



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในตำรับยาแก้หวัดโดยวิธี
แคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส

Analysis of active ingredients in common cold medicines
by capillary electrophoresis

โดย รศ.ดร. ลีณา สุนทรสุข
ภาควิชาเภสัชเคมี
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

พฤษภาคม 2546



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในตำรับชาแก้หวัดโคธวิธี
แคปิลลารีอิเล็กโทรโฟเรซิส

Analysis of active ingredients in common cold medicines
by capillary electrophoresis

โดย รศ. ดร. อธิภา สุนทรสุข
ภาควิชาเภสัชเคมี
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

พฤศจิกายน 2546

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในตำรับยาแก้หวัดโดยวิธี
แคปิลลารีอิเล็กโทรโฟเรซิส

Analysis of active ingredients in common cold medicines
by capillary electrophoresis

โดย รศ. ดร. ลีณา สุนทรสุข
ภาควิชาเภสัชเคมี
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานฉบับนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้พัฒนาวิธีวิเคราะห์พารามิเตอร์และทดสอบเฟนิลนีนมาลิคในตัวอย่างหัววัด โดยวิธีโมเชลลาร์อิเล็กโทรโครมติกโครมาโทกราฟี ซึ่งทั้งสองชนิดและสารประกอบในไลเซนใน ตัวอย่างหัววัด 7 ชนิด ได้แก่ ฟีนิลโพพานอนีน, คาฟีน, โฟฟานโซครามีน, เด็กซ์โทรมโทรแพน, โครโพลิทิน, ลอราทาซิน และแอสไพริน สามารถแยกออกจากกันได้ใน 25.5 นาที ในบีเฟออร์ซึ่งประกอบด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไดโซโครเรเนฟอสเฟต-โซเดียมคลอไรด์ (พีเอช 9.0) 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไดอะซิโอสัมพัทธ์ และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) อะซิโตนไนโตร โดยใช้เวลาเปิดสาร 50 เซนติเมตร แล้วนำตัวอย่างมาใน 75 ไมโครเมตร ความสูงสีกไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์ ความถี่ 30 องศาเซลเซียส และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร การประเมินวิธีวิเคราะห์พบความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นในช่วง 10-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เป็นสมการเส้นตรงที่ $r^2 > 0.999$ มีปริมาณแปรผันและควบคุมได้ (มากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์) รมิตการตรวจวัดมีค่า 0.4 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สำหรับพารามิเตอร์และทดสอบเฟนิลนีนมาลิค ค่าความคลาดเคลื่อน มีค่าความแปรปรวนต่ำสำหรับพารามิเตอร์และทดสอบเฟนิลนีนมาลิคมีค่า 2 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมตามลำดับ วิธีวิเคราะห์นี้มีปริมาณรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับระบบอื่น และที่สำคัญในตัวอย่างหัววัด

คำสำคัญ : โมเชลลาร์อิเล็กโทรโครมติกโครมาโทกราฟี, พารามิเตอร์, ทดสอบเฟนิลนีนมาลิค, ส่วนผสมในตัวอย่างหัววัด

Abstract

A micellar electrokinetic chromatography (MEKC) method was established for determination of paracetamol (PARA) and chlorpheniramine maleate (CPM) in cold tablets. Separation of both drugs as well as other seven cold remedy ingredients (e.g. phenylpropanolamine, caffeine, diphenhydramine, dextrometorphan, triprolidine, loratadine and aspirin) was achieved in 25.5 min using a sodium dihydrogenphosphate-sodium tetraborate buffer (10 mM, pH 9.0) containing sodium dodecyl sulfate (SDS) (50 mM) and acetonitrile (26% v/v). The effective capillary length of 30 cm, the separating voltage of 15 kV and the temperature of 30 °C was optimized. Detection was by a diode array detector at 214 nm. Method linearity was excellent ($r^2 > 0.999$) over the concentration tested (10-250 µg/mL) with good precision and accuracy. Recoveries were good ($> 99\%$) with limits of detection of 0.4 and 0.5 µg/mL and limits of quantitation of 2 (%RSD = 3.1%) and 4 (%RSD = 2.4%) µg/mL, for PARA and CPM, respectively. The developed method was applied for determination of ingredients in cold tablets and was found to be simple, rapid and efficient.

Keywords: Micellar electrokinetic chromatography (MEKC), Paracetamol (PARA), Chlorpheniramine maleate (CPM), Cold remedy ingredients

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Executive Summary	3
เนื้อหาบทวิจัย	7
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	7
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
วัตถุประสงค์	11
ขอบเขตการวิจัย	11
วิธีดำเนินการวิจัย	11
ผลการวิจัย	18
อภิปราย	69
สรุปผลการวิจัย	72
Output ที่ได้จากโครงการ	75
บรรณานุกรม	76
ภาคผนวก	79

ความแตกต่างของสารแต่ละชนิดในการเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าและการแตกเกิดขึ้นภายใน ทอแลนซ์แบบปฏิกิริยานาเคมีก เทคนิคนี้นี้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีง่าย สะดวก มีประสิทธิภาพสูงโดยให้ค่า จำนวนเทสต์ (number of theoretical plate) มากกว่าวิธีเก่าเกิน 10³ ใช้สารตัวอย่างและไฟฟ้าเฟิร์ ปริมาณเล็กน้อย 1-10 นาโนลิตร และได้เวลาสั้นในการวิเคราะห์โดยเฉลี่ย 5 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง แคปิลลารีอิเล็กโทรโฟริซิสจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ ที่ผสมในตำรับยาแก้หวัด ยาน้ำแก้ไอ ยาชา ใช้ และยาบรรเทาปวด เพื่อแก้ไขปัญหาวินิจฉัย วิเคราะห์สารเหล่านี้ในตำรับยาผสม ใช้เป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพยาเหล่านี้ ตลอดจนเป็น การสร้างองค์ความรู้ใหม่เนื่องจากการวิเคราะห์โดยแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟริซิสยังไม่เป็นที่แพร่ หลายในประเทศไทย

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ผสมในตำรับยาแก้หวัด ยาน้ำแก้ไอ ยาชา ใช้ และยาบรรเทาปวด ด้วยวิธีแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟริซิส ให้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ มีความถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ (method development) โดยการศึกษาสภาวะทางแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟริซิสที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารประกอบในโคโรนาในตำรับยาแก้หวัด โดยการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

- ชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ โดยใช้เมทานอล เอทานอล 2-โพรพานอล และอะซิโตน ในอัตรา ที่ความเข้มข้น 5-30% v/v
- ความเข้มข้นและค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ประกอบด้วยโซเดียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต-โซเดียมคลอไรด์ชนิดกรด ในอัตรา 1 : 1 ในช่วง 5-30 มิลลิโมลาร์ สำหรับผลของพีเอชต่อการแยกสารศึกษาในช่วงพีเอช 4.0-10.0
- อุณหภูมิ ศึกษาในช่วง 25-35 °C
- ความต่างศักย์ไฟฟ้า ศึกษาในช่วง 10-25 กิโลโวลต์

3.2 การประเมินวิธีวิเคราะห์ (method validation) ทำการศึกษาสำหรับยา paracetamol และ chlorpheniramine maleate ซึ่งเป็นสูตรตำรับยาผสมที่มีการผลิตและใช้กันมากที่สุด ในประเทศ โดยศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy) ค่าความขาด percent recovery และ percent bias ความแม่นยำ ของวิธีวิเคราะห์ (precision) ทดสอบจากค่าวิเคราะห์จำนวนในวิธีเดียวกัน (intra-

day precision) และในค่าวันกิน (inter-day precision) ลิมิตการตรวจวัด (limit of detection) และลิมิตการวัดความเข้มข้น (limit of quantitation)

3.3 การวิเคราะห์สารประกอบในโครเจนในตัวอย่างยา ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีแยกสกัดชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตในประเทศไทยโดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นที่ผ่านการประเมิน โดยศึกษาในตัวอย่างยาจำนวน 5 ตัวอย่าง

4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

ขั้นตอนการดำเนินงาน	เดือน			
	1-6	7-12	13-18	19-24
1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์	←→			
2. การประเมินวิธีวิเคราะห์			←→	
3. การวิเคราะห์สารประกอบในโครเจนในตัวอย่างยา				←→
4. การวิเคราะห์ข้อมูล				←→
5. สรุปผลและเขียนรายงานการวิจัย				←→

5. งบประมาณโครงการ (เฉพาะระยะเวลาโครงการที่ได้เสนอไว้ก่อน)

รายการค่าใช้จ่าย	ปีที่ 1	ปีที่ 2	รวม
1. หมวดค่าตอบแทน			
- ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการ	120,000	120,000	240,000
2. หมวดค่าวัสดุ			
- ค่าเอกสารอ้างอิง	3,000	1,000	4,000
- ค่าวัสดุสำนักงาน	5,000	3,000	8,000
- ค่าวัสดุทำความสะอาด	2,000	1,000	3,000
- ค่าวัสดุวิทยาศาสตร์	60,000	60,000	120,000
3. หมวดค่าใช้สอย			
- ค่าวิเคราะห์และทดสอบ	5,000	10,000	15,000
- ค่าพิมพ์ เครื่องเอกสาร	2,000	5,000	7,000
4. อื่นๆ	3,000		3,000
รวมงบประมาณโครงการ	200,000	200,000	400,000

*หากหมวดอื่นใดมีอีกก็ได้

6. สรุปผลการวิจัย

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์องค์ประกอบในยาแก้หวัดซึ่งประกอบด้วย phenylpropanolamine hydrochloride, caffeine, paracetamol, chlorpheniramine maleate, diphenhydramine hydrochloride, dextromethorphen hydrobromide, triprolidine hydrochloride, loratadine และ aspirin ด้วยวิธีแยกป้อนสารที่แยกโพไรฟิรอส โดยการศึกษาปัจจัยของตัวทำละลายอินทรีย์ ความเข้มข้นและพีเอชของอิเล็กโทรไลต์ อุณหภูมิและความต่างศักย์ไฟฟ้า พบผลการที่เหมาะสมในการแยกสารทั้ง 9 ชนิด เป็นดังนี้

Capillary electrophoresis condition

Mode	: micellar electrokinetic chromatography (MEKC)
Capillary tubing	: fused silica 58.5 cm x 75 μ m (effective length 50 cm)
Buffer concentration	: 10 mM sodium dihydrogen phosphate-sodium tetraborate (pH 9.0) containing 50 mM SDS and 26% v/v ACN
Oven temperature	: 30 $^{\circ}$ C
Injection	: pressure 50 mbar x 10 sec
Applied voltage	: +15 kV
Detector	: UV at 214 nm

การประเมินวิธีสำหรับการวิเคราะห์ paracetamol และ chlorpheniramine maleate พบความสัมพันธ์เส้นตรงในช่วง 10-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เส้นตรงนี้ $y = (4.30 \pm 0.07)x + (18.1 \pm 8.2)$ ($r^2 = 0.9993$) สำหรับ paracetamol และ $y = (6.00 \pm 0.08)x - (18.3 \pm 9.3)$ ($r^2 = 0.9995$) สำหรับ chlorpheniramine maleate ความแม่นยำในการวิเคราะห์สำหรับสารทั้งสองชนิดคำนวณจาก %RSD มีค่าอยู่ในช่วง 2-4% ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์คำนวณจาก % recovery สำหรับ paracetamol อยู่ในช่วง 99.22-101.79% และสำหรับ chlorpheniramine maleate อยู่ในช่วง 97.71-101.48% อิมิตการตรวจวัดมีค่าเท่ากับ 0.4 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สำหรับ paracetamol และ chlorpheniramine maleate ตามลำดับ อิมิตการวิเคราะห์ปริมาณมีค่าเท่ากับ 2.0 และ 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สำหรับ paracetamol และ chlorpheniramine maleate ตามลำดับ

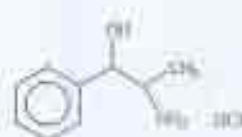
วิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมและถูกต้องสามารถนำไปใช้สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบในยาแก้หวัดซึ่งตัวแยกสารเหล่านี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกัน วิธีการนี้เป็นวิธีการที่สะดวก รวดเร็ว ประหยัด ใช้สารเคมีและสารตัวอย่างในปริมาณที่น้อย ทั้งลดการปนเปื้อนตัวอย่างไม่ยุ่งยาก และไม่ก่อให้เกิด organic waste ซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สารอินทรีย์ที่เป็นเบสจำพวกไนโตรเจน (nitrogenous compounds) อื่นๆใน aspirin เป็นสารที่นิยมใช้ในยานแก้ปวด ยานแก้แพ้ทางเดินหายใจ และยาบรรเทาปวด สารประกอบเหล่านี้ได้แก่ paracetamol (acetaminophen), chlorpheniramine maleate, phenylpropylamine hydrochloride, diphenhydramine, triprolidine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide, caffeine และ loratadine (ภาพที่ 1) เนื่องจากสารเหล่านี้มีคุณสมบัติทางเคมีใกล้เคียงกัน การวิเคราะห์เพื่อตรวจหาปริมาณตัวสารสำคัญในตำรับยาผสมจึงมีความจำเป็นแยกแต่ละตัวออกจากกันเพื่อไม่ให้รบกวนวิธีวิเคราะห์ การสกัดเป็นวิธีการหนึ่งสำหรับแยกสารเหล่านี้ในตำรับยาผสม ตัวอย่างเช่น การสกัด chlorpheniramine maleate, dextromethorphan hydrobromide และ acetaminophen ออกจากกันโดยวิธี acid-dye extractions หรือ ion-pair extraction โดยอาศัยการเกิดสีของตัวยากับ acid dye เป็น ion-pair complex ซึ่งสามารถสกัดแยกด้วยสารอินทรีย์ที่เหมาะสม จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet absorption) (Aoki et al., 1962; Mathew et al., 1972; Mammì and French, 1971; Tauboechi, 1970), การสกัด ephedrine hydrochloride, cinchonine hydrochloride, chlorpheniramine maleate, atropine sulphate และ diphenhydramine hydrochloride ออกจากกันโดยวิธี solvent extraction of mineckate complexes แล้วนำไปวิเคราะห์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (Shahar et al., 1992), การสกัด acetaminophen, pseudoephedrine และ chlorpheniramine maleate โดยวิธี liquid-liquid extraction ด้วยเฮกเซน (hexane) และสารผสมของน้ำและอะซิโตนไนโตร (acetonitrile) ก่อนการวิเคราะห์ด้วย high performance liquid chromatography (HPLC) (Gascó-Lopez et al., 1997) เป็นต้น การสกัดโดยวิธีการเหล่านี้ก็ค่อนข้างยุ่งยาก ใช้เวลานาน และบางครั้งก็ไม่สามารถแยกสารทุกชนิดออกจากกันได้สมบูรณ์

