั่วไปจะแสดงด้วยค่าเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์(% Relative Standard Deviation ; RSD) หรือ สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน(Coefficient of Variation; CV) โดยมีสูตรการคำนวณดังต่อไปนี้

$$\%\,RSD - or - \%\,CV = \frac{SD}{\overline{X}} \times 100 \qquad \text{.....(1)}$$

หมายเหตุ $\overline{X}$ = ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบ

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบ

%RSD = Experimental RSD

การประเมินความเที่ยงโดยใช้ Horwitz equation

$$RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \qquad \text{.....(2)}$$

$$RSD_R = 2^{(1-0.5 \log C)} \qquad \text{.....(3)}$$

หมายเหตุ RSD_r = ค่า RSD จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการเดียวกัน (Repeatability); จัดเป็น Predicted RSD

RSD_R = ค่า RSDจากการทดสอบต่างห้องปฏิบัติการเดียวกัน (Reproducibility);จัดเป็น Predicted RSD

C = Concentration ratio

นำค่า RSD ที่คำนวณได้ จากสมการที่ 1 มาเทียบกับค่า RSD ที่คำนวณได้ จากสมการที่ 2 และ 3 จะได้ค่า Horwitz ' s Ratio หรือ Horrat ดังสมการต่อไปนี้

$$Horwitz's - ratio / Horrat = \frac{Experimental - RSD}{\Pr edicted - RSD} \qquad \text{.....(4)}$$

ซึ่งค่า Horrat ที่ยอมรับได้ต้องค่าน้อยกว่า 2

ช.1 คลอเฟนิรามีน มาลีเอท

ตารางที่ ช.1 แสดงการคำนวณค่า RSD_r และ RSD_R ของคลอเฟนิรามีน มาลีเอทในยาดีคอลเจน และทิฟฟี่ ชุดที่ 1 และ ชุดที่ 2

	ปริมาณยาที่วิเคราะห์ได้ (mg/tablet)	µg/tablet	µg/g[a]	c	log c	0.5*log c	1-0.5*logc	$2^{(1-0.5*\log c)}$	$0.66*2^{(1-0.5*\log c)}$
ดีคอล-เจน	1.93[b]	1929.70	3069.05	0.0031	-2.513	-1.2565	2.2565	4.78	3.15
	1.93[c]	1929.91	3069.39	0.0031	-2.513	-1.2565	2.2565	4.78	3.15
	1.93[d]	1929.80	3069.22	0.0031	-2.513	-1.2565	2.2565	4.78	3.15
ทิฟฟี่	1.92[e]	1919.16	3354.99	0.0034	-2.474	-1.2372	2.2372	4.71	3.11
	1.90[f]	1896.99	3316.25	0.0033	-2.479	-1.2397	2.2397	4.72	3.12
	1.91[g]	1908.07	3335.62	0.0033	-2.477	-1.2384	2.2384	4.72	3.11

หมายเหตุ

a = น้ำหนักของดีคอลเจน 1 เม็ด เท่ากับ 0.62876 g

a = น้ำหนักของทิฟฟี่ 1 เม็ด เท่ากับ 0.57203 g

b = ปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ที่วิเคราะห์ได้ในดีคอลเจนชุดที่ 1

c = ปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ที่วิเคราะห์ได้ในดีคอลเจนชุดที่ 2

d = ปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ที่วิเคราะห์ได้ในดีคอลเจนของชุดที่ 1,2

e = ปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ที่วิเคราะห์ได้ในทิฟฟี่ ชุดที่ 1

f = ปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ที่วิเคราะห์ได้ในทิฟฟี่ ชุดที่ 2

g = ปริมาณคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ที่วิเคราะห์ได้ในทิฟฟี่ ของชุดที่ 1, 2

ตารางที่ ช.2 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาดีคอลเจนชุดที่ 1

Name	ปริมาณที่วัดได้(mg/tablet)
D1	1.82
D2	1.90
D3	2.12
D4	1.91
D5	1.94
D6	1.89
Mean	1.93
SD	0.10

$$\%\,RSD = \frac{0.10}{1.93} \times 100$$

$$= 5.31$$

จากตาราง ช.1

$$RSD_r = 3.15$$

$$Horrat = \frac{5.31}{3.15}$$

$$= 1.69$$

ค่า Horrat น้อยกว่า 2 แสดงว่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้

