บทที่ 2

Materials and Methods

Materials

Aspirin USP

Salicylic Acid USP

Chloroform GR.

0.5 N Sodium Hydroxide

0.5 N Hydrochloric Acid

Phenol Red Solution

Alcohol (95 %)

Acid Ferric Ammonium Sulfate Solution

Perkin Elmer model 267 Infrared Spectrophotometer

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

005014

Methods

Baseline Technique Method

การวัด intensity ของ band สำหรับเครื่องมือที่ใช้ chart paper เป็น "ablorbance " ก็สามารถจะวัดได้โดยตรงแต่ไม่แม่นยำนัก หรืออาจจะใช้วิธีวัด absorption band area (integrated absorption intensity) แต่ก็เป็นวิธีที่น่าเบื่อ วิธีที่ใช้กันทั่ว ๆ ไป สำหรับการหา intensity ก็คือการใช้ baseline technique method ซึ่งอาจจะแบ่งออกเป็น 3 แบบ ดังนี้ คือ

1. โดยการลากเส้นสัมผัสฐานของ band แล้วลากเส้นตรงจากยอดมาตัดกับเส้นสัมผัสตามรูป ก.

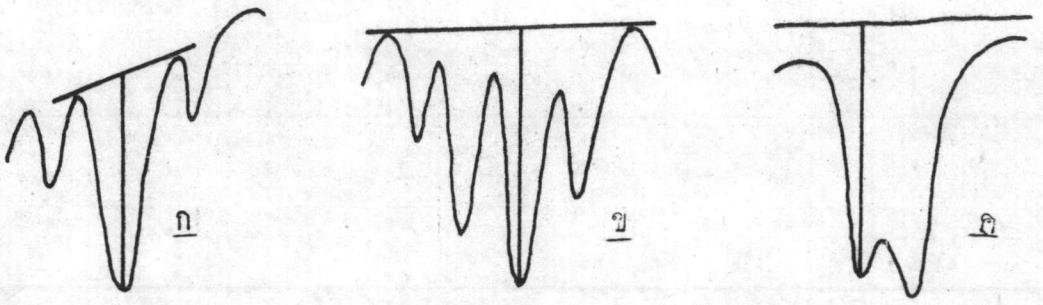
2. ถ้า band อยู่ชิดกันมาก (เกิดการ overlap จาก band ข้างเคียง)

i 17451073

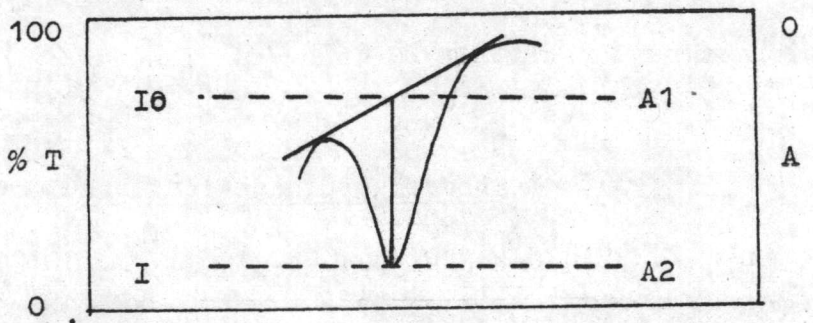
ใช้วิธีลากเส้นตรงสัมผัสรวม แล้วลากเส้นตรงจากยอด peak ไปตัดตามรูป ข. เรียก horizontal baseline

3. โดยการ run solvent ที่ใช้ทั้งใน Reference และSample Beam ได้เป็น solvent baselinc แล้วลากเส้นตรงจากยอด peak ลงไปตัดตามรูป ค.

รูปแสดง baseline ต่าง ๆ



เมื่อเลือก baseline ได้แล้ว จึงหาว่า absorbance ตามมาตราส่วน ของกระดาษโดยทั่วไปจะเป็นร%เป็น % transmittance แต่บางทีก็เป็น absorbance ตามรูปดังนี้



ในกรณีที่มาตราส่วน ระบุ เป็น % transmittance ก็อาจจะหา absorbance ได้ 2 วิธี คือ

1. อ่านค่า Io และ I ออกมาจาก spectrum นำมาหา absorbance ตามสูตร

$$A = -\log T = \log \frac{Io}{I}$$

2. อ่านค่า I และ Io ออกมาจาก spectrum แล้วเปลี่ยนเป็น absorbance A 2 และ A 1 ตามลำดับ ตามสูตร A = 2 - log T ความแตกต่าง