เทคนิคการวิเคราะห์ขั้นสูงได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบไนโตรเจนดังกล่าวที่ผสมในตำรับยาดังกล่าว อาทิ การใช้ HPLC coupled with diode array detection ในการวิเคราะห์ acetaminophen, phenylpropylamine hydrochloride, caffeine, glyceryl guaiacolate และ chlorpheniramine maleate ในอานีโต (Indrayanto et al., 1995) การใช้ derivative and differential spectrophotometry ในการวิเคราะห์ chlorpheniramine maleate, dihydrocodeine bitartrate และ ephedrine hydrochloride ในยาน้ำแก้ไอ (Korany et al., 1990) และการใช้ proton magnetic resonance (NMR) spectroscopy ในการวิเคราะห์ ephedrine, pseudoephedrine และ nor-ephedrine

ในยาผสม (Hanna, 1995) นอกจากนี้ยังมีการวิเคราะห์สารประกอบในโคโรนาในเส้นผมโดยวิธี gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (Nakahara and Kikura, 1997), และในเลือด พลาสมา และปัสสาวะโดยวิธี column switching combined with ion-pair chromatography (Yomashita, et al., 1996) เทคนิคเหล่านี้ต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเฉพาะทางในการวิเคราะห์และสันนิษฐานค่าใช้จำแนก



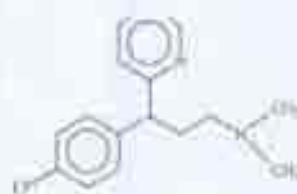
Phenylpropanolamine hydrochloride



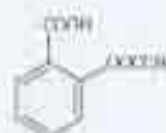
Paracetamol (acetaminophen)



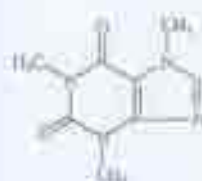
Dextromethorphan hydrobromide



Chlorpheniramine maleate



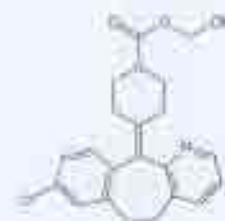
Aspirin



Caffeine



Triprolidine hydrochloride



Lorazepam

ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของสารในองค์ประกอบยาแก้หวัด

แคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary electrophoresis) เป็นวิธีการแยกสารที่กำลังได้รับความนิยมสูง เทคนิคการแยกสารโดยวิธีนี้อาศัยความแตกต่างของสารแต่ละชนิดในการเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้า การแยกเกิดขึ้นภายในคอลัมน์แคปิลลารีขนาดเล็ก ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางโดยทั่วไป 25-75 ไมครอน ภายในบรรจุด้วยบัฟเฟอร์ (buffer) เมื่อให้กระแสไฟฟ้าผ่านคอลัมน์สารประจุบวก (cation) จะเคลื่อนไปยังขั้วคาโทด (cathode) ด้วยความเร็วที่เป็นอัตราส่วนระหว่างค่ามวลต่อประจุ (mass to charge ratios) สารที่เป็นกลางทางไฟฟ้า (neutral compounds) จะเคลื่อนที่พร้อมกับ การไหลอิเล็กโทรออสโมติก (electroosmotic flow) ส่วนสารประจุลบจะเคลื่อนไปยังขั้วแอโนด (anode) ด้วยความเร็วที่เป็นผลต่างของแรงขับเคลื่อนอิเล็กโทรออสโมติกและแรงดึงดูดของขั้วแอโนด การวิเคราะห์โดยแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสกับวิธีวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพสูง ให้ค่าจำนวนเททลา (number of theoretical plate) มากกว่าหรือเท่ากับ 10^5 ใช้สารตัวอย่างและบัฟเฟอร์ปริมาณเล็กน้อย 1-10 นาโนลิตร และใช้เวลาสั้นในการวิเคราะห์โดยเฉลี่ย 10-20 นาทีโดยหนึ่งตัวอย่าง (Monning and Kennedy, 1994)

การวิเคราะห์โดยแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสสามารถทำได้หลายวิธี (modes) ขึ้นกับประเภทของสารตัวอย่าง (Monning and Kennedy, 1994) อาทิ 1) capillary zone electrophoresis (CZE) เหมาะสมกับการวิเคราะห์สารทั่วไป; 2) isotachopheresis (ITP) นิยมใช้เพื่อทำให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่น; 3) isoelectric focusing (IEF) ใช้สำหรับการแยกโปรตีนและโปรตีน โดยอาศัยค่าความแตกต่างของความเป็นกรด-ด่าง (pH gradient) ภายในหลอดแก้ว; 4) micellar electrokinetic chromatography (MECK) ใช้สำหรับการแยกสารไครัล (chiral compounds) และสารที่ไม่มีขั้ว (non-polar) และ 5) capillary gel electrophoresis (CGE) ใช้ในการแยกสารโมเลกุลใหญ่ เช่น นิวคลีโอไทด์ เปปไทด์และโปรตีน

แคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ยา เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายสะดวก ใช้ระยะเวลาสั้น และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารได้หลายประเภท รวมทั้งสารที่มีประจุและสารที่เป็นกลางทางไฟฟ้า การแยกสารอาศัยความแตกต่างในการเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้า ซึ่งขึ้นอยู่กับความสามารถในการเกิดประจุของสารตัวกั้นในบัฟเฟอร์แต่ละชนิด จำนวนและขนาดของประจุ สารประกอบในโครงสร้างที่ผสมในตัวยานเภสัชภัณฑ์ ยานแก้ปวด ยานชาด ยาคลายกล้ามเนื้อ และยาบรรเทาปวด ประกอบด้วยสารที่มีประจุและสารที่เป็นกลางทางไฟฟ้าซึ่งสามารถวิเคราะห์โดยแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส การนำ วิธีนี้มาใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบในโครงสร้างยาที่มีทั้งความเหมาะสม สะดวก รวดเร็ว และประหยัด

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารหรือไอออนต่าง ๆ มีความสามารถในการเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าที่แตกต่างกัน แคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสจึงสามารถใช้วิเคราะห์สารได้เกือบทุกชนิด ตั้งแต่แร่ธาตุระดับอนินทรีย์ถึงสารโพลีเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลถึงสองล้านดัลตัน (Chen and Cassidy, 1993; Richmond and Yeung, 1993) แคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในหลากหลายด้าน : ๑ อย่างกว้างขวาง อาทิ การตรวจหาน้ำตาล กรดอินทรีย์ และโคเลสเตอรอลในอาหารและเครื่องดื่ม (Oehle, 1995; Bergholdt et al., 1993) การวิเคราะห์หาปริมาณการปนเปื้อนใน แป้งโพดและโปรตีน (Higashiguma et al., 1992) และการวิจัยทางการแพทย์เพื่อศึกษาการจับตัวของโปรตีนและยา การออกฤทธิ์ของฮอร์โมน และการศึกษาความระคายเคืองในเลือด (Deyl, et al., 1994)

การวิเคราะห์โดยแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสสามารถทำได้หลายวิธีดังได้กล่าวมาแล้ว เช่น CZE, ITP, IEF, MEKC และ CGE ขึ้นกับชนิดของตัวอย่าง แคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสจึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการควบคุมคุณภาพและมาตรฐาน การพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) การตรวจวิเคราะห์ปริมาณตัวอย่าง การตรวจหาสารปนเปื้อน การวิเคราะห์และแยกสารโพลีเมอร์ที่เป็นสารที่มีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีแตกต่างกันทุกประการ สำหรับการหมุนทวนของแสงโพลาไรซ์ (plane of polarized light) แคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสสามารถวิเคราะห์ได้ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาแตกต่างกันหลายประเภท อาทิ การวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (tetracycline) คลอเตตราไซคลิน (chlorotetracycline) และคลอซีเฟลวโรไซคลิน โดยวิธี CZE และ MEKC (Croubles et al., 1994), การตรวจวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มควิโนโลน (quinolone antibiotics) และสารปนเปื้อน (impurities) โดยวิธี CZE ก็ใช้เหมือนกับวิธี HPLC (Altria and Chantor, 1993), การวิเคราะห์และการแยกเอแนนทิโอเมอร์ของอะมิโนเอทานอล (sulbutamol enantiomers) ซึ่งเป็นยาขยายหลอดลม โดยวิธี MEKC (Esquibel et al., 1997), การวิเคราะห์วิตามินที่ละลายน้ำได้ เช่น ไทอามีน (thiamine), นิโคตินาไมด์ (nicotinamide), ไพริดอกซีน (pyridoxine), แพนโททีน (pantothenate) และกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) โดยวิธี CZE (Jogle, 1993) และการวิเคราะห์สารอนินทรีย์ที่มีฤทธิ์ทางยาโดยการใช้น้ำเฟอรัที่เจือด้วยกรด (aqueous) และนอน-เอควิวอล (non-aqueous) ด้วยวิธี CZE (Gemma et al., 1998) เป็นต้น

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพ (efficiency) ความไว (selectivity) และความเฉพาะเจาะจง (specificity) ของการวิเคราะห์โดยแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้แก่ ชนิด ย่อประกอบและพารามิเตอร์ของบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ ความแรงของบัฟเฟอร์ (ionic strength) ชนิดและความเข้มข้นของ organic modifiers ที่เติมลงในบัฟเฟอร์ (Altria and Chantor, 1993; Croubles et al., 1994; Jogle, 1993) การวิเคราะห์สารประกอบในโละเซนในตัวอย่างกึ่งตัว ยานที่แพ้ภูมิตนเอง ยากดไข่ และยาบรรเทาปวด โดยแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสอาศัยหลักการที่สารเหล่านี้มีคุณสมบัติ

เป็นแบบสามารถถูกโปรโลนท (prolonged) ให้เป็นสารที่มีประจุได้ง่าย และจะเคลื่อนออกจากคอลัมน์แคปิลลารีในเวลาที่ต่างกัน ขึ้นกับความสามารถในการเกิดประจุ ขนาด และจำนวนประจุของสารแต่ละชนิด

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ผสมในตำรับยาแก้หวัด ยาลดไข้ และยาบรรเทาปวด ด้วยวิธีแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส ให้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ มีความถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็ว

ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งพัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับการตรวจสอบประกอบในโคโรเจนที่นิยมใช้ในสูตรตำรับยาแก้หวัด ยาลดไข้ และยาบรรเทาปวด ซึ่งได้แก่ paracetamol (acetaminophen), chlorpheniramine maleate, phenylpropanolamine hydrochloride, diphenhydramine, triprolidine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide, caffeine และ lorazepam โดยแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส ประเมินวิธีที่พัฒนาขึ้นและนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ paracetamol (acetaminophen) chlorpheniramine maleate ซึ่งเป็นตำรับยาผสมที่นิยมใช้มากที่สุด

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมีและเครื่องมือ

รายชื่อสารเคมีและเครื่องมือที่ใช้สรุปไว้ในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ดังนี้

ตารางที่ 1: รายชื่อสารเคมี

ชื่อสาร	ยี่ห้อ	ผู้ผลิต
Paracetamol (acetaminophen) (99.59%)	AR	Aldrich, USA
Aspirin (99.5%)	AR	Sigma, USA
Chlorpheniramine maleate (98%)	AR	Aldrich, USA
Phenylpropanolamine hydrochloride (99%)	AR	Aldrich, USA
Diphenhydramine hydrochloride (99%)	AR	Aldrich, USA
Triprolidine hydrochloride (98%)	AR	Aldrich, USA
Dextromethorphan hydrobromide (99%)	AR	Sigma, USA

ตารางที่ 1 รายชื่อสารเคมี (ต่อ)

ชื่อสาร	เกรด	ผู้ผลิต
Caffeine (99%)	AR	Sigma, USA
Losartidine (99%)	AR	Silom medical, Thailand
Sodium dodecyl sulfate (98%)	AR	Sigma, USA
Sodium dihydrogen phosphate (99.99%)	AR	Fluka, Switzerland
Sodium tetraborate (99.5%)	AR	Carlo Erba, Italy
Phosphoric acid (99.99%)	AR	Merck, Germany
Methanol	HPLC	Scharlau, Spain
Ethanol	HPLC	J.T Baker, USA
2-propanol	HPLC	J.T Baker, USA
Acetonitrile	HPLC	Scharlau, Spain
Sodium hydroxide (99.99%)	AR	Merck, Germany
Deionized distilled water	-	Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

ตารางที่ 2 รายชื่อเครื่องมือ

ชื่อเครื่องมือ	ผู้ผลิต
Capillary electrophoresis instrument (^{CE})	Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany
Capillary tubing, 75 μ m id (375 μ m od)	Polymicro Technologies, USA
pH Meter (TR 156)	Schott Geräte, Hofheim, Germany
Ultrasonic bath (D-7700)	Elma, Söngen, Germany
Electronic analytical balance (AE 160)	Mettler instrumente, Switzerland
Filtration apparatus	Sartorius, Germany
Millipore membrane filter, 0.2 μ m	Gelman Sciences, USA

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. คุณสมบัติของเครื่องมือ (Instrument specifications)

Mode of capillary electrophoresis: micellar electrokinetic chromatography (MEKC)

Instrument: Hewlett Packard[®] CE system (model G1600A)

Computer: HP pentium 4 (500 MHz, RAM 256 MB, hard disk 20 GB) under Microsoft/Windows NT 4.0

Software: Agilent ChemStation Plus software version A.08 (G1601A)

Printer: HP laserjet 4100 was used

Detector: a diode array detector (190-600 nm, wavelength accuracy ± 2 nm) consisted with a deuterium a lamp and detected by continuous emission

Voltage: 0-30 kV (current 0-300 μ A, power 0-6 W)

Temperature: 5-60 $^{\circ}$ C (± 1 $^{\circ}$ C)

Capillary tube: 10-200 μ m I.D. $\times$ 350-400 μ m

Injection system: 1) applying pressure to sample vial and (hydrostatic injection) and
2) applying voltage (electromigration injection)

2. ขั้นตอนการทำงานทั่วไป

การแยกสารทำบนท่อคอล์มแคปิลลารีความยาวทั้งหมด (total length) 58.5 ซม ความยาวจาก inlet ถึง detector (effective length) 50 ซม เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 75 ไมครอน เส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 375 ไมครอน การทำกรรมสภาวะคอล์มคอล์มก่อนการวิเคราะห์แต่ละระหว่างการวิเคราะห์แสดงผลการวิ่ง 3 การฉีดสารทำโดยการใช้ความดัน 50 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 10 วินาทีจากด้านหัวท่อ ในที่สุด การตรวจวัดสารทำโดยการใช้การดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร

ตารางที่ 3 การทำความสะอาดคอลัมน์

ขั้นตอน	ระยะเวลา	สารละลาย
New capillary tube		
1) Rinse	20 min	1 M NaOH
2) Rinse	5 min	Deionized water
3) Rinse	10 min	0.1 M NaOH
4) Rinse	10 min	Deionized water
5) Rinse	10 min	Buffer
Between run after 5 injections		
1) Rinse	5 min	Deionized water
2) Rinse	10 min	Buffer
Storage		
1) Rinse	10 min	Deionized water
2) Rinse	15 min	0.1 M NaOH
3) Rinse	15 min	Deionized water
4) Rinse	20 min	MeOH
5) Rinse	10 min	Air

3. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard preparations)

สารละลาย stock standard solutions ของ paracetamol, chlorpheniramine maleate, aspirin, phenylpropanolamine hydrochloride, diphenhydramine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide, triprolidine hydrochloride และ cetirizine เตรียมโดยการละลายสารมาตรฐานแต่ละชนิดใน deionized water ให้มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สำหรับ loratadine ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย สารละลาย stock solutions ทั้งหมดเก็บในตู้เย็น 5°C

สารละลาย working standard solutions เตรียมโดยการเจือจางจาก stock standard solutions ให้มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สารละลายผสมของสารมาตรฐานพร้อมโดยการเจือจาง 10 ไมโครกรัมของ working standard solution แต่ละชนิด ด้วย deionized water และปรับให้มีปริมาตร 10 มิลลิกรัม

4. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ (Method development)

สถานะเริ่มต้นในการแยกยา paracetamol, chlorpheniramine maleate, aspirin, phenylpropanolamine hydrochloride, diphenhydramine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide, triprolidine hydrochloride, caffeine and loxasoline ได้แก่ คีเล็คโทรไลต์ซึ่งประกอบด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต-โซเดียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ (พีเอช 9.0) 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมโพรพิลซัลเฟต และ 5 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล ใช้คอลัมน์แบบเปิดยาวความยาว effective length of 60 ซม เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 75 ไมครอน ความต้านทานไฟฟ้า 25 กิโลโอม์ และตรวจวัดที่ ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษานี้ มีปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการแยกสาร ได้แก่ ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ ความเข้มข้นและพีเอชของคีเล็คโทรไลต์ อุณหภูมิและความต้านทานไฟฟ้า สถานะที่เหมาะสมที่สุดในการแยกสารพิจารณาจากเวลาในการเคลื่อนที่ของสาร (migration time, t_m) ความสามารถในการเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้า (apparent mobility, μ_a) และความสามารถในการแยกสาร (resolution, R_s) ซึ่งคำนวณจากสมการดังต่อไปนี้

$$\mu_a = \frac{L}{E \cdot t_m} = \frac{L}{V}$$

$$\mu_a = \mu_e + \mu_{we}$$

$$\mu_e = \mu_a - \mu_{we}$$

$$R_s = \frac{2(t_{m_{x+1}} - t_{m_x})}{w_x + w_{x+1}}$$

where	μ_a	- apparent mobility (cm^2/Vs)
	μ_e	- effective mobility (cm^2/Vs)
	μ_{we}	- the electro-osmotic flow mobility (cm^2/Vs)
	L	- the distance from the point of injection to the detector (cm) (effective capillary length to the detector)
	t	- the time taken for the species to migrate to the region of the detector (migration time, min)
	E	- the electric field (V/L , V/cm)
	V	- the applied voltage (kV)
	L	- the total length of the capillary (cm)
	$t_{m_{x+1}}$	- migration time of peak x (min), where $t_{m_{x+1}} > t_{m_x}$
	w_x	- base width for peak x (min)

4.1 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ (Effect of organic modifiers)

การเติมตัวทำละลายอินทรีย์มีผลเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกสาร ในการศึกษาได้ใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เช่น เมทานอล เอทานอล 2-โพรพานอล และอะซิโตนไนไตรล์ ที่ความเข้มข้นในช่วง 5-30 % v/v

4.2 ผลของความเข้มข้นและพีเอชของบัฟเฟอร์ (Effect of buffer concentrations and pH)

ผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ได้ออกฤทธิ์ต่อการแยกสาร ได้ศึกษาในบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วยโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต-โซเดียมคลอไรด์ระบบกรด-เบส ในอัตรา 1 : 1 ในช่วง 5-30 มิลลิโมลาร์ บัฟเฟอร์ได้ออกฤทธิ์ต่อความเข้มข้นของสารด้วย 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไดไฮดรอกไซด์เฟด ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมจากข้อ 4.1 ผลของพีเอชต่อการแยกสาร ได้ศึกษาในช่วงพีเอช 4.0-10.0

4.3 ผลของอุณหภูมิและความต่างศักย์ไฟฟ้า (Effect of temperature and voltage)

อุณหภูมิและความต่างศักย์ไฟฟ้ามีผลต่อเวลาและความเร็วในการเคลื่อนที่ของสาร ในการศึกษาได้ปรับเปลี่ยนอุณหภูมิของหลอดในระหว่าง 25-35 °C และความต่างศักย์ไฟฟ้าในช่วง 10-25 กิโลโวลต์

5. การประเมินวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

การประเมินวิธีวิเคราะห์ทำการศึกษาสำหรับยา paracetamol และ chlorpheniramine maleate ซึ่งเป็นสูตรตำรับยาผสมที่มีการผลิตและใช้กันมากที่สุดในประเทศ โดยศึกษาในหัวข้อต่อไปนี้

5.1 ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)

ความสัมพันธ์เชิงเส้นจะศึกษาโดยการฉีด working standard solutions ความเข้มข้น 10-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ฉีดความเข้มข้น 3 ครั้ง ความสัมพันธ์เชิงเส้นคำนวณจาก linear regression with correlation coefficient (r^2) โดยใช้ Sigma Plot 2000 version 7.0

5.2 ความแม่นยำ (Precision)

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ประเมินจากความแม่นยำในการฉีดสาร (injection precision) ความแม่นยำในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (intra-day precision) และต่างวันกัน (inter-day precision) ความแม่นยำคำนวณจาก percentage of relative standard deviation (% RSD) ดังสมการต่อไปนี้

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

where SD = the standard deviation from the mean value
 $\bar{X}$ = the mean value

ความแม่นยำในการวัดสารศึกษาโดยการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และฉีด 10 ครั้ง ติดต่อกัน ความแม่นยำในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน ศึกษาโดยการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และฉีดความเข้มข้นละ 6 ครั้ง ความแม่นยำในการวิเคราะห์ต่างวันกันศึกษาโดยการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 6 วัน ที่แตกต่างกันและฉีดความเข้มข้นละ 3 ครั้ง

5.3 ความถูกต้อง (Accuracy)

ความถูกต้องของวิธีประเมินได้ใช้ standard addition method โดยการเติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่างในปริมาณ 30-150% ของปริมาณที่แท้จริงในอีก การถูกต้องของวิธีคำนวณจาก percent recovery (%R) ซึ่งคำนวณจากสมการต่อไปนี้

$$\% Recovery = \frac{X_{\text{found}}}{X_{\text{added}}} \times 100$$

where X_{found} = the concentration of standard found in the spiked sample
 X_{added} = the concentration of standard added

5.4 ลิ้มิตการตรวจวัด (Limit of detection, LOD)

ลิ้มิตการตรวจวัดหมายถึงความเข้มข้นต่ำสุดของสารซึ่งวิธีสามารถตรวจวัดได้ซึ่งพิจารณาจากอัตราส่วนระหว่างสัญญาณและสัญญาณรบกวน (signal to noise, S/N) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3

5.5 ลิ้มิตการวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ลิ้มิตการวิเคราะห์ปริมาณหมายถึงความเข้มข้นต่ำสุดของสารซึ่งวิธีสามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้อย่างถูกต้องแม่นยำซึ่งพิจารณาจากอัตราส่วนระหว่างสัญญาณและสัญญาณรบกวน (signal to noise, S/N) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 10

6. การวิเคราะห์สารประกอบในโครเซนในตัวอย่างยา (Determination of cold ingredient in formulations)

นำวิธีที่พัฒนาขึ้นและผ่านอาร์ประเมินมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบในโครเซนในตัวอย่างยา 5 ตัวรับ นำตัวอย่างยาเม็ดแต่ละยี่ห้อจำนวน 20 เม็ด มาบดให้ละเอียด ซึ่งผงยาละลายด้วย deionized water กรองด้วยกระดาษกรอง 4 Whattman No.1 และเอ็กแมมเบรอนขนาด 0.2 ไมครอน และเจือจางให้มีความเข้มข้นของตัวอย่างสำคัญ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นในข้อ 4

ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาการพัฒนาวิธีไมโครอาร์เรย์อิเล็กโทรโครมาโทกราฟี สำหรับวิเคราะห์สารประกอบในตัวอย่างยาเม็ด ได้แก่ paracetamol, chlorpheniramine maleate, caffeine, phenylpropanolamine hydrochloride, diphenhydramine hydrochloride, triprolidine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide, aspirin และ lorazepam โดยการศึกษาของตัวอย่างละลายอินทรีย์ ความเข้มข้นและพีคของอิเล็กโทรโครมาโทกราฟี และคุณสมบัติการแยกตัวของตัวอย่าง วิจัยที่พัฒนาขึ้นผ่านการประเมินและนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ paracetamol and chlorpheniramine maleate ในตัวอย่างยาเม็ด

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

สารประกอบในตัวอย่างยาเม็ดที่ศึกษามีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 1 สารดังกล่าวมีการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตดังแสดงในภาพที่ 2 การวิเคราะห์สารจึงทำการตรวจสอบวัดความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่สารทุกชนิดมีการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตที่ดี

1.1 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์

จากการวิเคราะห์สารที่ศึกษาทั้ง 9 ชนิดโดยสภาวะการทดลองที่รายงานโดย Suntornsuk (Suntornsuk, 2001) พบว่าสารทั้งหมดถูกแยกออกเป็น 6 กลุ่ม โดยมีลำดับการแยกดังนี้ paracetamol, caffeine, lorazepam, aspirin, chlorpheniramine maleate ส่วนสาร phenylpropanolamine hydrochloride, diphenhydramine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide และ triprolidine hydrochloride ซ้อนทับกัน ไม่สามารถแยกจากกันได้ เวลาในการเสถียรของสารทั้งหมดเท่ากับ 26.9 นาที ดังนั้นจึงได้ศึกษาการแยกสารในตัวทำละลายชนิดอื่น (e.g. EtOH, i-PrOH and ACN) ตารางที่ 4 ภาพที่ 3-4 แสดงการแยกสารในตัวทำละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ชนิดต่างๆ

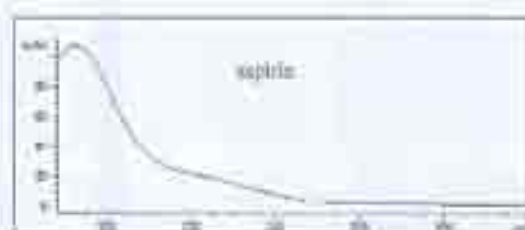
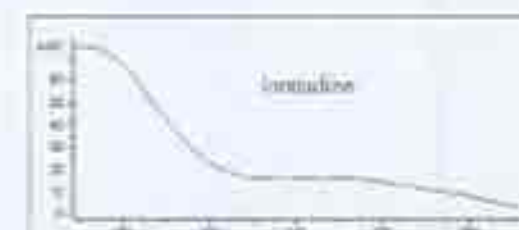
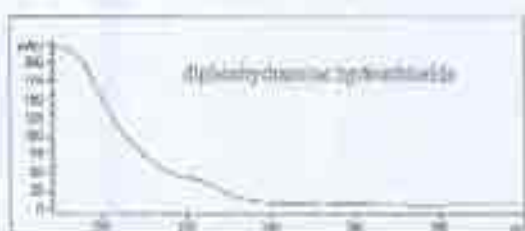
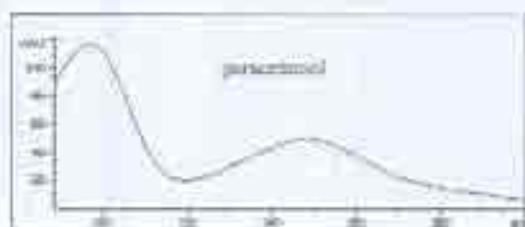
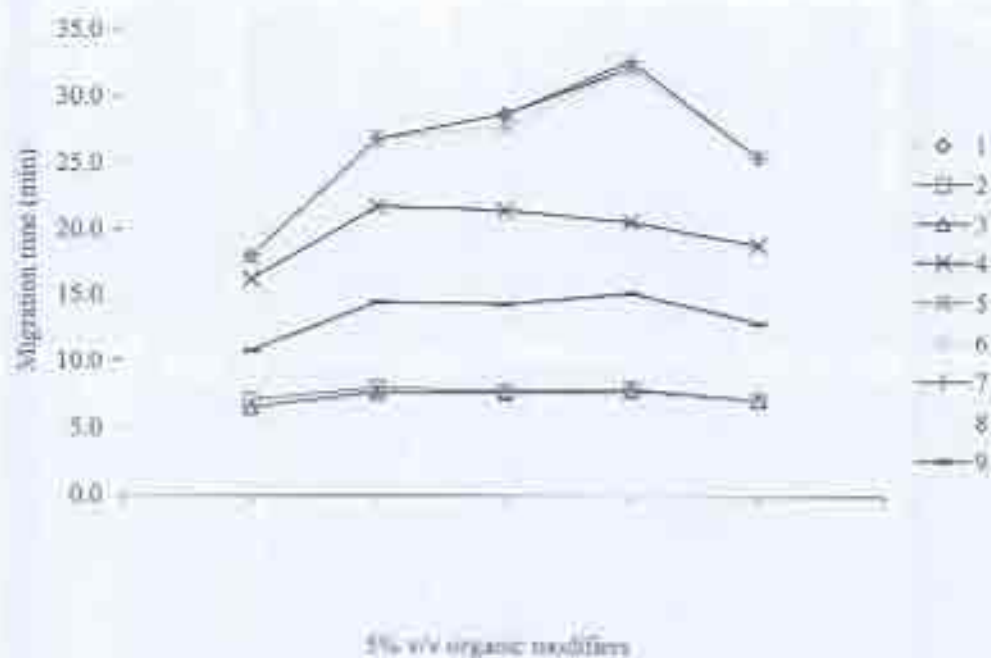
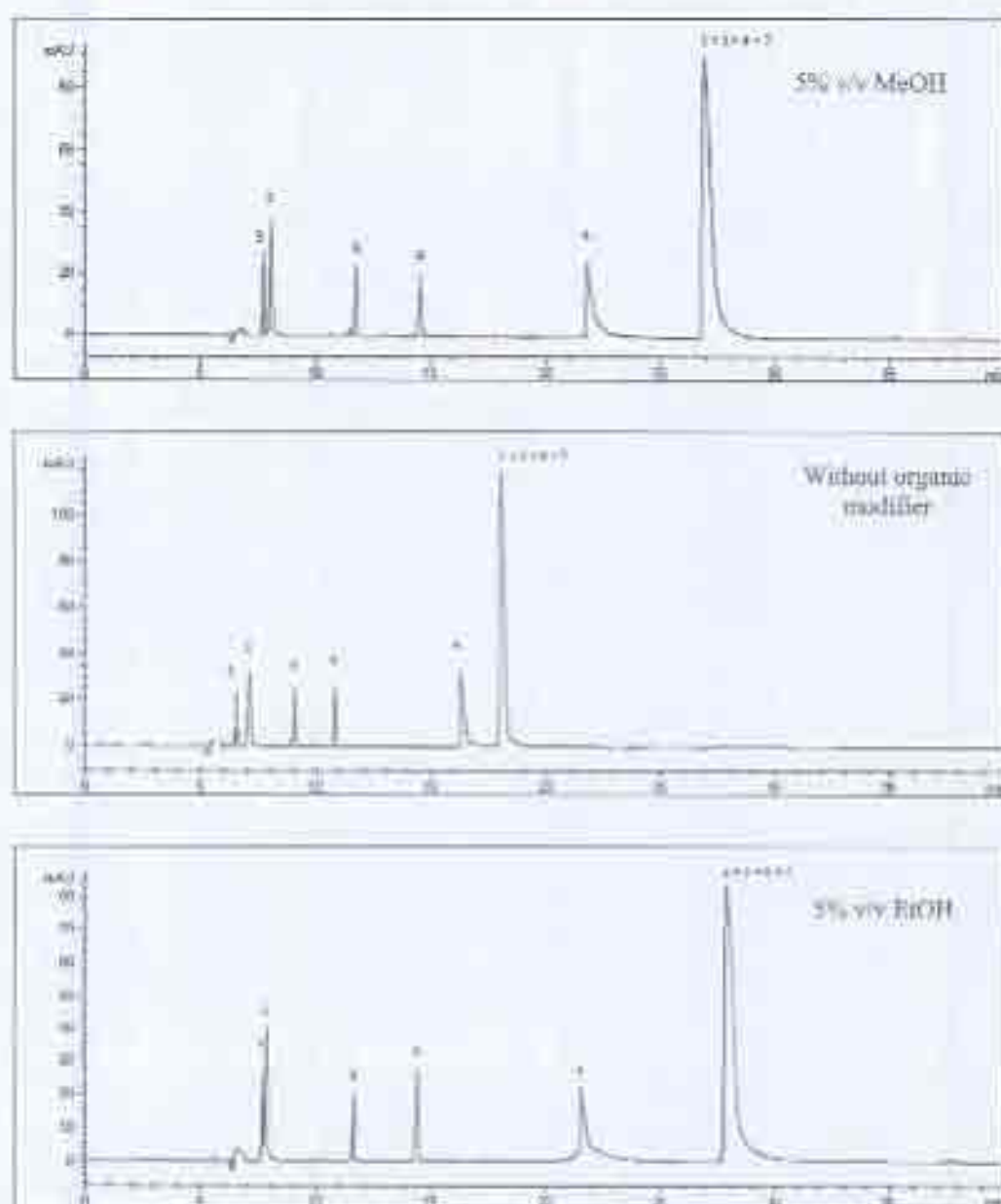