ตารางที่ ช.3 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาดีคอลเจนชุดที่ 2

Name	ปริมาณที่วัดได้(mg/tablet)
D1	1.92
D2	2.04
D3	1.85
D4	1.95
D5	2.02
D6	1.79
Mean	1.93
SD	0.10

$$\%RSD = \frac{0.10}{1.93} \times 100$$

$$= 5.09$$

จากตาราง ช.1

$$RSD_r = 3.15$$

$$Horrat = \frac{5.09}{3.15}$$

$$= 1.62$$

ค่า Horrat น้อยกว่า 2 แสดงว่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้

ตารางที่ ช.4 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาดีคอลเจนชุดที่ 1และชุดที่ 2

Name	ปริมาณที่วัดได้(mg/tablet)
D1	1.82
D2	1.90
D3	2.12
D4	1.91
D5	1.94
D6	1.89
D7	1.92
D8	2.04
D9	1.85
D10	1.95
D11	2.02
D12	1.79
Mean	1.93
SD	0.10

$$\%RSD = \frac{0.10}{1.93} \times 100$$

$$= 4.96$$

จากตาราง ช.1

$$RSD_R = 4.78$$

$$Horrat = \frac{4.96}{4.78}$$

$$= 1.04$$

ค่า Horrat น้อยกว่า 2 แสดงว่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้

ตารางที่ ช.5 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาทิฟฟี่ชุดที่ 1

Name	ปริมาณที่วัดได้(mg/tablet)
T1	2.10
T2	1.94
T3	1.80
T4	1.91
T5	1.95
T6	1.82
mean	1.92
sd	0.11

$$\% RSD = \frac{0.11}{1.92} \times 100$$

$$= 5.58$$

จากตาราง ช.1

$$RSD_r = 3.11$$

$$Horrat = \frac{5.58}{3.11}$$

$$= 1.79$$

ค่า Horrat น้อยกว่า 2 แสดงว่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้

ตารางที่ ช.6 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาทิฟฟี่ชุดที่ 2

Name	ปริมาณที่วัดได้(mg/tablet)
T1	1.83
T2	2.10
T3	1.88
T4	1.84
T5	1.95
T6	1.78
mean	1.90
sd	0.11

$$\%RSD = \frac{0.11}{1.90} \times 100$$

$$= 5.87$$

จากตาราง ช.1

$$RSD_r = 3.12$$

$$Horrat = \frac{5.87}{3.12}$$

$$= 1.88$$

ค่า Horrat น้อยกว่า 2 แสดงว่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้

ตารางที่ ช.7 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ในยาทิฟฟี่ชุดที่ 1,2

Name	ปริมาณที่วัดได้(mg/tablet)
T1	2.10
T2	1.94
T3	1.80
T4	1.91
T5	1.95
T6	1.82
T7	1.83
T8	2.10
T9	1.88
T10	1.84
T11	1.95
T12	1.78
mean	1.91
sd	0.10

$$\%\,RSD = \frac{0.10}{1.91} \times 100$$

$$= 5.49$$

จากตาราง ช.1

$$RSD_R = 4.72$$

$$Horrat = \frac{5.49}{4.72}$$

$$= 1.16$$

ค่า Horrat น้อยกว่า 2 แสดงว่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้

ช.2 ฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์

ตารางที่ ช.8 แสดงการคำนวณค่า RSD_r และ RSD_R ของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ในยาดีคอลเจน และ ทิฟฟี่ ชุดที่ 1 และ ชุดที่ 2

	ปริมาณยาที่วิเคราะห์ได้ (mg/tablet)	µg/tablet	µg/g[a]	c	log c	0.5*log c	1-0.5*logc	$2^{(1-0.5*\log c)}$	$0.66*2^{(1-0.5*\log c)}$
ดีคอลเจน	9.99[b]	9986.01	15882.07	0.0159	-1.799	-0.8996	1.8995	3.73	2.46
	9.92[c]	9922.87	15781.64	0.0158	-1.802	-0.9009	1.9009	3.73	2.46
	9.95[d]	9954.44	15831.86	0.0158	-1.800	-0.9002	1.9002	3.73	2.46
ทิฟฟี่	7.49[e]	7488.13	13090.44	0.0131	-1.883	-0.9415	1.9415	3.84	2.54
	7.46[f]	7461.41	13043.74	0.0130	-1.885	-0.9423	1.9423	3.84	2.54
	7.47[g]	7474.77	13067.09	0.0131	-1.884	-0.9419	1.9419	3.84	2.54