ของ A 2 และ A 1 คือ absorbance ของ peak

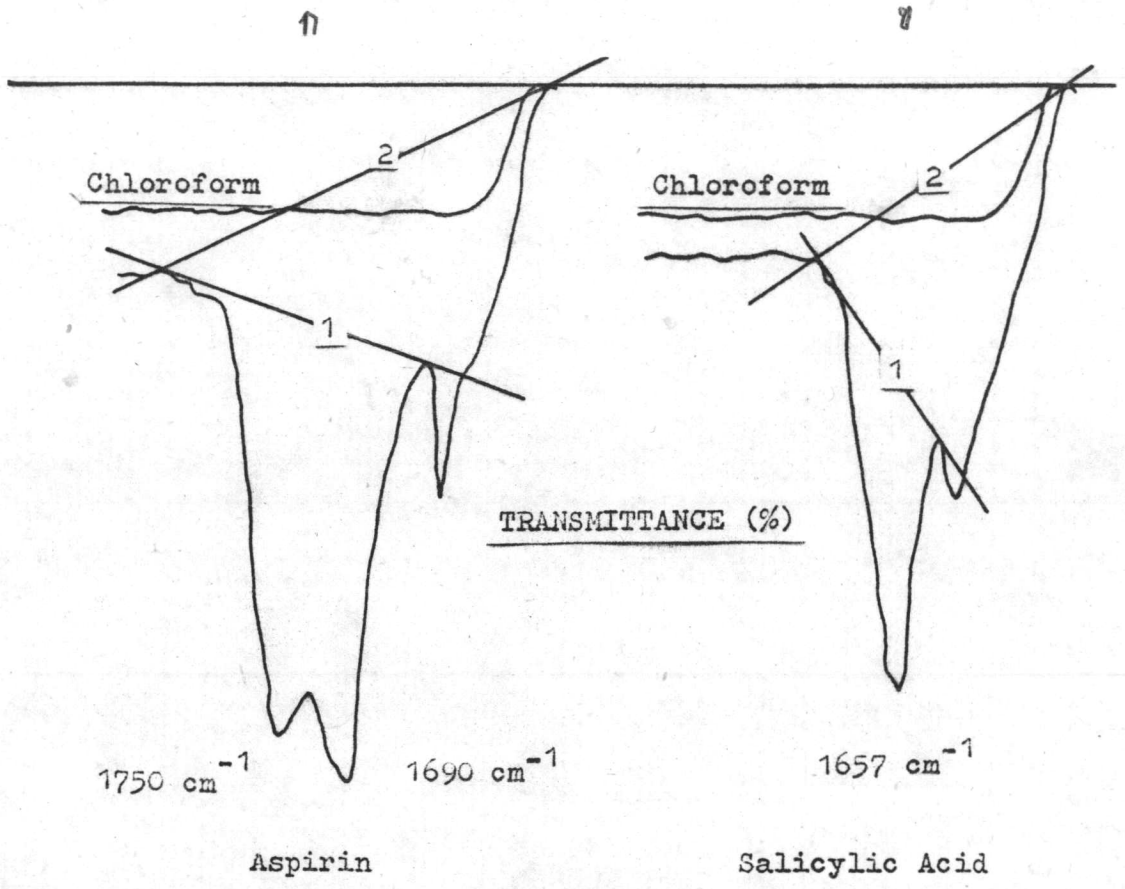
ในกรณีที่มาตราส่วนของ spectrum ระบุเป็น absorbance (ซึ่งไม่ค่อยนิยมนำมาวิเคราะห์ เพราะว่าการอ่านค่า absorbance อาจจะมีข้อผิดพลาดได้เนื่องจาก non linear scale) ก็อ่านค่า A 1 และA 2 มาหาผลต่างเป็น absorbance ของ peak ที่ต้องการ เช่นกัน

Construction of calibration curve of single component (Beer's saw)

แอสไพริน

Prepalation of sample ชั่งแอสไพรินมาตรฐานมา จำนวน 125, 250, 375, 500, 625, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150 และ 1250 mg ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml เติม chloroform เล็กน้อย เขย่าจนละลาย แล้วเติมต่อไปให้ครบปริมาตร

Method of measurement นำไป run IR Spectrophotometer scan - mode ที่ medium, time - constant ที่ 2 และ slit program ที่ 7 ซึ่งใช้สำหรับ การวิเคราะห์หาปริมาณ ใช้ sodium chloride liquid cell ที่มีความหนา 0.05 และ 0.1 mm นำ sample cell ใส่ที่ sample beam และใช้ chloroform เป็น blank ที่ reference beam ตามลำดับ run duplicate และใน spectrum ทุกอัน calibrate wavenumber โดย polystyrene แล้ววัด absorbance ที่ 1750 และ 1690cm^{-1} โดยใช้ baseline 1, baseline 2 และ chloroform baseline ตามรูป ก.



