บทที่ 1

บทนำ

อนุพันธ์สเปกโทรโฟโตเมตรี (derivative spectrophotometry) เป็นเทคนิคในการแปลงสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (absorption spectrum) ให้เป็นสเปกตรัมอีกลักษณะหนึ่ง เรียกว่า อนุพันธ์สเปกตรัม (derivative spectrum) โดยคำนวณจากค่าการเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงเทียบกับความยาวคลื่นแสง จากสมการสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ดังสมการที่ 1 จะได้สมการอนุพันธ์สเปกตรัม ดังสมการที่ 2 ซึ่งเป็นสมการอนุพันธ์สเปกตรัมอันดับที่ n (Beckett และ Stenlake, 1988; Braun, 1987)

$$A = abc \qquad \text{.....} \qquad (1)$$

$$\frac{d^n A}{d\lambda^n} = \left(\frac{d^n a}{d\lambda^n}\right)bc \qquad \text{.....} \qquad (2)$$

โดยที่ A คือ ค่าการดูดกลืนแสง

a คือ สภาพดูดกลืนแสง $[(\text{โมลาร์})^{-1}(\text{ซม.})^{-1}]$

b คือ ระยะทางที่แสงผ่าน (ซม.)

c คือ ความเข้มข้น $[(\text{โมล})(\text{ลิตร})^{-1}]$

n คือ อันดับของการทำอนุพันธ์

และ λ คือ ความยาวคลื่นแสง (นาโนเมตร)

ลักษณะอนุพันธ์สเปกตรัมที่ได้แสดงดังรูปที่ 1 โดยจะมีพีค (peak) เป็นสองขั้ว คือ มีทั้งค่าที่เป็นบวกและเป็นลบ สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่มีลักษณะสมมาตร เมื่อนำมาแปลงเป็นอนุพันธ์สเปกตรัมอันดับที่หนึ่งและอันดับที่เป็นเลขคี่อื่นๆ กลับให้ลักษณะที่ไม่สมมาตร โดยที่ตำแหน่งที่เป็นจุดยอดบนสเปกตรัมการดูดกลืนแสง จะได้เป็นจุดที่มีแอมพลิจูดเป็นศูนย์บนอนุพันธ์สเปกตรัม และจุดที่มีความชันสูงสุดบนสเปกตรัมการดูดกลืนแสงจะเป็นตำแหน่ง

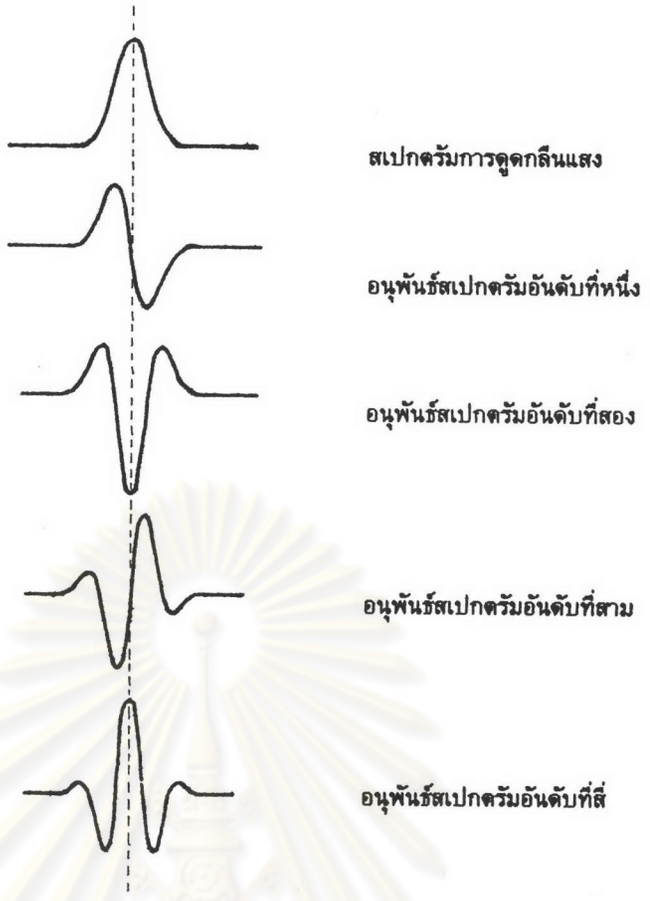
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ยอดของอนุพันธ์สเปกตรัม ส่วนอนุพันธ์สเปกตรัมอันดับที่เป็นเลขคู่ ได้แก่ อันดับที่สองและที่สี่หรือสูงกว่า จะให้ตำแหน่งยอดบนอนุพันธ์สเปกตรัมตรงกับตำแหน่งยอดบนสเปกตรัมการดูดกลืนแสงและยังคงมีลักษณะสมมาตร จุดที่มีความชันสูงสุดบนสเปกตรัมการดูดกลืนแสงเมื่อแปลงเป็นอนุพันธ์สเปกตรัมจะมีแอมพลิจูดเป็นศูนย์

