การวิเคราะห์หาปริมาณเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ และบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตในยาเม็ดสูตรผสม โดยอัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี

Simultaneous Determination of Phenylephrine Hydrochloride and Brompheniramine Maleate Tablets by Uv Spectroscopy

วิชาญ จันทร์วิทยานุชิต*
เพ็ญพรรณ อัศวกุล**

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาสูตรผสมบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต และเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ในรูปแบบยาเม็ด และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคอัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปีใช้วิธี simultaneous equation method พบค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตสูงสุดของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต และเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ที่ความยาวคลื่น (λ_{max}) 261.5 และ 272.9 นาโนเมตรตามลำดับ สารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตในช่วงความเข้มข้น 20-60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ในช่วงความเข้มข้น 40-120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าว ในการประเมินความแม่นของวิธีวิเคราะห์พบว่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์มีค่าเฉลี่ย 97.7 และ 102.2 ตามลำดับ การทดสอบความเที่ยงพบว่า เปอร์เซ็นต์ความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในวันเดียวกัน และต่างวันของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตมีค่าเฉลี่ย 0.57 และ 0.94 ตามลำดับ และของเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์มีค่าเฉลี่ย 0.61และ 0.63 ตามลำดับ ในการวิจัยนี้พบว่าการใช้วิธี simultaneous equation method ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องมากกว่าการวิเคราะห์โดยใช้สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1และ 2 วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว มีความถูกต้องเที่ยงตรง ประหยัด และสามารถนำไปใช้วิเคราะห์ยาเม็ดสูตรผสมที่มีบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์เป็นองค์ประกอบได้

* ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
** อาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

คำสำคัญ: การวิเคราะห์ เฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ บรอมเฟนิรามีนมาลีเอต ยาเม็ดสูตรผสม อัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี

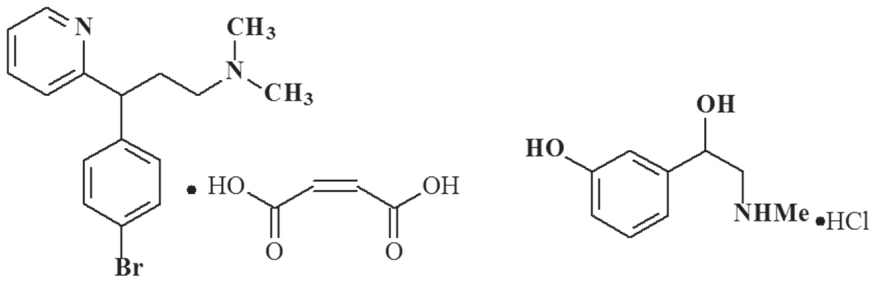
Abstract

The purpose of this study was to develop a simultaneous determination of brompheniramine maleate and phenylephrine hydrochloride in tablet dosage form using UV-spectroscopic technique. The methods were validated with respect to linearity, accuracy and precision. The UV-spectrophotometric method was based on simultaneous equation method which involved the formation and solving of simultaneous equation at 261.5 and 272.9 nm, as absorbance maxima of brompheniramine maleate and phenylephrine hydrochloride, respectively. The calibration curve of brompheniramine maleate was linear at 261.5 and 272.9 nm over the concentration range of 20-60 g/mL and the calibration curve of phenylephrine hydrochloride was linear at the same wavelengths between 40-120 g/mL. The mean percentage recoveries were 97.7 and 102.2 for brompheniramine maleate and phenylephrine hydrochloride respectively. The %RSD values of intra-day and inter-day precision were 0.57 and 0.94 for brompheniramine maleate, respectively and the %RSD values of that of phenylephrine hydrochloride were 0.61 and 0.63 respectively. The determinations using first and second derivative UV-spectrophotometric techniques were also investigated and the results showed that the simultaneous equation method was found to be more accurate and reproducible. The developed method was simple, rapid, precise, accurate, economical and suitable for simultaneous determination of brompheniramine maleate and phenylephrine hydrochloride combined tablets.