กรดซาลิไซลิก

Preparation of sample ชั่ง กรดซาลิไซลิกมาตรฐาน จำนวน 62.5 125, 187.5, 250, 312,5, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, และ 600mg ใส่ใน volumetric flaskขนาด 25 ml. เติม chloroform เล็กน้อย เขย่าจนละลาย แล้วเติมด้วย chloroform ให้ครบปริมาตร

Method of Measurement นำไป run IR Spectrophotometry เช่นเดียวกับ method of measurement ของแอสไพริน run duplicate แล้ววัด absorbance ที่ 1657 cm^{-1} โดยใช้ baseline 1 , baseline 2 และ chloroform baseline ตามรูป ข.

นำค่า absorbance ที่ได้ทั้งแอสไพรินและกรดซาลิไซลิกมา plot curve

กับความเข้มข้น เพื่อจะศึกษาถึงสภาพของการทดลองที่เหมาะสม เพื่อนำมาศึกษาขั้นต่อไป ได้ผลตามตาราง ที่ 1, 2, 3 และรูปที่ 1, 2, 3

Analysis of Aspirin in the Presence of Salicylic Acid

Method ชั่งแอสไพริน จำนวน 625 mg. ใส่ใน volumetric flask ขนาด25 ml. ทั้งหมด 5 ใบ แล้วชั่ง กรดซาลิไซลิก จำนวน125, 250, 375, และ 500 mg. ใส่ในflask ใบที่2, 3, 4, และ 5 ตามลำดับ นำแต่ละ flask มาละลายด้วย chlorform ให้ครบปริมาตร แล้วนำไป run IR Spectrophotometer เช่นเดียวกับmethod of measurement ในการทำ calibration curve โดยflask แรก แอสไพรินเดี่ยวๆ ทำหน้าที่เป็นสารละลายมาตรฐาน

ชั่งกรดซาลิไซลิกอีกครั้ง จำนวน 375 mg. ใส่ใน volumetiic flask ขนาด 25 ml. ทั้งหมด 6 ใบ แล้วชั่งแอสไพริน จำนวน 500, 550, 600, 650, 700 และ 750 mg. ใส่ในflask ใบที่ 1, 2, 3 ,4, 5, และ 6 ตามลำดับ นำแต่ละ flask มาละลายด้วย chloroform ให้ครบปริมาตร นำไปrun IR Spectrophotometer เช่นเดียวกับแอสไพริน

นำ spectrum ที่ได้แต่ละตัวอย่าง มาหาปริมาณแอสไพริน โดยวัด absorbance ที่ 1750 cm^{-1} แล้วใช้สูตร $\frac{Au}{As} = \frac{Cu}{Cs}$

เมื่อ Au และ As= absorbance ของสารละลายแอสไพริน ที่ต้องการวิเคราะห์ และ สารละลายมาตรฐาน ตามลำดับ

Cu และ Cs = ความเข้มข้นของสารเป็น g/100 ml.

จากการคำนวนหาปริมาณของ แอสไพริน แต่ละตัวอย่าง แล้วนำมาคิดเป็น เปอร์เซนต์ของแอสไพรินที่ตรวจได้ เพื่อนำมาดูผลว่า การหาปริมาณของ แอสไพริน อย่างเดียวจะถูกรบกวนโดยปริมาณของกรดซาลิไซลิกหรือไม่ ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4

Effect of time on Analasis of Aspirin and Salicylic Acid

Method ชั่งแอสไพริน 625 mg. ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25ml. ละลายด้วย chloroform ให้ครบปริมาตร นำไป run IR Spectrophotrmeter เช่นเช่นเดียว method of Measurement ในการทำ calibration curve ในช่วงเวลา 0 ,30, 60, 120, 180, และ 240 นาที ตามลำดับ แล้ววัด absorbance ที่ 1750 cm^{-1}