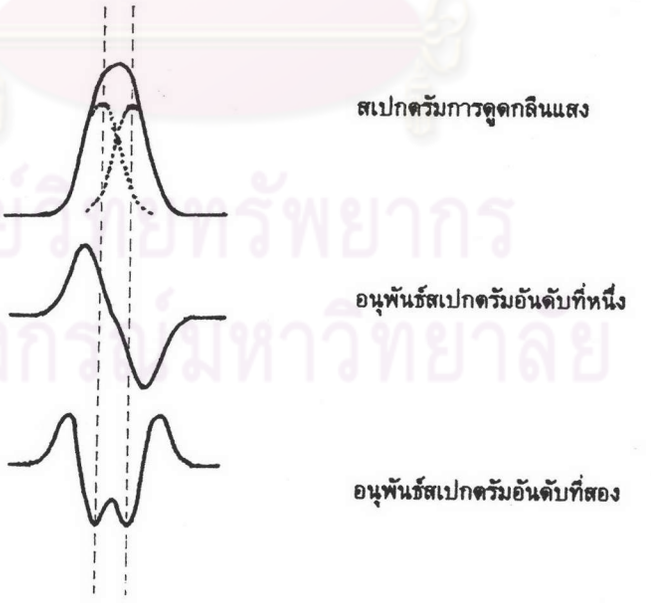
การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยบนสเปกตรัมการดูดกลืนแสง จะสามารถทำให้เห็นเด่นชัดบนอนุพันธ์สเปกตรัม โดยมีพีคเล็กๆ แยกออกมา และจำนวนพีคจะเพิ่มขึ้นตามอันดับของการทำอนุพันธ์ จึงสามารถใช้อนุพันธ์สเปกตรัมในการตรวจสอบและบ่งชี้พีคซึ่งถูกซ่อนไว้บนสเปกตรัมการดูดกลืนแสงได้ ดังแสดงในรูปที่ 2 อันดับของอนุพันธ์ที่สูงขึ้นจะยิ่งมีพีคแคบลงและซับซ้อนมากขึ้น (Butler และ Hopkins, 1970) จากการเปรียบเทียบพีคของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่มีความสูงเท่ากันแต่มีความกว้างต่างกัน พบว่าหลังการทำอนุพันธ์พีคที่มีความกว้างมากกว่ากลับให้แอมพลิจูดต่ำกว่า ลักษณะนี้จะนำไปสู่การกำจัดสเปกตรัมรบกวนที่มีแถบการดูดกลืนแสงกว้างได้อย่างจำเพาะเจาะจง ทั้งยังเพิ่มความไวของการวิเคราะห์ได้อีกด้วย

O'Haver และ Green, 1976 กล่าวถึงวิธีที่ใช้วัดแอมพลิจูดของอนุพันธ์สเปกตรัมสำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารผสมสองชนิดที่มีสเปกตรัมการดูดกลืนแสงซ้อนทับหรือเหลื่อมซ้อนกันอยู่ โดยการวัดแอมพลิจูดตรงตำแหน่งที่สเปกตรัมของสารรบกวนหรือตัวยาร่วมตัดแกนของความยาวคลื่นและที่ตำแหน่งศูนย์พอดี ทำให้ค่าที่แอมพลิจูดที่ได้เป็นของเฉพาะสารที่ต้องการวิเคราะห์เท่านั้น เรียกวิธีนี้ว่า การวัดตรงตำแหน่งตัดที่ศูนย์ (zero-crossing measures) ซึ่งสามารถตัดปัญหาเรื่องความผิดพลาดของระบบจากการรบกวนของอีกสารหนึ่งและยังเป็นค่าแอมพลิจูดของอนุพันธ์ที่แท้จริงอีกด้วย (Traveset และคณะ, 1980) การวัดแอมพลิจูดด้วยวิธีต่างๆ แสดงดังรูปที่ 3

การทำอนุพันธ์สเปกตรัมมี 2 วิธีใหญ่ๆ ได้แก่ วิธีเชิงทัศนศาสตร์ (optical method) ซึ่งใช้เทคนิคในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นแสงในช่วงแคบๆ อย่างรวดเร็ว (wavelength modulation technique) โดยใช้อุปกรณ์พิเศษ ได้แก่ ช่องเล็กยาวที่แกว่งกวัด (oscillating slit), เกรตติงหรือกระจกเงา ทำให้ได้อนุพันธ์สเปกตรัมออกมาทันทีที่สแกนสารตัวอย่าง (Bonfiglioli และ Brovetto, 1964; O'Haver, 1979) แต่เนื่องจากเป็นวิธีที่ต้องใช้อุปกรณ์ค่อนข้างซับซ้อน และมีสัญญาณรบกวนเกิดขึ้นสูงจึงไม่เป็นที่นิยมนัก (Fell, 1980) อีกวิธีหนึ่งซึ่งสามารถทำอนุพันธ์สเปกตรัมได้เป็นอย่างดี

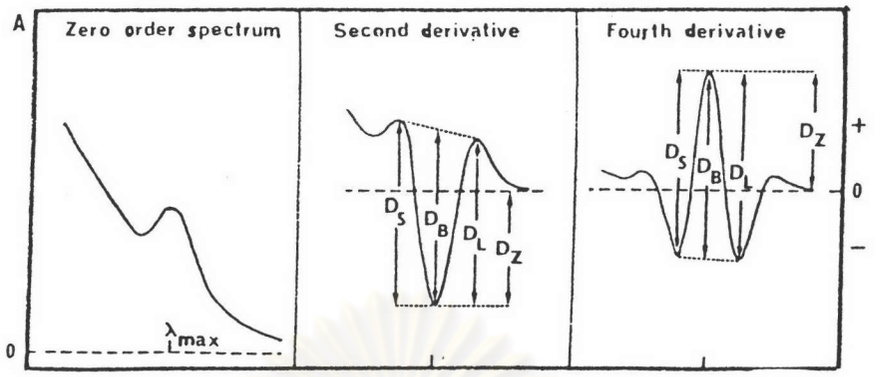


รูปที่ 1. อนุพันธ์สเปกตรัมอันดับที่หนึ่งถึงสี่ ที่เปลี่ยนไปจากสเปกตรัมการดูดกลืนแสง