Keywords: Simultaneous determination, phenylephrine hydrochloride, brompheniramine maleate, tablets, UV spectroscopy

บทนำ

เฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ (phenylephrine hydrochloride) เป็นยาที่มีฤทธิ์ทำให้เส้นเลือดหดตัว ส่วนบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต (brompheniramine maleate) เป็นยาต้านฮิสตามีน ออกฤทธิ์โดยป้องกันผลของสารที่เรียกว่า ฮิสตามีน (histamine) ซึ่งถูกสร้างขึ้นภายในร่างกาย ฮิสตามีนทำให้เกิดอาการคัน จาม น้ำมูกหรือน้ำตาไหล ยาสูตรผสมที่มีตัวยา 2 ชนิดดังกล่าวเป็นองค์ประกอบเป็นยาที่นำมาใช้บรรเทาอาการคัดจมูก บรรเทาน้ำมูกไหล อาการคันจากการแพ้ ในรูปแบบต่างๆ เช่น ยาเม็ด ยาแคปซูล ยาน้ำเชื่อม ยาหยอดจมูก ทั้งเป็นยาเดี่ยวและยาสูตรผสม เป็นต้น



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์และบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต

มีรายงานการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ โดยใช้เทคนิคและวิธีการหลากหลาย เช่น การวิเคราะห์ด้วยวิธี UV spectrophotometry (Ahmed and Amin. 2007 : 84-7 ; Collado et al. 2000 : 909-20 ; Erk. 2000 : 1023-31 ; Khoshayand et al. 2010 : 292-7; Rocha et al. 2002 : 875-8 ; Savic et al. 2008 : 261-4 ; Shama. 2002 : 1385-92) การวิเคราะห์ด้วยวิธี spectrofluorometry (Juan et al. 2000 : 159-68) วิเคราะห์ด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี ได้แก่ high-performance liquid chromatography (Erk and Kartal. 1998 : 617-22 ; De Beer, Vandenbroucke and Massart. 1994 : 1379-89 ; Galmier et al. 2000 : 202-4 ; Marin et al. 2002 : 701-14 ; Okamura et al. 1999 : 363-72 ; Olmo et al. 2005 : 159-65), micellar electrokinetic chromatography (Gil-Agusti et al. 2001 : 621-30 ; Maria and Arroyo. 2003: 947-52) และ Capillary Zone Electrophoresis (Marin and Barbas. 2004 : 769-77 ; Wang, Sun and Sun. 1966 : 295-14) เป็นต้น มีการพัฒนาวิเคราะห์ยาบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต โดยใช้เทคนิคและวิธีการวิเคราะห์อื่นๆ เช่น Gas-liquid Chromatography (Robert et al. 1968 : 1246-50) นอกจากนี้ มีรายงานการพัฒนาวิธีการ

วิเคราะห์ยาสูตรผสมที่มีตัวยามากกว่า 2 ชนิดที่มีตัวยาเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์และบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตผสมอยู่ ด้วยวิธี HPLC (Ghanekar and Das Gupta. 1978 : 873-4 ; Zhao. 2005 : 167-8) แนวทางการวิเคราะห์ยาสูตรผสมดังกล่าวสามารถทำได้หลายวิธีเช่น ใช้วิธีการทาง สเปกโทรสโกปี (Spectroscopy) และ HPLC โดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิเคราะห์ด้วย HPLC เป็นวิธีที่นิยมใช้มาก เนื่องจากสามารถใช้วิเคราะห์ยาสูตรผสมได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ด้วย HPLC เป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายสูง ใช้เวลานาน และใช้สารเคมีปริมาณมาก

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาสูตรผสมด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี (Ultraviolet Spectroscopy) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็วและประหยัดค่าใช้จ่าย เพื่อเป็นทางเลือกในการนำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์ยาสูตรผสมรูปแบบต่างๆ ตามความเหมาะสม

สารเคมีและเครื่องมือ สารมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและสารมาตรฐานเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ (Siam Bheasach Co.,Ltd. Bangkok Thailand) Nasotapp® tablets (เฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ 10 มิลลิกรัม บรอมเฟนิรามีนมาลีเอต 4 มิลลิกรัม lot. 12A047)

เครื่องมือ UV-VIS spectrophotometer JASCO V630

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (Standard Stock Solution) ชั่งสารมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ อย่างละ 0.2000 กรัม ในขวดวัดปริมาตร (Volumetric Flask) 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ

การเตรียมสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต เตรียมสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น โดยนำไปเจือจางด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้น 20, 30, 40, 50, และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) และหาค่าความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตสูงสุด (λ_{max})

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ เตรียมสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น โดยนำไปเจือจางด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้น 40, 50, 60, 80, 100, และ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงและหาค่า λ_{max}

การเตรียมสารละลายตัวอย่างยา ชั่งตัวอย่างผงยาให้มีปริมาณเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ 20 มิลลิกรัมและบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต 8 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปแช่ใน ultrasonic bath 5 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำ กรองสารละลายผ่านแผ่นกรองขนาด