ชั่ง กรดซาลิไซลิก จำนวน 375mg. ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml. ละลายด้วย chloroform ให้ครบปริมาตร นำไป run IR Spectro photometor เช่นเดียวกับ แอสไพริน ในเวลา 0, 30? 60, 120, 180 และ 240 นาที ตามลำดับแล้ววัด absorbance ที่ 1657 cm^{-1}

นำค่าที่ได้มา plot curve ระหว่างเวลา และ absorbance เพื่อดูว่า เวลาจะมีผลต่อการวิเคราะห์หรือไม่ ได้ผลตามตารางที่ 5 และรูปที่ 4

Percentage recovery for the assay of Aspirin and Salicylic Acid by Infrared Spectrophotomtry

แอสไพริน

ชั่งแอสไพริน 500 mg. ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml. ทั้งหมด 4 ใบ แล้วชั่ง แอสไพรินอีกครั้ง จำนวนแน่นอนประมาณ 175 mg. ใส่ลงไปใน flask ใบที่ 1, 2, 3, 4, ตามลำดับ นำแต่ละ flask มาละลายด้วย chloroform ให้ครบปริมาตรนำไปอ่าน IR Spectrophotometry เช่นเดียวกับ method of measurement ในการทำ calibration curve แล้ววัด absorbance ที่ 1750 cm^{-1} หาปริมาณของแอสไพรินที่เติมลงไป โดยใช้หลักการคำนวนหาปริมาณ ของแอสไพรินทั้งหมด

จากสูตร $\frac{Au}{As} = \frac{Cu}{Cs}$ ปริมาณสารหลังจากที่เติมแอสไพรินแล้ว ลบด้วยปริมาณสารที่ยังไม่ได้เติม แอสไพริน ก็จะได้เป็นปริมาณของ

แอสไพริน ที่เติมลงไป นำมาหาค่าเป็น % recovery ได้ผลตามตาราง ที่ 6

กรดซาลิไซลิก

ชั่งกรดซาลิไซลิก จำนวน 375 mg ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml ทั้งหมด 4ใบ แล้วเติมกรดซาลิไซลิก จำนวนแน่นอนประมาณ 125 mg ใส่ลงไปอีกใน flask ใบที่ 1,2,3, และ 4 ตามลำดับ นำแต่ละใ flask มาละลายด้วย chloroform ให้ครบปริมาตร นำไปอ่าน IR Spectrophotometer เช่นเดียวกับแอสไพริน แล้ววัด absorbance ที่ 1657 cm^{-1} หาปริมาณ ของกรดซาลิไซลิกที่เติมลงไป ทำนองเดียวกับการคำนวนหา % recovery ของแอสไพริน ได้ผลตามตารางที่ 6

General Procedure for the Analysis of Binary Mixtures

ใน binary mixture ซึ่งเป็นสารผสมที่ประกอบด้วยสาร 2 ตัว เมื่อนำมา run IR Spectrophotometer จะสามารถหาปริมาณสารแต่ละตัวได้โดยใช้วิธี simultaneous equation method โดยการวัดค่า absorbanec ที่ maximum absorption ของสารทั้งสองแล้วนำไปตั้งสมการ 2 ชั้น จะหาความเข้มข้นได้ หรือใช้วิธี Q - Analysis (Absorbance Ratio Method) โดยวัดค่า absorbance ที่ maximum ของตัวใดตัวหนึ่ง กับที่ isoabsorptive point ออกมาเป็น ratio ของ absorbance หรือ Q การใช้ Q - analysis จะให้ผลในความความแม่นยำสูงกว่า simultaneous method

ในการทดลองครั้งนี้ใช้วิธี Q - Analysis มีรายละเอียดดังนี้

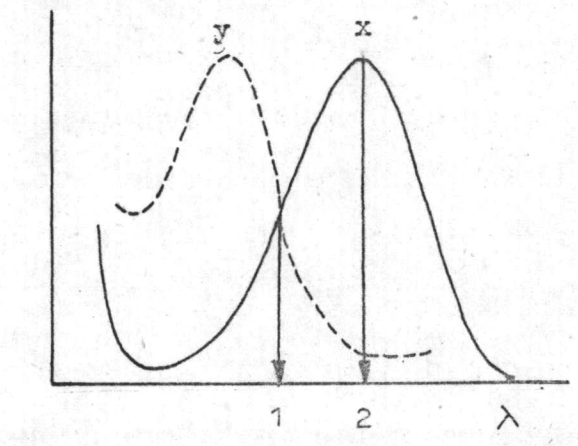
1. run SA curve (Absorption Spectra curve) ของแต่ละ component x และ x แล้วเลือก wavelength ที่ maximum ของตัวใดตัวหนึ่งกับที่ isoabsorptive point

