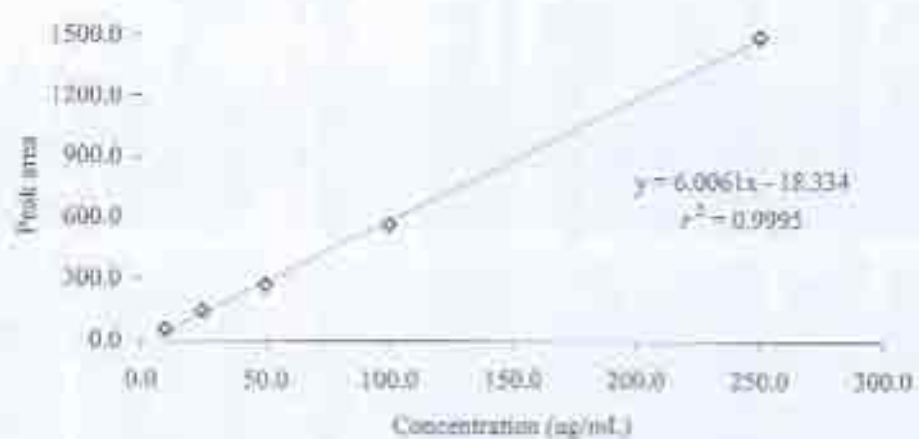


ตารางที่ 12 Calibration data สำหรับ chlorpheniramine maleate

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Sample No.	Migration time (min)	Peak area (mAU*s)	Peak height (mAU)	Normalized peak area
10	1	12.062	50.780	6.233	4.210
	2	11.983	52.866	6.205	4.412
	3	12.047	52.021	6.353	4.318
	Average	12.031	51.889	6.264	4.313
	SD	0.04	1.05	0.08	0.10
	%RSD	0.35	2.02	1.26	2.34
25	1	12.385	142.399	15.106	11.498
	2	12.440	142.178	14.762	11.429
	3	12.485	142.050	14.997	11.378
	Average	12.437	142.209	14.955	11.435
	SD	0.05	0.18	0.18	0.06
	%RSD	0.40	0.12	1.18	0.53
50	1	12.678	268.930	31.521	21.212
	2	12.682	269.051	31.752	21.215
	3	12.735	270.877	31.856	21.270
	Average	12.698	269.619	31.710	21.233
	SD	0.03	1.09	0.17	0.03
	%RSD	0.25	0.40	0.54	0.15
100	1	13.369	560.349	53.145	41.914
	2	13.404	566.792	56.071	42.285
	3	13.310	572.585	53.297	43.094
	Average	13.361	566.909	54.838	42.431
	SD	0.05	6.62	1.52	0.60
	%RSD	0.36	1.17	2.76	1.42
250	1	13.417	1494.000	115.598	111.351
	2	13.577	1488.045	112.473	109.600
	3	13.754	1489.078	101.046	108.265
	Average	13.583	1490.374	109.706	109.739
	SD	0.17	3.18	7.66	1.55
	%RSD	1.24	0.21	6.98	1.41



ภาพที่ 16 Calibration curve ที่ได้รับ chlorpheniramine maleate ที่นำมาหาพื้นที่ใต้พีค

ตารางที่ 13 Regression data ที่ได้รับ chlorpheniramine maleate

Calculated from	Sample No.	Linear equation	Standard error		Correlation coefficient (r^2)
			Slope	Intercept	
Peak area (mAU*s)	1	$y = 6.02x - 20.6$	0.09	11.2	0.9993
	2	$y = 6.00x - 17.8$	0.08	9.4	0.9995
	3	$y = 6.00x - 16.6$	0.06	7.6	0.9997
	Average	$y = 6.00x - 18.3$	0.08	9.3	0.9995
Peak height (mAU)	1	$y = 0.45x + 5.4$	0.02	2.4	0.9946
	2	$y = 0.44x + 6.4$	0.03	3.4	0.9883
	3	$y = 0.39x + 8.4$	0.04	4.4	0.9748
	Average	$y = 0.42x + 6.7$	0.03	3.3	0.9878
Normalized peak area	1	$y = 0.445x - 0.7$	0.007	0.9	0.9992
	2	$y = 0.438x - 0.3$	0.005	0.6	0.9997
	3	$y = 0.423x + 0.0$	0.002	0.3	0.9999
	Average	$y = 0.439x - 0.3$	0.004	0.5	0.9997

2.2 ความแม่นยำ

2.2.1 ความแม่นยำในการวัด

ความแม่นยำในการวัด pacetamol และ chlorpheniramine maleate ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ครั้ง ผลคือเป็นค่า %RSDs ของ migration time, peak area, peak height และ normalized peak area ดังตารางที่ 14-15

ตารางที่ 14 ความแม่นยำในการวัด pacetamol ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($n = 10$)

Injection No.	Migration time (min)	Peak area (mAU*s)	Peak height (mAU)	Normalized peak area
1	9.409	1122.510	101.462	119.302
2	9.444	1098.563	94.369	116.324
3	9.598	1083.198	80.750	112.857
4	9.816	1088.978	79.639	110.939
5	10.083	1067.461	78.243	105.367
6	9.843	1069.310	81.066	108.637
7	9.286	1085.343	86.325	116.880
8	9.181	1069.732	89.534	116.516
9	9.150	1071.931	91.329	117.151
10	9.137	1057.786	92.611	115.769
Average	9.493	1081.481	87.533	114.024
SD	0.33	18.81	7.62	4.31
%RSD	3.48	1.74	8.71	3.78

ตารางที่ 15 ความแม่นยำในการวัด chlorpheniramine maleate ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร (n = 10)

Injection No	Migration time (min)	Peak area (mAU*s)	Peak height (mAU)	Normalized peak area
1	13.417	1494.000	115.598	111.351
2	13.577	1488.045	112.473	109.600
3	13.928	1446.329	107.545	103.843
4	14.369	1421.030	103.404	98.758
5	14.818	1421.282	100.051	95.916
6	14.574	1394.239	97.354	95.666
7	13.787	1435.390	101.965	104.112
8	13.701	1474.651	101.506	107.631
9	13.754	1489.078	101.046	108.265
10	13.841	1463.414	99.375	105.729
Average	13.979	1452.746	101.932	104.087
SD	0.46	34.36	5.98	5.60
%RSD	3.28	2.37	5.75	5.38

2.2.2 ความแม่นยำในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน

ความแม่นยำในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันสำหรับ paracetamol และ chlorpheniramine maleate ทำการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 6 ครั้ง ทำการวัดและวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน ได้ผลดังตารางที่ 16-17

ตารางที่ 16 ความแม่นยำในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันสำหรับ paracetamol ($n = 6$)

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Injection No.	Migration time (min)	Peak area (mAU*s)	Peak height (mAU)	Normalized peak area
10	1	9.803	54.187	7.729	5.528
	2	9.724	54.033	7.599	5.557
	3	9.739	51.128	7.189	5.250
	4	9.667	53.091	7.606	5.492
	5	9.601	53.791	7.544	5.603
	6	9.455	52.801	7.731	5.585
	Average	9.665	53.172	7.566	5.502
	SD	0.12	1.14	0.20	0.13
	%RSD	1.28	2.14	2.64	2.36
50	1	9.096	229.891	31.219	25.274
	2	9.056	225.178	30.478	24.8654
	3	9.050	228.411	28.680	25.239
	4	8.999	221.377	27.965	24.600
	5	9.053	225.434	27.189	24.904
	6	9.028	217.274	25.720	24.067
	Average	9.047	224.397	28.542	24.825
	SD	0.03	4.64	2.05	0.45
	%RSD	0.36	2.07	7.19	1.81

ตารางที่ 16 (ต่อ) ความแม่นยำในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันสำหรับ paracetamol (n = 6)

Concentration (µg/mL)	Injection No.	Migration time (min)	Peak area (mAU*s)	Peak height (mAU)	Normalized peak area
100	1	9.513	487.220	60.369	51.216
	2	9.485	481.557	60.251	50.770
	3	9.462	471.758	59.709	49.858
	4	9.431	475.970	58.708	50.469
	5	9.387	464.158	57.542	49.447
	6	9.344	465.778	56.365	49.848
	Average	9.437	474.407	58.824	50.268
	SD	0.06	8.99	1.61	0.66
	%RSD	0.67	1.90	2.73	1.32
250	1	9.598	1083.198	80.750	112.637
	2	9.816	1088.978	79.639	110.939
	3	9.843	1069.310	81.066	108.637
	4	9.286	1085.345	86.326	116.880
	5	9.181	1069.732	89.538	116.516
	6	9.150	1071.931	91.329	117.151
	Average	9.479	1078.083	84.774	113.830
	SD	0.31	8.74	4.99	3.57
	%RSD	3.32	0.81	5.88	3.14

ตารางที่ 17 ความแม่นยำในการวัดสารพิษในดินตัวอย่างสำหรับ chlorphoniramine maleate (n = 6)

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Injection No.	Migration time (min)	Peak area (mAU*s)	Peak height (mAU)	Normalized peak area
10	1	12.761	53.410	5.776	4.185
	2	12.669	52.653	5.365	4.156
	3	12.672	52.839	5.656	4.167
	4	12.062	50.780	6.233	4.210
	5	11.983	52.866	6.205	4.412
	6	12.047	52.022	6.353	4.318
	Average	12.368	52.438	5.931	4.242
	SD	0.37	0.92	0.39	0.10
	%RSD	2.99	1.76	0.60	2.29
50	1	12.678	268.930	31.521	21.212
	2	12.682	269.051	31.752	21.215
	3	12.735	270.877	31.856	21.270
	4	12.956	259.314	31.783	20.015
	5	13.023	262.047	31.656	20.122
	6	13.065	257.039	31.647	19.074
	Average	12.857	264.543	31.703	20.585
	SD	0.18	5.82	0.12	0.73
	%RSD	1.38	2.20	0.38	3.52

ตารางที่ 17 (ต่อ) ความแม่นยำในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันสำหรับ chlorpheniramine maleate (n = 6)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Injection No.	Migration time (min)	Peak area (mAU*s)	Peak height (mAU)	Normalized peak area
100	1	13.186	589.812	55.595	44.730
	2	13.369	560.349	53.145	41.914
	3	13.414	566.792	56.071	42.285
	4	13.310	573.585	55.297	43.094
	5	13.351	588.700	56.453	44.094
	6	13.325	596.804	60.073	44.788
	Average	13.324	579.340	56.106	43.484
	SD	0.06	14.52	2.26	1.24
	%RSD	0.57	2.51	4.03	2.85
250	1	13.417	1494.000	115.598	111.351
	2	13.577	1488.045	112.473	109.600
	3	13.928	1446.329	107.545	103.843
	4	13.701	1474.651	101.500	107.631
	5	13.754	1489.073	101.046	108.265
	6	13.841	1463.414	99.375	105.729
	Average	13.703	1475.920	106.257	107.737
	SD	0.18	18.33	6.70	2.68
	%RSD	1.35	1.24	6.31	2.49

2.2.3 ความแม่นยำในการวิเคราะห์ค่าวันกัน

ความแม่นยำในการวิเคราะห์ค่าวันกันสำหรับ paracetamol และ chlorpheniramine maleate ทำการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการวิเคราะห์และฉีดใน 6 วันที่แตกต่างกันที่ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 18-19

ตารางที่ 18. ความแม่นยำในการวิเคราะห์ค่าวันกันสำหรับ paracetamol (n = 3)

Concentration (µg/mL)	Day	Migration time (min)	Peak area (mAU*s)	Peak height (mAU)	Normalized peak area
10	1	9.461	55.708	7.896	5.889
	2	9.062	56.439	6.719	6.228
	3	9.627	53.664	7.979	5.575
	4	9.751	54.654	7.346	5.605
	5	9.593	53.542	7.624	5.581
	6	9.090	54.817	7.052	6.037
	Average	9.431	54.804	7.436	5.819
	SD	0.29	1.13	0.49	0.28
	%RSD	3.07	3.07	6.62	4.75
50	1	9.234	235.530	32.377	25.511
	2	9.138	226.950	28.701	24.862
	3	9.138	251.811	27.347	27.557
	4	9.776	238.995	30.086	24.456
	5	9.744	267.317	36.061	27.436
	6	9.053	226.348	28.782	25.003
	Average	9.347	241.158	30.542	25.804
	SD	0.32	15.85	3.21	1.35
	%RSD	3.48	6.57	10.50	5.25

ตารางที่ 18 (ต่อ) ความแม่นยำในการวิเคราะห์ค่าปริมาณยาสำหรับ paracetamol (n = 3)

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Day	Migration time (min)	Peak area (mAU*s)	Peak height (mAU)	Normalized peak area
100	1	9.826	505.576	61.699	51.451
	2	9.648	508.563	58.690	52.709
	3	9.600	537.554	63.868	55.978
	4	9.960	493.776	57.223	49.577
	5	10.118	503.118	59.415	49.728
	6	9.528	488.295	60.538	51.349
	Average	9.780	506.114	60.242	51.782
	SD	0.23	17.09	2.35	2.36
	%RSD	2.34	3.38	3.90	4.57
250	1	9.475	1174.429	103.883	123.953
	2	9.670	1281.588	107.633	132.532
	3	9.330	1230.941	99.146	131.849
	4	9.552	1306.132	110.784	136.743
	5	9.752	1155.481	91.487	118.501
	6	10.086	1186.838	100.593	117.667
	Average	9.646	1222.568	102.254	126.874
	SD	0.26	61.04	6.82	7.97
	%RSD	2.70	4.99	6.67	6.28

ตารางที่ 19 ความแม่นยำในการวิเคราะห์ค่าจริงกับสำหรับ chlorpheniramine maleate (n = 3)

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Day	Migration time (min)	Peak area (mAU%)	Peak height (mAU)	Normalized peak area
10	1	13.086	62.518	6.327	4.778
	2	13.438	65.623	6.104	4.883
	3	12.785	71.487	6.917	5.591
	5	13.857	65.727	5.008	4.744
	5	12.712	67.814	6.590	5.336
	6	12.264	61.382	6.660	5.006
	Average	13.024	65.758	6.277	5.056
	SD	0.57	3.65	0.66	0.34
	%RSD	4.34	5.56	10.44	6.69
50	1	13.180	308.250	31.670	23.389
	2	13.715	318.199	32.300	23.203
	3	13.221	297.068	27.388	22.488
	4	13.336	326.998	33.547	24.523
	5	13.049	312.212	25.139	23.930
	6	12.444	323.047	30.184	25.965
	Average	13.157	314.285	30.038	23.916
	SD	0.42	10.89	3.20	1.22
	%RSD	3.17	3.46	10.65	5.08

ตารางที่ 19 (ต่อ) ความแม่นยำในการวิเคราะห์ค่าจริงกับค่าที่พบ chlorpheniramine maleate (n = 3)