รูปที่ 2. อนุพันธ์สเปกตรัมอันดับที่หนึ่งและสองของสารผสม ที่สามารถแยกพีคซึ่ง สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของแต่ละสารเหลื่อมซ้อนกันและเห็นเพียงพีคเดียวได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



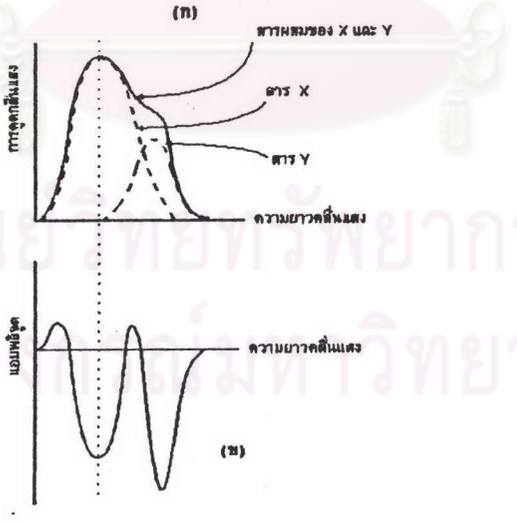
D_S คือ แอมพลิจูดของพีคบริวารที่ความยาวคลื่นสั้น (short-wavelength satellite)

D_L คือ แอมพลิจูดของพีคบริวารที่ความยาวคลื่นยาว (long-wavelength satellite)

D_B คือ แอมพลิจูดที่จุดกลาง (mid-point amplitude)

D_Z คือ ค่าอนุพันธ์ที่วัดจากเส้นศูนย์ (derivative zero)

รูปที่ 3 ก. การวัดแอมพลิจูดของอนุพันธ์สเปกตรัมด้วยวิธีต่าง ๆ



รูปที่ 3 ข. การวัดแอมพลิจูดของอนุพันธ์สเปกตรัมอันดับที่สองของยาผสม โดยวิธีวัดตรงตำแหน่งตัดที่ศูนย์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้แก่ วิธีทางอิเล็กทรอนิกหรือวิธีเชิงตัวเลข (digital methodl) โดยจะมีการสร้างอนุพันธ์สเปกตรัมขึ้นบน photometric detector output วิธีทางอิเล็กทรอนิกจะใช้เครื่องมือ low-noise analogue resistance-capacitance (RC) เป็นตัวทำให้เกิดอนุพันธ์สเปกตรัม โดยแอมพลิจูดที่ได้จะขึ้นอยู่กับพารามิเตอร์ของเครื่องมือ ได้แก่ ความเร็วในการสแกน ความกว้างของช่องเล็กยาว (slit width) และ RC device gain factor เป็นต้น สำหรับวิธีเชิงตัวเลขจะใช้คอมพิวเตอร์ทำการคำนวณทางคณิตศาสตร์ต่างๆ เพื่อแปลงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงไปเป็นอนุพันธ์สเปกตรัมอันดับที่ต้องการ โดยมีทั้งการคำนวณแล้วให้ผลออกมาเป็นอนุพันธ์สเปกตรัมพร้อมๆ กับการสแกนสารตัวอย่าง หรืออาจเป็นการคำนวณภายหลังจากที่ได้ข้อมูลของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงมาแล้ว การทำอนุพันธ์สเปกตรัมด้วยวิธีหลังนี้มีความนิยมเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีการใช้คอมพิวเตอร์กันอย่างแพร่หลาย โดยคอมพิวเตอร์จะต่อภายในโดยตรงกับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ทำให้การปรับเปลี่ยนพารามิเตอร์ต่างๆ ในการคำนวณทำได้ง่ายและยังให้ความสะดวกในการเก็บข้อมูลไว้ประมวลผลในภายหลัง (Butler และ Hopkins, 1970)

การแปลงสเปกตรัมทำให้เกิดสัญญาณรบกวนร่วมด้วย Cameron และ Moffatt (1987) ทำการแปลงจากสเปกตรัมการดูดกลืนแสงไปเป็นอนุพันธ์สเปกตรัม โดยใช้ 2 ขั้นตอนคือ การหาอนุพันธ์ (differentiation) และการทำให้เรียบ (smoothing) นอกจากนี้ยังทำการรวมทั้งสองขั้นตอนดังกล่าวเข้าเป็นการคำนวณด้วย convoluting function เพียงขั้นตอนเดียวเท่านั้น (Savitzky และ Golay, 1964) ขั้นตอนการทำอนุพันธ์เริ่มจากการนำข้อมูลจากการสแกนสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงที่ต่อเนื่องกันมาหาอนุพันธ์ ผลจากการคำนวณจะทำให้มีสัญญาณรบกวนเกิดขึ้น โดยปริมาณสัญญาณรบกวนจะขึ้นอยู่กับช่วงความยาวคลื่นแสงและอันดับของการทำอนุพันธ์ด้วย ขั้นต่อมาเป็นการทำอนุพันธ์สเปกตรัมนั้นให้เรียบ ซึ่งจะช่วยเพิ่มสัดส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio) ได้เป็นอย่างดี วิธีการทำให้เรียบที่มีผู้ศึกษามาแล้ว ได้แก่วิธีกำลังสองน้อยที่สุดหรือ least square (Savitzky และ Golay, 1964), วิธีเฉลี่ยเคลื่อนที่อย่างง่ายหรือ sliding average (O'Haver และ Green, 1976; O'Haver และ Begley, 1981), วิธีเชิงสามเหลี่ยมหรือ triangular (Maddams และ Mead, 1982) และวิธีแปลงแบบฟูเรียร์ (Cameron และ Moffatt, 1987; Kauppinen และคณะ, 1981) อนุพันธ์สเปกตรัมที่ได้หลังจากผ่านทั้งสองขั้นตอนดังกล่าวมาแล้ว จะสามารถนำไปใช้สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณจากสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงหนึ่งๆ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารเป็นไปตามกฎของเบียร์ เมื่อเปลี่ยนรูปเป็นสมการอนุพันธ์ ค่าแอมพลิจูด ($d^nA/d\lambda^n$) ของอนุพันธ์จะยังคงความสัมพันธ์กับปริมาณอย่างเป็นเส้นตรงอยู่ แอมพลิจูดของอนุพันธ์สเปกตรัมที่ได้ของแต่ละวิธีจะมีค่าแตกต่างกัน ผลของการวิเคราะห์เชิงปริมาณจะมีความถูกต้องที่สุด เมื่อทำการวัดสารมาตรฐานและสารตัวอย่างไปพร้อมๆ กันและโดยวิธีอันเดียวกัน (O'Haver และ Begley, 1981) ดังนั้นการระบุสภาวะต่างๆ ในการทดลองรวมทั้งวิธีในการทำอนุพันธ์จึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงด้วย (Beckett และ Stenlake, 1988)