Isoabsorptive point คือ wavelength ที่ component x และ y มี absorptivity เท่ากันหาได้โดย

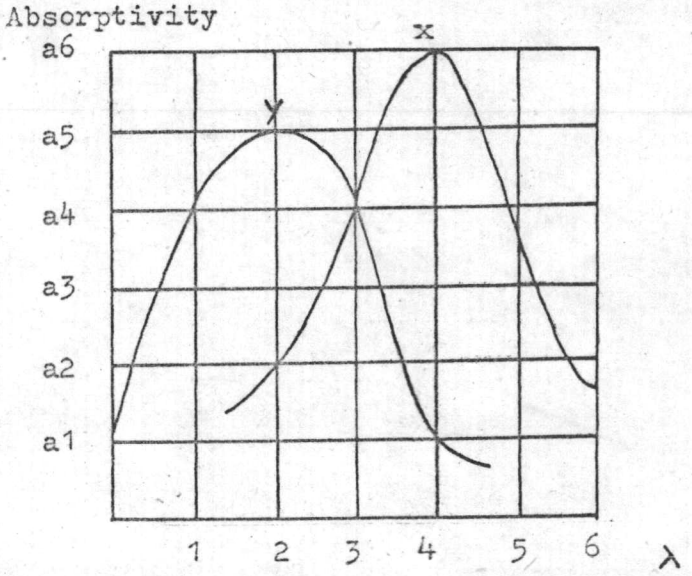
– การ run SA curve ของ component x และ y ที่มีความเข้มข้นเท่ากันจุดที่ curve ทั้งสองตัดกันคือ isoabsorptive point ตามรูป (a)

– run SA curve ของ component x และ y ที่มีความเข้มข้นไม่เท่ากัน แล้วหา absorptivity ที่แต่ละ wavelength นำมา absorptivety vs wavelength จุดที่ตัดกันก็คือ isoabsorptive point ตามรูป (b)

(a)



(b)



2. ใช้หลักที่ว่า ratio ของค่า absorbance 2 ค่า ของน้ำยาอันเดียวกันที่ wavelength ต่างกัน จะมีค่าคงที่

นั่นคือ

$$\lambda 4 \quad A4\,(x) = a6.b.Cx$$

$$\lambda 3 \quad A3\,(x) = a4.b.Cx$$

$$\therefore \quad \frac{A4\,(x)}{A3\,(x)} = \frac{a6}{a4}$$

เป็นลักษณะเฉพาะของ component x เรียก Absorbant Ratio = Ratio ของ absorptivity ที่ wavelength ทั้ง2 ก้วย

และใน mixture $A4 = a6.b.Cx + a1.b.Cy$

$A2 = a4.b.Cx + a4.b.Cy$

$$\therefore \quad \frac{A4}{A3} = \frac{a6.b.Cx + a1.b.Cy}{a4.b.Cx + a4.b.Cy}$$

เมื่อ b = thickness ของ cell เท่ากันตลอด

$$\therefore \quad \frac{A4}{A3} = \frac{a6}{a4} \cdot \left(\frac{Cx}{Cx + Cy} \right) + \frac{a1}{a4} \cdot \left(\frac{Cy}{Cx + Cy} \right)$$

ถ้าให้ $Fx = \dfrac{Cx}{Cx + Cy}$, $Fy = \dfrac{Cy}{Cx + Cy}$ $\therefore \quad Fx + Fy = 1$