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Day	Migration time (min)	Peak area (mAU*s)	Peak height (mAU)	Normalized peak area
100	1	13.775	557.102	58.190	40.455
	2	13.847	568.532	46.938	41.060
	3	13.699	590.950	52.508	43.156
	5	13.709	575.305	48.919	41.970
	5	13.730	584.588	58.609	44.189
	6	13.361	566.909	54.838	42.431
	Average	13.603	573.898	53.333	42.210
	SD	0.25	12.38	4.79	1.37
	%RSD	1.82	2.16	8.98	3.23
250	1	13.114	1470.870	125.577	112.157
	2	13.550	1403.186	102.560	103.553
	3	13.184	1532.226	133.841	116.237
	5	14.192	1442.032	87.285	101.749
	5	13.558	1447.700	123.064	106.782
	6	14.594	1412.184	99.936	96.780
	Average	13.699	1451.370	112.044	106.209
	SD	0.58	46.64	18.05	7.10
	%RSD	4.25	3.21	16.11	6.69

3. ความถูกต้อง

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ศึกษาโดย standard addition method โดยการเพิ่มสารมาตรฐานในปริมาณ 50-150 % ของปริมาณที่เจือในตัวอย่าง ซึ่งการวิเคราะห์และคำนวณ percent recoveries (%R) และ %RSD) ของ migration time และ peak area ของ paracetamol และ chlorpheniramine maleate ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 20-21 ตามลำดับ

ตารางที่ 20 Recoveries ของ paracetamol จาก spiked samples (n = 3)

Standard added (%)	Sample No.	Migration time (min)	Peak area (mAU*s)	Amount added ($\mu\text{g/mL}$)	Amount found ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)
50	1	9.098	740.946	50.10	51.91	103.61
	2	9.026	730.472	50.10	49.47	98.74
	3	8.948	736.760	50.10	50.93	101.66
	Average	9.024	736.059	50.10	50.77	101.34
	SD	0.08	5.27	0.00	1.23	2.45
	%RSD	0.83	0.72	0.00	2.42	2.42
80	1	9.619	870.465	80.16	82.06	102.37
	2	9.396	864.547	80.16	80.68	100.65
	3	9.373	870.436	80.16	82.05	102.36
	Average	9.463	868.483	80.16	81.60	101.79
	SD	0.14	3.41	0.00	0.79	0.99
	%RSD	1.44	0.39	0.00	0.97	0.97
100	1	9.170	944.171	100.20	102.25	102.04
	2	9.127	933.030	100.20	99.65	99.45
	3	9.079	935.430	100.20	100.21	100.01
	Average	9.125	937.544	100.20	100.70	100.50
	SD	0.05	5.86	0.00	1.36	1.36
	%RSD	0.50	0.63	0.00	1.36	1.36

ตารางที่ 20 (ต่อ) Recoveries 10% paracetamol 110 spiked samples (n = 3)

Standard added (%)	Sample No.	Migration time (min)	Peak area (mAU*s)	Amount added ($\mu\text{g/mL}$)	Amount found ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)
120	1	9.980	1016.795	120.24	120.84	100.50
	2	9.980	994.263	120.24	115.60	96.14
	3	9.783	1019.556	120.24	121.48	101.04
	Average	9.908	1010.205	120.24	119.31	99.22
	SD	0.11	13.87	0.00	3.23	2.69
	%RSD	1.08	1.37	0.00	2.71	2.71
150	1	9.261	1184.307	150.30	153.21	101.94
	2	9.231	1184.675	150.30	153.25	101.96
	3	9.189	1155.399	150.30	146.44	97.43
	Average	9.227	1174.860	150.30	150.97	100.44
	SD	0.04	16.85	0.00	3.92	2.61
	%RSD	0.39	1.43	0.00	2.60	2.60

ตารางที่ 21 Recoveries % of chlorpheniramine maleate 5/10 spiked samples (n = 3)

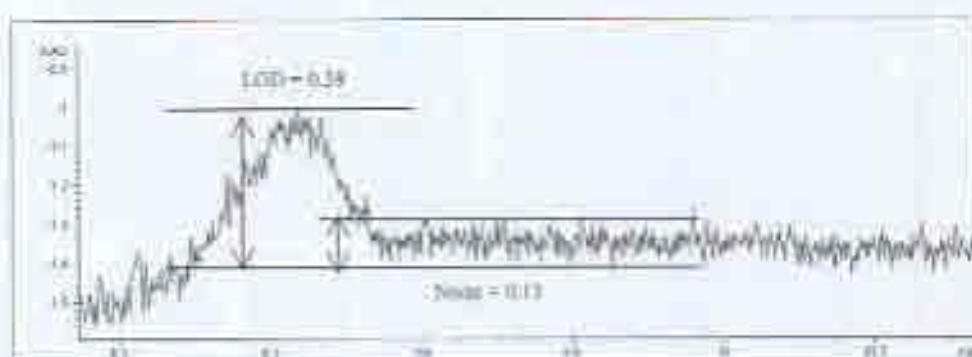
Standard added (%)	Sample No.	Migration time (min)	Peak area (mAU*s)	Amount Added ($\mu\text{g/mL}$)	Amount found ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)
50	1	15.349	649.766	50.70	51.61	101.80
	2	15.249	641.502	50.70	50.24	99.09
	3	15.766	640.919	50.70	50.14	98.89
	Average	15.421	644.062	50.70	50.66	99.93
	SD	0.30	4.95	0.00	0.82	1.62
	%RSD	1.94	0.77	0.00	1.63	1.63
80	1	12.157	805.578	79.76	77.55	97.24
	2	12.169	817.346	79.76	79.51	99.69
	3	12.157	800.578	79.76	76.72	96.19
	Average	12.161	807.834	79.76	77.93	97.71
	SD	0.01	8.61	0.00	1.43	1.80
	%RSD	0.06	1.07	0.00	1.84	1.84
100	1	15.235	921.454	99.70	96.85	97.14
	2	15.486	939.692	99.70	99.88	100.19
	3	15.667	926.302	99.70	97.66	97.95
	Average	15.463	929.149	99.70	98.13	98.42
	SD	0.22	9.45	0.00	1.57	1.58
	%RSD	1.40	1.02	0.00	1.60	1.60
120	1	12.130	1035.064	119.64	115.76	96.76
	2	12.183	1071.503	119.64	121.83	101.83
	3	12.066	1063.344	119.64	120.47	100.70
	Average	12.126	1056.637	119.64	119.36	99.76
	SD	0.06	19.12	0.00	3.18	2.66
	%RSD	0.48	1.81	0.00	2.67	2.67

ตารางที่ 21 (ต่อ) Recoveries ของ chlorpheniramine maleate จาก spiked samples (n = 3)

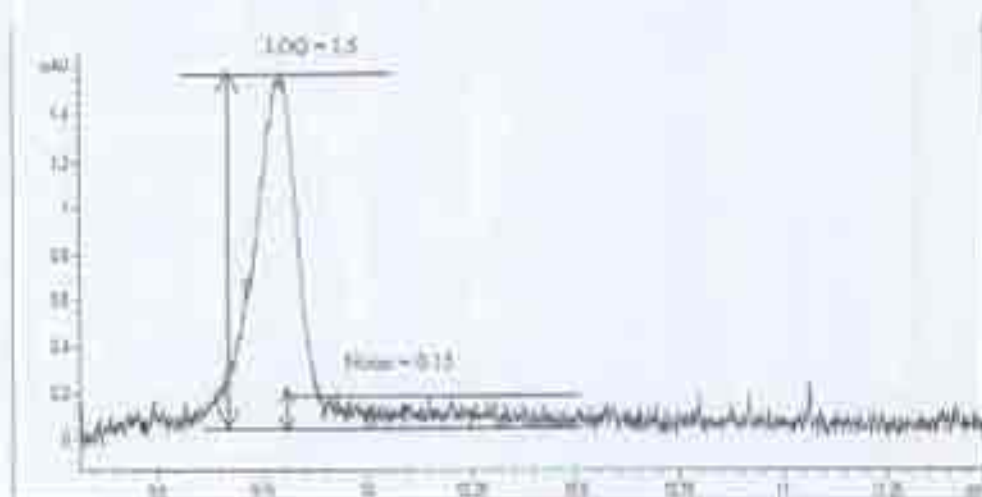
Standard added (%)	Sample No.	Migration time (min)	Peak area (mAU*s)	Amount Added ($\mu\text{g/mL}$)	Amount found ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)
150	1	12.416	1282.937	149.55	155.41	103.92
	2	12.500	1270.194	149.55	153.29	102.50
	3	12.502	1229.867	149.55	146.58	98.01
	Average	12.473	1260.999	149.55	151.76	101.48
	SD	0.05	27.70	0.00	4.61	3.08
	%RSD	0.39	2.20	0.00	3.04	3.04

2.4 ลิมิตการตรวจวัดและลิมิตการวิเคราะห์ปริมาณ

ลิมิตการตรวจวัดคือความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีสามารถตรวจวัด ซึ่งคำนวณจากค่าสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signal to noise ratios, S/N) เท่ากับ 3 สำหรับ paracetamol และ chlorpheniramine มีค่าเท่ากับ 0.4 และ 2 ในโครมาตोगรามมีผลลิตกร ตามลำดับ (ภาพที่ 17, 19) ลิมิตการวิเคราะห์ปริมาณ คือความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีสามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ซึ่งคำนวณจากค่าสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signal to noise ratios, S/N) เท่ากับ 10 สำหรับ paracetamol และ chlorpheniramine มีค่าเท่ากับ 0.5 และ 4 ในโครมาตोगรามมีผลลิตกร ตามลำดับ (ภาพที่ 18, 20) % RSDs สำหรับลิมิตการวิเคราะห์ปริมาณ paracetamol และ chlorpheniramine มีค่าเท่ากับ 3.12 and 2.37% ตามลำดับ (ตารางที่ 22-23)



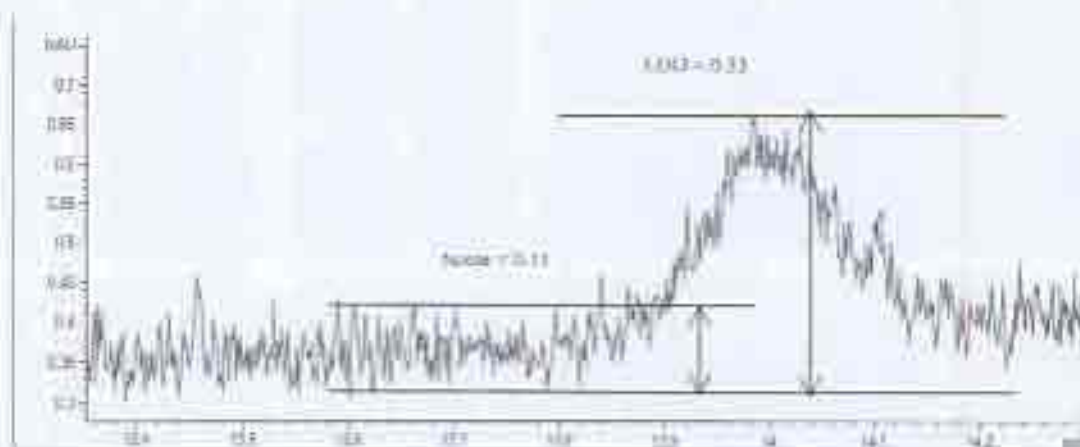
ภาพที่ 17 สัมผัสการตรวจวัดซ้ำสำหรับ paracetamol (S/N = 3)



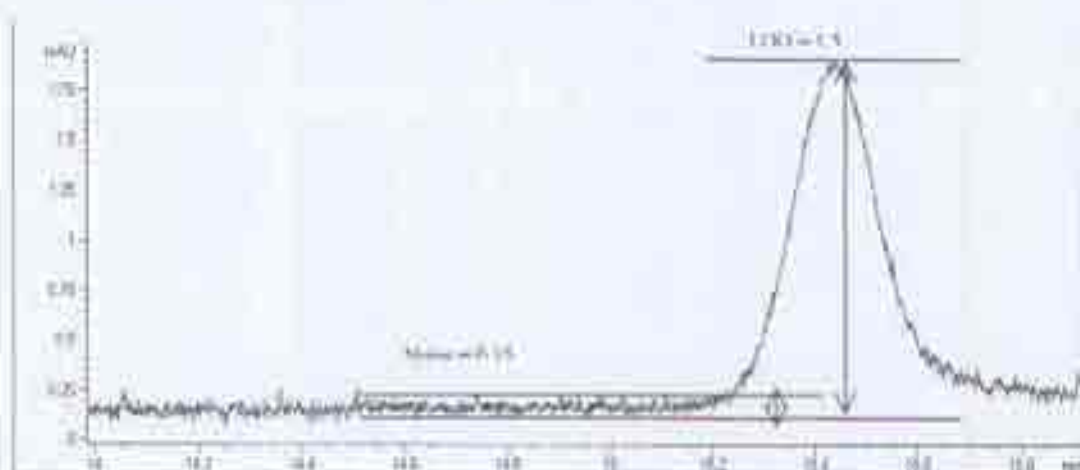
ภาพที่ 18 สัมผัสการวิเคราะห์ปริมาณซ้ำสำหรับ paracetamol (S/N = 10)

ตารางที่ 22 ความแม่นยำของสัมพัทธ์การวิเคราะห์ปริมาณซ้ำสำหรับ paracetamol (n = 6)

Injection No.	Migration time (min)	Peak area (mAU*s)
1	9.793	13.525
2	9.772	14.113
3	9.716	14.877
4	9.679	14.084
5	9.655	14.420
6	9.725	14.205
Average	9.723	14.204
SD	0.05	0.44
%RSD	0.54	3.12



ภาพที่ 19 ลิมิตการตรวจวัดสำหรับ chlorpheniramine maleate (S/N = 3)



ภาพที่ 20 ลิมิตการวิเคราะห์ปริมาณสำหรับ chlorpheniramine maleate (S/N = 10)

ตารางที่ 23 ความแม่นยำของลิมิตการวิเคราะห์ปริมาณสำหรับ chlorpheniramine maleate (n = 6)