เภสัชภัณฑ์ที่นำมาเป็นต้นแบบในการศึกษานี้ จะเป็นรูปแบบยาเม็ดและมีตัวยาผสมสองชนิดที่เป็นเอมีน เนื่องจากเป็นกลุ่มที่พบมากในท้องตลาดและมักใช้เป็นยาแก้หวัดคัดจมูก เช่นยาซูโดอีฟีดรีน ไฮโดรคลอไรด์, ยาเฟนิลโปรปาโนลามีน ไฮโดรคลอไรด์, บรอมเฟนิรามีน มาลีเอต, คลอร์เฟนิรามีน มาลีเอตและยาคาร์บิโนซามีน มาลีเอต เป็นต้น การที่ยากลุ่มดังกล่าวมีใช้ในรูปของยาผสมมาเป็นเวลานานและยังคงมีใช้อยู่แพร่หลายในปัจจุบัน จึงมีรายงานการวิเคราะห์หลายวิธีด้วยกัน อาจแบ่งวิธีวิเคราะห์เป็นข้อๆ ได้ดังนี้

1. Colorimetric method

Hudanick (1964) เสนอวิธีวิเคราะห์ยาคลอร์เฟนิรามีน มาลีเอตที่ผสมกับตัวยาต่างๆ โดยการทำปฏิกิริยากับไซยาโนเจนโบรไมด์และกรดซัลฟานิลิก เกิดเป็นสีย้อมโพลีเมทีนที่มีสีเหลืองและให้การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร โดยที่ตัวยาผสมอื่นๆ เช่น ยาเฟนิลโปรปาโนลามีน ไฮโดรคลอไรด์, เฟนิลอีฟรีน ไฮโดรคลอไรด์และเดกซ์โตรเมทอร์แฟน ไฮโดรโบรไมด์ ไม่รบกวนผลการวิเคราะห์ ทั้งยังพบว่ายาบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต และยาเฟนิรามีน มาลีเอตให้ผลเช่นเดียวกันกับยาคลอร์เฟนิรามีน มาลีเอตอีกด้วย

การวิเคราะห์ยาผสมโดยวิธีนี้มักต้องใช้การสกัดร่วมด้วย ดังเช่นวิธีของ Bhatkar และ Madkaiker (1980) ที่ทำการวิเคราะห์ยาไตรโปรลิดีน ไฮโดรคลอไรด์ในยาเม็ดซึ่งมีส่วนผสมของยาซูโดอีฟีดรีน ไฮโดรคลอไรด์หรือยาอีฟีดรีน ไฮโดรคลอไรด์ร่วมอยู่ด้วย โดยการสกัดเอาตัวยาของไตรโปรลิดีน ไฮโดรคลอไรด์ด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ออกจากสารละลายผสมที่ถูกทำให้เป็นด่างแล้วนำไปทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียมไรเนกเกตในแอซีโตน จะได้สารประกอบเชิงซ้อนสีชมพูซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร

2. UV Spectrophotometric method

Brown และ Portmann (1971) เสนอวิธีการวิเคราะห์ยาผสมระหว่างยาเฟนิลโปรปาโนลามีนและเฟนิลอีฟรีน ไฮโดรคลอไรด์ในยาเม็ดหรือแคปซูล โดยการทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโซเดียมเมตาเปอริโอเดตเกิดเป็นเบนซาลดีไฮด์และเอน-ไฮดรอกซีเบนซาลดีไฮด์ ตามลำดับ และเมื่อทำการปรับพีเอชให้เหมาะสม จะสามารถสกัดสารแต่ละตัวด้วยคลอโรฟอร์มได้อย่างจำเพาะเจาะจงแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 247.5 และ 252.5 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณยาทั้งสองโดยเทียบกับสารมาตรฐาน วิธีนี้สามารถใช้วิเคราะห์ได้แม้จะมียาแอสไพรินผสมอยู่ด้วย Tan และ Salvador (1985) อาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน อย่างเดียวกันนี้ร่วมกับเทคนิค difference spectrophotometry ทำการวิเคราะห์ยาเฟนิลโปรปาโนลามีน ไฮโดรคลอไรด์ ที่มียาเดกซ์โตรเมทอร์แฟน ไฮโดรโบรไมด์ หรือยากัวเอียเฟเนซินผสมอยู่ โดยไม่มีการสกัดเกี่ยวข้องด้วย ค่าการดูดกลืนแสงที่ใช้คำนวณจะได้จากการวัดการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมของยาเฟนิลโปรปาโนลามีน ไฮโดรคลอไรด์ที่ได้จากการเกิดและไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