$$\therefore \quad \frac{A4}{A3} = \frac{a6.Fx}{a4} + \frac{a1.Fy}{a4}$$

$$= \frac{a6.Fx}{a4} + \frac{a1\ (1 - Fx)}{a4}$$

$$= \left(\frac{a6}{a4} - \frac{a1}{a4} \right) Fx + \frac{a1}{a4}$$

ซึ่ง $\dfrac{A4}{A3} = Qo$, $\dfrac{a6}{a4} = Qx$, $\dfrac{a1}{a4} = Qy$

$$\therefore \quad \boxed{Qo = (Qx - Qy)\, Fx + Qy} \qquad (1)$$

แสดงว่าเป็นสมการเส้นตรง เมื่อนำมา plot graph Qo vs Fx

จะได้ slope = Qx - Qy intercept = Qy

3. จะหา absolute weight ของ component x และ y ได้จาก

ที่ $\lambda 3$, $A(total) = a4.b.Cx + a4.b.Cy$

$$= a4\,(Cx + Cy)$$

$$\frac{A3}{a4} = Cx + Cy$$

และจากสมการที่ 1 $$Fx = \frac{Qo - Qy}{Qx - Qy}$$

เพราะว่า $$Cx = Fx\,(Cx + Cy)$$

แทนค่าจะได้ $$Cx = \frac{Qo - Qy}{Qx - Qy} \cdot \frac{A3}{a4}$$

หรือ $$\boxed{Cx = \frac{Qo - \text{intercept}}{\text{slope}} \cdot \frac{A3}{a4}} \qquad (2)$$

เมื่อ Cx = ความเข้มข้นของ component x (g/l)

A3 = total absorbance ที่ isoabsorptive point

a4 = absorptivity ที่ isoabsorptive point

หรืออาจจะหาค่าจาก graph เส้นตรงได้ โดยนำ mixture ไปวัด absorbance หา Qo ได้ค่า Fx ไปแทนในสมการ

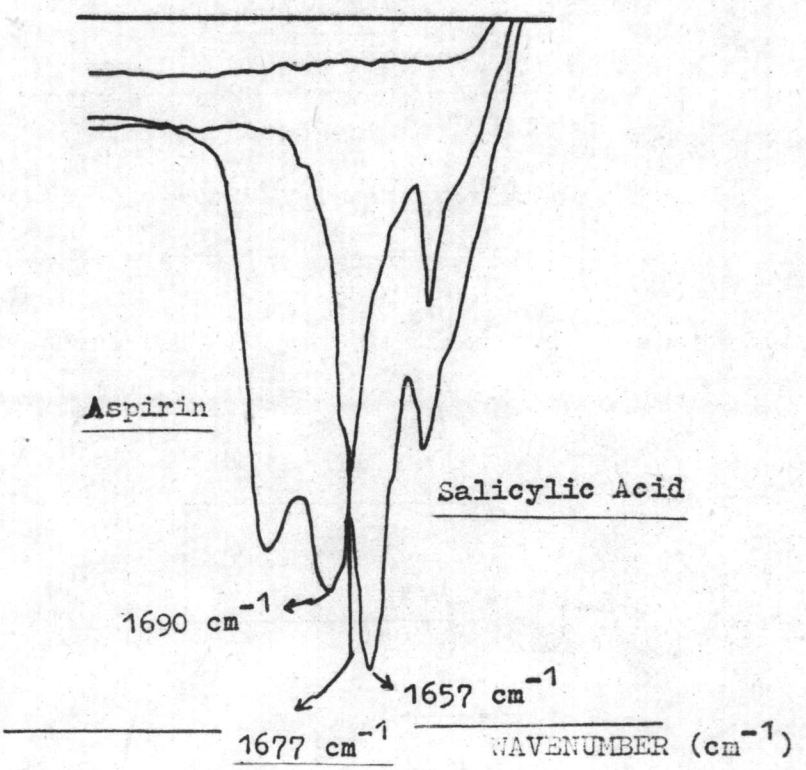
$$Cx = Fx \cdot (Cx + Cy)$$

$$\boxed{Cx = Fx \cdot \frac{A3}{a4}} \qquad (3)$$

Preparation of Q-curve for the mixture of Aspirin and Salicylic Acid

1. Frequency or wavenumber of isoabsorptive point

ชั่งแอสไพริน จำนวน 500 mg. ใส่ volumetric flask ขนาด 25 ml. ละลายด้วย chloroform ให้ครบปริมาตร นำไป run IR Spectrophotometer เช่นเดียวกับ method of measurement ในการทำ calibration curve แล้วชั่งกรดซาลิไซลิก จำนวน 500 mg. ใส่ volumetric flask ขนาด 25 ml. ละลายด้วย chloroform ให้ครบปริมาตร นำไป run IR บนกระดาษแผ่นเดียวกัน สภาพใน – การ run เหมือนกันทุกประการกับ แอสไพริน จะได้ isoabsorptive point ดังแสดงในรูป



Isoabsorptive point of standard aspirin and salicylic acid solution in the same concentration.