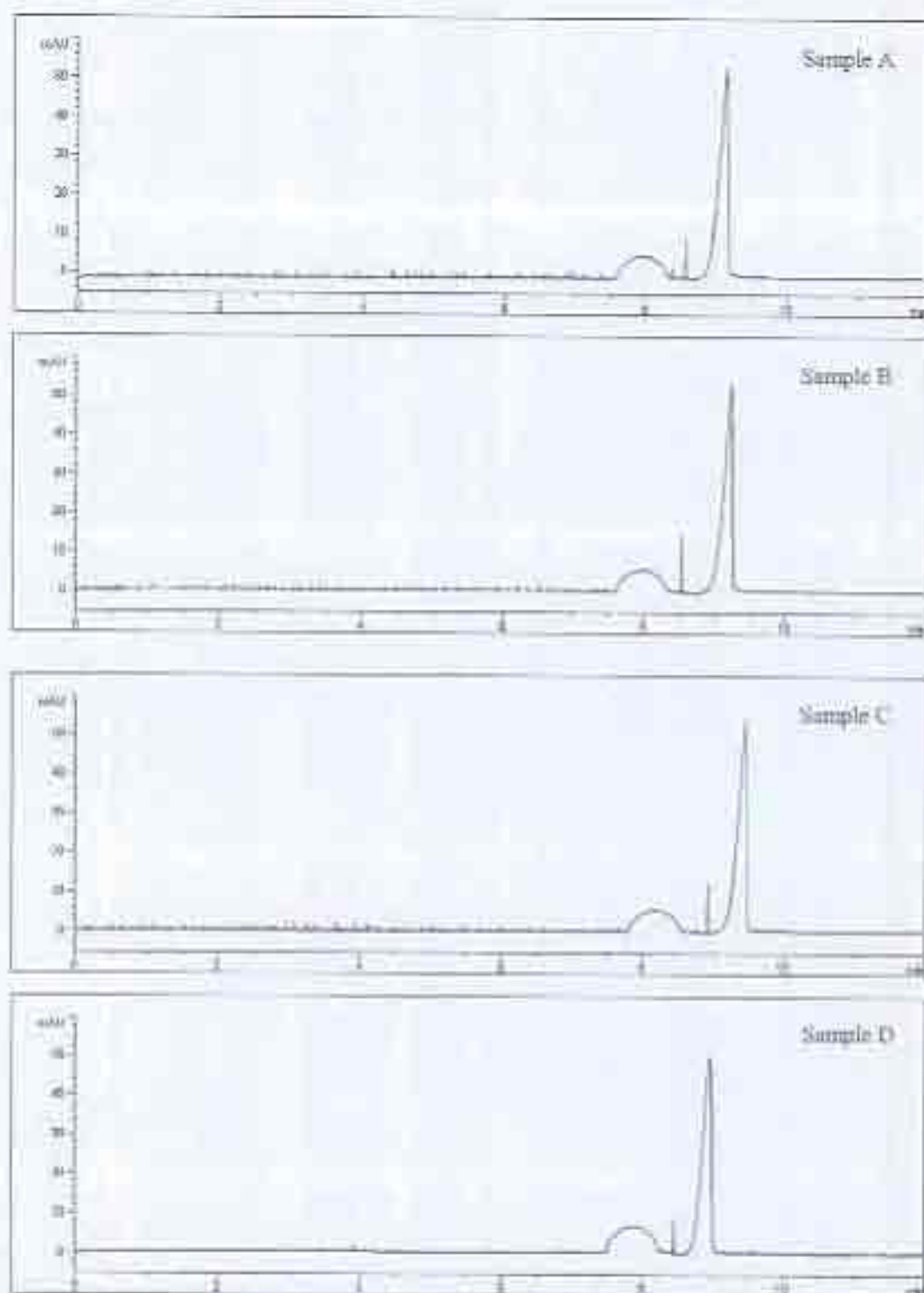
Injection No.	Migration time (min)	Peak area (mAU*%)
1	15.227	21.651
2	15.221	21.612
3	15.271	21.584
4	15.438	22.113
6	15.354	22.456
7	15.369	22.640
Average	15.313	22.043
SD	0.09	0.52
%RSD	0.57	2.37

3. การวิเคราะห์การประกอบในโคมมอนในตัวอย่างยา

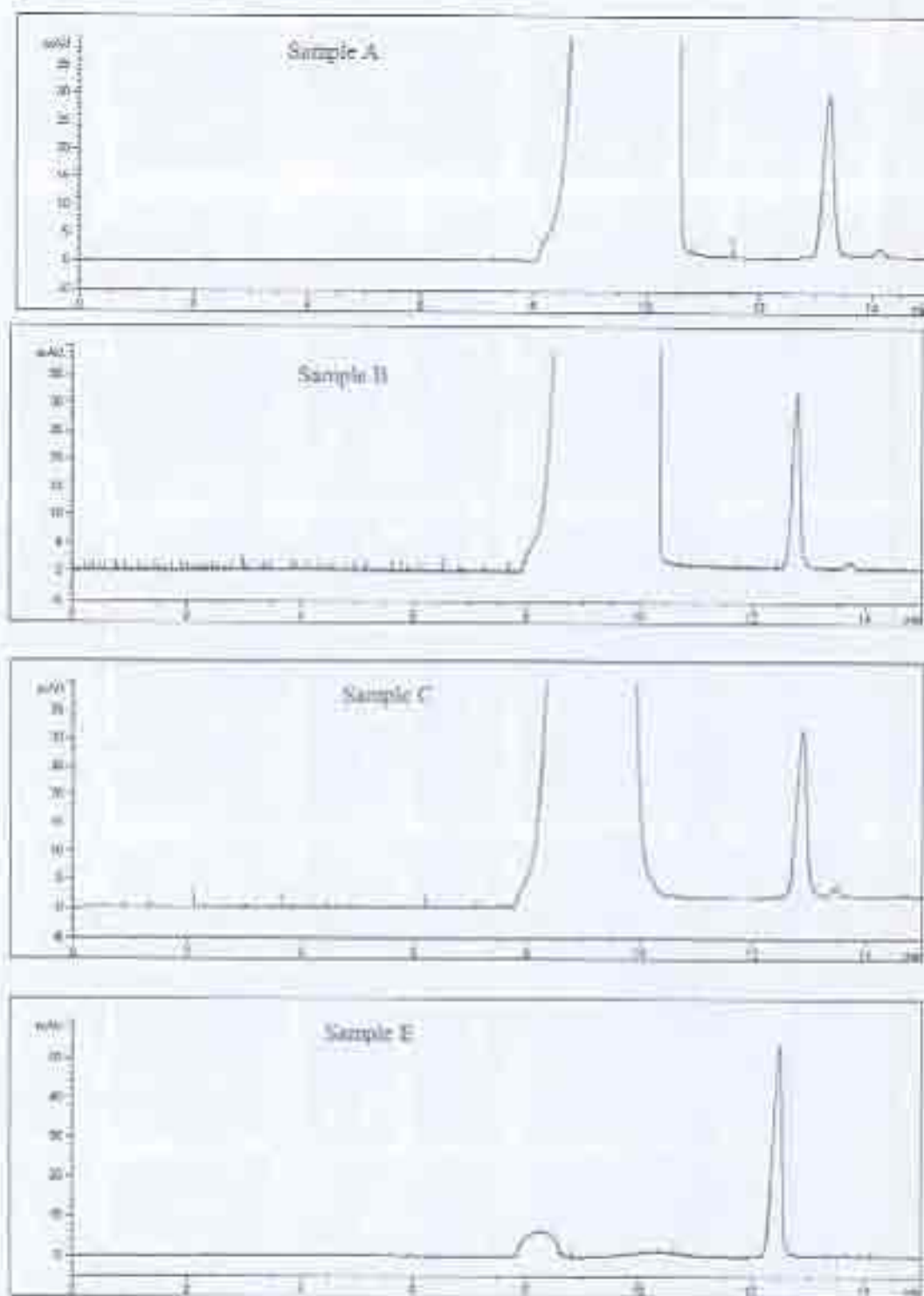
วิธีที่พัฒนาขึ้นและผ่านการประเมินได้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบในยาพหุองค์ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย 5 ยี่ห้อ ชื่อยี่ห้อ A, B และ C ประกอบด้วย paracetamol 500 มิลลิกรัม และ chlorpheniramine maleate 2 มิลลิกรัมต่อเม็ด ชื่อยี่ห้อ D ประกอบด้วย paracetamol 500 มิลลิกรัมต่อเม็ด และยี่ห้อ E ประกอบด้วย chlorpheniramine maleate 4 มิลลิกรัมต่อเม็ด ผลการวิเคราะห์ที่แสดงในตารางที่ 24 ตัวอย่างอิเล็กทรอนิกส์ไฟล์ในแนบของการวิเคราะห์ paracetamol และ chlorpheniramine maleate ในตัวอย่างแสดงในภาพที่ 21-22 ขอบข่ายคำค้น

ตารางที่ 24 ผลการวิเคราะห์ paracetamol และ chlorpheniramine maleate ในตัวอย่าง 14 (n = 3)

Brand	Active Ingredient	Spl No.	Migration time (min)	Peak area (mAU*s)	Actual amount (mg)	Amount found (mg)	Label amount (%)	% RSD
A	Paracetamol	1	8.984	471.733	500.00	529.09	105.82	1.43
		2	9.190	472.708	500.00	528.96	105.79	0.99
	Chlorpheniramine maleate	1	13.030	38.445	2.00	1.33	66.4	2.09
		2	12.935	364.387	2.00	1.28	63.7	0.45
B	Paracetamol	1	9.168	448.423	500.00	500.30	100.06	0.81
		2	9.116	456.645	500.00	509.41	101.88	0.71
	Chlorpheniramine maleate	1	13.125	484.510	2.00	1.68	83.75	0.50
		2	12.771	475.380	2.00	1.64	82.21	0.44
C	Paracetamol	1	9.143	463.982	500.00	520.66	104.13	0.32
		2	9.407	470.000	500.00	525.88	105.18	0.58
	Chlorpheniramine maleate	1	13.941	535.938	2.00	1.85	92.33	0.08
		2	13.991	535.326	2.00	1.84	92.17	0.77
D	Paracetamol	1	8.978	455.778	500.00	510.54	102.11	0.30
		2	8.932	461.855	500.00	517.14	103.43	0.69
E	Chlorpheniramine maleate	1	13.185	581.788	4.00	3.99	99.78	0.15
		2	12.487	586.139	4.00	4.03	100.69	0.30



ภาพที่ 21 อิเล็กโทรโฟเรแกรมของ paracetamol ในตัวอย่าง Condition: 10 mM sodium dihydrogen phosphate-sodium tetraborate, pH 9.0 containing 50 mM SDS; 26% w/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



ภาพที่ 22 อิเล็กโตรโฟเรโกราฟีของ chlorpheniramine maleate ในน้ำ 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 I.D.; detection by UV absorbance at 214 nm; applied voltage: 15 kV; temperature: 20 $^{\circ}$ C

ข้อวิจารณ์

1. ព័ត៌មានអំពីស្ថាប័ន

1.1 ผลของคว่ำทำต่อรายอื่นหรือ

ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอลและอะซิโตนใดก็มีผลต่อการนำไฟฟ้าของซีเอ็มไอโอดีและลดการไหลของฮอลล์โมบิลิตีโดยการรบกวนการจับประจุกับโพลิเมอร์ของน้ำ การเพิ่มความหนาแน่นในการแยกสารจึงเกิดจากการลดลงของการไหลของฮอลล์โมบิลิตี การลดการแพร่กระจายนี้เกิดจากความร้อนและการเพิ่มการระเหยของสาร ดังนั้นการเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ลงในซีเอ็มไอโอดีจึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการออกสาร

ในงานวิจัยมีพบว่าเมื่อใช้ขี้ดกของธัญพืชต่าง ๆ (e.g., MeOH, EtOH and *i*-PrOH) เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ทำให้ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสารเพิ่มขึ้นทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มของ migration window และความหนืด ซึ่งสาเหตุหลักของข้อผิดพลาดนี้เวลาที่เพิ่มเพิ่มขึ้น แต่กลับพบว่าประสิทธิภาพในการแยกสารไม่ได้ขึ้น (ภาพที่ 4) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายจาก 10-40% v/v สารทั้ง 9 ชนิดยังไม่สามารถแยกออกจากกันได้ จึงได้ศึกษาการใช้อะซิโตนไครล์เป็นตัวทำละลายชนิดใหม่ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกสาร พบว่าอะซิโตนไครล์มี selectivity แตกต่างจากขี้ดกของธัญพืช และช่วยให้การแยกดีขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอะซิโตนไครล์ถึง 26% v/v สารทั้ง 9 ชนิดสามารถแยกออกจากกันได้ (ภาพที่ 5) ภายใน 25.5 นาที โดยมีค่า $R_f = 1.0$ ซึ่งคำนวณจากพื้นที่ที่อยู่ใต้ถักกันมากที่สุด (diphencydamine and dexocetethanophan) เมื่อเพิ่มปริมาณอะซิโตนไครล์ต่อในขี้ดกเป็น 28 และ 30% v/v ประสิทธิภาพการแยกสารลดลงเนื่องจากปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์สูงเกินไปจนการแพร่กระจายการเกิด ไมเซลล์ คำนวณปริมาณอะซิโตนไครล์ที่เหมาะสมคือที่ 26% v/v

1.2 ผลของควมเข้มข้นของอิเล็คโทรไลต์

ความเข้มข้นของอิเล็กโทรไลต์หรือ ionic strength มีผลอย่างมากต่อเวลาในการเคลื่อนที่ของสาร เนื่องจากมีผลโดยตรงต่อการไหลของสโมลลิค โดยการเพิ่มความเข้มข้นของอิเล็กโทรไลต์ลดการไหลของสโมลลิคจนกระทั่งทำให้เวลาในการเคลื่อนที่ของสารเพิ่มขึ้นซึ่งมีลักษณะการเพิ่มความหนาของdiffusion of double-layer ที่ผนังด้านในของคอลัมน์แบบไฮดรอฟิล

หากการศึกษาค้นคว้าของความสัมพันธ์ของอิเล็กโทรโกลด์ซึ่งประกอบด้วยไฮโดรเจนไดออกไซด์-ไฮโดรเจนไดออกไซด์-ไฮโดรเจนไดออกไซด์ ในอัตรา 1 : 1, 50 มิลลิโมลาร์ ไฮโดรเจนไดออกไซด์-ไฮโดรเจนไดออกไซด์ และ 26% โดยปริมาตร อะซิโตนไดออกไซด์ พบว่าการเกิดของอิเล็กโทรโกลด์ที่อุณหภูมิห้องมีความสัมพันธ์กับเวลาในการเคลือบที่ลดลงตามลำดับ (ภาพที่ 8) เมื่อทำการวัดค่าของค่าต่างศักย์ไฟฟ้า (zeta potential) ที่ผิวด้านในของท่อที่มีลักษณะเป็นท่อ ที่ความเข้มข้นอิเล็กโทรโกลด์ 20 และ 30 มิลลิโมลาร์ พบว่าต้องใช้เวลานานกว่า 60 นาทีในการเคลือบสารทั้ง 9 ชนิด และพบว่าสารเคลือบที่เคลือบเพียง

7 พีก โดยใช้เวลาในการเคลื่อนที่ที่ประมาณเท่ากับ 37.6 และ 42.2 นาที ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบ ปริมาณกระแสไฟฟ้าสูงมากกว่า 100 μA ที่ความเข้มข้นทั้งสอง เมื่อลดความเข้มข้นลงพบว่าที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ สารทั้งหมดถูกแยกออกจากกัน แต่ที่ 5 มิลลิโมลาร์ phenylpropanolamine hydrochloride และ caffeine ไม่สามารถถูกแยกออกจากกันได้ที่ baseline ดังนั้น ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแยกสาร

1.3 ผลของพีเอชของอิเล็กโทรไลต์

พีเอชมีผลต่อประสิทธิภาพและลำดับในการแยกสาร ผลดังกล่าวขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสารตัวอย่าง (nature of the analytes) และ mode ของแคโทดหรืออิเล็กโทรไลต์ที่เลือกใช้ การแยกสารที่มีคุณสมบัติเป็นด่างและเป็นกลางนิยมใช้พีเอชสูงและเคมสารลดแรงดึงผิวลงในอิเล็กโทรไลต์ เพื่อช่วยให้การไหลของสารไม่ติดมีค่าการเพิ่มและเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกสาร

ในการแยกองค์ประกอบในยาแก้หวัดโดยการใช้อิเล็กโทรไลต์ที่พีเอช 4.0-10.0 พบว่าที่พีเอชสูง (9.0 และ 10.0) ให้ผลการวิเคราะห์ดีกว่าที่พีเอชต่ำ (4.0 และ 7.0) ดังแสดงในภาพที่ 10 เนื่องจากที่พีเอชสูงช่วงลดประจุบวกที่หนึ่งด้านในของเคอทีนมีแคปิลลารี ช่วงลดการเกิดอีควิวียาของสารกันประจุบวกเหล่านี้ นอกจากนั้นสารที่ศึกษามีความคงตัวที่พีเอชสูงมากกว่าที่พีเอชต่ำ พีเอชที่เหมาะสมที่พบคือพีเอช 9.0 เนื่องจากที่พีเอช 10.0 พีคของ phenylpropanolamine และ caffeine ซ้อนทับกัน

1.4 ผลของอุณหภูมิและความต่างศักย์ไฟฟ้า

อุณหภูมิและกรรมค่าศักย์ไฟฟ้า เป็นปัจจัยทางเคมีที่มีผลโดยตรงต่อเวลาในการเคลื่อนที่ของสาร การเพิ่มอุณหภูมิและความต่างศักย์ไฟฟ้าทำให้เวลาในการเคลื่อนที่ลดลง พิกของสารขาซ้กันทับกันได้ นอกจากนั้นยังทำให้กระแสไฟฟ้าและความร้อนสูงขึ้น ดังนั้นในการวิเคราะห์จะต้องเลือกอุณหภูมิและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าอุณหภูมิและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการแยกองค์ประกอบในยาแก้หวัดคือที่ 30 $^{\circ}\text{C}$ และที่ 15 กิโลโวลต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 12 และ 14) ซึ่งสามารถแยกองค์ประกอบทั้ง 9 ชนิดออกจากกันภายใน 25.5 นาที โดยก่อให้เกิดกระแสไฟฟ้าในปริมาณค่า (50 μA)

จากการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์องค์ประกอบในยาแก้หวัดทั้ง 9 ชนิด พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคืออิเล็กโทรไลต์ซึ่งประกอบด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต-โซเดียมคลอไรด์ (พีเอช 9.0) 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไดเตทราซึกเตต และ 26% โคซปริมาตร อะซิโตนในโวลล์ คลัมมันต์กัปิลลารีความยาวทั้งหมด 58.5 ซม (effective length

50 ชม) เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 ไมครอน อุณหภูมิคงที่ 30 °C ความดันตกอยู่ที่ 15 กิโลโวลต์ และตรวจวัดการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตที่ 214 นาโนเมตร

2. การประเมินวิธีวิเคราะห์

2.1 ความสัมพันธ์เชิงตรง

Calibration curve และ regression data สำหรับ paracetamol และ chlorpheniramine maleate ทำมาจากพื้นที่ที่ได้ทดสอบมีความสัมพันธ์เชิงเส้นในช่วงความเข้มข้น 10-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีสมการเส้นตรงดังนี้ $y = (4.30 \pm 0.07)x + (18.1 \pm 8.2)$ ($r^2 = 0.9993$) สำหรับ paracetamol (ตารางที่ 10-11) และ $y = (6.00 \pm 0.08)x - (18.3 \pm 9.3)$ ($r^2 = 0.9995$) สำหรับ chlorpheniramine maleate (ตารางที่ 12-13)

2.2 ความแม่นยำ

ความแม่นยำในการวิเคราะห์ ($n = 10$) ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ paracetamol และ chlorpheniramine maleate มีค่า %RSDs สำหรับ migration time เท่ากับ 3.48% และ 3.28% และ %RSDs สำหรับ peak area มีค่าเท่ากับ 1.74% และ 2.37% ตามลำดับ (ตารางที่ 14-15)

ความแม่นยำในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน ($n = 6$) ที่ความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบ %RSDs ของ migration time ที่ความเข้มข้นเหล่านี้มีค่าเท่ากับ 1.28, 0.36, 0.67 และ 3.32% สำหรับ paracetamol และมีค่าเท่ากับ 2.99, 1.38, 0.57 and 1.35% สำหรับ chlorpheniramine maleate ค่า %RSDs ของ peak area ที่ความเข้มข้นเหล่านี้มีค่าเท่ากับ 2.14, 2.07, 1.90 และ 0.81% สำหรับ paracetamol และ 1.76, 2.20, 2.51 และ 1.24 % สำหรับ chlorpheniramine maleate (ตารางที่ 16-17)

ความแม่นยำในการวิเคราะห์ต่างวันเป็นเวลา 6 วัน ที่ความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบ %RSDs ของ migration time ที่ความเข้มข้นเหล่านี้มีค่าเท่ากับ 3.07, 3.48, 2.34 และ 2.70% สำหรับ paracetamol และมีค่าเท่ากับ 4.34, 3.17, 1.82 and 4.25% สำหรับ chlorpheniramine maleate %RSDs ของ peak area ที่ความเข้มข้นเหล่านี้มีค่าเท่ากับ 2.07, 6.57, 3.38, 4.99% สำหรับ paracetamol และ 5.56, 3.46, 2.16 และ 3.21% สำหรับ chlorpheniramine maleate (ตารางที่ 18-19)

2.3 ความถูกต้อง

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์คำนวณจาก % recovery ของสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 50-150 ขอบปริมาณที่เจือในฉลาก พบว่า % recovery สำหรับ paracetamol และ chlorpheniramine maleate อยู่ในช่วง 99.22-101.79 % และ 97.71-101.48% ตามลำดับ (ตารางที่ 20-21)

2.4 ลิขิตการตรวจวัดและลิขิตการวิเคราะห์ปริมาณ

ลิขิตการตรวจวัดสำหรับ paracetamol และ chlorpheniramine maleate มีค่าเท่ากับ 0.4 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ลิขิตการวิเคราะห์ปริมาณสำหรับ paracetamol และ chlorpheniramine maleate มีค่าเท่ากับ 2 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมี %RSDs เท่ากับ 3.12 and 2.37% ตามลำดับ (ตารางที่ 22-23)

3. การวิเคราะห์สารประกอบในโสรจนในตัวอย่งยา

การวิเคราะห์สารประกอบในโสรจนในตัวอย่งยา 5 ยี่ห้อ ดังนี้ ยี่ห้อ A, B และ C ประกอบด้วย paracetamol 500 มิลลิกรัม และ chlorpheniramine maleate 2 มิลลิกรัมต่อเม็ด ยี่ห้อ D ประกอบด้วย paracetamol 500 มิลลิกรัมต่อเม็ด และยี่ห้อ E ประกอบด้วย chlorpheniramine maleate 4 มิลลิกรัมต่อเม็ด พบว่า label amount (in) paracetamol ในยี่ห้อ A, B, C และ D มีค่าเท่ากับ 105.81, 100.97, 104.66 และ 102.77% ตามลำดับ %in ของ chlorpheniramine maleate ในยี่ห้อ A, B, C และ E มีค่าเท่ากับ 65.05, 82.98, 92.25 และ 100.24% ตามลำดับ ปริมาณ paracetamol ในยี่ห้อ A-D และ chlorpheniramine maleate ในยี่ห้อ C และ E เข้าตามมาตรฐาน USP 25 (90.0-110.0%) ในขณะที่ปริมาณ chlorpheniramine maleate ในยี่ห้อ A และ B มีค่าต่ำกว่ามาตรฐาน (ตารางที่ 24)

สรุปผลการวิจัย

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์องค์ประกอบในยาน้ำแก้หวัดซึ่งประกอบด้วย phenylpropanolamine hydrochloride, caffeine, paracetamol, chlorpheniramine maleate, diphenhydramine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide, ipropiridine hydrochloride, loxatadine และ aspirin ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี โดยการศึกษาปัจจัยของตัวทำละลายอินทรีย์ ความเข้มข้นและพีเอชของอิเล็กโตรไลต์ อุดหนุนและความดันศักย์ไฟฟ้า พบสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารทั้ง 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 พบความสัมพันธ์เชิงตรงในช่วง 10-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นดังนี้ $y = (4.30 \pm 0.07)x + (18.1 \pm 8.2)$ ($r^2 = 0.9993$) สำหรับ paracetamol และ $y = (6.10 \pm 0.08)x - (18.3 \pm 9.3)$ ($r^2 = 0.9995$) 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% วิกฤตการตรวจวัดมีค่าเท่ากับ 0.4 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ paracetamol และ chlorpheniramine maleate ตามลำดับ วิกฤตการวิเคราะห์ปริมาณมีค่าเท่ากับ 2.0 และ 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ paracetamol และ chlorpheniramine maleate ตามลำดับ

วิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมและถูกต้อง สามารถนำไปใช้สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบในขบวนการผลิตตัวอย่างผงในหารานที่ 25 นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์กากทิ้งที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกัน วิธีการนี้เป็นวิธีการที่สะดวก รวดเร็ว ประหยัด ไร้สารเคมีและสารด้วยอย่างในปริมาณเล็กน้อย ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยาก และไม่ก่อให้เกิด organic waste ซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม

ตารางที่ 25 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบในซามกันวัดในด้วยสาร 5 ซึ่คือ (n = 3)

Brands	% labeled amount*	
	Paracetamol	Chlorpheniramine maleate
A	103.81	85.05
B	100.97	82.98
C	104.66	92.25
D	102.77	-
E	-	100.24

* % labeled amount specified in USP 25 for both drugs in tablets are 90-110%

Output ที่ได้จากโครงการ

Output ที่ได้จากโครงการประกอบด้วย 2 ส่วน ดังนี้

1. ได้วิธีการวิเคราะห์สารประกอบในโคมกมที่ผสมในตำรับยาแก้หัด ตามแก้ฟ้าทาษ อาตดไ้และยกรวรวทาป่ว โดยการใช้เทคนิคแคปิลลาไรีอิเล็กโทรโฟรีซิส วิธีดังกล่าว สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณยาพาราศานอลและคสอที่บิรามีนนาอีเอท เพื่อการควบคุมคุณภาพยาที่ส่งของชาวลในตำรับยาแก้หัด ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อหน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนที่ผลิตยาดังกล่าวเนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และประหยัด ในขนาดบ่งสามารถป่ววิธีนี้ไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบในโคมกมหรือสารที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับที่ผสมในตำรับยาประเภทอื่น

2. ได้ผลงานวิจัยที่สามารถเผยแพร่ได้ในระดับนานาชาติ 2 เรื่อง ดังนี้

- 2.1 Sumritsuk L., Pipitharone O., Wilairat P., Simultaneous determination of paracetamol and chlorpheniramine maleate by micellar electrokinetic chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 33: 441-449.
- 2.2 Sumritsuk L., Pipitharone O., Wilairat P. Method Development for Separation of Cold Medicine Ingredients by Micellar Electrokinetic Chromatography, *Sci. Pharm.* 2003, 71: 235-250.

บรรณานุกรม

1. Altria, K.D. (1993) Quantitative Aspects of the Application of Capillary Electrophoresis to the Analysis of Pharmaceuticals and Drug-Related Impurities. *J. Chromatogr.*, 646: 245-257.
2. Altria, K.D. and Chatter, Y.L. (1993) Validation of a Capillary Electrophoresis Method for the Determination of a Quinolone Antibiotic and its Related Impurities. *J. Chromatogr. A*, 652: 459-463.
3. Aoki, M., Iwayama, Y. and Yata, N. (1962) Colorimetric Determination of Organic Bases with Sulfophthalein Dyes. *Yakugaku Zasshi*, 82: 918-21.
4. Bergholdt, A., Overgaard, J., Colding, A., and Frederiksen, R.H. (1993) Separation of D-galacturonic and D-glucosuric Acids by Capillary Zone Electrophoresis. *J. Chromatogr.*, 644: 412-415.
5. Chen, M. and Cassidy, R.M. (1993) Separation of Metal Ions by Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr.*, 640: 425-431.
6. Croubels, S., Baeyens, W., Dewaele, C., Van Peteghem, C. (1994) Capillary Electrophoresis of Some Tetracycline Antibiotics. *J. Chromatogr. A*, 67: 3267-274.
7. Deyl, A., Taghiz, F. and Miksik, I. (1994) Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr. B*, 656: 3-27.
8. Faquihel, A., Hernandez, R.M., Gascon, A.R. et al., (1997) Determination of Salbutamol Enantiomers by High-Performance Capillary Electrophoresis and its Application to Dissolution Assays. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 16: 357-366.
9. Gasco-Lopez, A.L., Izquierdo-Hornillos, R. and Jimenez, A. (1997) Development and Validation of a High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Cold Relief Ingredients in Chewing Gum. *J. Chromatogr. A*, 775:179-85.
10. Germán, A.M., Edwards, R. D., Ejerby M.R. and Johnson, C. M. (1998) Aqueous and Non-aqueous Capillary Electrophoresis of Pharmaceutical Amines. *Pharm. Pharmacol. Commun.*, 4: 189-192.
11. Hanna, G.M. (1995) Determination of Ephedrine, Pseudoephedrine, and Norzephedrine in Mixtures (Bulk and Dosage Forms) by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Off. Anal. Chem.*, 78: 946-54.

12. Indrayanto, G., Senarto, A. and Andriani, Y. (1995) Simultaneous Assay of phenylpropionol-amine Hydrochloride, Caffeine, Paracetamol, Glycerylguaiacolate and Chlorpheniramine Maleate in Silabat Tablet Using HPLC with Diode Array Detection. *J. Pharm. & Biomed. Anal.* 13: 1555-59.
13. Korany, M.A., Badair, M.M. and el-Gindy, A. (1990) Determination of Chlorpheniramine Maleate, Dihydrocodeine Bitartrate and Ephedrine Hydrochloride in cough Mixture by Derivative and Differential Spectrometry. *J. de Pharmacie de Belgique* 45:252-8.
14. Mathew, W.R., Brown, H.C. and Weber, J.B. (1972) Rapid Method for the Quantitative Measurement of numerous Pharmaceutically Important Amines. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 55:789.
15. Matsui, F. and French, W.N. (1971) Analysis of Binary Mixtures of Pharmaceutical Amines by the Acid Dye Technique. *J. Pharm. Sci.* 60: 287-91.
16. Munnig, C.A. and Kennedy, R.T. (1994) Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* 66: 280R-314R.
17. Nakahara, Y. and Kikura, R. (1997) Hair Analysis for Drug Abuse. XIX. Determination of Ephedrine and its Homologs in Rat Hair and Human Hair. *J. Chromogr. B*, 700: 83-91.
18. Oehrle, S.A. (1995) Capillary-Ion Analysis of Ion and Organic Acids in Circuit Board Extracts. Pittsburgh Conf. Abstract 1368.
18. Richmond, M.D. and Yeung, E.S. (1993) Development of Laser-Excited Indirect Fluorescence Detection for High-Molecular-Weight Polysaccharide in Capillary Electrophoresis. *Anal. Biochem.* 210: 245-248.
19. Shuhai, M.F., Abdel Rahef, M.M. and Daifullah, A.A. (1992) Spectrophotometric Determination of Ephedrine HCl, Cinchonine HCl, Chlorpheniramine maleate, Atropine Sulphate and Diphenhydramine HCl by Solvent Extraction of Reineckate Complexes. *J. Chem. Tech. & Biotech.* 54: 175-81.
20. Suntomauk, L. (2001) Method Development of Capillary Electrophoresis for Separation of Cold Medicine Ingredient. *Electrophoresis* 22: 139-143.
21. Tsubouchi, M. (1970) Spectrophotometric Determination of Diphenhydramine in Pharmaceutical Preparations. *Bull. Chem. Soc. Jap.* 43: 3164-65.