3. Chromatographic method

3.1 Thin Layer Chromatographic method

Matsui, Watson และ French (1969) ทำการวิเคราะห์ยาผสมที่เป็นเอมีนโดยใช้ TLC ที่มีซิลิกาเจล DSF-5 เป็นตัวดูดซับและใช้คลอโรฟอร์ม-เมทานอล-แอมโมเนีย (100:8:1) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เพื่อแยกยาแต่ละตัวออกจากกัน แล้วนำบริเวณจุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์มาทำปฏิกิริยากับบรอมไทมอลบลูซึ่งเป็นสีย้อมที่เป็นกรด นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน สำหรับยาที่นำมาศึกษาได้แก่ ยาผสมระหว่างยาคลอร์เฟนิรามีน มาลีเอต กับไดเฟนไฮดรามีน ไฮโดรคลอไรด์, ยาคลอร์เฟนิรามีน มาลีเอตกับยาอีฟีดรีน ไฮโดรคลอไรด์ และยาอีฟีดรีน ไฮโดรคลอไรด์ร่วมกับยาไดเฟนไฮดรามีน ไฮโดรคลอไรด์ เป็นต้น

3.2 Partition chromatographic method

Smith (1966) ศึกษาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณยาผสมของยาเฟนิลโปรปาโนลามีน ไฮโดรคลอไรด์, คลอร์เฟนิรามีน มาลีเอต, ไพริลามีน มาลีเอต, เฟนิลอีฟรีน ไฮโดรคลอไรด์และยาโคดีอีน ฟอสเฟต เป็นต้น โดยการผ่านสารผสมในคอลัมน์สี่ตัวที่ต่อเชื่อมกัน คอลัมน์ทั้งสี่บรรจุเอาไว้ด้วยซีไลต์สภาวะต่างๆ กัน และเมื่อใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวชะ พบว่ายาเฟนิลอีฟรีนและยาเฟนิลโปรปาโนลามีน ไฮโดรคลอไรด์จะถูกจับไว้โดยคอลัมน์ที่หนึ่ง ส่วนกรดซิตริกจะถูกจับไว้โดยคอลัมน์ที่สองซึ่งเป็นโซเดียมไฮดรอกไซด์ผสมกับซีไลต์ ยาคลอร์เฟนิรามีนและยาไพริลามีน มาลีเอตจะถูกจับไว้โดยคอลัมน์ที่สามซึ่งเป็นกรดไนตริกผสมกับซีไลต์ และสุดท้ายคือยาโคดีอีน ฟอสเฟตจะถูกจับไว้โดยคอลัมน์ที่สี่ซึ่งเป็นส่วนผสมของกรดซัลฟามิกกับซีไลต์ หลังจากยาแต่ละตัวแยกออกจากกันแล้วจึงนำไปหาปริมาณโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรโฟโตเมตรีต่อไป

3.3 Ion Exchange Chromatographic Method

Smith (1972) ศึกษาวิธีวิเคราะห์ยาผสมที่เป็นเอมีนหลายชนิด เช่น ยาคลอร์เฟนิรามีน มาลีเอต, เฟนิลโปรปาโนลามีน ไฮโดรคลอไรด์, เฟนิลอีฟรีน ไฮโดรคลอไรด์ และยาเดกซ์โตรเมทอร์แฟน ไฮโดรโบรไมด์ โดยใช้ sulfonated polystyrene cation resin เป็นตัวแยกเอายาต่างๆ ออกจากกัน ยาที่ถูกจับไว้ในคอลัมน์สามารถชะออกมาได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกในแอลกอฮอล์ที่ปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมสำหรับยาแต่ละตัว แล้วหาปริมาณโดยใช้วิธีสเปกโทรโฟโตเมตรี ถ้ามีกรดอินทรีย์อยู่ก็อาจใช้ strong anion exchange resin จับไว้ได้ วิธีนี้ให้ผลดีกับการวิเคราะห์หาปริมาณของยาเตรียมต่างๆ ทั้งที่อยู่ในรูปยาเดี่ยวและยาผสม

3.4 Gas Chromatographic Method

Celeste และ Polito (1966) ศึกษาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณยาผสมของยาต้านฮิสตามีน 12 ชนิด รวมทั้งยาเดกซ์โตรเมทอร์แฟน ไฮโดรโบรไมด์และยาเฟนิลโปรปาโนลามีน ไฮโดรคลอไรด์ โดยใช้วัฏภาคนิ่ง (stationary phase) ที่มีส่วนผสมของส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้วคือ Carbowax 20M กับ SE-30 บนคอลัมน์ anakom ABS และใช้เฟนิลไพรารีน ไฮโดรคลอไรด์เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard)

ปัญหาที่พบเมื่อทำการวิเคราะห์ยาที่อยู่ในรูปของเบสอิสระ จากการใช้คอลัมน์ที่เป็นโลหะก็คือ ตัวยามักทำปฏิกิริยาบางอย่างกับผิวของโลหะทำให้เกิด tailing ของพีคอันจะส่งผลต่อความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ Mario และ Meehan (1970) ศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณยาผสมระหว่างยาเฟนิลโปรปาโนลามีน, ยาคลอร์เฟนิรามีนและยาเดกซ์โตรเมทอร์แฟนโดยใช้คอลัมน์ที่เป็นแก้วทั้งหมด มี nonpolar rubber SE-30 เป็นวัฏภาคนิ่ง และใช้ flame-ionization detector ทำให้ปัญหาดังกล่าวหมดไป