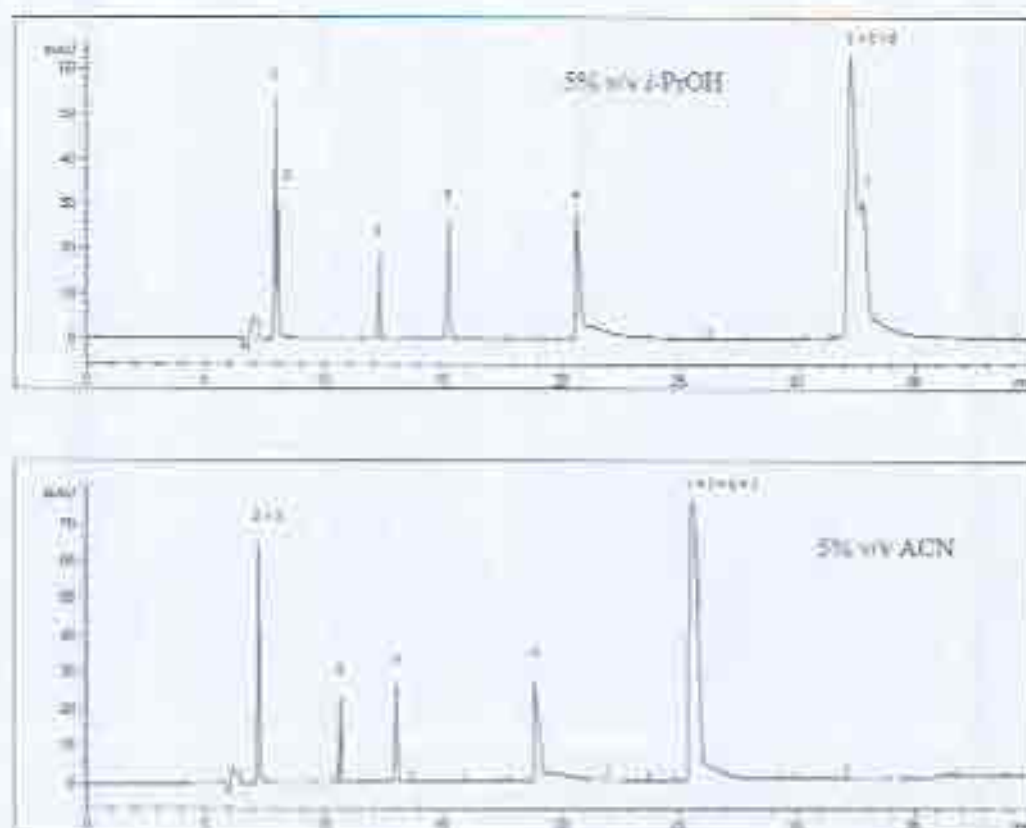
Figure 2 UV spectra of various drugs



ภาพที่ 3 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการแยกสาร: Condition: 10 mM sodium dihydrogen phosphate-sodium tetraborate, pH 9.0 containing 50 mM SDS; capillary, 50 cm effective length (8.5 cm to detector), 75 μ m I.D.; detection by UV absorbance at 214 nm; applied voltage: 15 kV; temperature: 30 $^{\circ}$ C. Identification: 1 = phenylpropanolamine hydrochloride, 2 = caffeine, 3 = paracetamol, 4 = chlorpheniramine maleate, 5 = diphenhydramine hydrochloride, 6 = dextromethorphan hydrobromide, 7 = triprolidine hydrochloride, 8 = lorazepam and 9 = aspirin.



ภาพที่ 4 อิเล็กโตรโฟเรียมของสารแยกสารในหัวหาคะลายอื่นที่เข้มข้นต่าง ๆ Condition: 10 mM sodium dihydrogen phosphate-sodium tetraborate, pH 9.0 containing 50 mM SDS; capillary, 50 cm effective length (8.5 cm to detector), 75 μ m I.D.; detection by UV absorbance at 214 nm; applied voltage: 15 kV; temperature: 30 $^{\circ}$ C. Peak identification: 1 = phenylpropanolamine hydrochloride, 2 = caffeine, 3 = paracetamol, 4 = chlorpheniramine maleate, 5 = diphenhydramine hydrochloride, 6 = dextromethorphan hydrobromide, 7 = triprolidine hydrochloride, 8 = lorastadine and 9 = aspirin



ภาพที่ 4 (ต่อ) โครมาโทแกรมของการแยกสารในตัวอย่างอะนาลิซิสต่าง ๆ Condition: 10 mM sodium dihydrogen phosphate-sodium tetraborate, pH 9.0 containing 50 mM SDS; capillary, 50 cm effective length (8.5 cm to detector), 75 μ m I.D.; detection by UV absorbance at 214 nm; applied voltage: 15 kV; temperature, 30 $^{\circ}$ C. Peak identification: 1 - phenylpropanolamine hydrochloride, 2 - caffeine, 3 - paracetamol, 4 - chlorpheniramine maleate, 5 - diphenhydramine hydrochloride, 6 - dextromethorphan hydrobromide, 7 - triprolidine hydrochloride, 8 - lorazepam and 9 - aspirin

ผลการวิจัยแสดงว่าการใช้ alcohol ไม่มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์ แต่การใช้ อะซิโตนไนโตรเจน มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์ ตารางที่ 5 และ ภาพที่ 5 แสดงผลของการเพิ่ม ปริมาณ อะซิโตนไนโตรเจนต่อการแยกสาร ซึ่งพบว่าปริมาณที่เหมาะสม คือ 25% โดยปริมาตร อะซิโตนไนโตรเจน โดยใช้เวลาในการแยกสาร 25.5 นาที และให้ค่า resolution 3.0

Table 5. Resolution of compounds 1-9 on the basis of migration times, apparent mobilities (10% resolution) and R_F values.

Compounds	Without organic			50% CAS								
	Modifier			10 %			20 %			25 %		
	t _R (min)	u _R	R _F	t _R (min)	u _R	R _F	t _R (min)	u _R	R _F	t _R (min)	u _R	R _F
1	18.011	1.8025	5.8	17.825	1.823	4.72	11.786	2.778	2.4	8.209	3.960	-
2	7.106	4.574	3.3	7.583	4.286	-	9.815	2.311	-	8.951	3.631	3.4
3	6.540	4.969	-	7.049	4.089	3.1	11.316	2.872	10.2	9.915	3.278	4.5
4	16.243	2.001	25.4	41.193	0.789	46.1	>60.0	ND	-	15.589	2.085	20.0
5	18.011	1.804	5.8	43.204	0.752	0.8	>60.0	ND	-	17.278	1.881	4.6
6	18.011	1.804	5.8	41.623	0.781	0.7	>60.0	ND	-	19.620	1.656	2.3
7	18.011	1.804	5.8	42.248	0.769	0.6	>60.0	ND	-	20.613	1.572	1.0
8	9.058	3.588	11.7	12.684	2.562	35.1	27.685	1.174	43.7	23.835	1.364	6.9
9	10.808	3.907	13.7	16.156	2.012	17.1	57.355	0.870	21.5	28.144	1.155	7.8

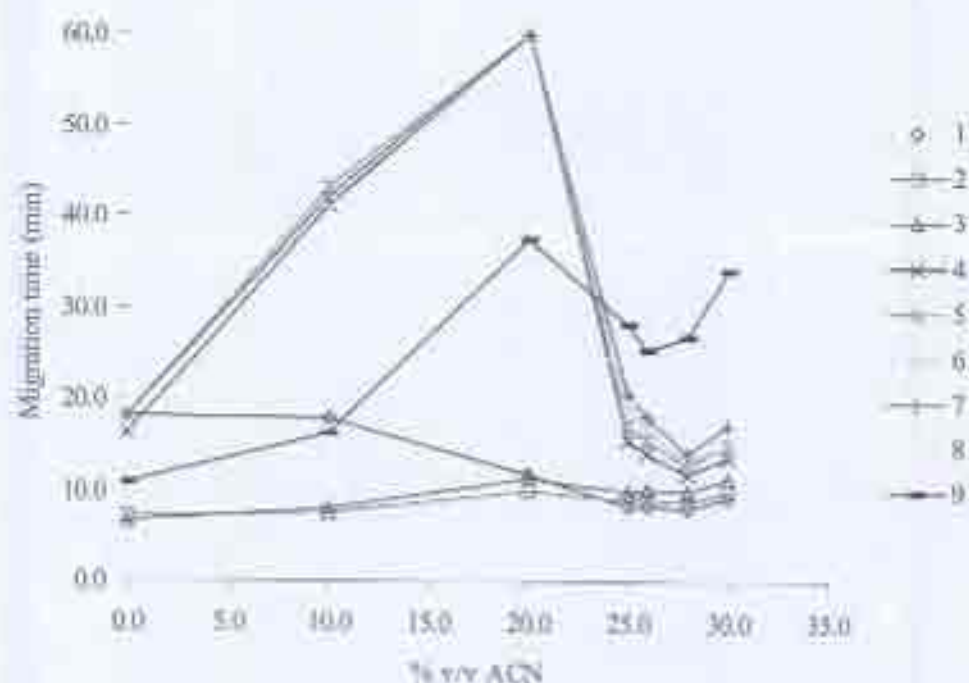
Identification: 1 = phenylpropylamine hydrochloride, 2 = caffeine, 3 = paracetamol, 4 = chlorpheniramine malate, 5 = diphenhydramine hydrochloride,

6 = dextromethorphan hydrobromide, 7 = triprolidine hydrochloride, 8 = fenistamine and 9 = aspirin, ND = not determined.

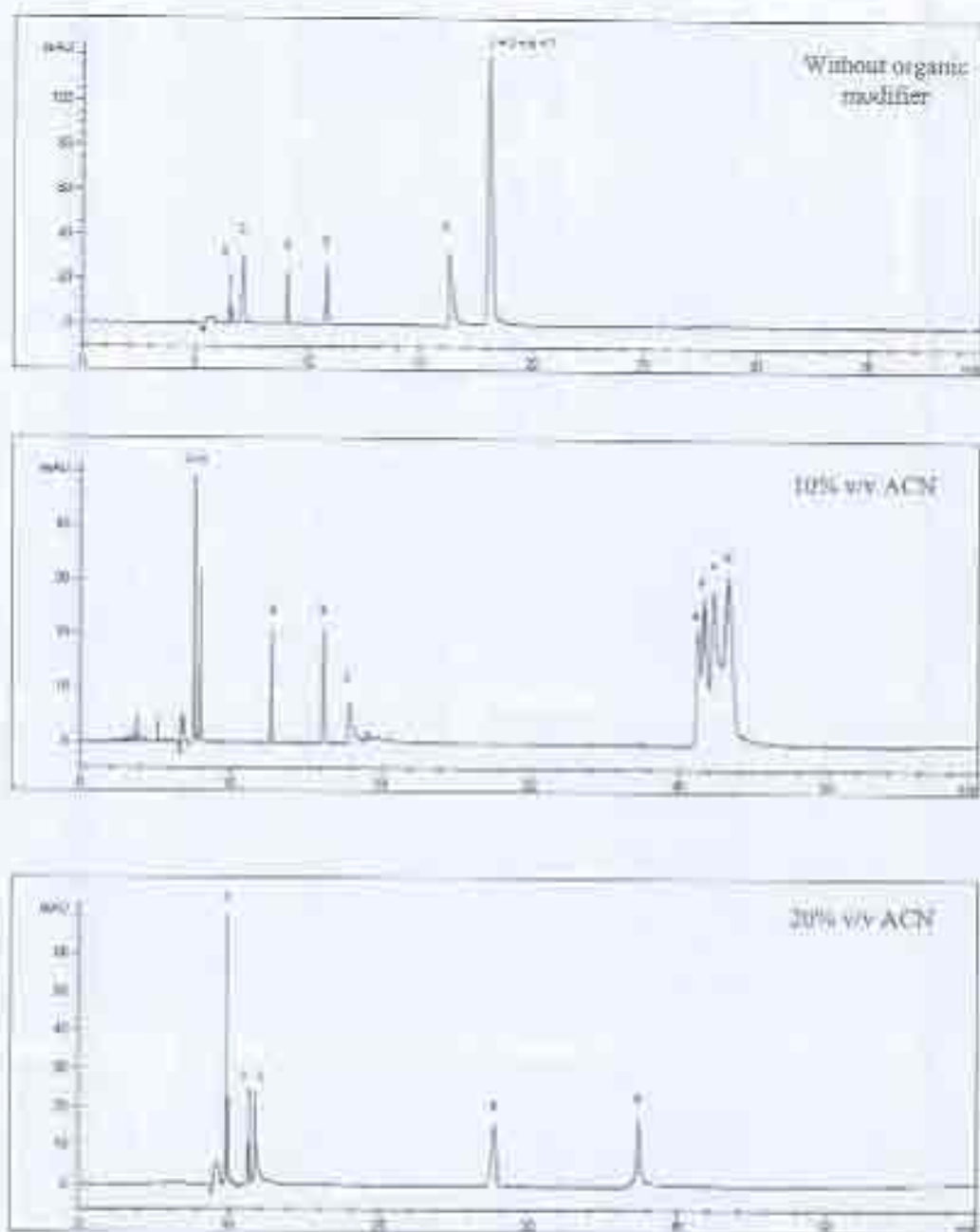
ตารางที่ 5 (ต่อ) ผลของการปรับความเข้มข้นในเฟสเคลื่อนที่ต่อการแยก, apparent mobilities and resolutions ที่ 80 มิลลิเมตร