0.45 ไมครอน ปิเปตสารละลายยา 25.0 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ความเป็นเส้นตรง (Linearity) นำสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตในช่วงความเข้มข้น 20 ถึง 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ในช่วงความเข้มข้น 40 ถึง 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ λ_{max} หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นและหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient, r)

ความเที่ยง (Precision) ทำการทดสอบความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (Intra-day Precision) และความเที่ยงต่างวันกัน (Inter-day Precision) โดยผสมสารละลายตัวอย่างยากับสารละลายมาตรฐานผสมบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้นของยาผสมบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ 80, 100, 120 เปอร์เซ็นต์ที่ระบุบนฉลาก ระดับละ 3 ซ้ำ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD)

ความแม่น (Accuracy) ทดสอบโดยวิธีการเติมสารมาตรฐาน (Standard Addition) โดยผสมสารละลายตัวอย่างยากับสารละลายมาตรฐานผสมบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นของยาผสมบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ 80, 100, 120 เปอร์เซ็นต์ที่ระบุบนฉลาก ระดับละ 3 ซ้ำ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืน (% Recovery)

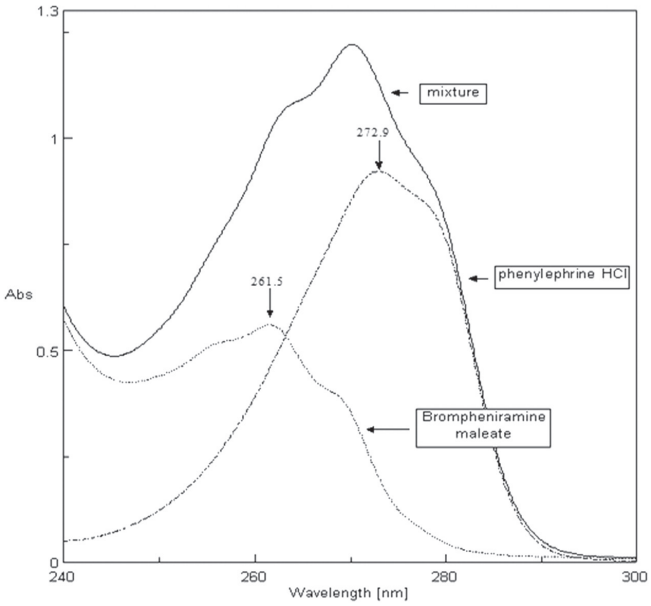
การวิเคราะห์หาปริมาณบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ในยาเม็ด ชั่งตัวอย่างผงยาให้มีปริมาณ เฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ 10 มิลลิกรัม และบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต 4 มิลลิกรัม (เทียบเท่ากับยา 1 เม็ด) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปแช่ใน ultrasonic bath 5 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำ กรองสารละลายผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การพัฒนาการวิเคราะห์ในที่นี้ใช้ 3 วิธี คือ Simultaneous Equation Method, สเปกตรัม (Spectrum) อนุพันธ์อันดับที่ 1 และสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 2

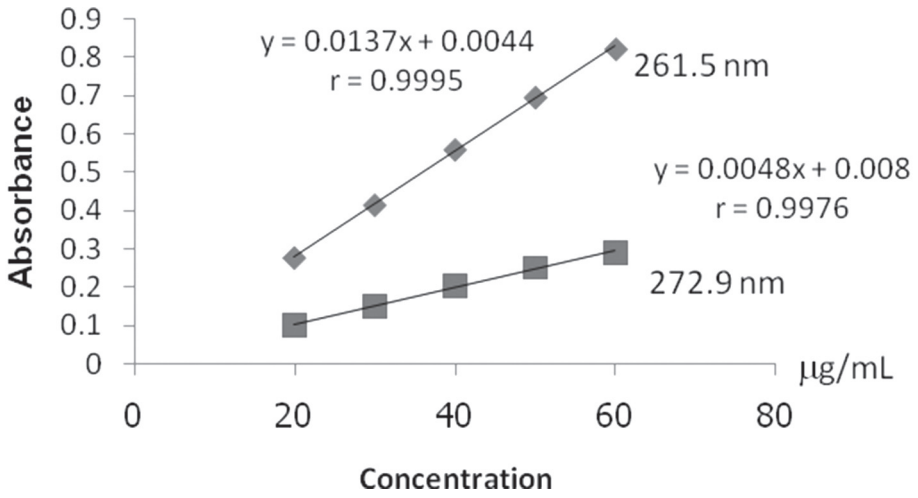
วิธีที่ 1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยวิธี Simultaneous Equation Method