22. Jegic, U. (1993) Separation of Water-Soluble Vitamins via High Performance Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 652: 495-501.
23. Yamashita, K., Motohashi, M. and Yashiki, T. (1990) High-Performance Liquid Chromatography Determination of Phenylpropanolamine in Human Plasma and Urine, Using Column Switching Combined with Ion-Pair Chromatography. *J. Chromatogr.* 527: 103-14.

บทบรรณานุกรม

- Reprint I Suntornnuk L., Pipitharone O., Wilairat P., Simultaneous determination of paracetamol and chlorpheniramine maleate by micellar electrokinetic chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 33, 441-449.
- Reprint II Suntornnuk L., Pipitharone O., Wilairat P., Method Development for Separation of Cold Medicine Ingredients by Micellar Electrokinetic Chromatography, *Sci. Pharm.* 2005, 71, 235-250.



Simultaneous determination of paracetamol and chlorpheniramine maleate by micellar electrokinetic chromatography

Leena Suntornsuk^{a,*}, Ongart Pipitharome^a, Prapin Wilairat^b

^a Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 447 Sri-Ayudhya Rd., Rajathavee, Bangkok 10400, Thailand

^b Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Rd., Bangkok 10400, Thailand

Received 6 December 2002; received in revised form 16 April 2003; accepted 1 May 2003

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, 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 50 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 (%R.S.D. = 3.1%) and 3 (%R.S.D. = 2.4%) µg/ml for PARA and CPM, respectively. The developed method was applied to the determination of ingredients in cold tablets and was found to be simple, rapid and efficient. © 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

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

1. Introduction

Most cold remedies contain one or more active ingredients, which include paracetamol (PARA), chlorpheniramine maleate (CPM), diphenhydramine hydrochloride (DPIH), triprolidine hydrochloride

(TPIH), phenylpropanolamine hydrochloride (PPA), dextromethorphan hydrobromide (DEX), loratadine (LOR), aspirin (ASA) and caffeine (CAF) (Fig. 1). Simultaneous separation of these compounds can be problematic since they show some similar physical and chemical characteristics. Several methods have been proposed for analysis of these compounds such as spectrophotometry [1–6], HPLC [7–12] and capillary electrophoresis (CE) [13–23]. Spectrophotometric methods

* Corresponding author. Tel.: +66-2-644-5673x3101; fax: +66-2-347-4696.

E-mail address: pyll@mahidol.ac.th (L. Suntornsuk).

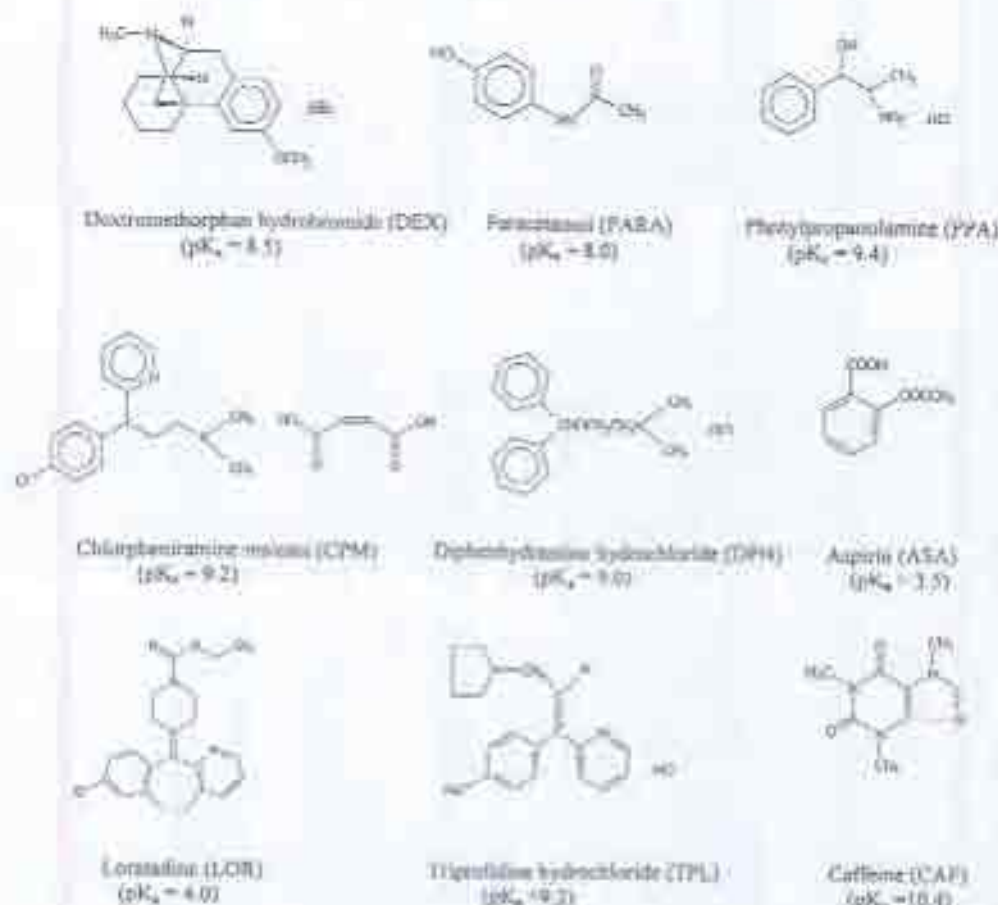


Fig. 1. Structures of the investigated cold remedy ingredients.

usually require sample pre-treatments (e.g. extraction, complex formation, etc.) which can be laborious and time consuming. Additionally, some of the cold remedy ingredients are basic drugs, which strongly react with the stationary phase of the reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). This causes the peak asymmetry and low separation efficiency. Compared with other techniques CE is a micro-analytical method, which provides advantages in term of simplicity, high efficiency, low cost and short analysis time. Major drawbacks of CE are its sensitivity and reproducibility, which usually are lower than those obtained from HPLC. Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) is one mode of CE that is useful for the separation of charged compounds, with similar electrophoretic mobilities, and neutral analytes. Separation in

MEKC occurs by the use of either charged or neutral zwitterion surfactants, thus the separation mechanism is based on differences of electrophoretic mobilities, partitioning of analytes and nature of additives.

The previous study of our group [23], revealed that PARA, CPM, PPA and DEX were well separated in a 10 mM sodium dihydrogenphosphate-sodium tetraborate buffer containing 50 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) and 5% v/v MeOH, pH 9.0. Since, there is no report on the simultaneous separation of the nine cold remedy ingredients shown in Fig. 1, the current investigation focused on the optimization of the MEKC condition for the separation of these substances. The influence of types and amounts of organic modifiers, buffer concentrations and pH, temperature and voltage were systematically ex-

umined. The optimized condition was validated and applied for quantitation of PARA and CPM in cold tablets.

2. Experimental

2.1. Chemicals

PARA, CPM, DPH, TPL, PPA and sodium tetraborate were from Aldrich (Milwaukee, MI, USA) and DEX, LOR, ASA, CAF, SDS, and sodium dihydrogenphosphate were from Sigma (St. Louis, MO, USA). Methanol (MeOH), ethanol (EtOH), isopropanol (*i*-PrOH) and acetonitrile (ACN) were HPLC grade, all other reagents were of analytical reagent grade and water was deionized distilled water.

2.2. Instrumentation and electrophoretic procedure

CE measurements were performed on a ²⁵CE system (Hewlett Packard, Waldbronn, Germany) equipped with a diode-array detector, an automatic injector, and an autosampler. Separations were carried out using fused-silica capillary tubes (Polymicro Technologies, USA) with a total length of 58.5 cm, an effective length of 50.0 cm and an inner diameter of 75 µm. The detector wavelength was 214 nm with a bandwidth of 4 nm. All experiments were carried out in a positive mode (anode at the inlet and cathode at the outlet). Sample injections were achieved using the pressure mode for 10 s at 50 mbar. ¹⁷CE Chemstation software (Hewlett Packard) was used for instrumental control, data acquisition and data handling.

For a new capillary tube, the tube was pre-conditioned by rinsing with 0.1 M sodium hydroxide for 20 min, followed by deionized water for 10 min. For routine uses, the tube was washed with 0.1 M sodium hydroxide for 2 min, followed by deionized water for 2 min, and then the buffer for 5 min. As electrolysis can alter the composition of the buffer and subsequently change the electroosmotic flow (EOF), the buffer solution was replaced after five injections to maintain high reproducibility.

2.3. Standard preparations

Stock standard and working standard solutions were prepared in deionized water at a concentration of 1000 and 100 µg/ml, respectively. In case of LOR, MeOH was used the solvent. All solutions were filtered through a 0.2 µm membrane prior injection.

2.4. Linearity, precision, accuracy, recover, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ)

Method linearity was evaluated by injecting five concentrations of the working standard solutions over the range of 10–250 µg/ml ($n=3$). The calibration curve was plotted between the signals and the standard solution concentrations and regression equation and regression coefficient (r^2) was obtained using Microsoft EXCEL[®]. Injection precision was determined by repetitive injecting the standard solution at 250 µg/ml ($n=10$). Intra-day and inter-day precision was performed by analyzing the standard solutions at various concentrations (10, 50, 100 and 250 µg/ml) and on 6 different days ($n=6$), respectively. The precision was expressed as %R.S.D. Accuracy and recovery were determined by standard addition method. Standard solutions ranging from 50 to 150% of the label amount (300 µg and 2.5 µg per tablet for PARA and CPM, respectively) were added into the samples. The accuracy was calculated in term of percent recovery (%R, the ratio of amount of standard recovered and standard added). The amount of standard, which could be detected with a signal to noise ratio (S/N) of 3 was considered to be the LOD. The lowest amount of standard, which could be quantified with S/N of 10 was defined as the LOQ.

2.5. Determination of paracetamol and chlorpheniramine maleate in tablets

Five different brands of cold tablets were purchased from local drugstores. Twenty tablets of each brand were finely powdered and the equivalent of one tablet was weighed and diluted to give the concentration of 100 µg/ml in deionized

water. All sample solutions were filtered through a 0.2 µm membrane prior injection ($n = 3$).

3. Results and discussion

3.1. Optimization of MEKC condition

Optimization experiments for the separation of the nine cold remedy ingredients was further investigated from the previous study [23]. The initial buffer system was a 10 mM sodium dihydrogenphosphate-sodium tetraborate buffer containing 50 mM SDS and 5% v/v MeOH, pH 9.0. The separation of the investigated compounds in the absence and presence of SDS was not compared since our previous data showed that without SDS peaks of CPM and DEX could not be resolved [23]. In the present study, effects of types (MeOH, EtOH, *i*-PrOH, ACN) and percentages of organic modifiers (0–30% v/v), concentrations (5–30 mM) and pHs (4.0–10.0) of sodium dihydrogenphosphate-sodium tetraborate at a ratio of 1:1 as a buffer, temperature (25–35 °C) and voltage (10–25 kV) were investigated. The buffer pH was controlled by addition of 0.1 M H_3BO_3 or 0.1 M NaOH. Throughout the study, peak resolution ($R_s = 2(t_2 - t_1)/(w_1 + w_2)$) was determined by the separation of DPH and DEX since they were the two closest peaks.

3.1.1. Effects of types and percentages of organic modifier

Organic modifiers play an important role in improving separation efficiency and selectivity in MEKC. Typically, small amounts of organic modifier increase the migration window and resolution of the separation due to the reduction of the micellar electrophoretic mobility. This effect is caused by the decrease of the buffer conductivity and the EOF through their ability to disrupt the ordered structure of water molecules. Additionally, organic modifiers reduce the thermal diffusion and improve analyte solubility resulting in the enhancement of resolution. Results showed that in the absence and presence of small amount of alcohol (5% v/v), the number of peak separated and the migration order of the interested com-

pounds were similar. The migration order was PARA, CAF, LOR, ASA, and CPM followed by the overlapped peaks of DPH, DEX, PPA and TPL, respectively. Lengthening of the alcohol chain did not greatly improve the separation, but an increase of the total migration time was obtained: 18.0 min in the absence of alcohol, 26.9 min in MeOH, 27.8 min in EtOH and 32.3 min in *i*-PrOH. This was due to the enlargement of the migration window. Further increases in MeOH (10–40% v/v) did not give satisfying results, whereas adding ACN as the organic modifier gave promising results. In the presence of 5% v/v ACN, CAF, LOR, ASA and CPM were eluted as separated peaks, whereas PARA, DPH, DEX, PPA and TPL co-eluted at 25.5 min. At 10% v/v ACN, the resolution was further decreased since CPM was included in the overlapped peak at 43 min. Interestingly, a specific amount of ACN was required for the complete separation of all compounds (Fig. 2). Baseline separation of all analytes with the R_s (calculated from DPH and DEX peaks) of 3.0 was obtained when 26% v/v of ACN was added into the buffer. The total t_m was 25.5 min with the migration order of PPA, CAF, PARA, CPM, DPH, DEX, TPL, LOR and

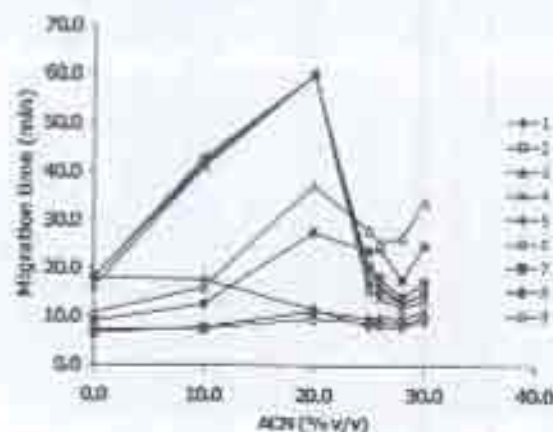


Fig. 2. Plot of migration time vs. percentages of ACN. Conditions: 10 mM sodium dihydrogenphosphate-sodium tetraborate buffer containing 50 mM SDS and various amount of ACN, pH 9.0, capillary, 58.5 cm full length, 20 cm effective length, 75 µm ID, 375 µm OD, hydrodynamic injection at 50 mbar, 10 s, 15 kV constant voltage, 30 °C; detection by UV absorbance at 214 nm. Peak identification: (1) PPA; (2) CAF; (3) PARA; (4) CPM; (5) DPH; (6) DEX; (7) TPL; (8) LOR; (9) ASA.

ASA, respectively. Further increases in the amount of ACN decreased the separation efficiency causing the peaks of DEX and DPH (at 28% v/v) and PPA and CAF (at 30% v/v) to overlap. Addition of extremely high amounts of ACN (> 26% v/v) had marked effects on the separation since it reduced the partitioning of the analytes into micelles (i.e. solute micelle interaction) and increased the migration window. Micelle formation was slowed due to the solvophobic interaction with individual surfactant molecules. Consequently, the separation efficiency was decreased when 28 and 30% v/v ACN was added into the buffer containing SDS as the surfactant.