Compounds	% 80 v/v ACN								
	26 %			28 %			30 %		
	t_R (min)	u_R	R_s	t_R (min)	u_R	R_s	t_R (min)	u_R	R_s
1	8.206	3.961	-	8.021	4.049	-	9.222	3.574	-
2	8.958	3.628	7.2	8.786	3.699	6.6	9.222	3.524	-
3	10.035	3.239	5.1	9.801	3.316	4.9	11.391	2.853	8.1
4	14.084	2.308	15.5	11.856	2.741	8.7	13.578	2.394	8.3
5	15.478	2.100	4.3	12.810	2.537	2.7	15.908	2.166	9.6
6	16.756	1.940	3.0	13.168	2.468	0.7	15.008	2.166	4.4
7	18.105	1.795	3.0	14.156	2.296	2.6	17.061	1.905	4.8
8	24.232	1.336	11.5	17.638	1.843	10.1	24.916	1.304	10.1
9	25.492	1.275	2.1	20.731	1.216	10.4	34.110	0.953	13.8

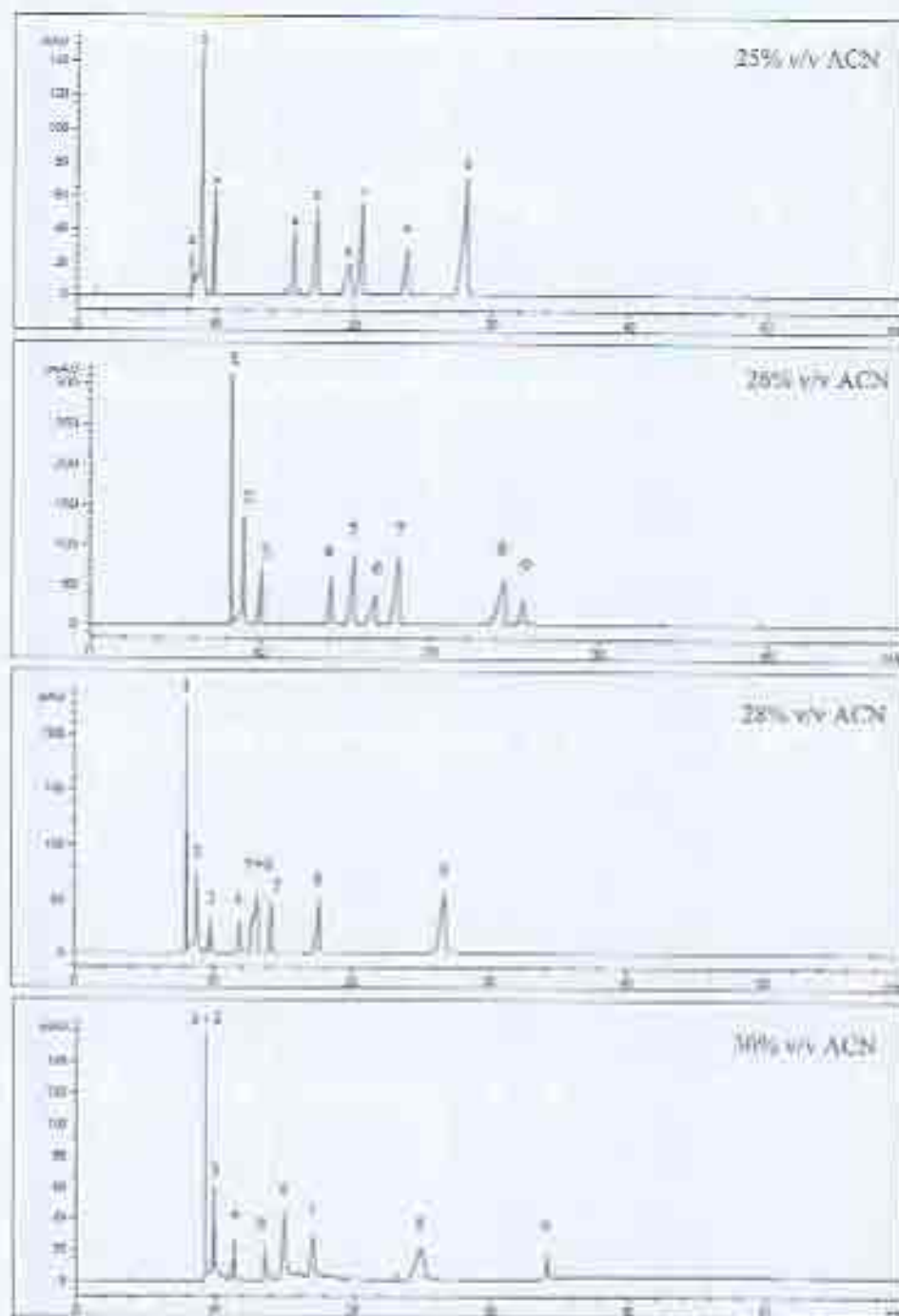
Identification 1 = phenylpropanolamine hydrochloride, 2 = caffeine, 3 = paracetamol, 4 = chlorpheniramine maleate, 5 = diphenhydramine hydrochloride, 6 = dextromethorphan hydrobromide, 7 = triproline hydrochloride, 8 = formadine and 9 = aspirin



ภาพที่ 5 ผลของปริมาณอะซิโตนในโคโรนต์ต่อการแยกสาร Condition: 10 mM sodium dihydrogen phosphate-sodium tetraborate, pH 9.0 containing 50 mM SDS; capillary, 50 cm effective length (8.5 cm in detector), 75 μ m I.D.; detection by UV absorbance at 214 nm; applied voltage: 15 kV; temperature: 30 $^{\circ}$ C. Identification: 1 = phenylpropanolamine hydrochloride, 2 = caffeine, 3 = paracetamol, 4 = chlorpheniramine maleate, 5 = diphenhydramine hydrochloride, 6 = dextromethorphan hydrobromide, 7 = triprolidine hydrochloride, 8 = lorazepam and 9 = aspirin.



ภาพที่ 6 โวลุ่มโครมาโทกราฟีรีแอมของสารเภสัชในอะซิโตนในอัตราส่วนต่าง ๆ Condition: 10 mM sodium dihydrogen phosphate-sodium tetraborate, pH 9.0 containing 50 mM SDS; capillary, 50 cm effective length (8.5 cm to detector), 75 μ m I.D.; detection by UV absorbance at 214 nm; applied voltage: 15 kV; temperature: 30 $^{\circ}$ C. Peak identification: 1 = phenylpropanolamine hydrochloride; 2 = caffeine; 3 = paracetamol; 4 = chlorpheniramine maleate; 5 = diphenhydramine hydrochloride; 6 = dextromethorphan hydrobromide; 7 = triprolidine hydrochloride; 8 = loratadine and 9 = aspirin



ภาพที่ 6 (ต่อ) อีเล็กโทรโฟเรโกราฟีของสารออกฤทธิ์ในยาแก้ปวดชนิดต่าง ๆ Condition: 10 mM sodium dihydrogen phosphate-sodium tetraborate, pH 9.0 containing 50 mM SDS; capillary, 50 cm effective length (8.5 cm to detector), 75 μ m I.D.; detection by UV absorbance at 214 nm; applied voltage: 15 kV; temperature: 30 $^{\circ}$ C. Peak identification: 1 - phenylpropanolamine hydrochloride, 2 - caffeine, 3 - paracetamol, 4 - chlorpheniramine maleate, 5 - diphenhydramine hydrochloride, 6 - dextromethorphan hydrobromide, 7 - triprolidine hydrochloride, 8 - loratadine and 9 - aspirin

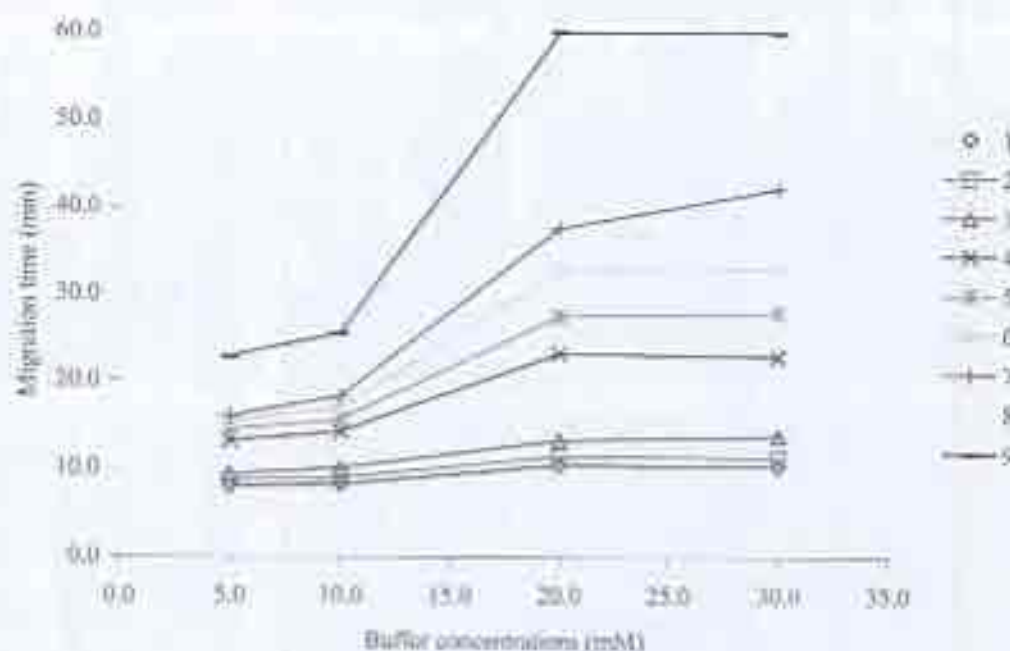
1.2 ผลของความเข้มข้นของอิเล็กโทรไลต์

การวิจัยนี้ศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมไคลโอโรเจนฟอสเฟต-โซเดียมเพอร์บอเรต อัตราส่วน 1 : 1 (พิกษ 9.0) ในช่วงความเข้มข้น 5-30 มิลลิโมลาร์ ซึ่งประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไคลโอโรเจนฟอสเฟต และ 26% ไดอปริมาตร อะซิโตนไนโตรส เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเวลาในการเคลื่อนที่ของสารเพิ่มขึ้นเนื่องจากความสามารถในการเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าลดลง (ตารางที่ 6 ภาพที่ 7-8) ที่ความเข้มข้น 20 และ 30 มิลลิโมลาร์ สารทั้ง 9 ชนิดถูกแยกเป็น 7 พิก โดยมีเวลาในการเคลื่อนที่ทั้งหมด 37.6 และ 42.2 นาที ตามลำดับ โดยมีลำดับการแยกสารเป็นดังนี้ phenylpropanolamine hydrochloride, caffeine, paracetamol, chlorpheniramine maleate, diphenhydramine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide and triprolidine hydrochloride ตามลำดับ สาร loratadine และ aspirin ไม่สามารถถูกตรวจวัดได้ใน 60 นาที ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ สารทั้งหมดสามารถถูกแยกได้เป็น 9 พิก โดยมีเวลาในการเคลื่อนที่ทั้งหมด 22.8 และ 25.3 นาที ตามลำดับ ลำดับการแยกสารเป็นดังนี้ phenylpropanolamine hydrochloride, caffeine, paracetamol, chlorpheniramine maleate, diphenhydramine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide, triprolidine hydrochloride, loratadine และ aspirin อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ phenylpropanolamine hydrochloride และ caffeine ไม่สามารถแยกกันจนถึง baseline แต่สารทั้งสองสามารถถูกแยกออกจากกันที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (รูป 3)