เมื่อนำสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตสูงสุดของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์อยู่ที่ 261.5 นาโนเมตร และ 272.9 นาโนเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 2)

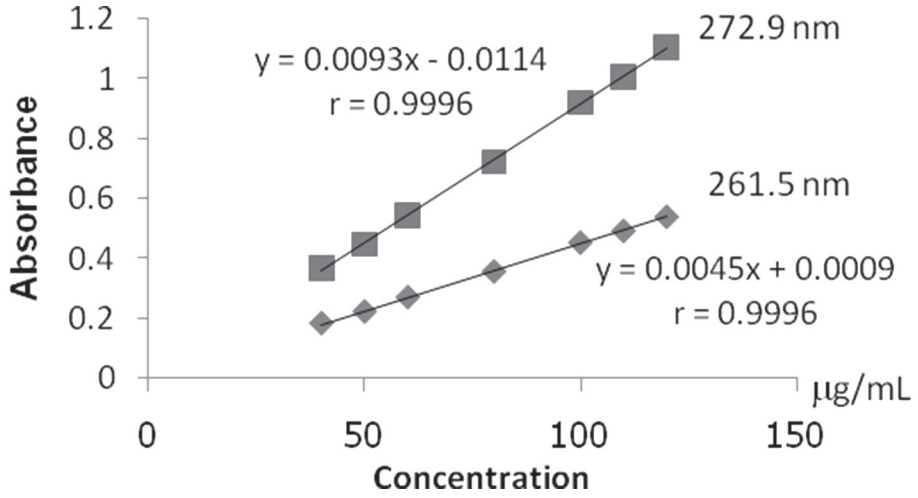


รูปที่ 2 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตในน้ำและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ในน้ำ

เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 261.5 นาโนเมตรกับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต เป็นไปตามสมการ y = 0.0137x + 0.0044 และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9995 และความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272.9 นาโนเมตร กับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต เป็นไปตามสมการ y = 0.0048x + 0.008 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9976 (รูปที่ 3) แสดงว่า ในช่วงความเข้มข้น 20-60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับค่าการดูดกลืนแสง ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 261.5 นาโนเมตร กับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ เป็นไปตามสมการ y = 0.0045x + 0.0009 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9996 และความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272.9 นาโนเมตรกับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ เป็นไปตามสมการ y = 0.0093x - 0.0114 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9996 (รูปที่ 4) แสดงว่า ในช่วงความเข้มข้น 40-120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับค่าการดูดกลืนแสงเช่นเดียวกัน ค่าเฉลี่ยสภาพการดูดกลืนแสง (absorptivity) ของยาทั้ง 2 ชนิด แสดงดังตารางที่ 1



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 261.5 และ 272.9 นาโนเมตรและความเข้มข้นของสารละลายบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตในน้ำ



รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 261.5 และ 272.9 นาโนเมตรและความเข้มข้นของสารละลายเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ในน้ำ

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยสภาพการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน		สภาพการดูดกลืนแสง mL/mg.cm	
		265.1 nm	272.9 nm
บรอมเฟนิรามีนมาลีเอต	ค่าเฉลี่ย (n= 5)	13.9	5
	SD	0.1	0.1
เฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์	ค่าเฉลี่ย (n= 6)	4.5	9.1
	SD	0.05	0.1

การคำนวณหาความเข้มข้นของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ด้วยวิธี simultaneous equation method หาได้จากสูตรต่อไปนี้

$$C_{BPM} = (A1ay2 - A2ay1) / (ax1ay2 - ax2ay1)$$

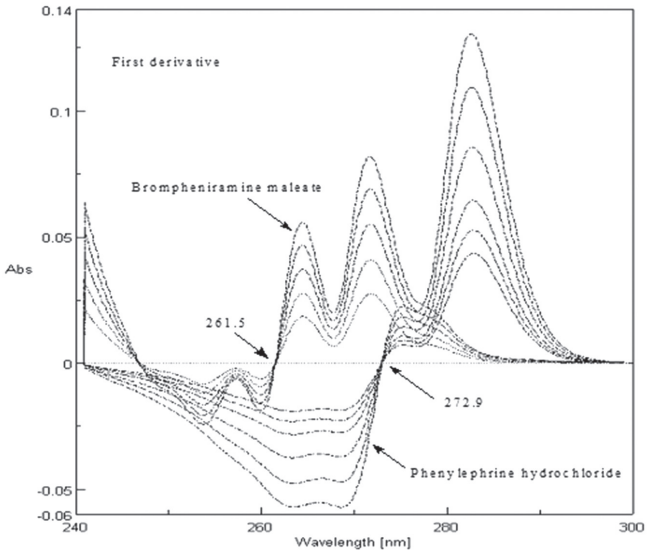
$$C_{PEH} = (A2ax1 - A1ax2) / (ax1ay2 - ax2ay1)$$