Yacobi, Look และ Lai (1978) ทำการวิเคราะห์ยาผสมสองชนิดที่เป็นเอมีนระหว่างยาซูโดอีฟีดรีน ไฮโดรคลอไรด์กับยาคลอร์เฟนิรามีน มาลีเอต ศึกษาโดย โดยใช้คอลัมน์แก้วและบรรจุวัฏภาคนิ่ง คือ 3% OV-17 เคลือบบน Chromosorb W-HP และใช้ flame-ionization detector

ในยาผสมบางตำรับ อาจต้องมีการทำอนุพันธ์ (derivertization) ของยาบางตัวก่อนเพื่อขจัดปัญหาจากการรบกวนการวิเคราะห์ Fabrizio (1980) ศึกษาการหาปริมาณยาผสมระหว่างเฟนิลโปรปาโนลามีน ไฮโดรคลอไรด์, เฟนิลอีฟรีน ไฮโดรคลอไรด์, คลอร์เฟนิรามีน มาลีเอตและยาอื่นๆ โดยใช้คอลัมน์แก้วที่บรรจุด้วย 8% OV-101 เคลือบบน Chromosorb W-HP และใช้ flame-ionization detector เตรียมอนุพันธ์ของยาผสมโดยใช้ 4-(ไดเมทิลอมิโน)ไพริดีน ในไพริดีนและแอซีติก แอนไฮไดรด์ก่อนทำการฉีด

3.5 High Performance Liquid Chromatographic Method

ปัจจุบัน วิธีนี้นิยมใช้ในการวิเคราะห์เภสัชภัณฑ์ผสม เนื่องจากมีความถูกต้องสูงและวิเคราะห์ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งในเภสัชตำรับ (USP XXIII) ได้ใช้วิเคราะห์เภสัชภัณฑ์ผสมของยาแก้หวัดคัดจมูกต่างๆ ได้แก่

3.5.1 การวิเคราะห์ยาน้ำเชื่อม ที่มีส่วนผสมระหว่างยาบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตกับยาซูโดอีฟีดรีน ซัลเฟต

วัฏภาคนิ่งเป็น octadecyl silane จับกับ porous silica ขนาด 3-10 ไมครอน บรรจุในคอลัมน์ขนาด 4 มม. x 30 ซม. อัตราการไหลประมาณ 1.5 มล.ต่อนาที ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นส่วนผสมของน้ำ, แอซีโตไนไตรล์, เมทานอลและเตตระไฮโดรฟิวแรน (550:320:80:50) ที่มีการเติมกรดฟอสฟอริกและโซเดียมลอริลซัลเฟต

และปรับพีเอชเป็น 3.50 ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ใช้นาฟาโซลีน ไฮโดรคลอไรด์เป็นสารมาตรฐานภายใน และใช้ UV ดีเทกเตอร์วัดที่ความยาวคลื่นแสง 254 นาโนเมตร

3.5.2 การวิเคราะห์เภสัชภัณฑ์ยาเม็ดหรือยาน้ำเชื่อม ที่มีส่วนผสมของยาซูโดอีฟีดรีน ไฮโดรคลอไรด์กับยาไตรโปรลิดีน ไฮโดรคลอไรด์

ใช้วัฏภาคนิ่งเป็น porous silica ขนาด 5-10 ไมครอน บรรจุในคอลัมน์ขนาด 4.2 มม. x 25 ซม. อัตราการไหลประมาณ 1.5 มล. ต่อนาที ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นส่วนผสมของแอลกอฮอล์กับสารละลายแอมโมเนียมแอซีเตต (1 ใน 250) อัตราส่วน 17:3 และใช้ UV ดีเทกเตอร์วัดที่ความยาวคลื่นแสง 254 นาโนเมตร

3.5.3 การวิเคราะห์เภสัชภัณฑ์ที่เป็นแคปซูล ซึ่งมีส่วนผสมของยาซูโดอีฟีดรีนกับยาไดเฟนไฮดรามีน

วัฏภาคนิ่งเป็น porous silica ขนาด 5-10 ไมครอน จับด้วยพันธะเคมีกับกลุ่มไนไตรล์บรรจุในคอลัมน์ขนาด 4.6 มม. x 25 ซม. ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นส่วนผสมของน้ำ, แอซีโตรไนไตรล์และเมทานอล อัตราส่วน 64:26:10 อัตราการไหลประมาณ 3 มล. ต่อนาที และใช้ UV ดีเทกเตอร์วัดที่ความยาวคลื่นแสง 254 นาโนเมตร

นอกจากวิธีที่ระบุในเภสัชตำรับดังกล่าวแล้ว ได้มีผู้ทำการศึกษาเทคนิค High Pressure Liquid Chromatography สำหรับวิเคราะห์ยาผสมที่เป็นยาแก้หวัดอีกเป็นจำนวนมาก ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