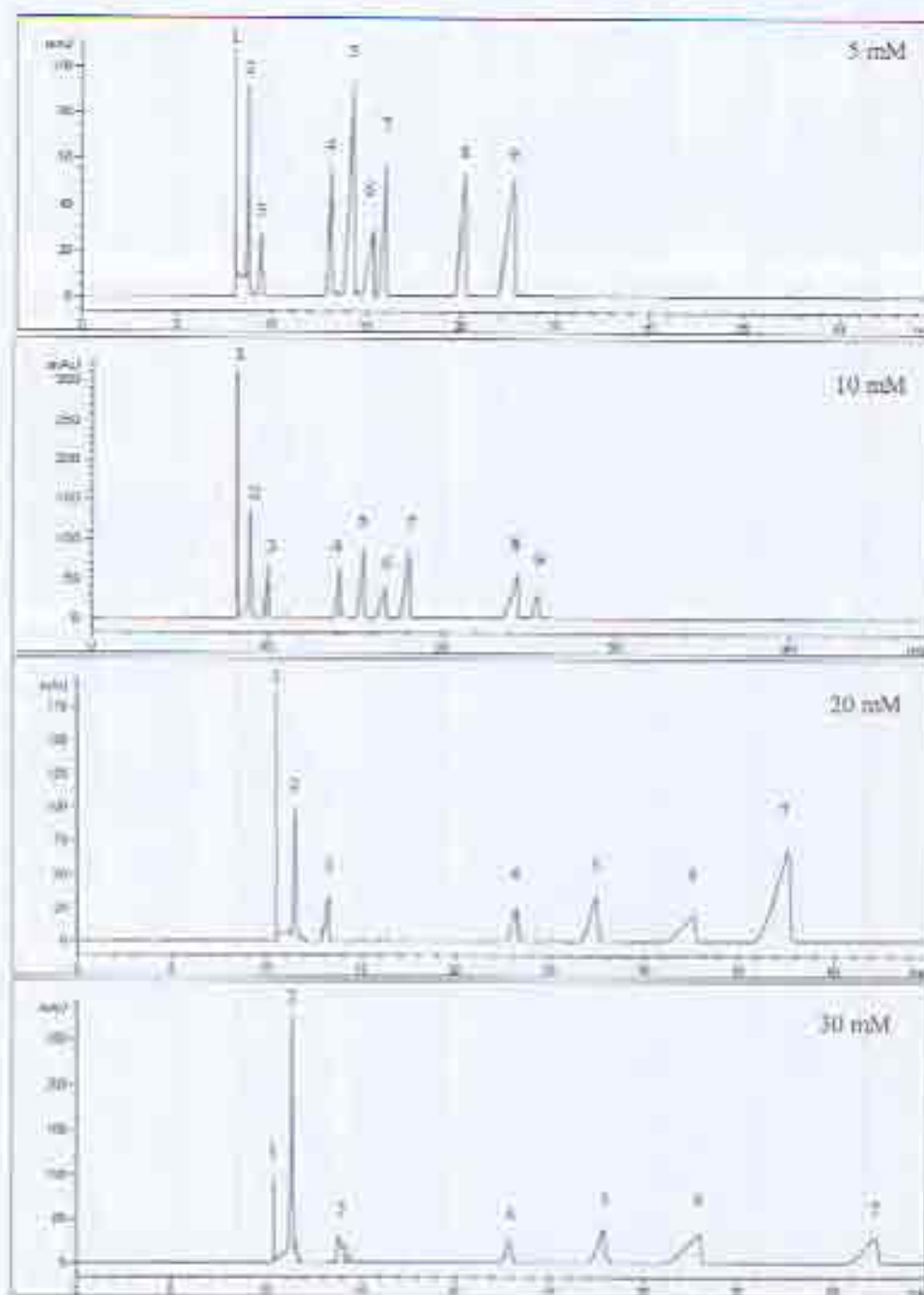
ตารางที่ 6 ผลของความเข้มข้นของอิเล็กโทรไลต์ที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสารประกอบต่างๆ

Compounds	Buffer concentration (mM)											
	5 mM			10 mM			20 mM			30 mM		
	t_R (min)	α_s	R_s	t_R (min)	α_s	R_s	t_R (min)	α_s	R_s	t_R (min)	α_s	R_s
1	7.994	4.066	-	8.206	3.961	-	10.429	3.113	-	10.353	3.139	-
2	8.714	3.730	-	8.958	3.628	7.2	11.430	2.843	8.8	11.311	2.873	8.9
3	9.369	3.469	2.7	10.038	3.238	5.1	13.237	2.455	6.9	13.764	2.361	5.6
4	13.131	2.475	12.4	14.084	2.308	15.5	23.166	1.403	22.7	22.850	1.422	15.3
5	14.309	2.271	3.1	15.478	2.100	4.3	27.405	1.186	6.3	27.882	1.166	7.9
6	15.281	2.127	2.2	16.756	1.940	3.0	32.615	0.996	4.9	32.957	0.986	4.6
7	15.882	2.046	2.0	18.103	1.795	2.0	37.605	0.864	3.6	42.235	0.770	6.7
8	20.205	1.609	10.7	24.332	1.336	11.5	>60.0	ND	-	>60.0	ND	-
9	22.791	1.426	4.3	25.492	1.275	2.1	>60.0	ND	-	>60.0	ND	-

Identification 1 = phenylpropanolamine hydrochloride, 2 = caffeine, 3 = paracetamol, 4 = chlorpheniramine maleate, 5 = diphenhydramine hydrochloride, 6 = dextromethorphan hydrobromide, 7 = triprolidine hydrochloride, 8 = lorazepam and 9 = aspirin, ND = not determined



ภาพที่ 7 ผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่มีต่อการแยกสาร Condition: different buffer concentrations, pH 9.0 containing 50 mM SDS; 26% v/v ACN; capillary, 50 cm effective length (8.5 cm to detector), 75 μ m I.D.; detection by UV absorbance at 214 nm; applied voltage: 15 kV; temperature: 30 $^{\circ}$ C. Identification: 1 = phenylpropanolamine hydrochloride, 2 = caffeine, 3 = paracetamol, 4 = chlorpheniramine maleate, 5 = diphenhydramine hydrochloride, 6 = dextromethorphan hydrobromide, 7 = triprolidine hydrochloride, 8 = lorazepam and 9 = aspirin



ภาพที่ 8. โครมาโทแกรมของการแยกสารในอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ Condition: different buffer concentrations, pH 9.0 containing 50 mM SDS; 26% v/v ACN; capillary, 50 cm effective length (8.5 cm to detector), 75 μ m ID; detection by UV absorbance at 214 nm; applied voltage: 15 kV; temperature: 30 $^{\circ}$ C. Peak identification: 1 - pöcnytypropanolamine hydrochloride, 2 - caffeine, 3 - paracetamol, 4 - chlorpheniramine maleate, 5 - diphenhydramine hydrochloride, 6 - dextromethorphan hydrobromide, 7 - triprolidine hydrochloride, 8 - lorazepam and 9 - aspirin

1.3 ผอของพีเอชของอิเล็กโทรไลต์

พีเอชเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการแยกสารสำหรับเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในการวิจัยนี้ศึกษาผลของพีเอชช่วง 4.0-10.0 ของอิเล็กโทรไลต์ซึ่งประกอบด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต-โซเดียมคลอไรด์ระบบแรงดัน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมโอดีซัลเฟต และ 26% ไดเมทิลแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (ตารางที่ 7 ภาพที่ 9-10) พีเอช 7.0 ไม่เหมาะสมสำหรับการแยกสาร เนื่องจากที่พีเอชนี้สารทั้งหมดยกเว้นคลอโรฟอร์มเคลื่อนที่กับการไหลอิเล็กโทรออสโมติก (electro-osmotic flow, EOF) ปรากฏเป็นพีคเพียงพีคเดียวที่ 13.9 นาที การลดพีเอชเป็น 4.0 ทำให้พีคของ phenylpropanolamine hydrochloride และ caffeine ซ้อนทับกัน และเวลาในการเคลื่อนที่ของสารทั้งหมด 19.1 นาที โดยมีค่าดัชนีการแยกเป็นดังนี้ phenylpropanolamine hydrochloride ซ้อนทับกับ caffeine, paracetamol, lorazepam and aspirin; dextromethorphan hydrobromide, triprolidine hydrochloride และ diphenhydramine hydrochloride ตามลำดับ ประสิทธิภาพการแยกสารเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มพีเอชของอิเล็กโทรไลต์โดยพบว่าสารทั้งหมดถูกแยกเป็น 9 และ 8 พีค โดยมีเวลาในการเคลื่อนที่ของสารทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 25.5 และ 34.1 นาที ที่พีเอช 9.0 and 10.0 ตามลำดับ พีเอชทั้งสองให้ค่าดัชนีการแยกสารที่เหมือนกัน คือ phenylpropanolamine hydrochloride, caffeine, paracetamol, chlorpheniramine maleate, diphenhydramine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide, triprolidine hydrochloride, lorazepam และ aspirin ตามลำดับ ยกเว้นที่พีเอช 10.0 พีค phenylpropanolamine hydrochloride และ caffeine ซ้อนทับกัน นอกจากนี้ที่พีเอช 10.0 ยังทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าสูง (70 μ A)

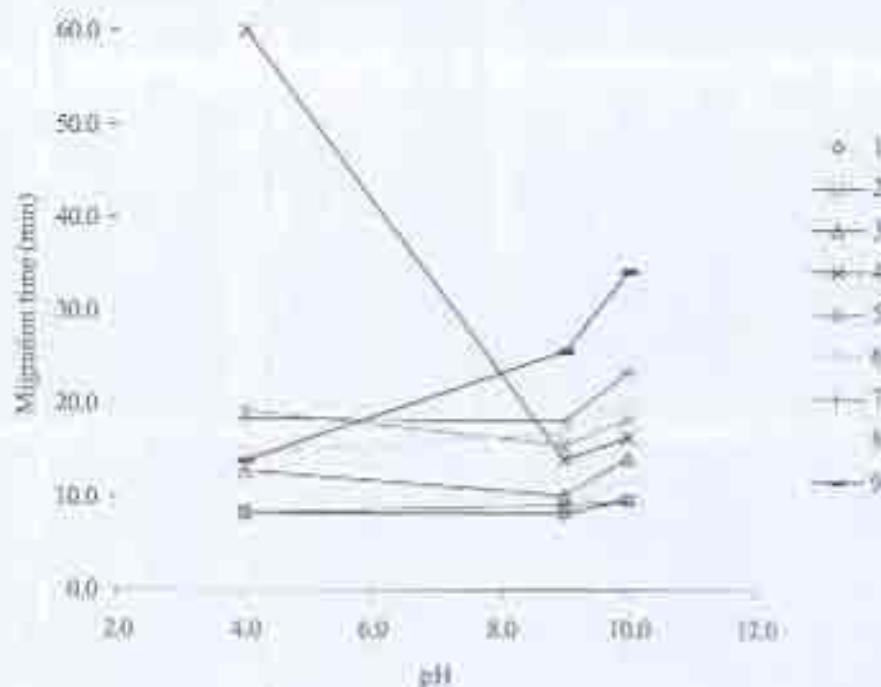
ตารางที่ 7 ผลของ pH ของของยัติเทที่ไว้ใกล้ค่า migration times, apparent mobilities และ resolutions ของสารประกอบต่างๆ

Compounds	pH									
	4.0			9.0			10.0			
	t_R (min)	u_R	R_s	t_R (min)	U_s	R_s	t_R (min)	u_R	R_s	
1	8.215	3.956	-	8.206	3.961	-	9.651	3.368	-	-
2	8.215	3.956	-	8.958	3.628	7.160	9.651	3.368	-	-
3	12.708	2.557	12.770	10.038	3.238	5.110	14.224	2.285	14.760	
4	>60.0	ND	-	14.084	2.308	15.590	16.257	1.999	5.730	
5	19.115	1.700	21.000	15.478	2.100	4.340	18.290	1.777	5.890	
6	14.579	2.229	7.370	16.756	1.940	3.030	19.883	1.635	3.660	
7	18.354	1.771	1.700	18.105	1.795	2.950	25.457	1.386	6.920	
8	13.831	2.350	1.740	24.332	1.336	11.540	31.891	1.019	13.150	
9	13.831	2.350	1.120	25.492	1.275	2.080	34.142	0.952	2.490	

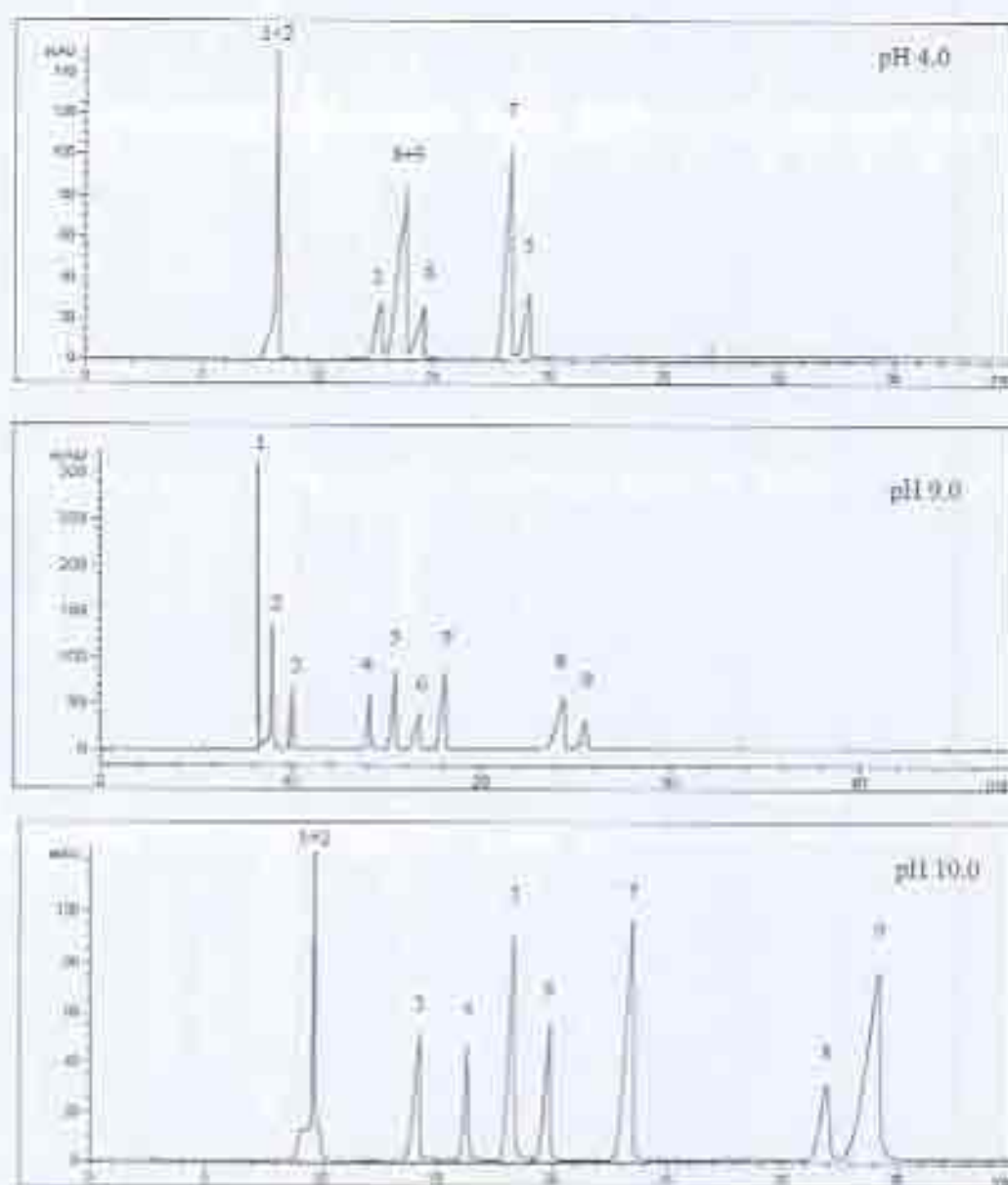
Identification: 1 = phenylpropanolamine hydrochloride, 2 = caffeine, 3 = paracetamol, 4 = chlorpheniramine maleate,

5 = diphenhydramine hydrochloride, 6 = dextromethorphan hydrobromide, 7 = triprolidine hydrochloride, 8 = loratadine and

9 = aspirin, ND = not determined



ภาพที่ 9 ผลของพีเอชของบัฟเฟอร์ไทโวลโลสต่อการแยกสาร Condition: 10 mM sodium dihydrogen phosphate-sodium tetraborate and containing 50 mM SDS; 26% v/v ACN; capillary, 50 cm effective length (8.5 cm to detector), 75 μ m I.D.; detection by UV absorbance at 214 nm; applied voltage: 15 kV; temperature: 30 $^{\circ}$ C. Identification: 1 = phenylpropanolamine hydrochloride, 2 = caffeine, 3 = paracetamol, 4 = chlorpheniramine maleate, 5 = diphenhydramine hydrochloride, 6 = dextromethorphan hydrobromide, 7 = triprolidine hydrochloride, 8 = loratadine and 9 = aspirin.