(C_{BPM} = ความเข้มข้นของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต, C_{PEH}= ความเข้มข้นของเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์, A1 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 261.5 นาโนเมตร, A2 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 272.9 นาโนเมตร, ax1 = ค่าสภาพการดูดกลืนแสงของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตที่ความยาวคลื่น 261.5 นาโนเมตร, ax2 = ค่าสภาพการดูดกลืนแสงของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตที่ความยาวคลื่น 272.9 นาโนเมตร, ay1 = ค่าสภาพการดูดกลืนแสงของเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ที่ความยาวคลื่น 261.5 นาโนเมตร, ay2 = ค่าสภาพการดูดกลืนแสงของเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ที่ความยาวคลื่น 272.9 นาโนเมตร)

วิธีที่ 2 การวิเคราะห์โดยวิธีการใช้สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1

นำสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ แปลงเป็นสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 โดยใช้ Savitzky-Golay algorithm และใช้ $\Delta\lambda$ เท่ากับ 15 points มาซ้อนทับกัน พบว่า สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 ของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีน มาลีเอต มีจุดผ่านศูนย์ (zero crossing) ที่ความยาวคลื่น 261.5 นาโนเมตร และ สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 ของสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอฟริน ไฮโดรคลอไรด์ มีจุดผ่านศูนย์ที่ความยาวคลื่น 272.9 นาโนเมตร (รูปที่ 5) ซึ่ง

สามารถนำมาใช้หาปริมาณของสารละลายบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและสารละลายเฟนิล-เอฟรินไฮโดรคลอไรด์ได้โดยตรง โดยการสร้างกราฟมาตรฐานหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าอนุพันธ์อันดับที่ 1 กับความเข้มข้นของสารละลายบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและสารละลายเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ที่ความยาวคลื่น 261.5 และ 272.9 นาโนเมตร พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตกับค่าอนุพันธ์อันดับที่ 1 ที่ความยาวคลื่น 272.9 นาโนเมตร เป็นไปตามสมการ y = 0.0012x + 0.0012 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9993 และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์กับค่าอนุพันธ์อันดับที่ 1 ที่ความยาวคลื่น 261.5 นาโนเมตร เป็นไปตามสมการ y = 0.004x - 0.002 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9997

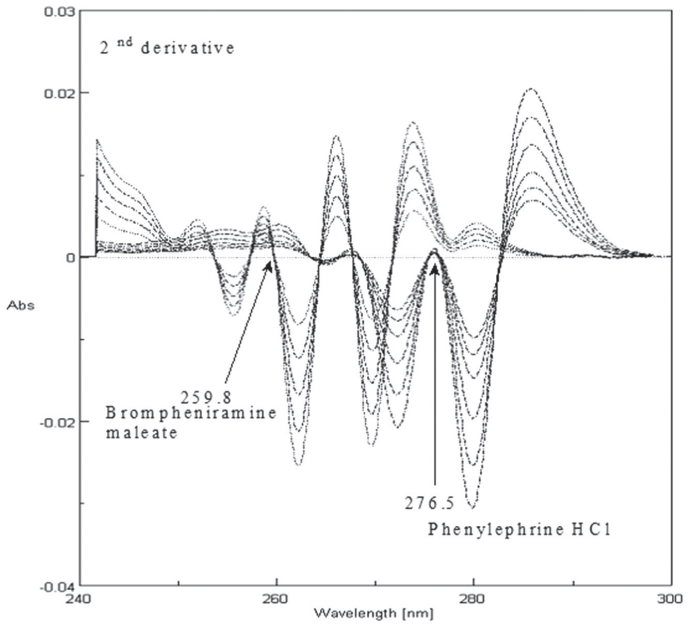


รูปที่ 5 สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 ของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตในน้ำ (ความเข้มข้น 20, 30, 40, 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารละลายมาตรฐานของเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ในน้ำ (ความเข้มข้น 40, 50, 60, 80, 100 และ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

วิธีที่ 3 การวิเคราะห์โดยใช้สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 2

สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 2 ของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต มีจุดผ่านศูนย์ที่ความยาวคลื่น 259.8 นาโนเมตร และสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 2 ของสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ มีจุดผ่านศูนย์ที่ความยาวคลื่น 276.5 นาโนเมตร ดังรูปที่ 6 ซึ่งสามารถนำมาใช้หาปริมาณของยาทั้ง 2 ได้โดยตรง โดยการสร้างกราฟมาตรฐานหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตกับค่าอนุพันธ์