3.1.2. Effects of buffer concentrations and pH

The buffer concentration or ionic strength greatly affects the EOF and the current generated in the capillary tubes. Fig. 3 shows that increasing of the buffer concentration to 20–30 mM only lengthened the migration time without enhancement of the separation. At these concentrations, the nine compounds were separated into seven peaks with the migration order of PPA, CAF, PARA, CPM, DPH, DEX and TPL, respectively, whereas LOR and ASA could not be detected in 60 min. When the buffer concentration was lowered to 5 and 10 mM, all compounds were eluted in the same order with the total t_m of 22.8 and 25.5 min. At 5 mM, PPA and CAF were not completely

separated, whereas at 10 mM the R_s of both drugs was 7.2. Thus, the 10 mM buffer was carried out for further studies.

The buffer pH influences the selectivity, separation efficiency and migration order in CE, especially for closely related compounds. Generally, decreasing the pH reduces the EOF, while increasing of pH enhance the EOF. At pH 7.0, the separation of the cold remedy ingredients could not be achieved and they were detected as one peak which co-eluted with the EOF at 13.9 min. Lowering the pH to 4.0 did not improved the separation but caused overlapping peaks. The total t_m was 19.1 min with the migration order of the overlapped PPA/CAF, PARA, LOR/ASA, DEX, TPL, and DPH. The compounds were eluted into nine and eight peaks with the total t_m of 25.5 and 34.1 min at pH 9.0 and 10.0, respectively. The migration order at both pH's was similar, which was PPA, CAF, PARA, CPM, DPH, DEX, TPL, LOR and ASA, respectively. However, PPA and CAF co-eluted at pH 10.0. ASA was not incorporated into the micelles and was eluted last since it was highly ionized in the basic pH buffer giving it a negative charge resulting in an attraction towards the anode.

3.1.3. Effect of temperature and voltage

High temperature affects the viscosity of the buffer resulting in the increase of the EOF and the observed electrophoretic mobility and the decrease of the migration time. Use of high voltage enhances the EOF and the electrophoretic velocity giving a short analysis time. Thus, high separation efficiency was obtained since diffusion, which causes band broadening, is minimized. However, high voltages can induce a high current and Joule heating, which may cause instability of analytes and lower migration time reproducibility. In this study, both temperature and voltage did not alter the selectivity or migration order of the separation. All analytes were completely separated at 25, 30 and 35 °C with the resolution (calculated from DPH and DEX peaks) of 4.8, 3.0 and 1.9 and the total t_m of 34.7, 25.5, 27.6 min, respectively. The temperature at 30 °C was selected as a compromise for the resolution and analysis time. When applying the voltage of 10, 15, 20 and 25 kV, the

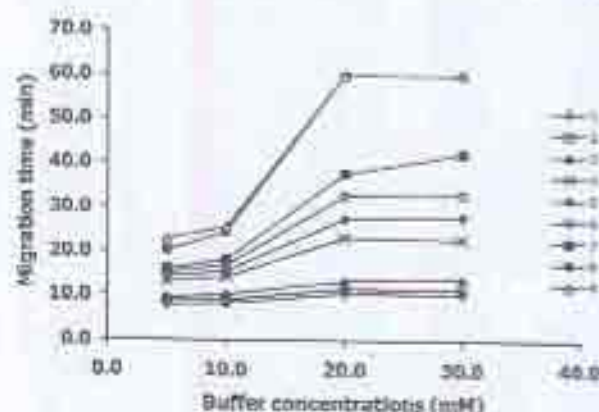


Fig. 3. Plot of migration time vs. buffer concentrations. Conditions: various concentration of sodium dihydrogenphosphate–sodium tetraborate buffer (at a ratio of 1:1) containing 50 mM SDS and 20% v/v ACN, pH 5.0. Other conditions are as Fig. 2.

resolution obtained was 3.6, 3.0, 2.6 and 1.9, respectively. At 10 kV, the total migration time was lengthening to more than 60 min and the peaks of CPM, DPH, DEX, TPL and LOR were broadening. At 20 and 25 kV, the total migration time was 20.1 and 15.3 min, respectively, however, DPH and DEX, were not completely separated. Thus, the optimum condition for all compounds was at 15 kV, which provided the reasonable migration time (25.5 min) and an acceptable resolution ($R_s = 3.0$).

3.2. Method validation

Under the optimized MEKC conditions (Fig. 4), the content of PARA and CPM in sample can be quantified. Calibration curves parameters and statistics for PARA and CPM are in Table 1. Results were calculated using peak area since it provided the best correlation with the smallest %R.S.D.s. Calibration curves for both ingredients were linear using linear regression in the range of 10–250 $\mu\text{g/ml}$, with correlation coefficients > 0.999 for all curves. Injection precision determined by ten replicate injections of the standard solutions at 250 $\mu\text{g/ml}$, showed the %R.S.D.s calculated from peak area of 1.7 and 2.4% for PARA and CPM, respectively. Intra-day precision from six replicate injections of the standard solutions at 10,

Table 1

Calibration curve parameters and statistics of PARA and CPM

Curve	Slope	y-Intercept	Correlation coefficient (r^2)
PARA			
1	4.284	18.590	0.9989
2	4.303	18.502	0.9995
3	4.300	16.483	0.9993
Mean ($n = 3$)	4.296	18.122	0.9993
%R.S.D.	0.2	1.6	
CPM			
1	8.022	10.632	0.9993
2	8.395	12.752	0.9995
3	8.003	16.418	0.9997
Mean ($n = 3$)	8.106	13.234	0.9995
%R.S.D.	0.2	1.2	

50, 100 and 250 $\mu\text{g/ml}$ was within 3.3% for the migration time and 2.5% for peak area (Table 2). The %R.S.D.s of inter-day variability, determined on 6 different days at one point of the calibration curve (100 $\mu\text{g/ml}$, $n = 3$) were within 2 and 3% for the migration time and peak area, respectively. The %R.S.D.s are acceptable in CE analysis, although they are slightly higher than those obtained from HPLC technique. Recoveries, determined by standard addition method, showed good accuracy of the method (Table 3). The mean recovery was 100.6% and the mean %R.S.D. was 2.0% assuming the label amount of 500 mg per

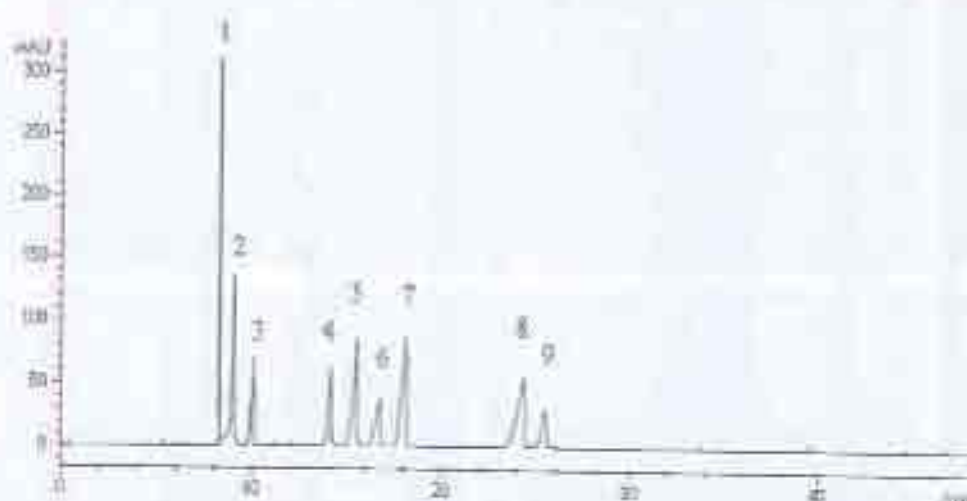


Fig. 4. A typical electropherogram of the standard mixture solution (100 $\mu\text{g/ml}$). Conditions: 10 mM sodium dihydrogenphosphate-sodium tetraborate buffer containing 50 mM SDS and 30% v/v ACN, pH 9.0. Other conditions are as Fig. 2.

Table 2
Intra-day precision of PARA and CPM ($n = 6$)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	%R.S.D. (PARA)		%R.S.D. (CPM)	
	t_R	Peak area	t_R	Peak area
10	4.3	2.1	3.0	1.8
50	0.4	2.1	1.4	2.2
100	0.7	1.8	0.6	2.5
250	2.3	0.8	1.3	1.2

tablet for PARA. The mean recovery was 99.5% and the mean %R.S.D. was 2.1% assuming the label amount of 2.5 mg per tablet for CPM. The LOD based on the $S/N = 3$ were 0.4 and 0.5 $\mu\text{g/ml}$, and the LOQ based on the $S/N = 10$ were 2 and 4 $\mu\text{g/ml}$, with the %R.S.D. of 3.1 and 2.4%, for PARA and CPM, respectively.

3.3. Determination of paracetamol and chlorpheniramine maleate in cold tablets

Data from assay of PARA and CPM in five different brands of cold tablets is shown in Table 4. Brand A, B and C contained 500 mg PARA and 2.5 mg CPM per tablet, brand D contained only 500 mg PARA and brand E contained only 4 mg CPM per tablet. A typical electropherogram of MEKC separation from brand A is shown in Fig. 5. All samples could be directly analyzed without sample pre-treatment. Other ingredients in the tablets did not interfere with the analysis (data not shown). The percent label amount of PARA was within 101.0–105.8% and of CPM was within 65.0–100.2%. The PARA content in brands A–D and the CPM content in brands C and E complied

Table 4
Assay of PARA and CPM in cold tablets

Brand	Active ingredients	% label amount found (%R.S.D.)	
		PARA	CPM
A	500 mg PARA + 2.5 mg CPM	103.8 (1.2)	65.0 (2.3)
B	500 mg PARA + 2.5 mg CPM	101.0 (0.8)	83.0 (0.5)
C	500 mg PARA + 2.5 mg CPM	104.7 (0.6)	92.3 (0.8)
D	500 mg PARA	102.8 (0.5)	—
E	4 mg CPM	—	100.2 (0.2)

with the United States Pharmacopocia 25 limit (90.0–110.0%), whereas the CPM content in brand A and B was out of the limit. These two brands were generic drugs from local manufacturers and the stability of CPM in the tablets decreased during improper storage.

4. Conclusions

The current study demonstrated the systematic procedure of MEKC method development for

Table 3
Accuracy and recoveries of PARA and CPM ($n = 3$)

Amount added (as % of theoretical)	PARA		CPM	
	%Recovery	%R.S.D.	%Recovery	%R.S.D.
50	101.7	2.4	99.9	1.6
80	101.8	1.8	97.7	1.8
100	103.5	1.4	98.4	1.6
120	99.2	2.7	99.8	2.7
150	100.4	2.8	101.5	3.0



Fig. 3. A representative electropherogram of PARA and CPM in brand A. Other conditions are as Fig. 4.

separation of the commonly used cold remedy ingredients (e.g. PARA, CPM, DPH, DFX, PPA, TPL, CAF, LOR and ASA). The simple buffer system containing 10 mM sodium dihydrogenphosphate–sodium tetraborate 50 mM SDS and 26% v/v ACN, pH 9.0, using temperature at 30 °C and a constant voltage of 15 kV was optimized. Baseline separation of all compounds with the R_s of 3.0 was achieved within 25.5 min. Method assessment for determination of PARA and CPM in tablets shows good linearity, precision and accuracy. The detection and quantitation limits for both drugs were in the range of 0.5–4 µg/ml, respectively. The analysis was achieved in 13 min, which allowed the analysis of five samples per h. Comparing to HPLC, the developed MEKC technique was less expensive, simple, rapid, did not require sample-pre-treatment and generated minimal organic waste. The method can be easily transferred to other laboratories and can be used as an alternative for analysis of cold medicine ingredients in pharmaceutical products.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Thailand Research Fund (TRF) for the financial support (Grant no. PDF-44 Leena Sontornai) and the Faculty of Pharmacy, Mahidol University for providing all facilities.

References

- [1] L.Q. Zhang, X. Tong, X.L. An, *Lüna Janyin Huoxue* *Frocs* 37 (2001) 244–246.
- [2] I.T. Abdou, T.Z. Liu, *Anal. Chim. Acta* 443 (2001) 165–169.
- [3] A.F. Shokry, N.T. Abdel-Ghani, Y.M. Issa, O.A. Wahdan, *Anal. Lett.* 44 (2001) 1689–1701.
- [4] N. Erik, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 1023–1031.
- [5] W.B. Zhou, H.K. Li, G.Z. Zhao, Y.M. Kong, *Food Biotech* 28 (2000) 383.
- [6] Y.N. Ni, C. Lin, S. Kokot, *Anal. Chim. Acta* 419 (2000) 185–196.
- [7] M.L. Abu, N. Erik, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2001) 85–92.
- [8] K.A. Georga, V.F. Samandou, I.N. Papadogiannis, *J. Chromatogr. B* 739 (2001) 209–218.
- [9] G.V. Karamida, B. Ravon, I.C. Bhatt, *Indian Drugs* 38 (2001) 203–207.
- [10] S. Yamato, M. Nakajima, N. Kawakami, K. Shimada, E. Tachikawa, H. Zenda, *Chem. Pharm. Bull.* 48 (2000) 1258–1267.
- [11] E. Fidal, M. Sykora, G. Röschke, H.W. Jochke, K. Siska, I. Kersch, *J. Fresenius Anal. Chem.* 367 (2000) 298–299.
- [12] R. Rapenne, M. Muhlend, J. Kalman, *J. Chromatogr. A* 870 (2000) 45–51.
- [13] A.V. Eckhaus, M.R. Desai, Y. Michotte, *J. Chromatogr. A* 956 (2002) 291–297.
- [14] S. Zhang, X. Zhang, J. Szwedler, W. Thormann, *J. Chromatogr. B* 752 (2001) 17–31.
- [15] Y. Mreiss, R.H. Neubert, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 637–645.
- [16] W. Abou, E. Scherwenk, W. Buchberger, *J. Chromatogr. A* 916 (2001) 69–73.
- [17] L. Zhang, Q. Hu, G. Chen, Y. Fang, *Anal. Chim. Acta* 428 (2000) 257–262.
- [18] S. Horvath, G. Röschke, *J. Chromatogr. B* 721 (1999) 93–108.

- [19] S. Heitmanier, G. Blaschke, *J. Chromatogr. B* 721 (1999) 109–123.
- [20] E.P. Lai, F. Tobek-Zlotarynska, *Electrophoresis* 20 (1999) 2366–2372.
- [21] Y.R. Ku, Y.S. Chang, K.C. Wen, L.K. Ho, *J. Chromatogr. A* 848 (1999) 537–543.
- [22] H.T. Krummen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1998) 827–838.
- [23] L. Samojlik, *Electrophoresis* 22 (2001) 139–143.

Method Development for Separation of Active Ingredients in Cold Medicines by Micellar Electrokinetic Chromatography

Leena Suntornsuk¹, Ongart Pipitharome¹, Prepin Wilaivat²

¹Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy,
Mahidol University, 447 Sri-Ayudhaya Rd., Rajathevee, Bangkok 10400 Thailand

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University,
Rama VI Rd., Rajathevee, Bangkok 10400 Thailand

Abstract

Separation of nine commonly used active ingredients in cold medicines, were demonstrated by micellar electrokinetic chromatography. The ingredients included paracetamol, chlorpheniramine maleate, diphenhydramine hydrochloride, trimidine hydrochloride, phenylpropanolamine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide, loratadine, ephedrine and caffeine. Effects of buffer concentrations, pH, organic modifiers and capillary length were investigated. The optimum conditions were achieved in 10 mM sodium dihydrogenphosphate-sodium tetraborate buffer, pH 9.0, containing 50 mM sodium dodecyl sulfate and 28% v/v acetonitrile using the effective length of 50 cm, the separating voltage of +15 kV and the capillary temperature of 30°C. Separation of all peaks was obtained within 28.4 min with a resolution of 1.2.

Keywords

cold medicine ingredients, micellar electrokinetic chromatography (MEKC)

Introduction

Paracetamol, chlorpheniramine maleate, diphenhydramine hydrochloride, triprolidine hydrochloride, phenylpropanolamine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide, loratadine, aspirin and caffeine (Fig. 1.) are commonly used active ingredients in cold medicines. Examples of the pharmaceutical formulations of these drugs were shown in Table 1. Phenylpropanolamine was not included in the table since the Thai Food and Drug Administration recently recommended the removal of phenylpropanolamine from all products due to the risk of hemorrhagic stroke associated with its use [1]. The active ingredients in cold medicine show similar physical and chemical properties, which make their separation and determination difficult. Quantitation of these compounds is extensively performed by ultra-violet (UV-Vis) spectroscopy [2-4] and reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) [5-12]. UV-Vis spectroscopy usually requires sample pre-treatment or extraction prior analyses, which could be laborious and time consuming. Basic nitrogenous compounds usually strongly interact with the stationary phase of RP-HPLC resulting in peak asymmetry and low separation efficiency. Additionally, RP-HPLC can be expensive due to the high organic solvent consumption. Capillary electrophoresis (CE) is now a well-established method for pharmaceutical analysis [13,14] and has been applied for determination of active ingredients in cold medicines [15-21]. Phenylpropanolamine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide, chlorpheniramine maleate and paracetamol were successfully separated within 11.4 min with a resolution of 1.2 by micellar electrokinetic chromatography (MEKC) using sodium dodecyl sulfate (SDS) as a surfactant [15]. CE with electrospray mass spectrometry (MS) was utilized for determination of paracetamol residue in river water samples [16]. Determination of caffeine and its metabolites, theobromine, paraxanthin, theophylline and 1,3,7-trimethylxanthic acid was achieved by MEKC using SDS as a surfactant [17]. The separation was achieved in 120 s with detection limits of less than 1 µg/mL.

Paracetamol and its metabolites in urine and plasma were directly determined by CE with UV and MS detection [18]. Analysis of caffeine, aspartame and benzoic acid in soft drinks and artificial sweetening powders were compared by capillary zone electrophoresis (CZE) and HPLC [19]. Results showed that CZE provided 85-110 times higher separation efficiency than that of HPLC, whereas HPLC was 10-20 times higher sensitive than CZE. Paracetamol, pseudoephedrine hydrochloride and dextromethorphan were baseline separated in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, within 5 min using an UV detector at 200 nm [20]. Phenylpropanolamine hydrochloride as well as other anorexics were simultaneously analyzed by CE using acetonitrile containing phosphate buffer [21]. It is evident that CE is a powerful tool in drug analysis since it provides high efficiency, reliability and low cost.

Table 1 Examples of the pharmaceutical formulations of the investigated compounds

Name	Formulation
Tylenol, Paradol tablets	Paracetamol 500 mg
Coldosain tablets	Paracetamol 500 mg
	Chlorpheniramine maleate 2 mg
Piriton tablet	Caffeine anhydrous 30 mg
Tify, Decolgen tablets	Chlorpheniramine maleate 4 mg
	Paracetamol 500 mg
Benedryl capsule	Chlorpheniramine maleate 2 mg
Bayer aspirin tablet	Diphenhydramine HCl 25 mg
Aspent enteric-coated tablet	Aspirin 500 mg
Actifed tablet	Aspirin 300 mg
	Triprolidine HCl 2.5 mg
Clarityne tablet	Pseudoephedrine HCl 60 mg
Actifed DM cough linctus	Loratadine 10 mg
	Triprolidine HCl 1.25 mg
	Pseudoephedrine HCl 30 mg
	Dextromethorphan HBr 10 mg

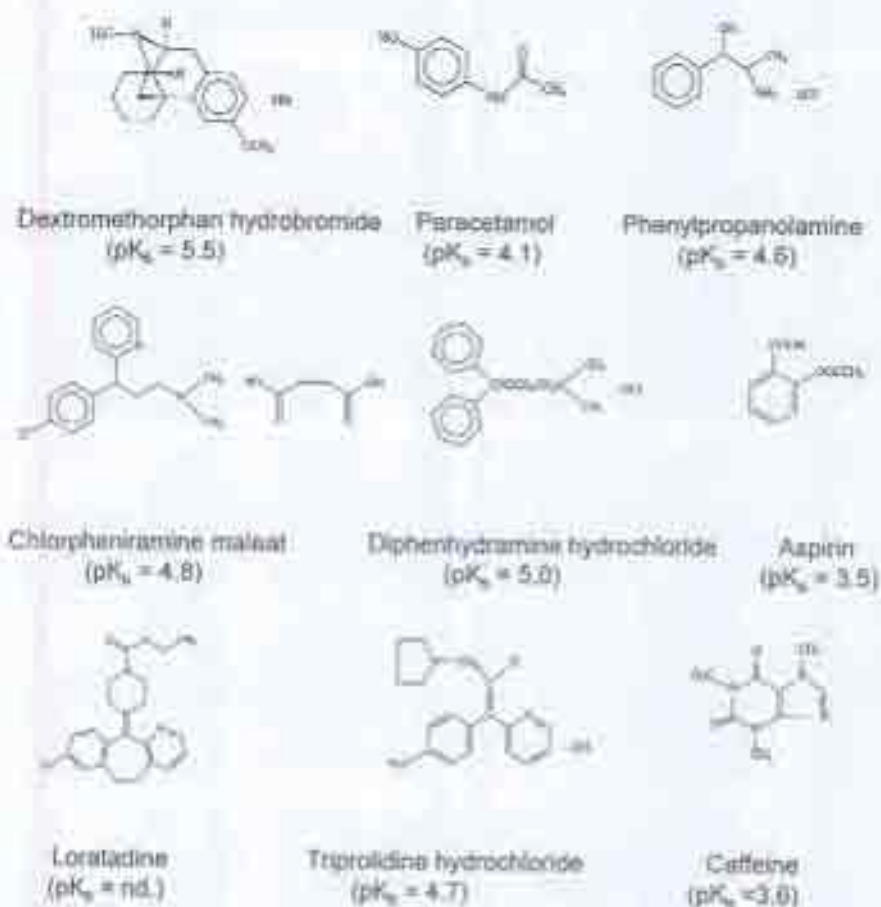


Fig. 1. Structures of active ingredients in cold medicines (nd. = not determined)

The aim of this work was to demonstrate the method development procedure for separation of nine commonly used active ingredients in cold medicines. This was the first study that reports the simultaneous separation of these compounds by MEKC. Factors affecting the separation, including buffer concentrations and pH,

types and percentages of organic modifiers and capillary length, were systematically examined.

Experimental

Instruments

The CE system was a Beckman Capillary Electrophoresis System Model P/ACE 2000 instrument equipped with a positive power supply and a fixed wavelength detector controlled by PC through Beckman System Gold software. The separations were performed on an eCAP™ capillary tubing (lot no. 8601595, reorder no. 338473, Beckman Instrument, U.S.A.), thermostated at 30 °C. The original dimension of the tube was 5 m in length, inner diameter of 75 µm, and outer diameter of 375 µm. The tube was cut to the desired length.

Separations were carried out at a constant voltage of +15 kV or +25 kV. UV detection was performed at 254 nm. Sample injections were achieved using the pressure mode for 10 second. For a new capillary tube, the tube was first pre-conditioned by rinsing with 0.1 N sodium hydroxide for 20 min, followed by deionized water for 10 min. For routine use, the tube was washed with 0.1 N sodium hydroxide for 2 min, followed by deionized water for 2 min, and then equilibrated with the buffer for 5 min. As electrolysis can alter the composition of the buffer and subsequently change the electro-osmotic flow (EOF), the buffer solution was replaced at regular intervals to maintain high reproducibility. Prior to each sequence, voltage had to be controlled by increasing from +10 kV to +15 kV in 5 minutes.

Materials

Paracetamol, chlorpheniramine maleate, diphenhydramine hydrochloride, imipridine hydrochloride, phenylpropanolamine hydrochloride and sodium tetraborate were from Aldrich (Milwaukee, WI, USA) and dextromethorphan hydrobromide, loratadine, aspirin, caffeine sodium dodecyl sulfate, and sodium

dihydrogenphosphate were from Sigma (St. Louis, MO, USA). Methanol, ethanol, acetonitrile were HPLC grade, all other reagents were of analytical reagent grade and water was deionized distilled water.

Standard preparation

Stock standard and working standard solutions were prepared in deionized water at a concentration of 1 and 0.1 mg/mL, respectively. Except for loratadine, methanol was used as a solvent. All solutions were filtered through a 0.45 μ membrane prior injection.

Optimization procedure

Separation of the working standard solutions was performed on different capillary length (43–65 cm, effective length) using a constant voltage of +15 or +25 kV and an capillary temperature at 30°C. Different concentrations (10–40 mM) and pH (7.0–10.0) of sodium dihydrogenphosphate-sodium tetraborate at a ratio of 1:1 were optimized. The pH buffers was adjusted by adding 1 N HCl or 1 N NaOH. Effects of types (e.g. MeOH, EtOH, *i*-PrOH, ACN) and percentages of organic modifier (5–30% v/v) were also investigated. The optimum condition was determined by the resolution value (R_s) of the two closest peaks calculated from: $R_s = 2(t_2 - t_1)/w_1 + w_2$, where t and w were migration time and baseline peak width, respectively.

Results and Discussion

Effects of buffer concentrations and pH

The preliminary condition for the separation of the investigated compounds was modified from our previous study [14]. The condition was 10 mM phosphate-borate buffer, pH 9.0, containing 50 mM SDS and 5% v/v MeOH using an effective capillary length of 45 cm with an inner diameter of 75 μ , and a constant voltage of +25 kV. Under this condition, the nine compounds were separated into three groups of overlapped peaks with a total migration time of 11.0 min. Changing of the

buffer concentration from 10 mM to 20, 30 and 40 mM resulted in decreasing of the separation efficiency and increasing of the total migration time (Fig. not shown). The increase of the migration time at higher buffer concentrations was due to the reduced EOF and the decrease of the observed electrophoretic mobility. Additionally, when the buffer concentration of 20-40 mM was employed, the high current ($>100 \mu\text{A}$) was obtained causing a lot of spiking peaks. We reasoned that this was due to an increase of the Joule's heating at high concentration buffers. Thus, the phosphate-borate buffer concentration was maintained at 10 mM and further modification was investigated by varying the buffer pH. Fig. 2 illustrated the influence of pH on separation of the investigated compounds. The nine compounds were separated into four groups of peaks at pH 7.0, 8.0, 9.0 with the total migration time of 52.8, 32.9 and 11.6 min, respectively. The ionization of the investigated compounds was minimized at or around neutral pH (7.0 and 8.0), therefore these pH was excluded from the study. The separation at pH 10.0 was slightly improved with the total migration time of 28.6 min. However, at this high pH (10.0), the analytes quickly degraded causing the instability of the standard solution. Further experiments were performed at pH 9.0, but different organic modifiers were included in order to improve the separation efficiency of the analytes.

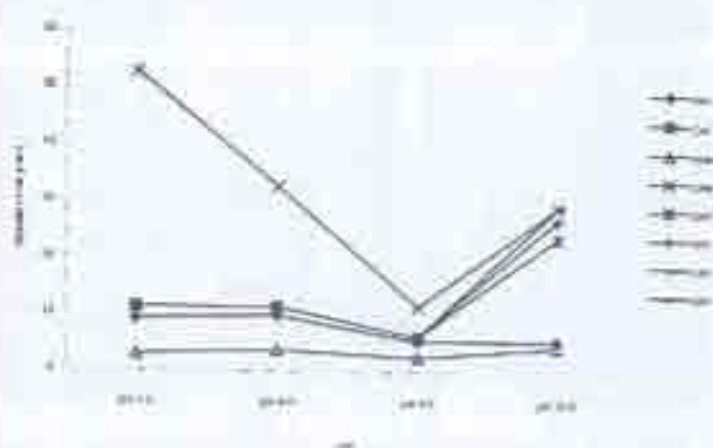


Fig. 2. Influence of pH on the separation of the investigated compounds. Condition: 10 mM sodium dihydrogenphosphate-sodium tetraborate containing 50 mM SDS, applied voltage: 25 kV, temperature: 30 °C, capillary: 45 cm (effective length) $\times$ 75 μ (i.d). PPA = Phenylpropanolamine, CAF = Caffeine, PARA = Paracetamol, CPM = Chlorpheniramine maleate, DHO = Diphenhydramine, DEX = Dextromethorphan, TPD = Triprolidine, LOR = Loratadine, ASP = Aspirin.

Effects of types and percentages of organic modifiers

In MEKC, selectivity is greatly affected by types and concentrations of organic modifiers. Separation obtained from buffer in the presence (5% v/v MeOH, EtOH, *i*-PrOH and ACN) and absence of organic modifiers were compared. In all cases, buffer containing organic modifiers provided the better results with the total migration time of 10.3 (without organic modifier), 11.0 (MeOH), 12.3 (EtOH), 12.6 (*i*-PrOH) and 28.5 (ACN), min. This is not unexpected since organic modifiers can manipulate the hydrophobicity, hydrogen bonding and charge interaction of solutes [14,16]. Small amount of organic modifiers increases the migration window and resolutions of the separation due to the increase of the micellar electrophoretic mobility. Lengthening of the alcohol chain from MeOH to *i*-PrOH did not greatly improve the separation, but increased the migration time. The employment of

MeOH at higher levels (10–40% v/v) still did not give satisfying results, but the lengthening of the migration time from 11.0 to 14.7 min was obtained. Results indicated that a different organic modifier was necessary and acetonitrile (ACN) was chosen as the alternative. Interestingly, varying amount of ACN significantly improved the separation of the analytes (Fig. 3). The separation was greatly enhanced when 25–30% v/v of ACN was added into the buffer. Keeping other factors constant (10 mM phosphat-borate buffer, pH 9.0, 30 °C), the combination of 28% v/v ACN as the organic modifier and the reduced separating voltage (+15 kV) provided separation of the analytes within 28.4 min. We reasoned that ACN has lower polarity than MeOH and has a stronger effect in the enlargement of the migration window resulting in the improvement of the separation. Additionally, ACN greatly reduced the EOF and the electrophoretic mobility of the micelles and analytes providing more partitioning between the analytes and the micelles. However, when excess organic modifier (30% v/v of ACN) was added into the buffer, the micelle formation decreased causing the overlapped peaks and lower separation efficiency.