2. Q-curve of Aspirin and Salicylic Acid

ชั่งแอสไพริน จำนวน 500 mg. ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml. อันที่ 1

แอสไพริน 400mg และกรดซาลิไซลิก 100 mg ใส่ใน flask อันที่ 2
แอสไพริน 300 mg และกรดซาลิไซลิก 200 mg ใส่ใน flask อันที่ 3
แอสไพริน 200 mg และกรดซาลิไซลิก 300 mg ใส่ใน flask อันที่ 4
แอสไพริน 100 mg และกรดซาลิไซลิก 400 mg ใส่ใน flask อันที่ 5

และกรดซาลิไซลิก จำนวน 500 mg. ใส่ใน flask อันที่ 6 นำแต่ละ flask มาละลายด้วย chloroform ให้ครบปริมาตร นำไปอ่าน IR Spectrophotometer เช่นเดียวกับ method of measurement ในการทำ calibration curve แล้ววัดค่า absorbance ที่ maximum absorption ของกรดซาลิไซลิก ที่ 1657 cm^{-1} ที่ isoabsorptive point ที่ 1677 cm^{-1} นำค่าที่ได้มาหาค่า Q $\frac{1657}{1677}$ นำไป plot graph กับความเข้มข้นของกรดซาลิไซลิก curve ที่ได้เรียกว่า Q-curve

การทำ Q - curve อาจจะทำได้อีก 2 แห่งโดยเลือก maximum absorption ของแอสไพริน ที่ 1750 และ 1690 cm^{-1} เทียบเป็น ratio กับ isoabsorptive point ที่ 1677 cm^{-1} แล้วนำมา plot graph เช่นเดียวกัน ได้ผล ตามรูป 5

Percentage recovery for the Assay of a Mixture of Aspirin and Salicylic Acid by Infrared Spectrophotometry using Q - Analysis Method

ชั่งแอสไพริน จำนวน 200 mg. และกรดซาลิไซลิก จำนวน 300 mg. ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml. ทั้งหมด 4 ใบ แล้วชั่งแอสไพริน อีกจำนวน 125 mg. เติมลงไปใน flask ทั้ง 4 นำแต่ละ flask มาละลายด้วย chloroform ให้ครบปริมาตร แล้วนำไป run IR Spectrophotometer เช่นเดียวกับ

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

method of measurement ในการทำ calibration curve จาก spectrum หา absorbanec ratio ที่ 1657 cm^{-1} และ 1677 cm^{-1} แล้วนำค่า Q_o ไปหาปริมาณของแอสไพริน จากQ - curve ก็จะได้จำนวน % แอสไพริน เทียบปริมาณของสารผสมทั้งหมด จะได้จำนวน % ของแอสไพริน

ชั่ง กรดซาลิไซลิก จำนวน 200 mg. และแอสไพริน 300 mg. ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 ml. ทั้งหมด 4 ใบ แล้วชั่งกรดซาลิไซลิก อีกจำนวน 250 mg. เติมลงไปใน flask ทั้ง 4 นำแต่ละ flask มาละลายด้วย Chloroform ให้ครบปริมาตรแล้วนำไป Run IR Spectrophotometer เช่นเดียวกับ method of measurement ในการทำ calibration curve จาก spectrum หาabsorbance ratio ที่ 1657 cm^{-1} และ 1677 cm^{-1} นำไปหาปริมาณ ของกรดซาลิไซลิก จาก Q - curve เช่นเดียวกับการหาปริมาณแอสไพริน ได้ผลตามตาราง ที่ 7

Comparison of Aspirin Tablet Assay by Infrared Spectrophotometry Method and Official Method

% Labeled Amount of Aspirin and the Amount of Salicylic

ชั่ง ยาเม็ดแอสไพรินมา20 เม็ด บดให้ละเอียด แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปตามวิธี BP 1973 ซึ่งมีมาตรฐานของปริมาณแอสไพรินเท่ากับ 95.0 - 105 % โดยชั่งผงยามาให้มี แอสไพริน ประมาณ 500 mg. ใส่ใน conical flask ขนาด 250 ml. แล้วเติม 0.5 N Sodium hydroxide solution 30 ml. นำไปต้มให้เดือด 10 นาที แล้วทิ้งให้เย็น titrate ด่างที่เหลือด้วย 0.5 N hydrochloric Acid ใช้ phenol red solution เป็น indicator นำ blank หาจำนวนของด่างที่ทำปฏิกริยาพอดีกับแอสไพรินจะได้ 1 ml. ของ 0.5 N sodium hydroxide solution = แอสไพริน 45.04 mg. ทำ duplicate ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง

การทดสอบปริมาณกรดซาลิไซลิก โดยชั่งผงยามาให้มี แอสไพริน อยู่ 400 mg.

ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 ml. เติม alcohol (95 %)4 ml.เขย่าแล้ว เจือจางด้วยน้ำให้ครบปริมาตร กรองทันที แล้วเท filtrate 50 ml. ใส่ Nessler cylinder เติม 1 ml.acid ferric ammonnium sulfate solution เขย่าตั้งทิ้งไว้อีก 1 นาที เปรียบเทียบความเข้มของสีม่วงที่เกิดขึ้นกับ Nessler cylinder อันที่ 2 ที่ประกอบด้วย 1 ml. ของ acid ferric ammonium sulfate solution 3 ml.freshly prepared 0.01 % w/v solution ของกรดซาลิไซลิก 2 ml. alcohol (95 %) แล้วเติมน้ำให้ครบ50 ml.

ส่วนที่ 2 นำไปทำตาม IR method โดยชั่งผงยามาให้มี แอสไพรินประมาณ 1000mg.ใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 ml เติม chloroform ประมาณ30 ml. เขย่า 5 – 10 นาที แล้วเติมต่อไปจนครบปริมาตร นำ filtrate ที่เหลือไป run IR. Spectrophotometry เช่นเดียวกับ method of measurement ในการทำ calibration curve นำ spectrum มาวัดค่า absorbance ที่ 1750, 1677 และ 1657cm^{-1} นำไปคำนวณหาปริมาณของ กรดซาลิไซลิค จาก Q - curve ซึ่งจะได้ค่าปริมาณของกรดซาลิไซลิคออกมาเป็น% ความเข้มข้นในสารผสม และเนื่องจากทราบปริมาณของแอสไพรินแล้ว ก็สามารถคำนวณหาปริมาณของกรดซาลิไซลิคได้ ทำ duplicate ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ผลที่ได้จากการหาปริมาณของ แอสไพริน และ กรดซาลิไซลิคตาม BP และ IR method นำไปคำนวณหา % labeled amount ของแอสไพรินตามตารางที่ 8

% Recovery of Aspirin for Aspirin Tablet by Infrared Spectrophotometer Method and Official Method

ชั่งยาเม็ดแอสไพริน 20 เม็ด บดให้ละเอียดแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำมาทำตามวิธี BP 1973 โดยชั่งผงยามาให้มีแอสไพรินประมาณ 250 mg. (ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์หาจำนวนแอสไพรินที่แน่นอนไว้แล้ว) ใส่ใน conical flask ขนาด 250 ml. แล้วชั่งแอสไพรินจำนวนแน่นอนประมาณ 250 mg. ใส่ใน flask แรก เติม 0.5 N sodium hydro-

xide solution 30 ml. นำไปต้มให้เดือด 10 นาที แล้วทิ้งให้เย็น titrate ด่างที่เหลือด้วย 0.5 N hydrochloric acid โดยใช้ phenol red solution เป็น indicator ทำ blank หาจำนวนด่างที่ทำปฏิกริยาพอดีกับแอสไพรินจะได้ 1 ml. ของ 0.5 N sodium hydroxide solution เท่ากับแอสไพริน 45.04mg. แล้วคำนวณหา % recovery ทำ duplicate ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง

ส่วนที่ 2 นำมาทำตามวิธี IR โดยชั่งผงยามาให้มีแอสไพรินประมาณ 1000 mg. ใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 ละลายด้วย chloroform จนครบปริมาตร กรอง filtrate 5 ml.แรกทิ้งไป แล้วชั่งแอสไพรินมาตรฐานประมาณ 125 mg. ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml. ละลายด้วย filtrate ครั้งแรกจนครบปริมาตรนำ filtrate ทั้งสองไป run IR เช่นเดียวกับ method of measurement ในการทำ calibration curve แล้ววัด absorbance ที่ 1750 cm^{-1} นำไปคำนวณหาปริมาณแอสไพริน จาก $\frac{Au}{As} = \frac{Cu}{Cs}$ คิดเป็น % recovery ทำ duplicate ใช้ 4 ตัวอย่าง เช่นเดียวกับวิธี BP 1973 ได้ผลตามตารางที่ 9