อันดับที่ 2 ที่ความยาวคลื่น 276.5 นาโนเมตร เป็นไปตามสมการ y = 0.00007x + 0.00034 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9959 และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์กับค่าอนุพันธ์อันดับที่ 2 ที่ความยาวคลื่น 259.8 นาโนเมตร เป็นไปตามสมการ y = 0.0003x - 0.0001 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9986



รูปที่ 6 สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 2 ของสารละลายมาตรฐานบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตในน้ำ (ความเข้มข้น 20, 30, 40, 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารละลายมาตรฐานของเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ในน้ำ (ความเข้มข้น 40, 50, 60, 80, 100 และ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ความเป็นเส้นตรง จากการทดสอบวิธีการวิเคราะห์ทั้ง 3 วิธี พบว่า ความเข้มข้นในช่วง 20-60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและความเข้มข้นในช่วง 40-120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 261.5 นาโนเมตร และ 272.9 นาโนเมตร

การทดสอบความเที่ยง ในการประเมินความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ พิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ จากข้อมูลตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบความเที่ยงภายในวันเดียวกันและต่างวันกันของการวิเคราะห์วิธีที่ 1 simultaneous equation

method พบว่า เปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันมีค่าเฉลี่ย 0.57 และ 0.61 ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์ต่างวันกัน 3 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ มีค่าเฉลี่ย 0.94 และ 0.63 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

การทดสอบความแม่น ในการประเมินความแม่นของวิธีวิเคราะห์ พิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การกลับคืน จากข้อมูลตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ของการวิเคราะห์ 3 วิธี พบว่า วิธีที่ 1 มีความแม่นดีที่สุด โดยเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 97.7 และ 102.2 ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์วิธีที่ 2 และ 3 มีความแม่นค่อนข้างต่ำ จึงเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ไม่เหมาะสม

จากรายงานการวิจัยของ Ghanekar และคณะ (1978) ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ยาสูตรผสมที่มีตัวยา 3 ชนิดคือเฟนิลโพรพาโนลามีน (Phenylpropanolamine) บรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์เป็นองค์ประกอบด้วยวิธี HPLC โดยใช้ 1-heptanesulfonic acid เป็นเคาท์เตอร์ไอออน (Counterion) พบว่า เป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถตรวจสอบยาทั้ง 3 ชนิดได้ในปริมาณที่ต่ำกว่า 1 ไมโครกรัม และ Zhao Xue-Mei (2005) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาผสมที่มีตัวยา 5 ชนิดโดยวิธี HPLC เช่นเดียวกัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ในยาผสมนั้นมีค่า 99.8 และ 99.7 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลต-สเปกโทรสโกปีที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้นจะมีความไวและความแม่นต่ำกว่า แต่เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว ประหยัดและมีความถูกต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 2 การทดสอบความเที่ยงในวันเดียวกันและต่างวันกันของการวิเคราะห์วิธีที่ 1

ความเที่ยง / ตัวยา	ความเที่ยงในวันเดียวกัน			ความเที่ยงต่างวันกัน								
				วันที่ 1			วันที่ 2			วันที่ 3		
	ปริมาณที่เติม (µmg/mL)	ปริมาณที่พบ (µmg/mL)	% RSD	ปริมาณที่เติม (µmg/mL)	ปริมาณที่พบ (µmg/mL)	% RSD	ปริมาณที่เติม (µmg/mL)	ปริมาณที่พบ (µmg/mL)	% RSD	ปริมาณที่เติม (µmg/mL)	ปริมาณที่พบ (µmg/mL)	% RSD
บรอมเฟนิรามีนมาลีเอต (n=3)	32	31.5	0.48	32	31.5	0.61	32	31.6	0.98	32	31.4	1.32
	40	39.4	0.30	40	39.1	0.71	40	39.4	0.63	40	39.3	1.49
	48	46.2	0.94	48	47.0	0.72	48	46.8	1.58	48	47.0	0.44
ค่าเฉลี่ย	0.57			0.94								
เฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ (n=3)	80	80.5	0.57	80	80.7	0.73	80	80.8	0.57	80	80.7	0.89
	100	102.0	0.89	100	101.8	0.93	100	101.6	0.79	100	101.3	0.47
	120	125.0	0.38	120	124,3	0.50	120	124.5	0.46	120	124.4	0.32
ค่าเฉลี่ย	0.61			0.63								