ภาพที่ 10 โครมาโทแกรมของสารในอิเล็กโตรโอสแตติกที่ pH ต่าง ๆ Condition: 10 mM sodium dihydrogen phosphate-sodium tetraborate and containing 50 mM SDS; 26% v/v ACN; capillary, 50 cm effective length (8.5 cm in detector), 75 μ m I.D.; detection by UV absorbance at 214 nm; applied voltage: 15 kV; temperature: 30 $^{\circ}$ C. Peak identification: 1 = phenylpropanolamine hydrochloride, 2 = caffeine, 3 = paracetamol, 4 = chlorpheniramine maleate, 5 = diphenhydramine hydrochloride, 6 = dextromethorphan hydrobromide, 7 = triprolidine hydrochloride, 8 = loratadine and 9 = aspirin

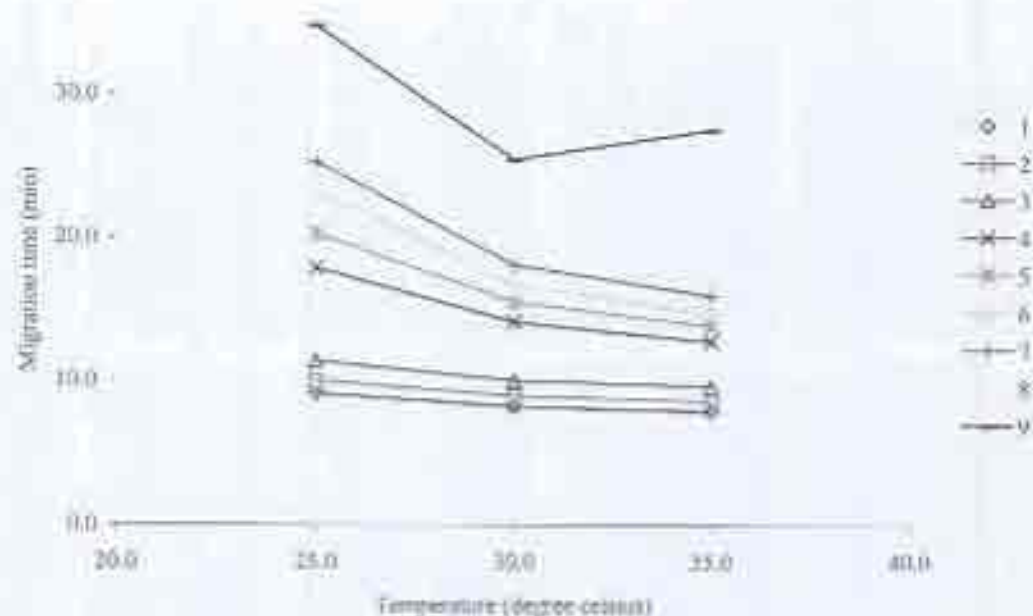
1.4 ผลของอุณหภูมิ

เมื่อเพิ่มอุณหภูมิผลทำให้เวลาในการเคลื่อนที่ของสารลดลงและเพิ่มความเร็วในการเคลื่อนที่ของสารภายใต้สนามไฟฟ้า จากการศึกษาผลของอุณหภูมิในช่วง 25-35 °C ต่อการแยกสารได้ผลดังตารางที่ 8 ภาพที่ 11-12 สารทั้ง 9 ชนิดสามารถถูกแยกได้ในทุกอุณหภูมิที่ศึกษาโดยมีลำดับการแยกสารดังนี้ phenylpropanolamine hydrochloride, caffeine, paracetamol, chlorpheniramine maleate, diphenhydramine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide, triprolidine hydrochloride, loratadine และ aspirin ตามลำดับ อย่างไรก็ตามที่ 25 °C พิกซ์ของ phenylpropanolamine hydrochloride และ caffeine ไม่สามารถแยกกันถึง baseline ในขณะที่ที่ 35 °C พิกซ์ของ phenylpropanolamine hydrochloride และ caffeine และพิกซ์ของ diphenhydramine hydrochloride และ dextromethorphan hydrobromide ไม่สามารถแยกกันถึง baseline เวลาในการเคลื่อนที่ของสารทั้งจำนวนที่ 25 และ 35 °C มีค่าเท่ากับ 34.8 และ 27.6 นาทีตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 °C สารทุกชนิดถูกแยกออกจากกันได้อย่างใน 25.5 นาที

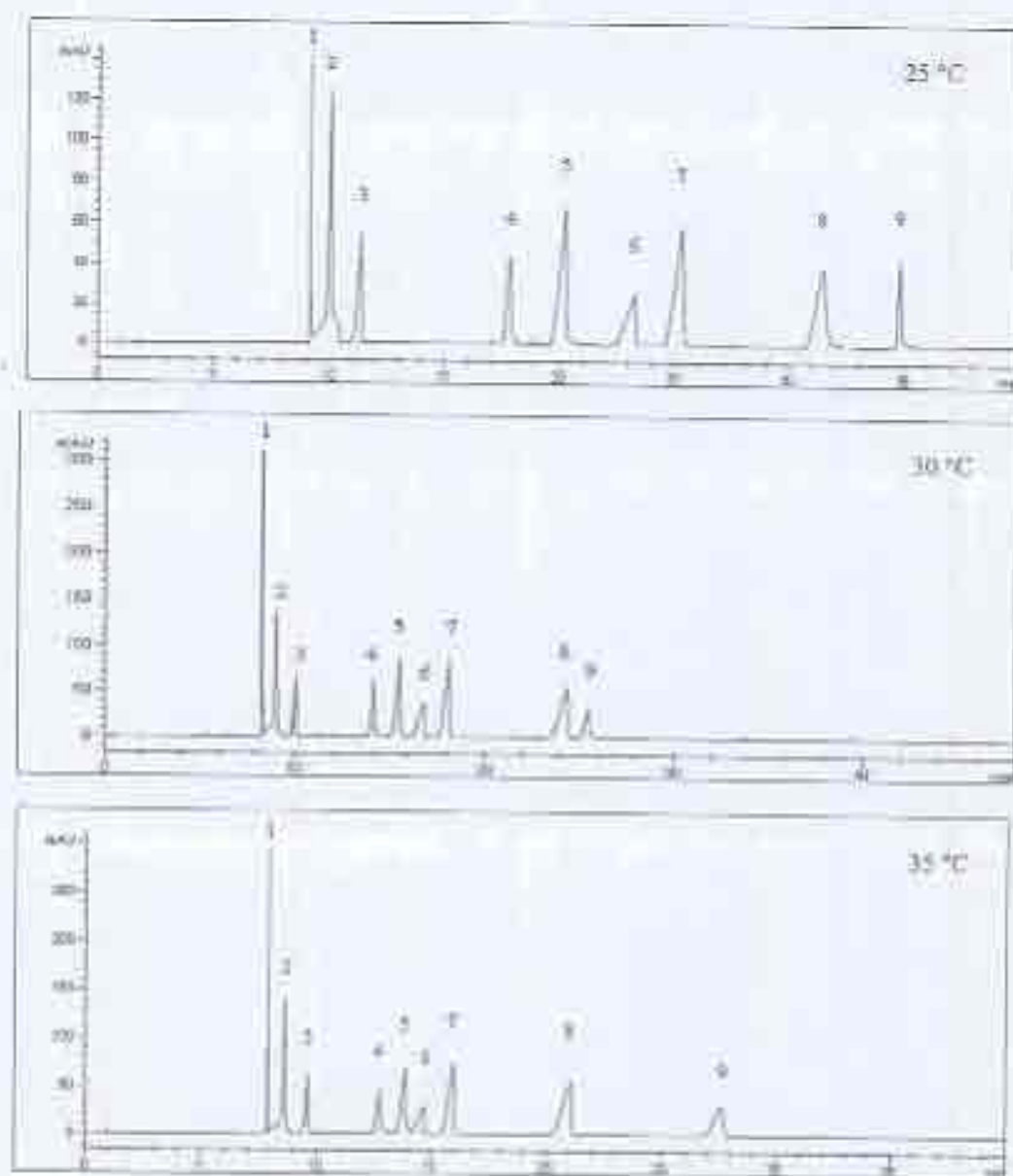
ตารางที่ 8 ผลของอุณหภูมิต่อ migration times, apparent mobilities และ resolutions ของสารแยก
สาร

Compounds	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)								
	25 $^{\circ}\text{C}$			30 $^{\circ}\text{C}$			35 $^{\circ}\text{C}$		
	t_{R} (min)	μ_{app}	R_{s}	t_{R} (min)	μ_{app}	R_{s}	t_{R} (min)	μ_{app}	R_{s}
1	9.119	3.564	-	8.206	3.961	-	7.884	4.122	-
2	9.984	3.255	-	8.958	3.628	7.2	8.608	3.776	7.0
3	11.323	2.870	5.8	10.038	3.238	5.1	9.618	3.379	5.0
4	17.837	1.822	20.3	14.064	2.308	15.5	12.750	2.549	11.8
5	20.248	1.605	5.4	15.478	2.100	4.3	13.858	2.345	3.3
6	23.270	1.397	4.8	16.756	1.940	3.0	14.671	2.213	1.9
7	25.305	1.284	3.0	18.105	1.795	3.0	15.937	2.039	2.8
8	31.432	1.034	8.9	24.332	1.336	11.5	21.045	1.544	9.3
9	34.752	0.935	7.0	25.492	1.273	2.1	27.582	1.178	9.4

Identification 1 = phenylpropanolamine hydrochloride, 2 = caffeine, 3 = paracetamol, 4 = chlorpheniramine maleate, 5 = diphenhydramine hydrochloride, 6 = dextromethorphan hydrobromide, 7 = triprolidine hydrochloride, 8 = lorazepam and 9 = aspirin



ภาพที่ 11 ผลของอุณหภูมิต่อการแยกสาร Condition: 10 mM sodium dihydrogen phosphato-sodium tetraborate, pH 9.0 containing 50 mM SDS, 26% v/v ACN, capillary, 50 cm effective length (8.5 cm to detector), 75 μ m ID; detection by UV absorbance at 214 nm; applied voltage: 15 kv. Identification: 1 = phenylpropanolamine hydrochloride, 2 = caffeine, 3 = paracetamol, 4 = chlorpheniramine maleate, 5 = diphenhydramine hydrochloride, 6 = dextromethorphan hydrobromide, 7 = triprolidine hydrochloride, 8 = lorazepam and 9 = aspirin



ภาพที่ 12 โครมาโทแกรมของสารที่อุณหภูมิต่าง ๆ Condition: 10 mM sodium dihydrogen phosphate-sodium tetraborate, pH 9.0 containing 50 mM SDS; 26% v/v ACN; capillary, 50 cm effective length (8.5 cm to detector), 75 μ m ID; detection by UV absorbance at 214 nm; applied voltage: 15 kV. Peak identification: 1 - phenylpropanolamine hydrochloride, 2 - caffeine, 3 - paracetamol, 4 - chlorpheniramine maleate, 5 - diphenhydramine hydrochloride, 6 - dextromethorphan hydrobromide, 7 - triprolidine hydrochloride, 8 - karmadine and 9 - aspirin.

1.5 ผลของความต่างศักย์ไฟฟ้า

ผลของสนามความต่างศักย์ไฟฟ้าในช่วง 10-25 กิโลโวลต์ ต่อการแยกแอสารโดยใช้อิเล็กโตรโอสตัทซึ่งประกอบด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไคลโอไดรเจนฟอสเฟต-โซเดียมคลอไรด์ (พีเอช 9.0) 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไคลอไซด์ซัลเฟต และ 26% โคอปริมาตร อะซีโตรไนโตรล กลีเซอรีน แต่ให้ผลวัดความยาวทั้งหมด 58.5 ซม (effective length 50 ซม) เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 75 ไมครอน อุณหภูมิห้อง 30 °C และในสภาวะที่ 9 ภาพที่ 13-14 เมื่อเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้าความสามารถในการเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าของสารเพิ่มขึ้นและเวลาในการเคลื่อนที่ของสารลดลง อย่างไรก็ตามการเคลื่อนที่ที่ช้าลงก็เพิ่มขึ้นเนื่องจากเพิ่มขนาดความร้อน (Joule's heating) และทำให้ทิศทางของสารซ้อนทับกัน ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 10 กิโลโวลต์ สารทั้ง 9 ชนิดถูกแยกเป็น 8 หัก โดยมีเวลาในการเคลื่อนที่ทั้งหมด 47.7 นาที และลำดับการแยกสารเป็น phenylpropanolamine hydrochloride, caffeine, paracetamol, chlorpheniramine maleate, diphenhydramine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide, triprolidine hydrochloride และ loratadine ตามลำดับ aspirin ไม่สามารถตรวจวัดได้ใน 60 นาที ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 15, 20 และ 25 กิโลโวลต์ เวลาในการเคลื่อนที่ทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 25.5, 20.1 และ 15.3 นาที ตามลำดับ โดยมีลำดับการแยกสารเช่นเดียวกันที่ 10 กิโลโวลต์ แต่ที่ 20 และ 25 กิโลโวลต์ phenylpropanolamine hydrochloride และ caffeine และ diphenhydramine hydrochloride และ dextromethorphan hydrobromide ไม่สามารถแยกจากกันถึง baseline นอกจากนั้น loratadine และ aspirin ไม่สามารถแยกจากกันได้ที่ 20 กิโลโวลต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารทั้งหมดคือที่ 15 กิโลโวลต์ ซึ่งสามารถแยกสารทั้งหมดออกจากกันได้ ($R_s = 3.0$) โดยทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าไม่มาก (50 μA)