หมายเหตุ

a = น้ำหนักของดีคอลเจน 1 เม็ด เท่ากับ 0.62876 g

a = น้ำหนักของทิฟฟี่ 1 เม็ด เท่ากับ 0.57203 g

b = ปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ที่วิเคราะห์ได้ในดีคอลเจน ชุดที่ 1

c = ปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ที่วิเคราะห์ได้ในดีคอลเจน ชุดที่ 2

d = ปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ที่วิเคราะห์ได้ในดีคอลเจนของ ชุดที่ 1,2

e = ปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ที่วิเคราะห์ได้ในทิฟฟี่ ชุดที่ 1

f = ปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ที่วิเคราะห์ได้ในทิฟฟี่ ชุดที่ 2

g = ปริมาณฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ที่วิเคราะห์ได้ในทิฟฟี่ ของชุดที่ 1, 2

ตารางที่ ช.9 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ในยาดีคอลเจน

ชุดที่ 1

Name	ปริมาณที่วัดได้(mg/tablet)
D1	9.85
D2	9.88
D3	10.05
D4	9.99
D5	10.09
D6	10.05
Mean	9.99
SD	0.10

$$\%RSD = \frac{0.10}{9.99} \times 100$$

$$= 0.98$$

จากตาราง ช.8

$$RSD_r = 2.46$$

$$Horrat = \frac{0.98}{2.46}$$

$$= 0.40$$

ค่า Horrat น้อยกว่า 2 แสดงว่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้

ตารางที่ ช.10 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ในยาดีคอลเจน ชุดที่ 2

Name	ปริมาณที่วัดได้(mg/tablet)
D1	9.56
D2	9.67
D3	10.25
D4	9.89
D5	10.37
D6	9.80
Mean	9.92
SD	0.32

$$\%\,RSD = \frac{0.32}{9.92} \times 100$$

$$= 3.23$$

จากตาราง ช.8

$$RSD_r = 2.46$$

$$Horrat = \frac{3.23}{2.46}$$

$$= 1.31$$

ค่า Horrat น้อยกว่า 2 แสดงว่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้

ตารางที่ ช.11 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ในยาดีคอลเจน ชุดที่ 1, 2

Name	ปริมาณที่วัดได้(mg/tablet)
D1	9.85
D2	9.88
D3	10.05
D4	9.99
D5	10.09
D6	10.05
D7	9.56
D8	9.67
D9	10.25
D10	9.89
D11	10.37
D12	9.80
Mean	9.95
SD	0.23

$$\%\,RSD = \frac{0.23}{9.95} \times 100$$

$$= 2.29$$

จากตาราง ช.8

$$RSD_R = 3.73$$

$$Horrat = \frac{2.29}{3.73}$$

$$= 0.61$$

ค่า Horrat น้อยกว่า 2 แสดงว่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้

ตารางที่ ช.12 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ในยาทิฟฟี่ชุดที่ 1

Name	ปริมาณที่วัดได้(mg/tablet)
T1	7.38
T2	7.46
T3	7.54
T4	7.52
T5	7.65
T6	7.38
mean	7.49
sd	0.11

$$\%RSD = \frac{0.11}{7.49} \times 100$$

$$= 1.42$$

จากตาราง ช.8

$$RSD_r = 2.54$$

$$Horrat = \frac{1.42}{2.54}$$

$$= 0.56$$

ค่า Horrat น้อยกว่า 2 แสดงว่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้

ตารางที่ ช.13 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ในยาทิฟฟี่ชุดที่ 2

Name	ปริมาณที่วัดได้(mg/tablet)
T1	7.18
T2	7.52
T3	7.73
T4	7.30
T5	7.67
T6	7.36
mean	7.46
sd	0.22

$$\%RSD = \frac{0.22}{7.46} \times 100$$

$$= 2.92$$

จากตาราง ช.8

$$RSD_r = 2.54$$

$$Horrat = \frac{2.92}{2.54}$$

$$= 1.15$$

ค่า Horrat น้อยกว่า 2 แสดงว่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้