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์

วิธีวิเคราะห์ / ตัวยา	วิธีที่ 1			วิธีที่ 2			วิธีที่ 3		
	ปริมาณที่เติม (µmg/mL)	ปริมาณที่พบ (µmg/mL)	% การกลับคืน	ปริมาณที่เติม (µmg/mL)	ปริมาณที่พบ (µmg/mL)	% การกลับคืน	ปริมาณที่เติม (µmg/mL)	ปริมาณที่พบ (µmg/mL)	% การกลับคืน
บรอมเฟนิรามีนมาลีเอต(n=3)	32	31.5	98.4	32	33.2	103.8	32	31.7	99.1
	40	39.4	98.5	40	43.6	109	40	40.0	100
	48	46.2	96.3	48	55.0	114.6	48	49.5	103.1
ค่าเฉลี่ย			97.7			109.1			100.4
%RSD			1.1			3.7			13.0
เฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ (n=3)	80	80.5	100.6	80	95.40	119.3	80	107.1	133.9
	100	101.9	101.9	100	122.5	122.5	100	144.4	144.4
	120	124.9	104.1	120	153.1	127.6	120	196.8	164
ค่าเฉลี่ย			102.2			123.1			147.4
%RSD			1.6			3.0			8.8

การวิเคราะห์หาปริมาณบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ในยาเม็ด ในการวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วย Simultaneous Equation Method ในการวิเคราะห์ตัวอย่างยา Nasotapp tablets ได้ผลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ ในยาเม็ดด้วยวิธี Simultaneous Equation Method

ตัวอย่างยา	Nasotapp® Tablets			
	บรอมเฟนิรามีนมาลีเอต		เฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์	
	น้ำหนัก/เม็ด (มิลลิกรัม)	เปอร์เซ็นต์ที่ระบุบนฉลาก (% L.A.)	น้ำหนัก/เม็ด(มิลลิกรัม)	เปอร์เซ็นต์ที่ระบุบนฉลาก (% L.A.)
1	4.12	103.0	10.45	104.5
2	4.20	105.0	10.39	103.9
3	4.17	104.2	10.22	102.2
ค่าเฉลี่ย	4.16	104.1	10.35	103.5
% RSD.		0.97		1.15

จากผลการวิเคราะห์ พบว่า ในยา 1 เม็ด ตรวจพบปริมาณบรอมเฟนิรามีนมาลีเอต 4.16 มิลลิกรัมหรือเทียบเท่า 104.1% ของปริมาณที่ระบุบนฉลาก (% LA.) และ พบเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์ 10.35 มิลลิกรัม หรือเทียบเท่ากับ 103.5 % ของปริมาณที่ระบุบนฉลาก โดยมีความเที่ยงเท่ากับ 0.97 และ 1.15 ตามลำดับ

สรุปผลการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยมุ่งพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาสูตรผสมในรูปแบบยาเม็ดโดยใช้ยาเม็ดสูตรผสมเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์และบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตเป็นยาตัวอย่าง ซึ่งการวิจัยนี้ใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยอัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี โดยแบ่งออกเป็น 3 วิธี คือ การวิเคราะห์โดย Simultaneous Equation Method การวิเคราะห์โดยวิธีการใช้สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 และสเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 2 การวิเคราะห์โดย Simultaneous Equation Method พบค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตสูงสุดของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตและเฟนิล-เอฟรินไฮโดรคลอไรด์ที่ 261.5 นาโนเมตร และ 272.9 นาโนเมตร ตามลำดับ ในการประเมินความแม่นของวิธีวิเคราะห์ พบว่า เปอร์เซ็นต์

การกลับคืนของบรอมเฟนิรามีนมาลีเอตมีค่าเฉลี่ย 97.7 และเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของเฟนิลเอฟรินไฮโดรคลอไรด์มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 102.2 วิธีวิเคราะห์ดังกล่าวเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว ประหยัดและมีความถูกต้อง สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ตัวยาในตำรับยาเม็ดได้ ส่วนการวิเคราะห์โดยใช้สเปกตรัมอนุพันธ์อันดับที่ 1 และอันดับที่ 2 ให้ผลการทดสอบความแม่นและความเที่ยงค่อนข้างต่ำซึ่งอาจเกิดจากมีสารที่รบกวนการวิเคราะห์ผสมอยู่ในยาเม็ดดังกล่าว ดังนั้น จึงไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ยาในตำรับนี้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบริษัทสยามฟาร์มาซูติคอล จำกัด ที่เอื้อเฟื้อสารมาตรฐานเพื่อการวิจัย และมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Ahmed, I. S. and Amin, A. S. (2007) "Spectrophotometric microdetermination of phenylephrine hydrochloride in pure pharmaceutical formulations using haematoxylin" **J Molecul Liq.** 130: 84–87

Collado, M. S. et al (2000) "Simultaneous spectrophotometric-multivariate calibration determination of several components of ophthalmic solutions: phenylephrine, chloramphenicol, antipyrine, methylparaben and thimerosal" **Talanta** 52: 909–920.