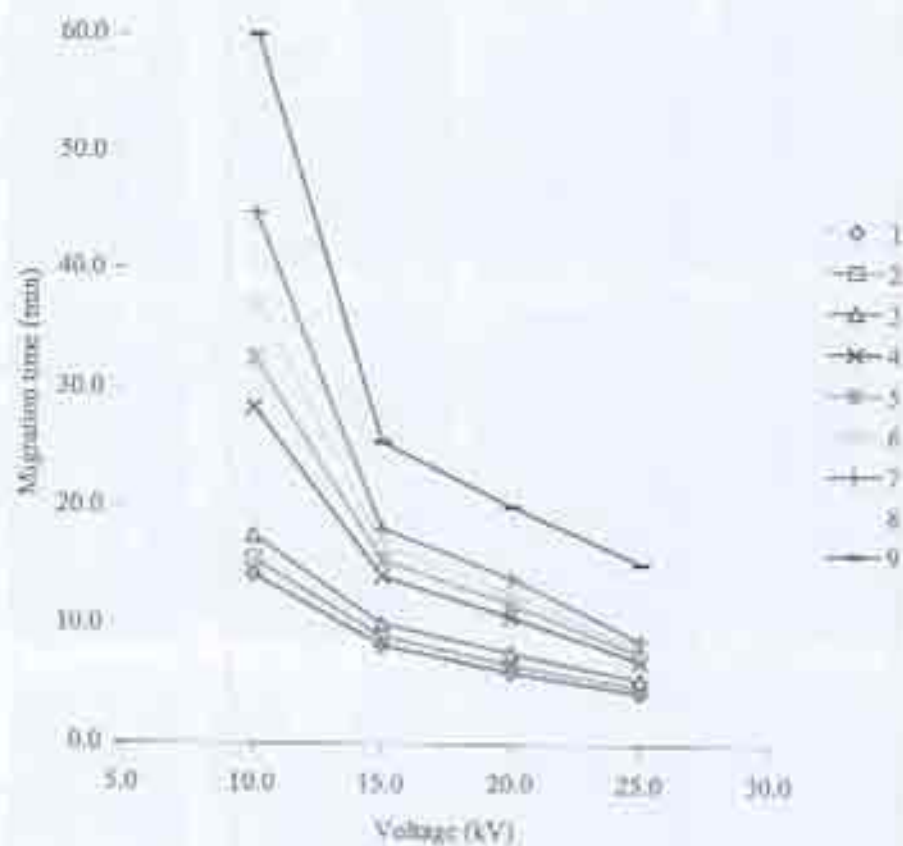
ตารางที่ 9 ผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าและ migration times, apparent mobilities and resolutions ของสารตัวอย่าง

Compounds	Voltage (kV)									
	10			15			20			25
	t_m (min)	u_e	R_s	t_m (min)	u_e	R_s	t_m (min)	u_e	R_s	t_m (min)
1	14.242	3.423	-	8.206	3.961	-	6.079	4.010	-	4.359
2	15.547	3.136	7.9	8.958	3.628	7.2	6.671	3.654	7.5	4.785
3	17.540	2.779	5.6	10.038	3.238	5.1	7.602	3.206	5.8	5.525
4	28.392	1.717	19.4	14.084	2.308	14.5	10.648	2.289	13.8	6.979
5	32.628	1.494	5.6	15.478	2.100	4.3	11.741	2.076	3.9	7.556
6	37.542	1.299	3.6	16.756	1.940	3.0	12.645	1.928	2.6	7.923
7	44.779	1.089	4.1	18.105	1.795	3.0	14.014	1.739	3.6	8.687
8	47.713	1.022	1.7	24.332	1.336	11.5	19.318	1.262	11.3	11.102
9	>60.0	ND	-	25.492	1.275	2.1	20.140	1.210	1.5	15.282
										1.276
										14.0

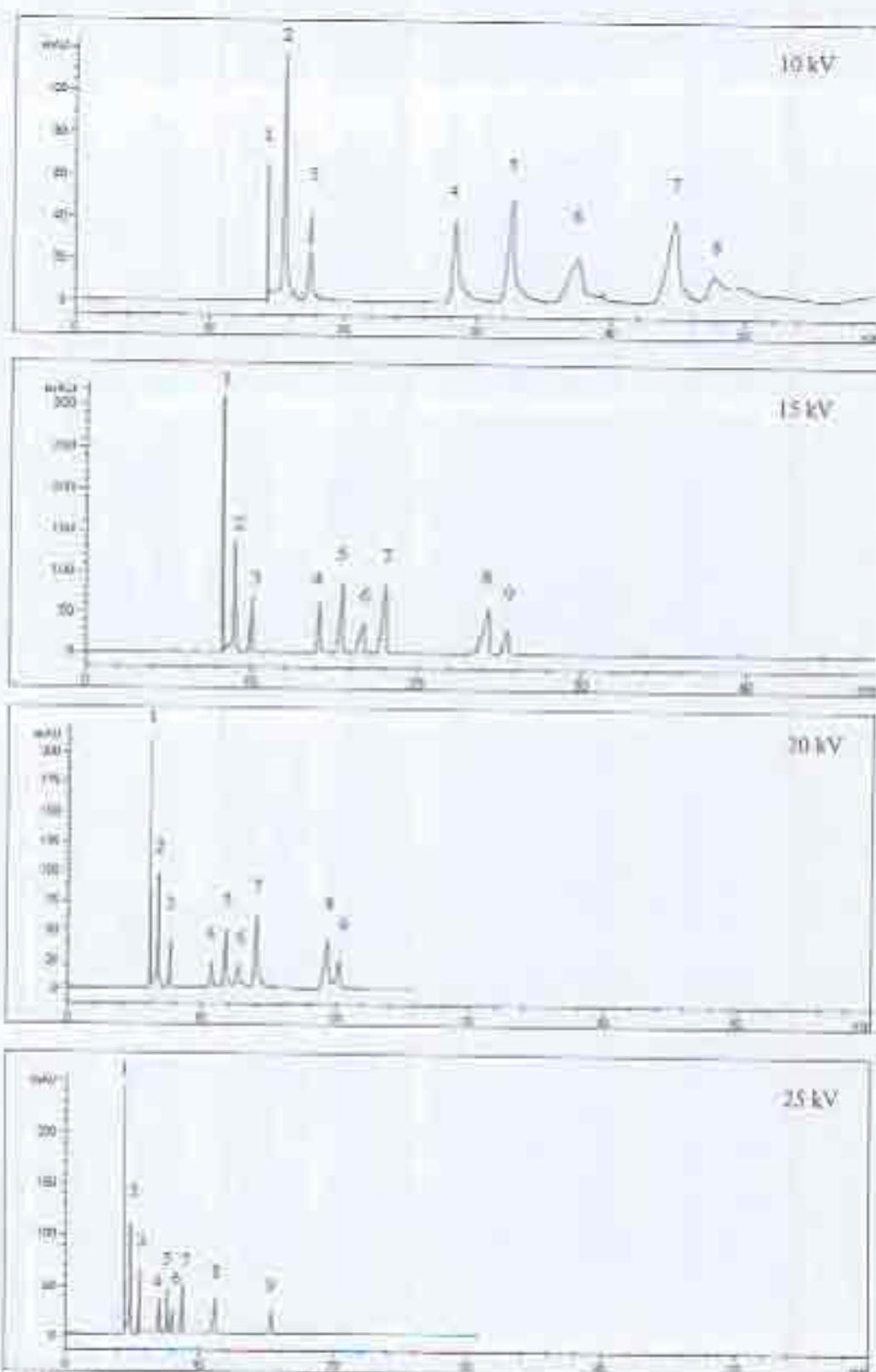
Identification 1 = phenylpropanolamine hydrochloride, 2 = caffeine, 3 = paracetamol, 4 = chlorpheniramine maleate, 5 = diphenhydramine hydrochloride,

6 = dextromethorphan hydrobromide, 7 = triprolidine hydrochloride, 8 = lorazepam and 9 = aspirin.

ND = not determined



ภาพที่ 13 ผลของความต่างศักย์ไฟฟ้าต่อการแยกสาร Condition: 10 mM sodium dihydrogen phosphate-sodium tetraborate, pH 9.0 and containing 50 mM SDS; 28% v/v ACN; capillary, 50 cm effective length (8.5 cm to detector), 75 μ m I.D.; detection by UV absorbance at 214 nm, temperature: 30 $^{\circ}$ C. Identification: 1 - phenylpropanolamine hydrochloride, 2 - caffeine, 3 - paracetamol, 4 - chlorpheniramine maleate, 5 - diphenhydramine hydrochloride, 6 - dextromethorphan hydrobromide, 7 - triptolidine hydrochloride, 8 - loratadine and 9 - aspirin.



ภาพที่ 14 โครมาโทแกรม UV ที่ความแรงสนามไฟฟ้าต่าง ๆ. Condition: 10 mM sodium dihydrogen phosphate-sodium carbonate, pH 9.0 containing 50 mM SDS; 26% v/v ACN, capillary: 50 cm effective length (65 cm in distance), 75 μ m I.D.; detector by UV absorbance at 214 nm, temperature: 30 $^{\circ}$ C. Peak identification: 1 - phenylephrine hydrochloride, 2 - caffeine, 3 - paracetamol, 4 - chlorpheniramine maleate, 5 - diphenhydramine hydrochloride, 6 - dexamethasone hydrous, 7 - triprolidine hydrochloride, 8 - lorazepam and 9 - aspirin

2. การประเมินวิธี

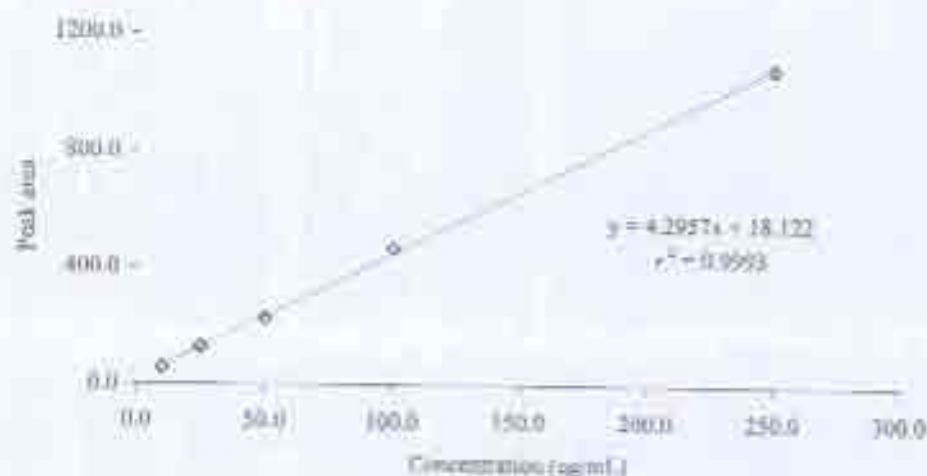
สภาวะที่เหมาะสม ที่สุดในการแยกองค์ประกอบในสารแก้ปวดทั้ง 9 ชนิด คือใช้แก๊สโครโมโตกราฟซึ่งประกอบด้วย 10 มิลลิโมตาร์ โพลีเอทิลีนไดโอสไตรเจนพอลิฟอส-โพลีเอทิลีนคลอไรด์ (พีเอช 9.0) 50 มิลลิโมตาร์ โพลีเอทิลีนไดโอสไตรเจนพอลิฟอส และ 26% โดยปริมาตร อะซิโตนไนโตรส คอลัมน์เคลือบซิลิกาความยาวทั้งหมด 58.5 ซม (effective length 50 ซม) เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 75 ไมครอน อุณหภูมิคงที่ 30 °C ความดันค้ำดันที่ 15 กิโลโวลต์ และตรวจวัดการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่ 214 นาโนเมตร วิธีที่พัฒนาขึ้นได้ผ่านการประเมินสำหรับการวิเคราะห์ paracetamol และ chlorpheniramine maleate ดังนี้

2.1 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

Calibration and regression data สำหรับ paracetamol และ chlorpheniramine maleate แสดงในตารางที่ 10-13 ตามลำดับ ข้อมูลแสดงว่าการคำนวณโดยใช้พื้นที่ใต้พีคให้ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (correlation coefficient) ที่ดีที่สุดและมีค่า %RSDs ต่ำสุดเทียบกับการคำนวณจากความสูงของพีคหรือ normalized peak area (ratio of peak area and migration time) ภาพที่ 15-16 แสดง calibration curves สำหรับ paracetamol และ chlorpheniramine maleate ตามลำดับ

ตารางที่ 10 Calibration data สำหรับ paracetamol

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Sample No.	Migration time (min)	Peak area (mAU $\cdot$ s)	Peak height (mAU)	Normalized peak area
10	1	9.471	54.543	7.816	5.759
	2	9.383	55.705	7.658	5.937
	3	8.917	54.521	6.947	6.114
	Average	9.257	54.923	7.474	5.937
	SD	0.30	0.68	0.46	0.18
	%RSD	3.22	1.23	6.19	2.99
25	1	9.159	126.964	17.836	13.862
	2	9.074	125.922	17.772	13.877
	3	9.011	121.749	16.277	13.511
	Average	9.081	124.879	17.312	13.750
	SD	0.07	2.76	0.90	0.21
	%RSD	0.82	2.21	5.18	1.51
50	1	9.056	225.178	30.478	24.865
	2	9.050	228.411	28.680	25.239
	3	9.053	225.454	27.189	24.904
	Average	9.053	226.347	28.782	25.003
	SD	0.00	1.79	1.65	0.21
	%RSD	0.03	0.79	5.72	0.82
100	1	9.462	471.758	59.709	49.855
	2	9.387	464.158	57.542	49.447
	3	9.344	465.778	56.365	49.848
	Average	9.398	467.231	57.872	49.718
	SD	0.06	4.00	1.70	0.23
	%RSD	0.64	0.86	2.93	0.47
250	1	9.598	1083.198	80.750	112.857
	2	9.816	1088.978	79.639	110.930
	3	9.286	1085.345	86.325	116.880
	Average	9.567	1085.840	82.238	113.558
	SD	0.27	2.92	3.58	3.03
	%RSD	2.78	0.27	4.36	2.67



ภาพที่ 15 Calibration curve สำหรับ paracetamol คำนวณจากพื้นที่ใต้พีค

ตารางที่ 11 Regression data สำหรับ paracetamol

Calculated from	Sample No.	Linear equation	Standard error		Correlation coefficient (r^2)
			Slope	Intercept	
Peak area (mAU*s)	1	$y = 4.28x + 19.6$	0.08	10.0	0.9989
	2	$y = 4.30x + 18.3$	0.05	6.6	0.9995
	3	$y = 4.30x + 16.5$	0.06	8.0	0.9993
	Average	$y = 4.30x + 18.1$	0.07	8.2	0.9993
Peak height (mAU)	1	$y = 0.29x + 13.8$	0.06	7.4	0.8882
	2	$y = 0.29x + 13.1$	0.06	6.8	0.9005
	3	$y = 0.32x + 10.4$	0.05	5.9	0.9383
	Average	$y = 0.30x + 12.5$	0.05	6.7	0.9112
Normalized peak Area	1	$y = 0.44x + 2.5$	0.01	1.2	0.9986
	2	$y = 0.44x + 3.3$	0.01	1.2	0.9984
	3	$y = 0.461x + 2.1$	0.005	0.7	0.9996
	Average	$y = 0.447x + 2.7$	0.008	1.0	0.9990