ตารางที่ ช.14 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ในยาทิฟฟี่ชุดที่ 1,2

Name	ปริมาณที่วัดได้(mg/tablet)
T1	7.38
T2	7.46
T3	7.54
T4	7.52
T5	7.65
T6	7.38
T7	7.18
T8	7.52
T9	7.73
T10	7.30
T11	7.67
T12	7.36
mean	7.47
sd	0.16

$$\%\,RSD = \frac{0.16}{7.47} \times 100$$

$$= 2.19$$

จากตาราง ช.8

$$RSD_R = 3.84$$

$$Horrat = \frac{2.19}{3.84}$$

$$= 0.57$$

ค่า Horrat น้อยกว่า 2 แสดงว่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้

ช.3 พาราเซตามอล

ตารางที่ ช.15 แสดงการคำนวณค่า RSD_r และ RSD_R ของพาราเซตามอลในยาดีคอลเจนและทิฟฟี่ ชุดที่ 1 และ ชุดที่ 2

	ปริมาณยาที่วิเคราะห์ได้ (mg/tablet)	µg/tablet	µg/g[a]	c	log c	0.5*log c	1-0.5*logc	$2^{(1-0.5*\log c)}$	$0.66*2^{(1-0.5*\log c)}$
ดีคอล-เจน	498.06[b]	498061.16	792132.38	0.7921	-0.101	-0.0506	1.0506	2.07	1.37
	491.44[c]	491437.65	781598.15	0.7816	-0.107	-0.0535	1.0535	2.08	1.37
	494.75[d]	494749.40	786865.27	0.7869	-0.104	-0.0520	1.0520	2.07	1.37
ทิฟฟี่	500.66[e]	500659.47	875232.89	0.8752	-0.058	-0.0289	1.0289	2.04	1.35
	494.61[f]	494614.52	864665.34	0.8647	-0.063	-0.0316	1.0316	2.04	1.35
	497.64[g]	497636.99	869949.12	0.8699	-0.061	-0.0303	1.0303	2.04	1.35

หมายเหตุ a = น้ำหนักของดีคอลเจน 1 เม็ด เท่ากับ 0.62876 g

a = น้ำหนักของทิฟฟี่ 1 เม็ด เท่ากับ 0.57203 g

b = ปริมาณพาราเซตามอลที่วิเคราะห์ได้ในดีคอลเจน ชุดที่ 1

c = ปริมาณพาราเซตามอลที่วิเคราะห์ได้ในดีคอลเจน ชุดที่ 2

d = ปริมาณพาราเซตามอลที่วิเคราะห์ได้ในดีคอลเจน ของชุดที่ 1,2

e = ปริมาณพาราเซตามอลที่วิเคราะห์ได้ในทิฟฟี่ ชุดที่ 1

f = ปริมาณพาราเซตามอลที่วิเคราะห์ได้ในทิฟฟี่ ชุดที่ 2

g = ปริมาณพาราเซตามอลที่วิเคราะห์ได้ในทิฟฟี่ ของชุดที่ 1, 2

ตารางที่ ช.16 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของพาราเซตามอลในยาดีคอลเจน ชุดที่ 1

Name	ปริมาณที่วัดได้(mg/tablet)
D1	498.4
D2	496.2
D3	502.6
D4	490.4
D5	502.6
D6	498.2
Mean	498.06
SD	4.56

$$\%RSD = \frac{4.56}{498.06} \times 100$$

$$= 0.91$$

จากตาราง ช.15

$$RSD_r = 1.37$$

$$Horrat = \frac{0.91}{1.37}$$

$$= 0.67$$

ค่า Horrat น้อยกว่า 2 แสดงว่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้

ตารางที่ ช.17 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของพาราเซตามอลในยาดีคอลเจน ชุดที่ 2

Name	ปริมาณที่วัดได้(mg/tablet)
D1	494.6
D2	486.5
D3	497.7
D4	501.7
D5	478.6
D6	489.6
Mean	491.44
SD	8.33

$$\%\, RSD = \frac{8.33}{491.44} \times 100$$

$$= 1.70$$

จากตาราง ช.15

$$RSD_r = 1.37$$

$$Horrat = \frac{1.70}{1.37}$$

$$= 1.24$$

ค่า Horrat น้อยกว่า 2 แสดงว่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้

ตารางที่ ช.18 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของพาราเซตามอลในยาดีคอลเจน ชุดที่ 1,2

Name	ปริมาณที่วัดได้(mg/tablet)
D1	498.4
D2	496.2
D3	502.6
D4	490.4
D5	502.6
D6	498.2
D7	494.6
D8	486.5
D9	497.7
D10	501.7
D11	478.6
D12	489.6
Mean	494.75
SD	7.28

$$\%\,RSD = \frac{7.28}{494.75} \times 100$$

$$= 1.47$$

จากตาราง ช.15

$$RSD_R = 2.07$$

$$Horrat = \frac{1.47}{2.07}$$

$$= 0.71$$

ค่า Horrat น้อยกว่า 2 แสดงว่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้

ตารางที่ ช.19 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของพาราเซตามอลในยาทิฟฟี่ ชุดที่ 1

Name	ปริมาณที่วัดได้(mg/tablet)
T1	503.1
T2	501.3
T3	494.6
T4	505.9
T5	496.6
T6	502.5
mean	500.66
sd	4.27

$$\%\,RSD = \frac{4.27}{500.66} \times 100$$

$$= 0.85$$

จากตาราง ช.15

$$RSD_r = 1.35$$

$$Horrat = \frac{0.85}{1.35}$$

$$= 0.63$$

ค่า Horrat น้อยกว่า 2 แสดงว่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้

ตารางที่ ช.20 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของพาราเซตามอลในยาทิฟฟี่ ชุดที่ 2

Name	ปริมาณที่วัดได้(mg/tablet)
T1	501.6
T2	496.7
T3	490.6
T4	486.1
T5	499.9
T6	492.8
mean	494.61
sd	5.89

$$\%RSD = \frac{5.89}{494.61} \times 100$$

$$= 1.19$$

จากตาราง ช.15

$$RSD_r = 1.35$$

$$Horrat = \frac{1.19}{1.35}$$

$$= 0.88$$

ค่า Horrat น้อยกว่า 2 แสดงว่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้

ตารางที่ ช.21 แสดงผลการศึกษาความเที่ยงของพาราเซตามอลในยาทิฟฟี่ ชุดที่ 1,2

Name	ปริมาณที่วัดได้(mg/tablet)
T1	503.1
T2	501.3
T3	494.6
T4	505.9
T5	496.6
T6	502.5
T7	501.6
T8	496.7
T9	490.6
T10	486.1
T11	499.9
T12	492.8
mean	497.64
sd	5.83

$$\%RSD = \frac{5.83}{497.64} \times 100$$

$$= 1.17$$

จากตาราง ช.15

$$RSD_R = 2.04$$

$$Horrat = \frac{1.17}{2.04}$$

$$= 0.57$$

ค่า Horrat น้อยกว่า 2 แสดงว่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้

ภาคผนวก ซ

การคำนวณการพิสูจน์ค่า LOQ

ซ.1 คลอเฟนิรามีน มาลีเอท

ตารางที่ ซ.1 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท ที่ระดับความเข้มข้น 5 ppm

น.น.Placebo (g)	Area	Conc.from curve (ppm)	Conc./10 ml (µg)	Conc./50ml (µg)	Conc. Found (µg/g)	Conc.added (µg/g)	%Recovery
0.62854	5550	5.30	53.02	1060.37	1687.04	1639.51	102.90
0.62906	5371	5.13	51.31	1026.18	1631.28	1638.16	99.58
0.62886	5360	5.12	51.20	1024.07	1628.46	1638.68	99.38
0.62932	5245	5.01	50.11	1002.10	1592.36	1637.48	97.24
0.62854	5081	4.85	48.54	970.77	1544.48	1639.51	94.20
0.62942	5353	5.11	51.14	1022.74	1624.89	1637.22	99.25
0.62852	5290	5.05	50.53	1010.70	1608.06	1639.57	98.08
Mean	**5321**	**5.08**		**Mean**	**1616.65**	**Mean**	**98.66**
				sd	**43.30**	**sd**	**2.64**
				%RSD	**2.68**		

เกณฑ์กำหนด % Recovery เฉลี่ย อยู่ในช่วง 95-105 % ; %RSD 3.7 %

สรุป %Recovery เฉลี่ย และ %RSD ของการวิเคราะห์ซ้ำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้เป็นวิธีที่มีความถูกต้องและความเที่ยงที่ยอมรับได้

ตารางที่ ซ.2 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของฟีนิลเอฟพริน ไฮโดรคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 48 ppm

น.น.Placebo (g)	Area	Conc.from curve (ppm)	Conc./10 ml (µg)	Conc./50ml (µg)	Conc. Found (µg/g)	conc.added (µg/g)	%Recovery
0.62854	231572	52.01	520.12	10402.35	16550.03	15701.15	105.41
0.62906	225065	50.55	505.50	10110.06	16071.69	15688.17	102.44
0.62886	223210	50.13	501.34	10026.73	15944.29	15693.16	101.60
0.62932	231930	52.09	520.92	10418.44	16555.07	15681.69	105.57
0.62854	221031	49.64	496.44	9928.85	15796.68	15701.15	100.61
0.62942	220309	49.48	494.82	9896.41	15723.07	15679.20	100.28
0.62852	231014	51.89	518.86	10377.29	16510.67	15711.65	105.09
mean	**226304**	**50.83**		**Mean**	**16164.50**	**Mean**	**103.00**
				sd	**367.03**	**sd**	**2.31**
				%RSD	**2.27**		

เกณฑ์กำหนด % Recovery เฉลี่ย อยู่ในช่วง 97-103 % ; %RSD 2.7 %

สรุป %Recovery เฉลี่ย และ %RSD ของการวิเคราะห์ซ้ำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้เป็นวิธีที่มีความถูกต้องและความเที่ยงที่ยอมรับได้

ตารางที่ ซ.3 แสดงการคำนวณค่าความถูกต้องและความเที่ยงของพาราเซตามอลที่ระดับความเข้มข้น 20 ppm

น.น.Placebo (g)	Area	Conc.from curve (ppm)	Conc./10 ml (µg)	Conc./50ml (µg)	Conc. Found (µg/g)	Conc.added (µg/g)	%Recovery
0.62854	822669	21.58	215.79	4315.87	6866.50	6379.36	107.64
0.62906	738756	19.38	193.78	3875.64	6161.01	6374.08	96.66
0.62886	738161	19.36	193.63	3872.52	6158.01	6376.11	96.58
0.62932	729610	19.14	191.38	3827.66	6082.22	6371.45	95.46
0.62854	741129	19.44	194.40	3888.09	6185.91	6379.36	96.97
0.62942	765140	20.07	200.70	4014.06	6377.39	6370.44	100.11
0.62852	742989	19.49	194.89	3897.85	6201.64	6379.56	97.21
mean	**754065**	**19.78**		**Mean**	**6290.38**	**Mean**	**98.66**
				sd	**269.52**	**sd**	**4.21**
				%RSD	**4.28**		

เกณฑ์กำหนด % Recovery เฉลี่ย อยู่ในช่วง 95-105 % ; %RSD 3.7 %

จะเห็นได้ว่าค่า %Recovery เฉลี่ย ของการวิเคราะห์ซ้ำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แต่ค่า %RSD มากกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้ จึงใช้ Horwitz equation เป็นตัวประเมินว่าความเที่ยงนี้ยอมรับได้หรือไม่ แสดงผลดังด้านล่าง

µg/g	C	log C	0.5 x log C	1-0.5 x logC	$2^{(1-0.5 \times \log C)}$	$0.66 \times 2^{(1-0.5 \times \log C)}$
6290.38	0.0063	-2.2013	-1.1007	2.1007	4.2891	2.83

%RSD =	4.28
RSDr(repeat)	2.83
เกณฑ์การยอมรับ	
Experimental RSD < 2	
Predicted RSD	
	1.51

จากการคำนวณข้างต้นพบว่าค่า Horrat เท่ากับ 1.51 นั้นก็หมายความว่าวิธีการวิเคราะห์นี้เป็นวิธีที่มีความถูกต้องและความเที่ยงที่ยอมรับได้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวยุพดี หนูสาย เกิดเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม พ.ศ. 2521 ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมีวิเคราะห์ จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตเทคนิคกรุงเทพฯ ในปีการศึกษา 2544 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมีวิเคราะห์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2546