De Beer, J. O. Vandenbroucke, C. V. and Massart, D. L. (1994) "Experimental design for the rapid selection of separation conditions for methyl and propyl parahydroxybenzoate, phenylephrine hydrochloride and chlorpheniramine maleate by ion-pair liquid chromatography" **J Pharm Biomed Anal.** 12: 1379–1389

Erk, N. (2000) "Quantitative analysis of chlorpheniramine maleate and phenylephrine hydrochloride in nasal drops by differential-derivative spectrophotometric, zero-crossing first UV spectrophotometric and absorbance ratio methods" **J Pharm Biomed Anal.** 23: 1023–1031.

Erk, N. and Kartal, M. (1998) "Simultaneous high performance liquid chromatographic and derivative ratio spectra spectrophotometric determination of chlorpheniramine maleate and phenylephrine hydrochloride" **Farmaco.** 53: 617–622

Galmier, M. J. et al. (2000) "High-performance liquid chromatographic determination of phenylephrine and tropicamide in human aqueous humor" **Biomed Chromatogr.** 14: 202–204

Ghanekar, A. G. and Das Gupta, V. (1978) "Quantitative determinations of two decongestants and an antihistamine in combination using paired ion high-pressure liquid chromatography" **J Pharm Sci.** 67(6): 873-4.

Gil-Agusti, M. et al. (2001) "Determination of active ingredients in cough-cold preparations by micellar liquid chromatography" **Talanta** 54: 621–630.

Juan, A. et al. (2000) "Spectrofluorimetric determination of phenylephrine in the presence of a large excess of paracetamol" **Analytica Chimica Acta** 419: 159–168

Khoshayand, M. R. et al. (2010) "Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, phenylephrine and chlropheniramine in pharmaceuticals using chemometric approaches" **DARU** 18(4): 292-297.

Maria, L. G. and Arroyo, P. J. (2003) "Determination of prednisolone, naphazoline and phenylephrine in local pharmaceutical preparations by micellar electrokinetic chromatography" **J Sep Sci.** 26: 947–952.

Marin, A. et al. (2002) "Validation of a HPLC quantification of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations: capsules and sachets" **J Pharm Biomed Anal.** 29: 701–714.

Marin, A. and Barbas, C. (2004) "CE versus HPLC for the dissolution test in a pharmaceutical formulation containing acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine" **J Pharm Biomed Anal.** 35: 769–777.

Okamura, N. et al. (1999) "Simultaneous determination of ephedrine, pseudoephedrine, norephedrine and methylephedrine in Kampo medicines by high-performance liquid chromatography" **J Pharm Biomed Anal.** 20: 363–372.

Olmo, B. et al. (2005) "New approaches with two cyano columns to the separation of acetaminophen, phenylephrine, chlorpheniramine and related compounds" **J Chromatogr B** 817: 159–165.

Robert, B. et al. (1968) "Determination of brompheniramine in blood and urine by gas-liquid chromatography" **Anal Chem.** 40 (8): 1246–1250.

Rocha, J. R. et al. (2002) "Spectrophotometric determination of phenylephrine hydrochloride in pharmaceuticals by flow injection analysis exploiting the reaction with potassium ferricyanide and 4-aminoantipyrine" **J AOAC** Int. 85(4): 875-8.

Savic, I. et al. (2008) "The simultaneous spectrophotometric determination of trimazolin and phenylephrine hydrochloride in nasal preparation" **Chem Ind Chem Eng.Q** 14 (4): 261-264

Shama, S. A. (2002) "Spectrophotometric determination of phenylephrine HCl and orphenadrine citrate in pure and in dosage forms" **J Pharm biomed Anal.** 30: 1385-1392

Wang, Z., Sun, Y. L. and Sun, Z. P. (1996) "Enantiomeric separation of amphetamine and phenylephrine by cyclodextrin mediated capillary zone electrophoresis" **J Chromatogr. A,** 735: 295–314.

Zhao, Xue-Mei. (2005) "Determination of five components in Liufenkamin tablets by HPLC" **Chinese Journal of Pharmaceuticals.** 3: 167-168.