4. อนุพันธ์สเปกโทรโฟโตเมตรี

การใช้เทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาในเภสัชภัณฑ์ผสมสองชนิด ไม่สามารถทำได้โดยตรงถ้าสเปกตรัมของตัวยาทั้งสองซ้อนทับหรือเหลื่อมซ้อนกันอยู่ วิธีหนึ่งที่ใช้ ได้แก่ การใช้ตัวทำละลายสกัดแยกเอายาแต่ละตัวออกจากกันซึ่งมีขั้นตอนยุ่งยากและอาจมีการสูญเสียตัวยาไประหว่างการสกัดได้ เนื่องจากอนุพันธ์สเปกโทรโฟโตเมตรีเป็นวิธีที่ง่าย สะดวกและให้ความถูกต้องสูง จึงได้มีการศึกษาเทคนิคนี้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาในเภสัชภัณฑ์ผสมของยาที่เป็นเอมีนและใช้เป็นยาแก้หวัดมาแล้วหลายชนิด

Davidson และ Elsheikh (1982) วิเคราะห์ยาซูโดอีฟีดรีน ไฮโดรคลอไรด์ที่ผสมอยู่กับยาไตรโปรลิดีน ไฮโดรคลอไรด์และโคดีอีน ฟอสเฟต โดยใช้อนุพันธ์อันดับที่สี่ Hoover, Soltero และ Bansal (1987) วิเคราะห์ยาผสมสองชนิดของซูโดอีฟีดรีน ไฮโดรคลอไรด์กับยาคลอร์เฟนิรามีน มาลีเอตโดยใช้อนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง นอกจากนี้ Murtha, Julian และ Radebaugh (1987) สามารถวิเคราะห์ยาผสมทั้งสามชนิดของซูโดอีฟีดรีน ไฮโดรคลอไรด์, คลอร์เฟนิรามีน มาลีเอตและยาเดกซ์โตรเมทอร์แฟน ไฮโดรโบรไมด์ได้พร้อมกันโดยใช้อนุพันธ์อันดับที่สองอันดับเดียวเท่านั้น

Zhang, Deng และ Zeng (1984) วิเคราะห์ยาเฟนิลโปรปาโนลามีน ไฮโดรคลอไรด์โดยวัดแอมพลิจูดของอนุพันธ์อันดับที่สองที่ตำแหน่งตัดศูนย์ที่ 257 นาโนเมตร ซึ่งปราศจากการรบกวนจากยาคลอร์เฟนิรามีน มาลีเอต Tan และ Kolmonpunporn (1989) ใช้วิธีอนุพันธ์อันดับที่สองทำการวิเคราะห์ยาผสมสองชนิด โดยวัดแอมพลิจูดที่ตำแหน่งยอด 260 ถึง 257 นาโนเมตรเพื่อหาปริมาณของยาเดกซ์โตรเมทอร์แฟน ไฮโดรโบรไมด์และที่ 291.5 ถึง 287.5 นาโนเมตรเพื่อหาปริมาณของยาเฟนิลโปรปาโนลามีน ไฮโดรคลอไรด์ Mahgoub (1990) ใช้คอมพิวเตอร์ทำการคำนวณอนุพันธ์อันดับที่หนึ่งร่วมกับวิธีกำลังสองน้อยที่สุด เพื่อหาปริมาณยาผสมสองชนิดระหว่างคลอร์เฟนิรามีน มาลีเอตและยาเฟนิลอีฟรีน ไฮโดรคลอไรด์ที่ความยาวคลื่นแสง 263 และ 273 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ยาผสมอื่นๆ ที่ใช้เทคนิคอนุพันธ์สเปกโทรโฟโตเมตรี ได้แก่ยาซูโดอีฟีดรีน ไฮโดรคลอไรด์เมื่อผสมอยู่กับเดกซ์โตรเมทอร์แฟน ไฮโดรโบรไมด์และไตรโปรลิดีน ไฮโดรคลอไรด์ (Jones, Orchard และ Hall, 1985), การวิเคราะห์ยาซูโดอีฟีดรีน ไฮโดรคลอไรด์และเดกซ์โตรเมทอร์แฟน ไฮโดรโบรไมด์ที่ผสมอยู่กับไตรโปรลิดีน ไฮโดรคลอไรด์ โดยใช้อนุพันธ์อันดับที่สองและสี่ (Davidson และ Mkoji, 1988), การวิเคราะห์ยาเฟนิลอีฟรีน ไฮโดรคลอไรด์เมื่อผสมอยู่กับคาร์บิโนซามีน มาลีเอต โดยใช้อนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง (Salem และคณะ, 1990), การวิเคราะห์ยาผสมสองชนิดระหว่างยาคลอร์เฟนิรามีน มาลีเอตกับเฟนิลอีฟรีน ไฮโดรคลอไรด์โดยใช้อนุพันธ์อันดับที่หนึ่ง (Shoukrallah, 1991) และการวิเคราะห์ยาคลอร์เฟนิรามีน มาลีเอต เมื่อผสมอยู่กับเดกซ์โตรเมทอร์แฟน ไฮโดรโบรไมด์ (El.Bolkiny และคณะ, 1992)

อย่างไรก็ดี การใช้เทคนิคอนุพันธ์สเปกโทรโฟโตเมตรียังไม่แพร่หลายในห้องปฏิบัติการ อาจเนื่องมาจากความไม่คุ้นเคยกับเทคนิคนี้ หรือเป็นเพราะต้องใช้เครื่องมือในราคาที่แพงขึ้น การวิจัยนี้ทำเพื่อศึกษาการใช้เทคนิคอนุพันธ์สเปกโทรโฟโตเมตรีในการวิเคราะห์เภสัชภัณฑ์ที่มีตัวยาผสมสองชนิด ร่วมกับการใช้โปรแกรมทางคณิตศาสตร์จากคอมพิวเตอร์มาทำอนุพันธ์และช่วยลดสัญญาณรบกวน และจากการใช้โปรแกรมคำนวณในรูปแบบที่ง่ายจะสามารถนำวิธีนี้ไปใช้กับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีใช้ทั่วๆ ไปได้