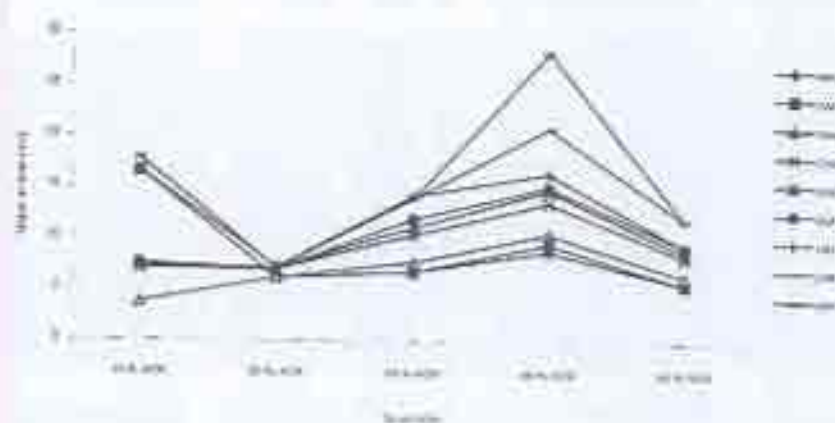


Fig. 3. Influence of percentages of acetonitrile on the separation of the investigated compounds. Condition: 10 mM sodium dihydrogenphosphate-sodium tetraborate (pH 9.0) containing 50 mM SDS and various amount of ACN, applied voltage: 15 kV, temperature: 30 °C, capillary: 50 cm (effective length) $\times$ 75 μ (I.D). Numbers are the same as Fig. 2.

Effects of capillary length

Capillary dimension, particularly the effective length, can improve or worsen the separation efficiency. In this study, various effective length ranging from 43–65 cm was investigated. As the length increased, the migration time and separation efficiency increased (Fig. 4). However, diphenhydramine and dextromethorphan overlapped at the length of 43 and 65 cm. Additionally, phenylpropanolamine hydrochloride and caffeine were not completely separated at 43 cm. The optimum separation of all compounds was obtained in a reasonable migration time (26.4 min) at the length of 50 cm with the resolution of 1.2 calculated from the two closest peaks, diphenhydramine and dextromethorphan.

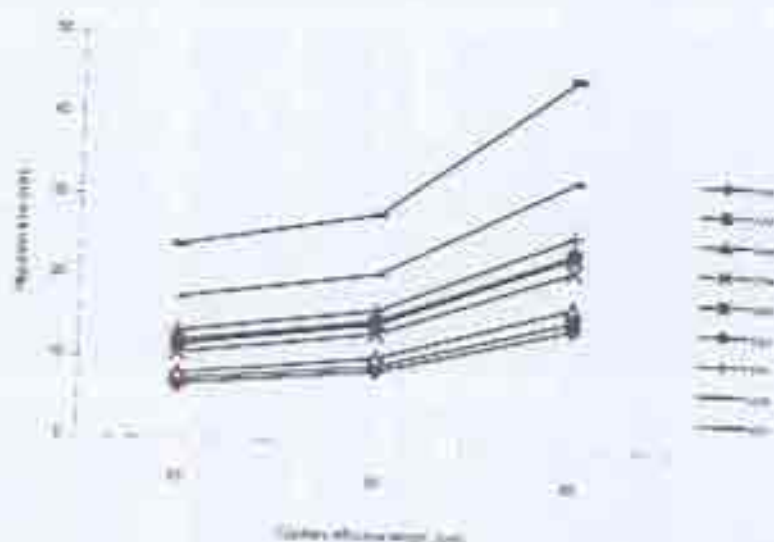


Fig. 4. Influence of capillary length on the separation of the investigated compounds. Condition: 10 mM sodium dihydrogenphosphate-sodium tetraborate (pH 9.0) containing 50 mM SDS and 25% v/v ACN, applied voltage: 15 kV, temperature: 30 °C, capillary: various effective length $\times$ 75 μ (I.D). Numbers are the same as Fig. 2.

Conclusion

Our results suggest that the commonly used active ingredients in cold medicines including paracetamol, chlorpheniramine maleate, diphenhydramine hydrochloride, triprolidine hydrochloride, phenylpropanolamine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide, loritidine, aspirin and caffeine, could be successfully separated by MEKC. Main factors affecting the separation of these compounds were buffer concentrations and pH and organic modifiers, whereas, capillary lengths help enhancing the separation efficiency. The optimum conditions were a 10 mM sodium dihydrogenphosphate-sodium tetraborate buffer, pH 9.0 containing 50 mM SDS and 25% v/v ACN using a constant voltage of +15 kV,

capillary temperature of 30 °C and a capillary length of 50 cm (effective length). The order of elution was phenylpropanolamine, caffeine, paracetamol, chlorpheniramine maleate, diphenhydramine, dextromethorphan, triprolidine, loratadine and aspirin, respectively. The conditions provided separation of all compounds (Fig. 5) with a reasonable migration time ($t_m = 28.4$ min) and an acceptable resolution ($R_s = 1.2$) calculated from the two closest peaks (diphenhydramine and dextromethorphan). The developed method is currently transferred to our new CE instrument, method validation and applications for determination of active ingredients in cold medicine preparations is under investigation.

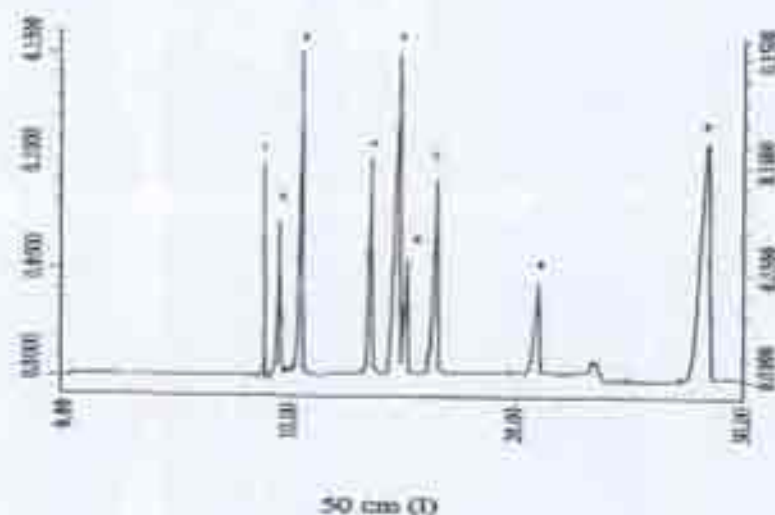


Fig. 5. A typical electropherogram of the investigated compounds under the optimized conditions. 1 = Phenylpropanolamine, 2 = Caffeine, 3 = Paracetamol, 4 = Chlorpheniramine maleate, 5 = Diphenhydramine, 6 = Dextromethorphan, 7 = Triprolidine, 8 = Loratadine, 9 = Aspirin.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Central Instrument Facilities (CIF, Faculty of Science, Mahidol University) for providing the CE instrument and the Thailand Research Fund (TRF) for providing the financial support for this work (grant no. PDF-44 Leena Suntornsuk).

References

- [1] American Medicine Association Editors.
Drug Evaluation Annual 1995.
The United States of America 1995.
- [2] Shahat MF, Abdel Badel MM, Dahulab AA.
Spectrophotometric determination of ephedrine HCl, cinchonine HCl, chlorpheniramine maleate, atropine sulphate and ephedrine HCl by solvent extraction of reneckate complexes.
J Chem Tech & Biotech 1992; 54:175-81.
- [3] Milch G, Szabo E.
Derivative spectrophotometric assay of acetaminophen and spectrofluorimetric determination of its main impurity.
J Pharm Biomed Anal 1991;9:1107-13.
- [4] Issopoulou PB.
A sensitive spectrophotometric determination of acetaminophen.
Acta Pharmaceutica Hungarica 1992;82:31-8.
- [5] Altun ML, Erik N.
The rapid quantitative analysis of phenprobamate and acetaminophen by RP-LC and compensation technique.
J Pharma Biomed Anal 2001; 25: 85-92.
- [6] Georgia KA, Samanidou VF, Papadogiannis IN.
Use of novel solid-phase extraction sorbent materials for high-performance liquid chromatography quantitation of caffeine metabolism products methylxanthines and methyluric acids in samples of biological origin.
J Chromatogr B 2001;759: 209-18.

- 7) Yamato S, Nakajima M, Kawakami N, Shimada K, Tachikawa E, Ohta S, Zenda H.
Evidence for the degradation of maleate moiety in chlorpheniramine maleate solution using a stability-indicating HPLC method.
Chem Pharm Bull 2000;48:1205-7.
- 8) Rauha JP, Salonen H, Alto M.
Simultaneous determination of bromhexine hydrochloride and methyl and propyl p-hydroxybenzoate and determination of dextromethorphan hydrobromide in cough cold syrup by high performance liquid chromatography.
J Pharm Biomed Anal 1996;315:287-93.
- 9) Ragonese R, Mulholland M, Kaiman J.
Full and fractionated experimental designs for robustness testing in the high-performance liquid chromatographic analysis of codeine phosphate, pseudoephedrine hydrochloride and chlorpheniramine maleate in a pharmaceutical preparation.
J Chromatogr A 2000;870:45-51.
- 10) Gasco-Lopez AL, Izquierdo-Hornillos R, Jimenez A.
Development and validation of a high performance liquid chromatography method for the determination of cold relief ingredients in chewing gum.
J Chromatogr A 1997;775:179-85.
- 11) Yamato S, Sakai M, Shimada K.
Quantitative analysis of chlorpheniramine maleate in cough and cold drugs by ion pair high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of chlorpheniramine and maleate.
J Pharm Soc Jap 1996;116:329-34.
- 12) Indrayanto G, Sunato A, Adriani Y.
Simultaneous assay of phenylpropanolamine hydrochloride, caffeine, paracetamol, glycerylguaiacolate and chlorpheniramine maleate in Sibadol tablet using HPLC with diode array detection.
J Pharm Biomed Anal 1995;13:1555-9.
- 13) Nishi H.
Capillary electrophoresis of drugs: Current status in the analysis of pharmaceuticals.
Electrophoresis 1999;20:3237-58.

- [14] Smith NW.
Comparison of aqueous and non-aqueous capillary electrochromatography for the separation of basic solutes.
J Chromatogr A 2000;887:233-43.
- [15] Suntornsuk L.
Separation of cold medicine ingredients by capillary electrophoresis.
Electrophoresis 2001;22:138-43.
- [16] Ahrar W, Scherwenk E, Buchberger W.
Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry.
J Chromatogr A 2001;910:69-78.
- [17] Yeping Z, Lunte CE.
Determination of caffeine and its metabolites by micellar electrokinetic capillary electrophoresis.
J Chromatogr B 1997;24:265-74.
- [18] Heitmeier S, Blaschke G.
Direct determination of paracetamol and its metabolites in urine and serum by capillary electrophoresis with ultraviolet and mass spectrometric detection.
J Chromatogr B 1999;721: 93-108.
- [19] Jimidar M, Hamoir TP, Foniers A, Massart DL.
Comparison of capillary zone electrophoresis with high performance liquid chromatography for the determination of additives in foodstuffs.
J Chromatogr A 1993;636:179-86.
- [20] Zhang L, Hu Q, Chen G, Fang Y.
Simultaneous determination of the active ingredients in composite pseudoephedrine hydrochloride tablets by capillary electrophoresis.
Anal Chim Acta 2000;424:257-62.
- [21] Ku YR, Chang YS, Wen KC, Ho LK.
Analysis and confirmation of synthetic anorexics in adulterated traditional Chinese medicines by high-performance capillary electrophoresis.
J Chromatogr A 1999;846:537-43.

- [22] Landers JP, editor.
Micellar electrokinetic chromatography
in: Handbook of Capillary Electrophoresis
New York: CRC Press, 1997:49-73.

Received November 20th, 2002
Accepted February 6th, 2003

Executive Summary

1. ความสำคัญและ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในตำรับยาแก้หวัด ไข้หวัดใหญ่ ยาแก้ไอ และยาบรรเทาปวด ได้แก่ paracetamol (acetaminophen), chlorpheniramine maleate, phenylpropanolamine hydrochloride, diphenhydramine, triprolidine hydrochloride, dexmethylphenhydramine hydrobromide, caffeine และ loratadine, และ triprolidine hydrochloride ในประเทศไทยมีการผลิตยามีส่วนผสมของสารประกอบเหล่านี้มากกว่า 400 ตำรับ ซึ่งมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องควบคุมคุณภาพยาเหล่านี้ให้มีมาตรฐานเพื่อความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค โดยเฉพาะสาร phenylpropanolamine hydrochloride ซึ่งอยู่ระหว่างการพัฒนาเพื่อถอนออกจากรายการตำรับยา สารออกฤทธิ์เหล่านี้เป็นสารประกอบในโครงสร้างที่มีคุณสมบัติทางเคมีคล้ายคลึงกัน การวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบปริมาณตัวยาสำคัญในตำรับยาผสมจึงมีความจำเป็นแยกแต่ละตัวออกจากกันเพื่อไม่ให้รบกวนวิธีวิเคราะห์ เช่น การสกัดโดยวิธี acid-dye extractions หรือ ion-pair extraction โดยอาศัยการเกิดสีของตัวยากับ acid dye เป็น ion-pair complex ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น การสกัดโดยวิธี liquid-liquid extraction ด้วยเฮกเซน (hexane) และสารผสมของน้ำและอะซิโตนไตรฟลูออไรด์ (acetonitrile) ก่อนการวิเคราะห์ด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) เป็นต้น การสกัดโดยวิธี การเหล่านี้ก่อนจำแนกยาก ให้รบกวน และในบางกรณีไม่สามารถแยกสารทุกชนิดออกจากกันได้ อย่างสมบูรณ์ จึงจำเป็นต้องนำเทคนิคการวิเคราะห์ขั้นสูงมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ดังกล่าวที่ผสมในตำรับยาแต่ละ ๆ ชนิด โดยใช้ HPLC with diode array detection (DAD) ใช้ derivative and differential spectrometry และการใช้ proton magnetic resonance (NMR) spectroscopy นอกจากนี้ยังมีการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์เหล่านี้ในเส้นผม โดยวิธี gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) และในเลือด พลาสมา และปัสสาวะ โดยวิธี column switching combined with ion-pair chromatography เทคนิคเหล่านี้ต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเฉพาะทางในการวิเคราะห์ และเป็นเทคนิคที่มีราคาแพง

วิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ที่ผสมในตำรับยาแก้หวัด ไข้หวัดใหญ่ ยาแก้ไอ และยาบรรเทาปวด บางวิธีไม่สามารถแยกสารประกอบทุกชนิดออกจากกันได้ เกิดการรบกวนจากสารอื่น ๆ ในตำรับยา ทำให้ผลการวิเคราะห์มีความคลาดเคลื่อน และบางวิธีมีขั้นตอนยุ่งยาก ใช้เวลานาน และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการพัฒนาวิธีที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และมีความไวสูงเพื่อใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบเหล่านี้ในตำรับยา เทคนิคการวิเคราะห์โครมาโทกราฟีจึงเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ค่าใช้จ่ายได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารหลายชนิดทั้งสารประกอบยา สารที่เป็นองค์ประกอบในอาหาร และสารประกอบ ผลิตภัณฑ์ยาเสพติด