ตารางที่ 1

H.P.L.C. ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณของยาผสมที่เป็นเอมีนในยาแก้หวัด

combined drug	stationary phase	mobile phase	detector	reference
codeine HCl pseudoephedrine HCl triprolidine HCl	Corosil/C_{18} and Corasil/phenyl, 37-50μm	various percentages of acetronitrile and ammonium carbonate or ammonium acetate, flow rate 1.4 ml/min	UV detector	Honigberg, stewart and Smith (1974)
chlorpheniramine maleate phenylpropanolamine HCl pseudoephedrine HCl	Dupont "Zipak" supported strong cation-exchange (SCX) material, (0.5 m x 2.1-mm)	0.02 *M* $(NH_4)_2HPO_4$ in various percentages of dioxane and water, flow rate 1.1 ml/min	UV detector	Sprieck (1974)
brompheniramine maleate phenylephrine HCl phenylpropanolamine HCl	μBondapak CN (30 cm x 4 mm)	13% (v/v) of acetronitrile in water containing 1.8% acetic acid with or without 0.005 *M* 1-heptanesulfonic acid, flow rate 0.6, 3.6 ml/min	UV at 254 nm	Ghanekar and Gupta (1978)
chlorpheniramine maleate pseudoephedrine HCl	μBondapak C_{18} (30 cm x 4 mm)	acetronitrile-methanol-sodium nitrate (35 : 40: 25) and 0.001 *M* 1- heptanesulfonic acid , pH 5, flow rate 2 ml/min	UV at 254 nm	Yacobi, Look and Lai (1978)
chlorpheniramine maleate phenylephrine HCl phenylpropanolamine HCl pseudoephedrine HCl	μBondapak phenyl (30 cm x 4 mm)	water-methanol-glacial acetic acid (55 : 44 : 1 v/v) containing heptanesulfonic acid sodium salt to yield a 0.005 *M* solution, flow rate 2 ml/min	UV at 254 nm	Koziol, Jacob and Achari (1979)
chlorpheniramine maleate dextromethorphan HBr phenylpropanolamine HCl	Radial-Pak cartridge packed with μPorosil silica (10 cm x 8 mm)	aqueous 75% methanol 0.01 *M* in $(NH_4)_2HPO_4$, pH 7.8, flow rate 2 ml/min	UV at 214 nm	Richardson and Bidlingmeyer (1984)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

H.P.L.C. ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณของยาผสมที่เป็นเอมีนในยาแก้หวัด

combined drug	combined drug	mobile phase	detector	เอกสารอ้างอิง
chlorpheniramine maleate dextromethorphan HBr phenylpropanolamine HCl phenylephrine HCl pseudoephedrine HCl	μBondapak C_{18} (30 cm x 4 mm)	methanol - water - tetrahydrofuran - 80% phosphoric acid (68:29:4:0.1) with dioctyl sulfosuccinate, pH 3.8, flow rate 1.3 ml/min	UV at 254 nm	Halsteak (1982)
chlorpheniramine maleate diphenhydramine HCl phenylpropanolamine HCl pseudoephedrine HCl	Zorbax 300 - SCX cation exchanger (15 cm x 4.6 mm)	acetronitrile - ethylenediamine sulphate buffer, pH 4.52 (7:13), flow rate 2 ml/min	UV at 216.5 nm	Heidemann, Groon and smith (1987)
carbinoxamine maleate phenylpropanolamine HCl	LiChrosorb CN (7 μm)	methanol containing debutylammonium phosphate (pH 2.5)	UV at 260 nm	Araujo, Bayer and Probecker (1988)
pseudoephedrine HCl triprolidine HCl	LiChrosorb Si-100 (10 μm) modified with adamantylethyl trichlorosilane (15 cm x 4.6 mm)	10 *mM*-$(NH_4)H_2PO_4$ -acetonitrile (9:1), flow rate 3 ml/min	UV at 216 nm	Yang and Gilpin (1988)
chlorpheniramine maleate diphenhydramine HCl ephedrine HCl phenylephrine HCl phenylpropanolamine HCl	Ultrasphere ODS (5 μm) (25 cm x 4.6 mm)	methanol-water-THF-85%H_3PO_4 (715:234: 50:1) containing 0.58% docusate sodium, adjusted to pH 4.6 with aq.NH_3	UV at 254 nm	Lau et. al. (1989)

วัตถุประสงค์ในการศึกษา

1. ศึกษาถึงการใช้เทคนิคอนุพันธ์สเปกโทรโฟโตเมตรี ในการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาในเภสัชภัณฑ์ที่มีตัวยาผสมสองชนิดที่เป็นเอมีน
2. ศึกษาถึงความเป็นไปได้ของการใช้เทคนิคอนุพันธ์สเปกโทรโฟโตเมตรี ในการวิเคราะห์เภสัชภัณฑ์ที่มีตัวยาผสมสองชนิด จากข้อมูลที่ได้จากสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ร่วมกับการใช้โปรแกรมทางคณิตศาสตร์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีวิเคราะห์เภสัชภัณฑ์ที่มีตัวยาผสมสองชนิดที่เป็นเอมีนพร้อมๆ กัน ที่ง่าย สะดวกและรวดเร็ว
2. สามารถนำเอาเทคนิคอนุพันธ์สเปกโทรโฟโตเมตรี ไปประยุกต์ใช้กับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ไม่สามารถทำอนุพันธ์ของสเปกตรัมได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย