#25931

รายงานวิจัย

เรื่อง

การวิเคราะห์หาปริมาณยาซินนาไรซีน(Cinnarizine) โดยวิธี เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคโตรสโคปี

ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา

ทุนอุดหนุนการวิจัยมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ปี 2539

HCULIB
3 0001 00040338 8

การวิเคราะห์หาปริมาณยาซินนาไรซีน (Cinnarizine) โดยวิธี เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคโตรสโคปี

ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

วิธีวิเคราะห์ยาเม็ดซินนาไรซีนโดยอาศัยเทคนิค เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคโตรสโคปีได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยชั่งผงยาให้มีปริมาณเท่ากับซินนาไรซีนเทียบ 100 มก.ลงในหลอดทอลอง เติมสารละลายของอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด(Hexamethylenetetramine) 3 มล.(ความเข้มข้น 1 มก./มล.) นำไปเขย่าด้วยเครื่องเป็นเวลา 5 นาที และนำไปใส่ในเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 4500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนบนที่ใสใส่ลงในหลอด เอ็ม.เอ็น.อาร์ และทำการบันทึกสเปคตรัม อาศัยหลักการอินติเกรตพื้นที่ได้พีคที่ 4.22 ppm. ของซินนาไรซีนเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้พีคของอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ที่ 4.72 ppm. โดยมีดิวเทอโรคลอโรฟอร์ม ($CDCl_3$) เป็นตัวทำละลาย มีค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเมื่อวิเคราะห์สารมาตรฐาน โดยเฉลี่ย 100.52 $\pm$ 0.60 % และเปอร์เซนต์การกลับคืนเมื่อวิเคราะห์ยาเม็ด โดยเฉลี่ย 99.80 $\pm$ 1.82 % วิธีดังกล่าวได้เปรียบเทียบกับวิธีการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนแบบชาร์จ-ทรานเฟอร์ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

QUANTITATIVE ANALYSIS OF CINNARIZINE BY NMR SPECTROSCOPY

Prasan Tangyuenyongwatana

Faculty of Pharmacy , Huachiew Chalermprakiet University

Abstract

A method for the quantitative analysis of cinnarizine in tablets using ^{1}H-NMR was reported. The procedure was based on weighing tablet powder equivalent to cinnarizine 100 mg. into the tube and added hexamethylenetetramine in $CDCl_3$ 3 ml. (1 mg/ml). The tube was mechanical shaken with vortex mixer for 5 min and centrifuged at 4,500 rpm for 10 min, the supernatant was transfered to N.M.R. tube. The calculation was based on integration of the sharp singlet at 4.22 ppm for cinnarizine relative to a clear singlet at 4.72 ppm of hexamethylenetetramine as internal standard. Deuterated chloroform was used as solvent. The mean recovery value $\pm$ SD were 100.52 $\pm$ 0.60 % for authentic cinnarizine and 99.80 $\pm$ 1.82 % for commercial tablets. The NMR results agreed with those obtain by charge-transfer complex method.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ความสะดวกในการใช้เครื่องมือ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติที่อนุญาตให้ใช้สถานที่ในการทำวิจัย

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อ		ก
Abstract		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญรูป		จ
สารบัญตาราง		ฉ
บทที่ 1	บทนำ	1
บทที่ 2	วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	5
บทที่ 3	ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	13
บทที่ 4	สรุปผลการวิจัย	42
ภาคผนวก		43
เอกสารอ้างอิง		46

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 3.1 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมของยาซินนาไรซีนใน $CDCl_3$ 15
รูปที่ 3.2 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมของไธมอลใน $CDCl_3$ 16
รูปที่ 3.3 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมของเฮกซะเมธลีนเตตรามีนใน $CDCl_3$ 17
รูปที่ 3.4 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมของแคมเฟอร์ใน $CDCl_3$ 18
รูปที่ 3.5 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมของ 3-เมทอกซีเบนซาลดีไฮด์
ใน $CDCl_3$ 19
รูปที่ 3.6 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมของเบนซิลเบนโซเอตใน $CDCl_3$ 20
รูปที่ 3.7 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมของยูจีนอลใน $CDCl_3$ 21
รูปที่ 3.8 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมของผงยาซินนาไรซีน กับ ไธมอล ใน $CDCl_3$ 23
รูปที่ 3.9 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมของผงยาซินนาไรซีน กับ เฮกซะเมธลีน-
เตตรามีน ใน $CDCl_3$ 24
รูปที่ 3.10 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมของสารมาตรฐานซินนาไรซีน กับ เฮกซะเมธ-
ลีนเตตรามีน ใน $CDCl_3$ 25
รูปที่ 3.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่พีคของสารมาตรฐาน
ซินนาไรซีน กับ อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด 28
รูปที่ 3.12 โปรตอน เอ็ม.เอ็น.อาร์ สเปคตรัมของสารมาตรฐานซินนาไรซีน (0.055 กรัม) กับ
อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด 29
รูปที่ 3.13 โปรตอน เอ็ม.เอ็น.อาร์ สเปคตรัมของสารมาตรฐานซินนาไรซีน (0.073 กรัม) กับ
อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด 30
รูปที่ 3.14 โปรตอน เอ็ม.เอ็น.อาร์ สเปคตรัมของสารมาตรฐานซินนาไรซีน (0.091 กรัม) กับ
อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด 31
รูปที่ 3.15 โปรตอน เอ็ม.เอ็น.อาร์ สเปคตรัมของสารมาตรฐานซินนาไรซีน (0.123 กรัม) กับ
อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด 32
รูปที่ 4.1 อุลตราไวโอเลตสเปคตรัมของซินนาไรซีน ใน $CHCl_3$ 35
รูปที่ 4.2 อุลตราไวโอเลตสเปคตรัมของสารประกอบเชิงซ้อนแบบชาร์จ-ทรานสเฟอร์
ระหว่างซินนาไรซีนกับ ไอโอดีน ใน 1,2 - dichloroethane 36
รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อน-
ซินนาไรซีนไอโอดีน กับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 295 นาโนเมตร 37

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 ผลการสกัดผงยาซินนาไรซีนโดยใช้ $CDCl_3$ ขนาด 3 มล. 26
ตารางที่ 3.2 ผลการสกัดผงยาซินนาไรซีนโดยใช้ $CDCl_3$ ขนาด 2 มล. 26
ตารางที่ 3.3 ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืน (%recovery) ของสารมาตรฐาน 27
ตารางที่ 3.4 ค่าอัตราส่วนพื้นที่อินติเกรตกับปริมาณของซินนาไรซีน 28
ตารางที่ 3.5 ค่า % Label claim ของการวิเคราะห์ยาเม็ดซินนาไรซีน 33
ตารางที่ 3.6 ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของซินนาไรซีนโดยวิธี Standard addition 34
ตารางที่ 4.1 แสดงค่าความเข้มข้นของซินนาไรซีนกับค่าการดูดกลืนแสง 37
ตารางที่ 4.2 การทดสอบความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์การเกิดสารประกอบเชิงซ้อน
แบบ ชาร์จ-ทรานสเฟอร์ ระหว่างซินนาไรซีน กับ ไอโอดีน 38
ตารางที่ 4.3 การทดสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์การเกิดสารประกอบเชิงซ้อน
แบบ ชาร์จ-ทรานสเฟอร์ ระหว่างซินนาไรซีน กับ ไอโอดีน 39
ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ระหว่าง วิธีเอ็น.เอ็ม.อาร์ กับ
วิธีชาร์จ-ทรานสเฟอร์ 39

HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

บทที่ 1

บทนำ

ซินนาไรซีน(Cinnarizine) จัดเป็นยาต้านแคลเซียม(Calcium antagonist หรือ calcium channel blocker) ในกลุ่ม ไดเฟนนิลปิเปอราซีนส์ (Diphenylpiperazines) โดยมีข้อบ่งใช้เป็นยาขยายหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงอวัยวะต่างๆ เช่น ปอด สมอง ดับ ไต (Cerebral / peripheral vascular insufficiency) จึงมีการนำมาใช้ป้องกันและรักษา pulmonary hypertension, Raynaud's syndrome, ไมเกรน และอาการผิดปกติอื่นๆที่เกิดจากการมีเลือดไปเลี้ยงสมองหรืออวัยวะอื่นไม่เพียงพอ นอกจากนั้นซินนาไรซีนยังมีฤทธิ์เป็น ยาต้านฮีสตามีน(Histamine H_1 -receptor antagonists) ใช้เป็นยาระงับอาเจียนจากการเมารถเมาเรือ และความผิดปกติอื่นที่เกี่ยวข้องกับการทรงตัว[1]

เนื่องจากซินนาไรซีนยังไม่ถูกบรรจุอยู่ในเภสัชตำรับใดๆที่ใช้เป็นมาตรฐานในปัจจุบัน ดังนั้นวิธีการควบคุมคุณภาพของยาซินนาไรซีนจึงยังคงมีการรายงานออกมาอย่างต่อเนื่องดังเช่น วิธี HPLC[2,3] วิธี Polarography [4] UV-spectroscopy [5,6] และ Potentiometry [7] ซึ่งวิธีต่างๆดังกล่าวข้างต้นต่างก็มีข้อดีและข้อจำกัดในบางกรณี

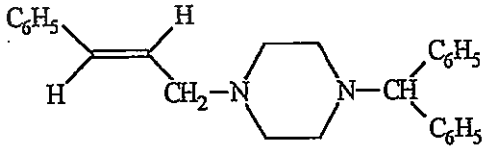
สำหรับวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคโตรสโคปีเป็นเทคนิคที่น่าสนใจและมีข้อดีหลายประการ คือ ใช้เวลาน้อยในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่าง กรรมวิธีการเตรียมตัวอย่างง่าย ไม่จำเป็นต้องผ่านการเจือจาง ไม่จำเป็นต้องใช้สารมาตรฐาน(Reference standard) ซึ่งมีราคาสูง สามารถวิเคราะห์สารโดยไม่ถูกรบกวนจากสารที่เป็นส่วนผสมของยาเม็ด ผลการวิเคราะห์มี เปอร์เซนต์ตัวยาจากการวิเคราะห์ (% Label claim)สูง[8, 9, 10 ,11] สำหรับการวิเคราะห์ซินนาไรซีนด้วยเทคนิค เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคโตรสโคปี ยังไม่เคยมีการรายงาน ผู้วิจัยมีความสนใจในเทคนิคการวิเคราะห์นี้ ซึ่งยังมีการทดลองกันน้อยในประเทศ นอกจากจะเป็นการศึกษาและพัฒนาวิธีวิเคราะห์แล้ว ยังทำให้ทราบเทคนิคและได้ข้อมูลพื้นฐานอันสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานสาขาอื่นๆ

RAJABHAT UNIVERSITY

<u>ข้อมูลเกี่ยวกับสาร ซินนาไรซีน</u>

ซินนาไรซีน(Cinnarizine) : 1-(Diphenylmethyl)-4-(3-phenyl-2-propenyl)piperazine;
1-cinnamyl-4-diphenylmethylpiperazine.

สูตรโครงสร้าง:



ซินนาไรซีน (Cinnarizine)

ลักษณะทางกายภาพ : ผงสีขาว หรือเกือบขาว (White or almost white powder)

สูตรโมเลกุล : $C_{26}H_{28}N_2$

น้ำหนักโมเลกุล : 368.5

จุดหลอมเหลว : 119.1° - 119.8 °C

การละลาย: ละลายได้ดีใน คลอโรฟอร์ม , เบนซีน , เตตราไฮโดรฟิวแรน (THF)

ละลายได้ใน เอธิลอะซิเตด (Ethyl acetate), ไดเมธิลฟอร์มาไมด์ (Dimethylformamide)

ละลายได้น้อยใน เมธานอล,เอธานอล,โปรปิลแอลกอฮอลล์(Propylalcohol) และ เฮกเซน (Hexane)

ไม่ละลายในน้ำ

การดูดกลืนแสง : UV ที่ ~ 250 นาโนเมตร

<u>ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา</u>

ซินนาไรซีน เป็นยาในกลุ่มยาต้านแคลเซี่ยม (Calcium channel blocker) ซึ่งใช้เป็นยาขยายหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงอวัยวะต่าง ๆในกรณีที่มีเลือดไปเลี้ยงไม่เพียงพอ (Cerebral / peripheral vascular insufficiency) นอกจากนั้นยังมีฤทธิ์เป็นยาต้านฮีสตามีน(Histamine H_1-receptor antagonist) ใช้รักษาอาการคลื่นไส้อาเจียน(Nuasea and vomiting) ในโรค Méniere และเป็นยาระงับอาเจียนจากอาการเมารถเมาเรือ และความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับการทรงตัว(Motion sickness)

ผลข้างเคียง ที่พบหลังรับประทานซินนาไรซีนได้แก่ อาการง่วงนอน เมื่อยล้าอ่อนเพลีย เกิดอาการแพ้ทางผิวหนัง(Skin hypersensitivity) ไม่ค่อยพบอาการทางระบบ Extrapyramidal

การดูดซึม และ การขับถ่าย พบว่าซินนาไรซีนถูกดูดซึมจากทางเดินอาหาร และ จะมีระดับยาในพลาสมาสูงสุดที่ 2 - 4 ชม. หลังการรับประทาน และจะถูกร่างกายเปลี่ยนแปลง(Metabolism) โดยมีค่าครึ่งชีวิต(Half-life) เท่ากับ 3 - 6 ชม. ซินนาไรซีนจะถูกขับถ่ายออกทางอุจจาระในรูปไม่เปลี่ยนแปลง(Unchanged drug) และทางปัสสาวะในรูปของเมทาบอไลท์

ซินนาไรซีนจะถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับ โดยเมตาบอไลท์ที่พบใน human liver microsome จะเป็นการเกิดไฮดรอกซิเลชันที่วงแหวน(Ring hydroxylation) และ N-ดีอัลคิลเลชัน(N-dealkylation) ซึ่งจัดเป็นเมตาบอไลท์หลัก[12]

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด พารา-ไฮดรอกซิเลชัน (p-hydroxylation) ตรงส่วนซินนามิล (Cinnamyl) ของโครงสร้างได้แก่ CYP2D6 ซึ่งสามารถพิสูจน์ได้โดยการให้ ควินิดีน(Quinidine) ซึ่งจัดเป็นสารยับยั้งที่จำเพาะเจาะจง(Selective inhibitor) ต่อ CYP2D6 พบว่าสามารถยับยั้งการเกิดไฮดรอกซิเลชันตรงวงแหวนของซินนาไรซีนได้ เอนไซม์ CYP2B6 เป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเกิด พารา-ไฮดรอกซิเลชัน ตรงหมู่ ไดเฟนนิลเมธิล(Diphenylmethyl group) ของซินนาไรซีน[13]

ขนาดของยาที่ใช้รักษา ในกรณีที่ใช้รักษาอาการคลื่นไส้อาเจียนจะให้รับประทาน 30 มก. วันละ 3 ครั้ง ในกรณีป้องกันก่อนออกเดินทางควรรับประทานยา 30 มก.ก่อน 2 ชม. และซ้ำอีก 15 มก. ทุก 8 ชม. ในเด็กอายุตั้งแต่ 5 - 12 ปี ขนาดยาจะเป็นครึ่งหนึ่งของผู้ใหญ่

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

วิธี HPLC : Sane และคณะ[2] ใช้ reverse-phase HPLC ในการวิเคราะห์ยาเม็ดซินนาไรซีน โดยใช้ยาเม็ดซินนาไรซีน 25 มก. ละลายด้วยเมธานอลจำนวน 10 มล. แล้วฉีดเข้าเครื่อง 20 ไมโครลิตร คอลัมน์ที่ใช้เป็นของ Whatman Partisil 5 ODS (10 cm x 3.9 mm.) โมบายล์เฟส(Mobile phase) ประกอบด้วย methanol : H_2O : anhyd. acetic acid : trimethylamine (1625 : 875 : 25 : 1) อัตราเร็วของโมบายล์เฟสเป็น 1.1 มล./นาที ตรวจวัดสารที่ 254 นาโนเมตร ใช้ไพริดรอกซีน ไฮโดรคลอไรด์ (Pyridroxine hydrochloride) เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด(Internal standard) อีกวิธีหนึ่งเป็นการวิเคราะห์ซินนาไรซีนในเลือดและพลาสมา ซึ่งมีขั้นตอนคล้ายคลึงกับวิธีแรกเพียงแตกต่างตรงขั้นตอนของการสกัดซึ่งใช้ $CHCl_3$: Hexane (2 : 3) แล้วนำมาระเหยให้แห้ง จากนั้นละลายด้วนเมธานอลแล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC โมบายล์เฟสเป็น phosphate buffer(pH 7.0) : methanol อัตราส่วน 1 : 9 ใช้เมโครซีน (Meclozine) เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด[3] ทั้งสองวิธีจัดเป็นวิธีที่ดี แต่ค่อนข้างใช้เวลาในการวิเคราะห์

วิธี Polarography : Boneva และ คณะ [4] ใช้วิธีโพลาโรกราฟีวิเคราะห์ยาเม็ด ซินนาไรซีน และอะลิเจอรอน(Aligeron) โดยใช้ขั้วปรอทหยด(Dropping mercury electrode)และมีขั้วซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์(Silver/silver chloride electrode) เป็นขั้วอ้างอิง โดยละลายตัวอย่างใน anhyd. ethanol และผสมด้วยบัฟเฟอร์ pH 9.0 เริ่มวิเคราะห์โดยตั้งค่าศักย์ที่ 0.4 โวลต์ และมีค่าความไวกระแส (Current sensitivity)เท่ากับ 30 นาโนแอมแปร์(nA) วิธีดังกล่าวระบุว่าให้ผลการวิเคราะห์ดีกว่าวิธีไตเตรต และวิธีทางสเปคโตรสโคปี วิธีดังกล่าวต้องระมัดระวังและหลีกเลี่ยงการสัมผัสปรอทที่ใช้ในการวิเคราะห์

วิธี UV spectroscopy : Saleh และคณะ[5] ใช้วิธีการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนแบบ ชาร์จ-ทรานสเฟอร์ (Charge-transfer complex) ระหว่างซินนาไรซีนกับไอโอดีน ใน 1,2-dichloroethane ซึ่งขั้นตอนการวิเคราะห์ต้องสกัดผงยาด้วยคลอโรฟอร์มและนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนใน1,2-dichloroethane สารประกอบเชิงซ้อนที่ได้จะนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 295 นาโนเมตร อีกวิธีใช้การสกัดยาเม็ดซินนาไรซีนด้วย anhd. ethanol ที่ร้อน แล้ววัดสารละลายที่ได้ที่ 250 นาโนเมตร[6] ซึ่งวิธีดังกล่าวอาจมีข้อผิดพลาดได้ในกรณีที่ยาเม็ดอาจมีสารบางชนิดที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วง 250 นาโนเมตรเช่นเดียวกัน

วิธี Potentiometry : Wu และคณะ[7] ใช้วิธีการไตเตรตแบบไม่มีน้ำ(Non-aqueous titration) ในการวิเคราะห์หาปริมาณซินนาไรซีน โดยใช้ผงยาที่มีซินนาไรซีน 0.1 กรัม เติม 0.1 กรัมของกรดทาร์ทาริค(Tartaric acid)และ 20 มล.ของ กรดอะซีติค(anhyd. acetic acid) แล้วไตเตรตด้วย 0.1N $HClO_4$ ตัดสินจุดยุติด้วยวิธี โพเทนชิโอเมตรี(Potentiometry) หรือใช้ คริสตอลไวโอเลต(Crystal violet) เป็นอินดิเคเตอร์ วิธีนี้จัดเป็นวิธีพื้นฐาน แต่ค่อนข้างจะเป็นอันตรายต่อสุขภาพขณะทำการวิเคราะห์ เนื่องจากกลิ่นของสารละลายสามารถก่อความระคายเคืองต่อทางเดินหายใจ

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาเม็ดซินนาไรซีน โดยวิธี เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคโตรสโคปี พร้อมประเมินผลการวิเคราะห์จากวิธีที่พัฒนาได้ในด้าน ความจำเพาะ ความเที่ยงตรง และ ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีวิเคราะห์วิธีใหม่สำหรับวิเคราะห์ตรวจสอบและควบคุมคุณภาพยาเม็ดซินนาไรซีน ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และผลการวิเคราะห์น่าเชื่อถือ

2. สามารถนำวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิเคราะห์ ฟลูนาราซีน(Flunarazine) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของซินนาไรซีน และ อีเมสาซีน(Emesazine) ซึ่งเป็นยาผสมระหว่างซินนาไรซีน กับวิตามิน บี 6 (Vitamin B_6)

3. สามารถนำวิธีดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณสารสกัดจากสมุนไพร เพื่อเตรียมเป็นสารมาตรฐาน ซึ่งปกติราคาสารมาตรฐานสมุนไพรบางชนิดมีราคาสูงหรือสมุนไพรบางชนิดอาจไม่สามารถหาสารมาตรฐานมาใช้ในการควบคุมคุณภาพเนื่องจากไม่มีผู้ผลิตสารมาตรฐานที่เราต้องการ

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. สารเคมี : สารเคมีทั้งหมดที่ใช้ตลอดการศึกษามีดังนี้

1.1 ซินนาไรซีน (Cinnarizine, Sigma Chemical , Missouri, USA, Lot No.94H1096)

1.2 เฮกซาเมธลีนเตตรามีน (Hexamethylenetretamine, Sigma Chemical Company, Missouri, USA , Lot No. 74H3561)

1.3 ดิวเทอโรคลอโรฟอร์ม(Deuterochloroform, $CDCl_3$, Sigma Chemical Company, Missouri, USA)

1.4 คลอโรฟอร์ม เกรด AR (Chloroform, $CHCl_3$, E.Merck, Darmstadt)

1.5 1,2 - ไดคลอโรอีเทน (1,2 - Dichloroethane, Sigma Chemical Company, Missouri, USA)

1.4 ไธมอล (Thymol, Sigma Chemical Company, Missouri, USA, Lot No.14H0277)

1.5 3-เมธอกซีเบนซาลดีไฮด์(3-methoxybenzaldehyde,Sigma Chemical Company, Missouri, USA)

1.6 ยูจีนอล(Eugenol, Sigma Chemical Company, Missouri, USA)

1.7 เบนซิลเบนโซเอต(Benzylbenzoate, Sigma Chemical Company, Missouri, USA)

1.8 ยาเม็ดซินนาไรซีน (Ceremin® , Lot No 96290 , Polipharm Co, Samutprakarn)

2. เครื่องมือ : เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่

2.1 เครื่องชั่งสำหรับวิเคราะห์ (Sartorius model BP210S, Sartorius AG, Germany)

2.2 เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Electrothermal IA 9400 , Electrothermal engineering, England)

2.3 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (Nuclear magnetic resonance spectrometer , JEOL JNM-A500 , JEOL, Japan)

2.4 อุลตราไวโอเลตสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Ultraviolet spectrophotometer, Jasco UV-530 double beam, Jasco, Japan)

2.5 เครื่องผสมวอร์เทกซ์ (Vortex mixer, Vortex-Genie, Scientific Industries, Inc; Newyork, USA)

2.6 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Hettich EBA 8S, Hettich zentrifugen , Tuttlingen, Germany)

วิธีการ

ขั้นตอนการศึกษาเพื่อให้ได้มาซึ่งวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยเทคนิคทาง เอ็น.เอ็ม.อาร์ ในครั้งนี้แบ่งออกเป็น 4 ส่วนดังนี้

ส่วนที่ 1 ทำการบันทึก เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมของ ซินนาไรซีน และทำการเลือกช่วงสเปคตรัมที่เหมาะสมในการวางสัญญานของอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด

ส่วนที่ 2 ทดสอบหา อินเทอร์นอลสแตนดาร์ดที่เหมาะสม

ส่วนที่ 3 พัฒนาวิธีวิเคราะห์และการประเมินวิธีวิเคราะห์ซินนาไรซีนในยาเม็ดและในสารมาตรฐาน

ส่วนที่ 4 การวิเคราะห์ยาเม็ดซินนาไรซีน โดยวิธี การเกิดปฏิกิริยาสารประกอบเชิงซ้อนแบบชาร์จ-ทรานสเฟอร์ (Charge-transfer complex reaction). เพื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์

ส่วนที่ 1 การบันทึก เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมของตัวยาซินนาไรซีน และทำการเลือกช่วงสเปคตรัมที่เหมาะสมในการวางสัญญานของอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด

วิธีการทดลอง

ทำการบันทึก เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมของซินนาไรซีน โดยชั่งสารมาตรฐานของ ซินนาไรซีน 10 มก. ใส่ในหลอดทดลอง เติม $CDCl_3$ จำนวน 2 มล. แล้วเขย่าหลอดเล็กน้อยจนสารละลายอย่างสมบูรณ์ ใช้หลอดหยดที่มีปลายยาวดูดสารละลายดังกล่าวใส่ลงในหลอด เอ็น.เอ็ม.อาร์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม ให้ได้ระดับสารละลายสูง 2.5 ซม. และนำไปใส่ลงในเครื่อง โดยมีค่าพารามิเตอร์ที่ตั้งไว้สำหรับการวิเคราะห์ ดังนี้

-เครื่อง NMR JEOL model JNM-A500

-จำนวนการสแกน(Scan) = 8

-อุณหภูมิของโพรบ(Probe) เฉลี่ย = 30.0 °C

-จำนวนรอบของการหมุนของหลอด เอ็น.เอ็ม.อาร์ = 12 Hz.

-ช่วงเวลาของการเก็บสัญญาน(Acquisition time) = 3.27 sec.

-ช่วงห่างของการส่งสัญญาน(Pulse duration) = 3.00 sec.

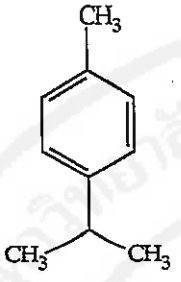
ส่วนที่ 2 ทดสอบหา อินเทอร์นอลสแตนดาร์ดที่เหมาะสม

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารซินนาไรซีนครั้งนี้ ใช้วิธีการเติมสารอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดที่รู้ความเข้มข้นแน่นอนลงไปในตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ โดยอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดที่เหมาะในการวิเคราะห์ด้วยวิธี เอ็น.เอ็ม.อาร์ ควรมีคุณสมบัติดังนี้[8]

-เป็นสารที่ละลายได้อย่างสมบูรณ์ในตัวทำละลายที่ใช้กับตัวยาหรือสารที่ต้องการวิเคราะห์

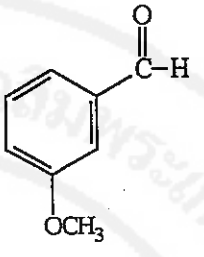
-โครงสร้างของสารควรมีอย่างน้อยหนึ่งโปรตอนที่ให้สัญญานปรากฏบนเอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมโดยไม่ซ้อนทับกับสัญญานของสารที่ต้องการวิเคราะห์

จากคุณสมบัติดังกล่าวได้มีการวิเคราะห์สเปคตรัมของซินนาไรซีน เพื่อเลือกสารที่เหมาะสมในการนำมาเป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด โดยได้พิจารณาจากโครงสร้างของสารและจากรายงานการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค เอ็น.เอ็ม.อาร์[8-11] สามารถเลือกสารได้ 6 ชนิดโดยมีรายชื่อพร้อมสูตรโครงสร้างดังต่อไปนี้



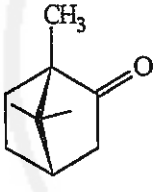
ไธมอล

(Thymol)



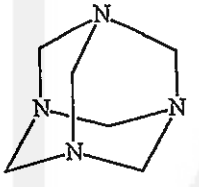
3-เมธอกซีเบนซาลดีไฮด์

(3-methoxybenzaldehyde)



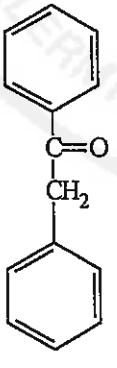
แคมเฟอร์

(Camphor)



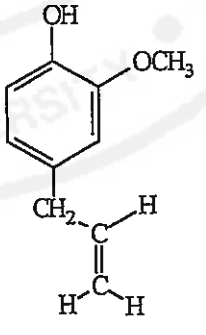
เฮกซะเมธลีนเตตรามีน

(Hexamethylenetetramine)



เบนซิลเบนโซเอต

(Benzyl benzoate)



ยูจีนอล

(Eugenol)

* สารทุกชนิดละลายได้ดีใน $CHCl_3$

วิธีการทดลอง

การเตรียมสารละลายอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด

ใช้สารทั้ง 6 ชนิด ชนิดละประมาณ 10 มก. ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม $CDCl_3$ หลอดละ 2 มล. เขย่าหลอดเล็กน้อยเพื่อช่วยในการละลาย เมื่อสารดังกล่าวละลายหมดได้สารละลายที่ใส ใช้หลอดหยดสารที่มีปลายยาวดูดสารละลายจากขวดใส่ลงในหลอด เอ็น.เอ็ม.อาร์ ให้ได้ขนาดความสูงของสารละลาย 2.5 ซม. ทำการบันทึก เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัม โดยตั้งค่าพารามิเตอร์เช่นเดียวกับส่วนที่ 1 สารตัวอย่างที่มีสเปคตรัมที่น่าสนใจจะนำไปทดลองขั้นต่อไป

ส่วนที่ 3 พัฒนาวิธีวิเคราะห์และการประเมินวิธีวิเคราะห์ซินนาไรซีนในยาเม็ด และในสารมาตรฐาน

ก. บันทึกสเปคตรัมของซินนาไรซีนกับอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ที่เลือกไว้

ชั่งสารมาตรฐานซินนาไรซีน 100 มก. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มล. แล้วปิเปตสารละลายของอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ที่เลือกไว้จากส่วนที่ 2 จำนวน 3 มล. โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ควรทำให้สัญญาณที่ปรากฏมีความสูงใกล้เคียงกับสัญญาณของซินนาไรซีน ทำการเขย่าหลอดทดลองเล็กน้อยเพื่อช่วยการละลาย และทำการบันทึก เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัม โดยตั้งค่าพารามิเตอร์เช่นเดียวกับส่วนที่ 1

ข. การทดสอบสารอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดกับผงยาซินนาไรซีน

ทำการทดลองผสม อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ในความเข้มข้นเดียวกับข้อ ก. กับ ผงยาซินนาไรซีนจำนวน 100 มก. และ ทำการสกัดโดยเขย่าด้วยเครื่องผสม วอร์เทกซ์ เป็นเวลา 5 นาที และนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 4500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที และ ดูดสารละลายใสชั้นบนด้วยหลอดหยดปลายแหลมใส่ลงในหลอด เอ็น.เอ็ม.อาร์ ให้มีความสูงของสารละลาย 2.5 ซม. และทำการบันทึกสเปคตรัมโดยตั้งค่าพารามิเตอร์เช่นเดียวกับส่วนที่ 1 ในส่วนนี้สามารถสังเกตความจำเพาะ (Selectivity) ของวิธีวิเคราะห์

ค. การทดสอบปริมาตรที่เหมาะสมของตัวทำละลาย

ชั่งสารมาตรฐานซินนาไรซีนจำนวน 100 มก. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มล. จำนวน 10 หลอด แล้วปิเปตสารละลายของอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ใน $CDCl_3$ จำนวน 2.0 มล.และ 3.0 มล.ใส่ในหลอดทดลองอย่างละ 5 หลอด ทำการเขย่าด้วยเครื่องผสมวอร์เทกซ์(Vortex mixer) เป็นเวลา 5 นาที นำหลอดทดลองที่ผ่านการเขย่ามาใส่ลงในเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีและทำการบันทึก เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัม โดยตั้งค่าพารามิเตอร์เช่นเดียวกับส่วนที่ 1 คำนวณปริมาณของซินนาไรซีน และเปอร์เซนต์ Label claim ของซินนาไรซีนที่ระบุอยู่ในยาเม็ดได้จากสูตร

ซินนาไรซีน (มก.) = $\frac{Ac}{Ai} \times \frac{Mc}{Mi}$ x อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (มก.)

เมื่อ Am = ค่าอินติเกรต(Integral value) ของซินนาไรซีน ที่ 4.22 ppm.

Ai = ค่าอินติเกรต(Integral value) ของอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ที่ 4.72 ppm.

Mc = น้ำหนักสมมูลต่อโปรตอน(Proton equivalent weight) ของซินนาไรซีน (FW/1 = 368.5)

M I = น้ำหนักสมมูลต่อโปรตอน(Proton equivalent weight) ของอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด(FW/12 = 11.683)

ในกรณีที่พีคสัญญานมี spinning sideband รบกวนซึ่งจะส่งผลต่อค่าอินติเกรต สามารถลดปัญหาดังกล่าวโดยการปรับความเร็วของการหมุนของหลอด เอ็น.เอ็ม.อาร์

ง. การทดสอบการวิเคราะห์สารมาตรฐานซินนาไรซีน

ชั่งสารมาตรฐานซินนาไรซีนจำนวน 50, 70, 90, 120 มก. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มล. จำนวน 4 หลอด แล้วปิเปตสารละลายของอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ใน $CDCl_3$ จำนวน 3.0 มล. ทำการเขย่าหลอดทดลองเล็กน้อยเพื่อช่วยการละลาย และทำการบันทึก เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัม โดยตั้งค่าพารามิเตอร์เช่นเดียวกับส่วนที่ 1 คำนวณเปอร์เซนต์การกลับคืน(% recovery)ของซินนาไรซีน ได้จากสูตร

ซินนาไรซีน (มก.) = $\frac{Ac}{Ai} \times \frac{Mc}{Mi}$ x อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (มก.)

เมื่อ Am = ค่าอินติเกรต(Integral value) ของซินนาไรซีน ที่ 4.22 ppm.

Ai = ค่าอินติเกรต(Integral value) ของอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ที่ 4.72 ppm.

Mc = น้ำหนักสมมูลต่อโปรตอน(Proton equivalent weight) ของซินนาไรซีน (FW/1 = 368.5)

M I = น้ำหนักสมมูลต่อโปรตอน(Proton equivalent weight) ของอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด(FW/12 = 11.683)

จ.การหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าอัตราส่วนพื้นที่การอินติเกรตกับค่าความเข้มข้นของซินนาไรซีน

จากข้อมูลในข้อ ง. นำค่าความเข้มข้นของซินนาไรซีนมาสร้างกราฟกับค่าอัตราส่วนพื้นที่การอินติเกรตระหว่างซินนาไรซีนกับอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (IS) พร้อมทั้งคำนวณ หาความสัมพันธ์โดยใช้วิธี Linear regression

ฉ. การทดสอบความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์(Precision)

ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์(Precision) จะแสดงถึงความแปรปรวนของผลการวิเคราะห์เมื่อทำการทดลองซ้ำหรือเป็นการกระจายของผลการวิเคราะห์จากค่าเฉลี่ยของการวิเคราะห์เมื่อทำซ้ำ ค่าที่ใช้แสดงความเที่ยงตรงคือ relative standard deviation (RSD) หรือ coefficient of variation (CV) ซึ่งค่าดังกล่าวคำนวณเป็นค่าร้อยละ

$$\% \text{ RSD หรือ } \% \text{ CV} = \frac{SD}{X}$$

เมื่อ $\overline{X}$ คือ ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

วิธีการทดลอง

1.ชั่งยาเม็ดซินนาไรซีน 20 เม็ด หาน้ำหนักเบี่ยงเบน(Weigth variation)ของยาแต่ละเม็ดเมื่อยาทั้งหมดเข้ามาตรฐาน นำมาบดให้ละเอียดในโกร่ง

2.ชั่งผงยาให้มีตัวยาเทียบเท่ากับซินนาไรซีน 100 มก. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มล.

3. ปิเปตสารละลายของ อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด จำนวน 3 มล. เติมลงในหลอดทดลอง

4.นำหลอดทดลองข้างต้นมาเขย่าด้วยเครื่องผสมวอร์เทกซ์(Vortex mixer) เป็นเวลา 5 นาที

5.นำหลอดทดลองที่ผ่านการเขย่ามาใส่ลงในเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

6.เมื่อนำหลอดทดลองออกจากเครื่องหมุนเหวี่ยงแล้ว ใช้หลอดหยดดูดสารละลายใสส่วนบน (Clear supernatant) ใส่ลงในหลอด เอ็น.เอ็ม.อาร์ โดยให้มีระดับความสูงของสารละลายประมาณ 2.5 ซม.

7.ทำการบันทึก เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัม และคำณวนหาปริมาณสาร

ช. การทดสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์(Accuracy)

การทดสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ก็เพื่อต้องการหาความใกล้เคียงของค่าเฉลี่ยที่วัดได้โดยวิธีวิเคราะห์นั้นๆ กับค่าที่เป็นจริง โดยพิจารณาจากค่าการกลับคืน(% recovery)

วิธีการทดลองจะใช้วิธี Standard addition ซึ่งวิธีนี้จะเป็นการเติมตัวยาที่ทราบปริมาณแน่นอนลงในผลิตภัณฑ์ที่ต้องการวิเคราะห์ หรือ ยาที่ผลิตตามกระบวนการผลิตจริง มีตัวยาที่จะ

วิเคราะห์อยู่ในตัวอย่างอยู่แล้วก่อนจะเติมตัวยาที่ทราบปริมาณแน่นอนเข้าไปเพิ่มอีก วิธีนี้สะดวกกว่าวิธีแรกคือไม่ต้องเตรียมยาหลอกโดยสามารถใช้ยาที่ผลิตตามปกติในโรงงานได้

วิธีการทดลอง

1. เตรียมผงยาเม็ดซินนาไรซีนที่บดละเอียด ชั่งผงยาซินนาไรซีนให้มีตัวยาเทียบเท่ากับซินนาไรซีน 70 - 120 มก. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มล. จำนวน 5 หลอด

2. ชั่งสารมาตรฐานของซินนาไรซีนจำนวน 10 - 25 มก. โดยใส่ลงไปในหลอดทดลองข้างต้น

3. ปิเปตอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด จำนวน 3 มล. ลงไปในหลอดทดลองแต่ละหลอด

4. นำหลอดทดลองข้างต้นมาเขย่าด้วยเครื่องผสมวอร์เทกซ์(Vortex mixer) เป็นเวลา 5 นาที

5. นำหลอดทดลองที่ผ่านการเขย่ามาใส่ลงในเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

6.เมื่อนำหลอดทดลองออกจากเครื่องหมุนเหวี่ยงแล้ว ใช้หลอดหยดดูดสารละลายใสส่วนบน (Clear supernatant) ใส่ลงในหลอด เอ็น.เอ็ม.อาร์ โดยให้มีระดับความสูงของสารละลายประมาณ 2.5 ซม.

7.ทำการบันทึก เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัม และคำนวณหาปริมาณสารซินนาไรซีน

ส่วนที่ 4 การวิเคราะห์ยาเม็ดซินนาไรซีน โดยวิธี การเกิดปฏิกิริยาสารประกอบเชิงซ้อนแบบ ชาร์จ-ทรานสเฟอร์ (Charge-transfer complex reaction) เพื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์

ในการตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ใหม่นั้น นอกจากค่าความเที่ยงตรง และความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แล้ว การตรวจสอบความถูกต้องควรเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์อื่น หรือวิธีที่ใช้เทคนิคต่างกันเพื่อดูผลการวิเคราะห์ว่ามีความสอดคล้องกันเพียงใด

ในการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ซินนาไรซีนนี้ ได้เลือกใช้วิธีชาร์จ-ทรานสเฟอร์ (Charge-transfer complex reaction) [5] เป็นวิธีเปรียบเทียบ วิธีนี้อาศัยหลักการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนในลักษณะชาร์จ-ทรานสเฟอร์ ระหว่างโมเลกุลของซินนาไรซีน กับ ไอโอดีน(Iodine) ในสารละลาย 1,2 - Dichloroethane แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 295 นาโนเมตร

วิธีการทดลอง

ก. การหาช่วงความเข้มข้นของการวิเคราะห์ที่เป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer's law)

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานซินนาไรซีน ให้มีระดับความเข้มข้น 0.0 , 2.0 , 4.0 8.0 , 10.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2. ปิเปต 1 มล. ของสารละลายในข้อ 1 ใส่ลงในขวดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 10 มล. เติม 2 มล.ของสารละลายไอโอดีน (เตรียมจาก 1mM-Iodine ใน 1,2 - Dichloroethane)

3. ปรับปริมาตรจนครบ 10 มล. ด้วย 1,2 - Dichloroethane ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 295 นาโนเมตร.

4. นำค่าการดูดกลืนแสงที่แต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟ และทำ Linear regression เพื่อดูว่าเป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer's law) หรือไม่

ข. <u>การทดสอบเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (Precision)</u>

1. ชั่งยาเม็ดซินนาไรซีน 20 เม็ด หาค่าน้ำหนักเฉลี่ยของแต่ละเม็ด และค่าน้ำหนักเบี่ยงเบนของแต่ละเม็ด หากยาเม็ดดังกล่าวผ่านเกณฑ์มาตรฐานให้บดให้ละเอียดในโกร่ง

2. ชั่งผงยาจากข้อ 1 ให้มีปริมาณเทียบเท่าซินนาไรซีน 8 - 12 มก. ใส่ลงในขวดปริมาตรขนาด 100 มล. เติม $CHCl_3$ เพื่อสกัดยาออกจาก matrix โดยใช้วิธี Sonicate สลับกับการเขย่าเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นกรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1

3. ปิเปต 1 มล. ของสารละลายในข้อ 2 ใส่ลงในขวดปริมาตรขนาด 10 มล. ปิเปตสารละลายไอโอดีนจำนวน 2 มล. ปรับปริมาตรด้วย 1,2 - Dichloroethane ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีให้สีคงที่ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 295 นาโนเมตร.

4. คำนวณหาปริมาณของซินนาไรซีน ในยาเม็ดโดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน

ค. <u>การทดสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy)</u>

1.ชั่งยาเม็ดซินนาไรซีน 20 เม็ด หาค่าน้ำหนักเฉลี่ยของแต่ละเม็ด และ ค่าน้ำหนักเบี่ยงเบนของแต่ละเม็ด หากยาเม็ดดังกล่าวผ่านเกณฑ์มาตรฐานให้บดให้ละเอียดในโกร่ง

2. ชั่งผงยาจากข้อ 1 ให้มีปริมาณเทียบเท่าซินนาไรซีน 10 - 12 มก. ใส่ลงในขวดปริมาตรขนาด 250 มล. และเติมสารมาตรฐานของซินนาไรซีน ในปริมาณ 10 - 15 มก. เติม $CHCl_3$ จำนวน 100 มล.เพื่อสกัดยาออกจาก matrix โดยใช้วิธี Sonicate สลับกับการเขย่าเป็นเวลา 15 นาที แล้วปรับปริมาตรจนครบด้วย $CHCl_3$ หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1

3. ปิเปต สารละลายในข้อ 2 จำนวน 1 มล. ใส่ลงในขวดปริมาตรขนาด 10 มล. เติมสารละลายไอโอดีนจำนวน 2 มล. และปรับปริมาตรด้วย 1,2 - Dichloroethane ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 295 นาโนเมตร.

4. คำนวณหาปริมาณของซินนาไรซีน ในยาเม็ดโดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน พร้อมทั้งคำนวณเปอร์เซนต์การกลับคืน (% recovery)

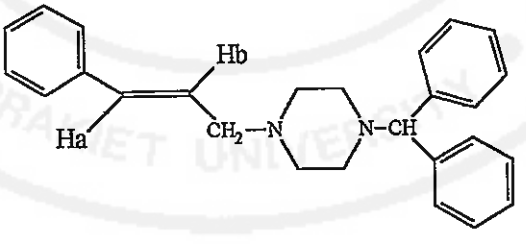
บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

<u>ส่วนที่ 1</u> การบันทึก เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมของตัวยาซินนาไรซีน และทำการเลือกช่วงสเปคตรัมที่เหมาะสมในการวางสัญญาณของอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด

โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมของยาซินนาไรซีน ใน $CDCl_3$ (รูปที่ 3.1) จะแสดงสัญญาณลักษณะ sharp singlet ที่ 4.22 ppm. ซึ่งเป็นสัญญาณของเมธีนโปรตอน (Methine proton) ที่ไม่เกิดการคู่ควบ(Coupling) กับหมู่ข้างเคียงใดๆ เลย เนื่องจากไม่มีโปรตอนข้างเคียงที่ห่างกัน 3 พันธะกับโปรตอนดังกล่าว ลักษณะสัญญาณที่เป็นพีค (Peak) เดี่ยวแยกออกจากสัญญาณอื่นอย่างอิสระและสามารถอินทิเกตพื้นที่ใต้พีคได้โดยไม่ถูกรบกวน

สัญญาณส่วนที่เหลือในสเปคตรัมอันได้แก่ ช่วง 7.0 - 7.5 ppm. เป็นสัญญาณโปรตอนบนวงแหวนเบนซีนสองวงซ้อนทับกัน ตำแหน่งดังกล่าวไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ เนื่องจากในบริเวณดังกล่าว สัญญาณมีความซับซ้อนมาก หากมีสิ่งปนเปื้อนในตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ปรากฏในสัญญาณช่วงดังกล่าวจะสังเกตได้ยากและบริเวณดังกล่าวยังมีสัญญาณของ $CDCl_3$ เกิดที่ 7.25 ppm. ร่วมอยู่ด้วย ช่วง 6.0 - 6.75 ppm. เป็นสัญญาณโปรตอนบนวงแหวนเบนซีนตรงส่วนของหมู่ซินนามิล (Cinnamyl group) สัญญาณตรงส่วนนี้ไม่เกิดการคู่ควบกับหมู่ข้างเคียงใดๆ ความซับซ้อนของสัญญาณเกิดจากการคู่ควบภายในวงแหวนของเบนซีนเอง สัญญาณส่วนนี้สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณได้



สัญญาณตรง 3.20 ppm. เป็นสัญญาณในลักษณะ doublet ที่มีค่าคงที่ Coupling แคบกว่าปกติ (~ 2 - 3 Hz) จะเป็นสัญญาณของโปรตอน Ha ซึ่งอยู่ในโครงสร้างแบบทรานส์ (Trans) และเกิดการคู่ควบกับโปรตอน Hb ส่วนสัญญาณของโปรตอน Hb จะไปรวมอยู่กับสัญญาณของเมธิลีนโปรตอน (Methylene proton) ของวงแหวนปิเปอราซีน (Piperazine ring) ตรงช่วง 1.5 - 3.5 ppm. ซึ่งสัญญาณในบริเวณนี้ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์

จากสเปคตรัมดังกล่าว บริเวณที่เหมาะแก่การนำอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด มาใช้ในการวิเคราะห์ที่สุดได้แก่ช่วง 4.5 - 6.0 ppm. เนื่องจากบริเวณดังกล่าวราบเรียบไม่มีสัญญาณใดๆรบกวน

สำหรับช่วงที่เหมาะสมรองลงมาได้แก่ช่วง 7.75 - 10.0 ppm. ขึ้นไปแต่จะหาสารที่ให้สัญญานเดี่ยว ๆ ในบริเวณนี้ค่อนข้างยาก บริเวณ 0.0 - 1.0 ppm. เป็นบริเวณที่พอใช้ได้เนื่องจากเป็นบริเวณที่หมู่ของไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวปรากฏ แต่เป็นบริเวณที่สารปนเปื้อนมักปรากฏเช่นกัน การเลือกใช้บริเวณนี้ต้องตรวจสอบสัญญานให้ชัดเจน

<u>ส่วนที่ 2</u> ทดสอบหา อินเทอร์นอลสแตนดาร์ดที่เหมาะสม

สารทั้ง 6 ชนิดคือ ไธมอล, 3-เมธอกซีเบนซาลดีไฮด์, แคมเฟอร์, เฮกซะเมธลีนเตตรามีน, เบนซิลเบนโซเอต และ ยูจีนอล สารทุกชนิดมีโครงสร้างที่ให้เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมที่เรียบง่าย และมีหมู่ที่ให้สัญญานที่สามารถแทรกลงในสเปคตรัมของซินนาไรซีนได้ เมื่อนำมาทดสอบการละลายในตัวทำละลาย $CDCl_3$ พบว่าทุกตัวละลายได้ดีใน $CDCl_3$ นำสารทั้งหมดมาบันทึกโปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัม (ดังรูปที่ 3.2 - 3.7) โดยสามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้

ไธมอล (Thymol) มีสัญญาน singlet ที่ 2.27 ppm. เป็นสัญญานของ เมธิลโปรตอน ($-CH_3$) และสัญญาน doublet ที่ 1.24 ppm. เป็นสัญญานของเมธิล 2 หมู่ พบว่าสัญญานทั้ง 2 ชุดไม่ซ้อนทับกับสัญญานของซินนาไรซีนที่ 4.22 ppm.

เฮกซะเมธลีนเตตรามีน (Hexamethylenetetramine) มีสัญญาน singlet ที่ 4.72 ppm. เพียงสัญญานเดียว โดยโปรตอนทุกตัวในโครงสร้างมีความเท่าเทียมกัน (Equivalent)หมด สัญญานดังกล่าวสามารถแทรกลงในสเปคตรัมของซินนาไรซีนในช่วง 4.5 - 6.0 ppm. ได้อย่างสมบูรณ์

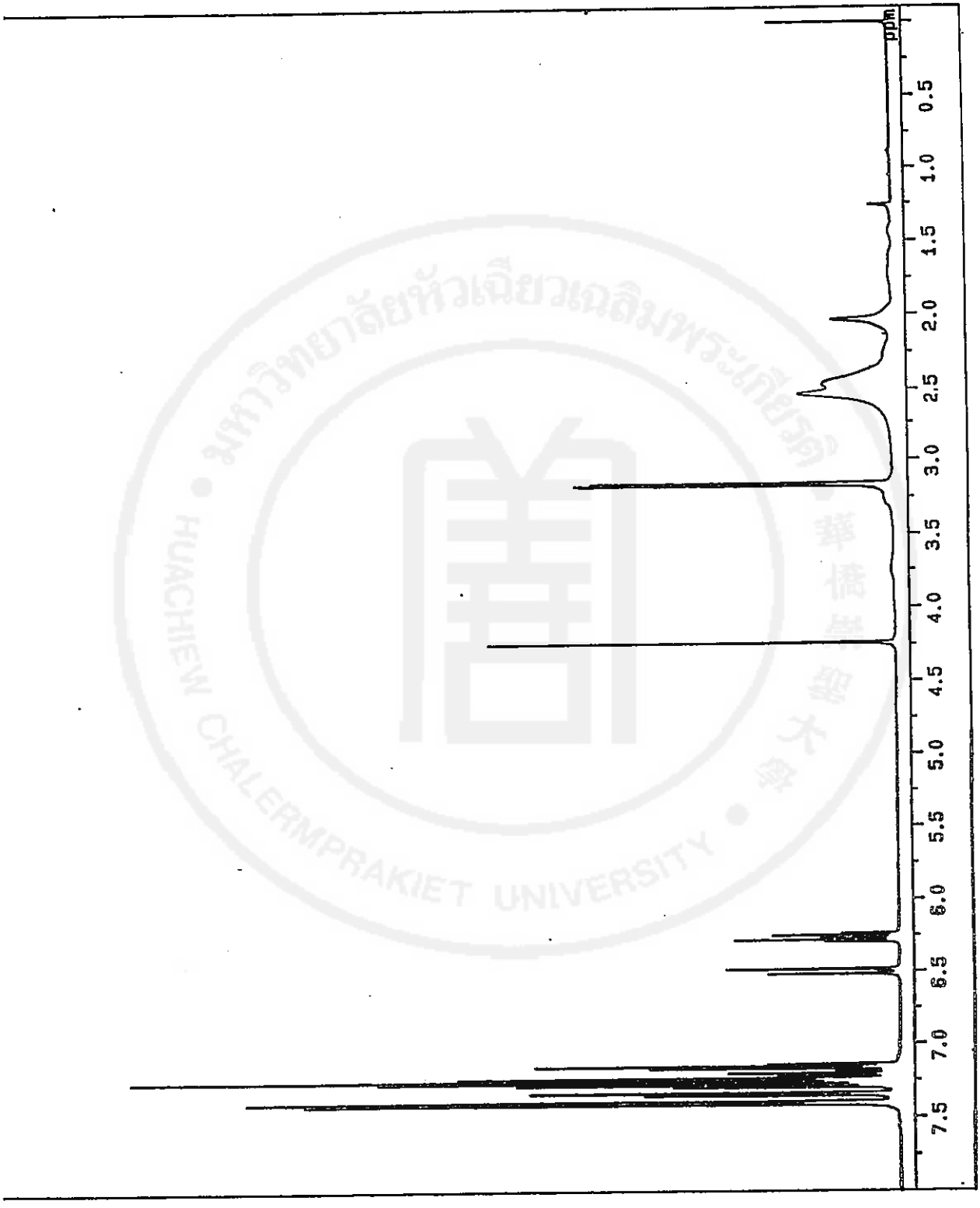
แคมเฟอร์ (Camphor) มีสัญญาน singlet 3 พีคในช่วง 0.75 - 1.25 ppm. เป็นของ เมธิล สามหมู่ที่ไม่เกิดการคู่ควบกับหมู่ใดๆ สัญญานในช่วงดังกล่าวค่อนข้างจะมีสัญญานอื่นรบกวนไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์

3-เมธอกซีเบนซาลดีไฮด์ (3-methoxybenzaldehyde) มีสัญญาน singlet ที่ 3.86 ppm. เป็นของเมธอกซีโปรตอน ($-OCH_3$) และที่ 9.97 ppm. เป็นสัญญานโปรตอนของหมู่อัลดีไฮด์

เบนซิลเบนโซเอต (Benzylbenzoate) มีสัญญาน singlet ที่ 5.36 ppm. เป็นของเมธิลีนโปรตอน ($-CH_2$)

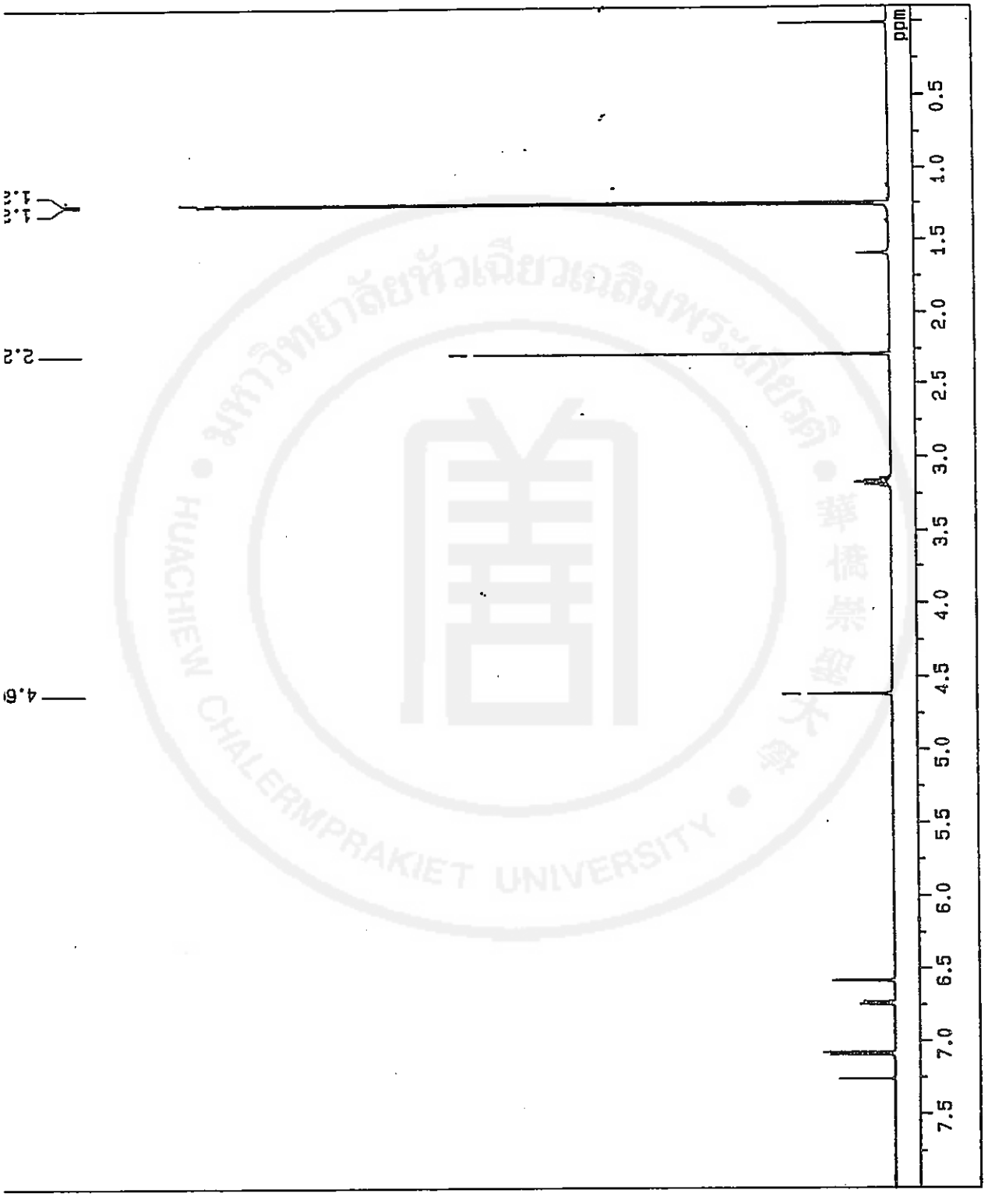
ยูจีนอล (Eugenol) มีสัญญาน singlet ที่ 3.86 ppm. เป็นของเมธอกซีโปรตอน (OCH_3) เป็นสัญญานเดียวของสารนี้ที่เหมาะสม

จากรายละเอียดของสเปคตรัมข้างต้น พบว่าไธมอล และ เฮกซะเมธลีนเตตรามีน เป็นสารที่น่าใช้เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดมากที่สุด โดยสาร 3 ชนิดหลังคือ 3-เมธอกซีเบนซาลดีไฮด์, เบนซิลเบนโซเอต และ ยูจีนอล แม้ว่าสเปคตรัมมีสัญญานที่ใช้ได้ แต่สารมีลักษณะเป็นของเหลวที่ระเหยได้ จึงไม่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ สำหรับ ไธมอล และ เฮกซะเมธลีนเตตรามีนมีลักษณะ เป็นของแข็ง จึงนำสารทั้งสองไปทดสอบสกัดพร้อมกับผงยาซินนาไรซีนในขั้นต่อไป



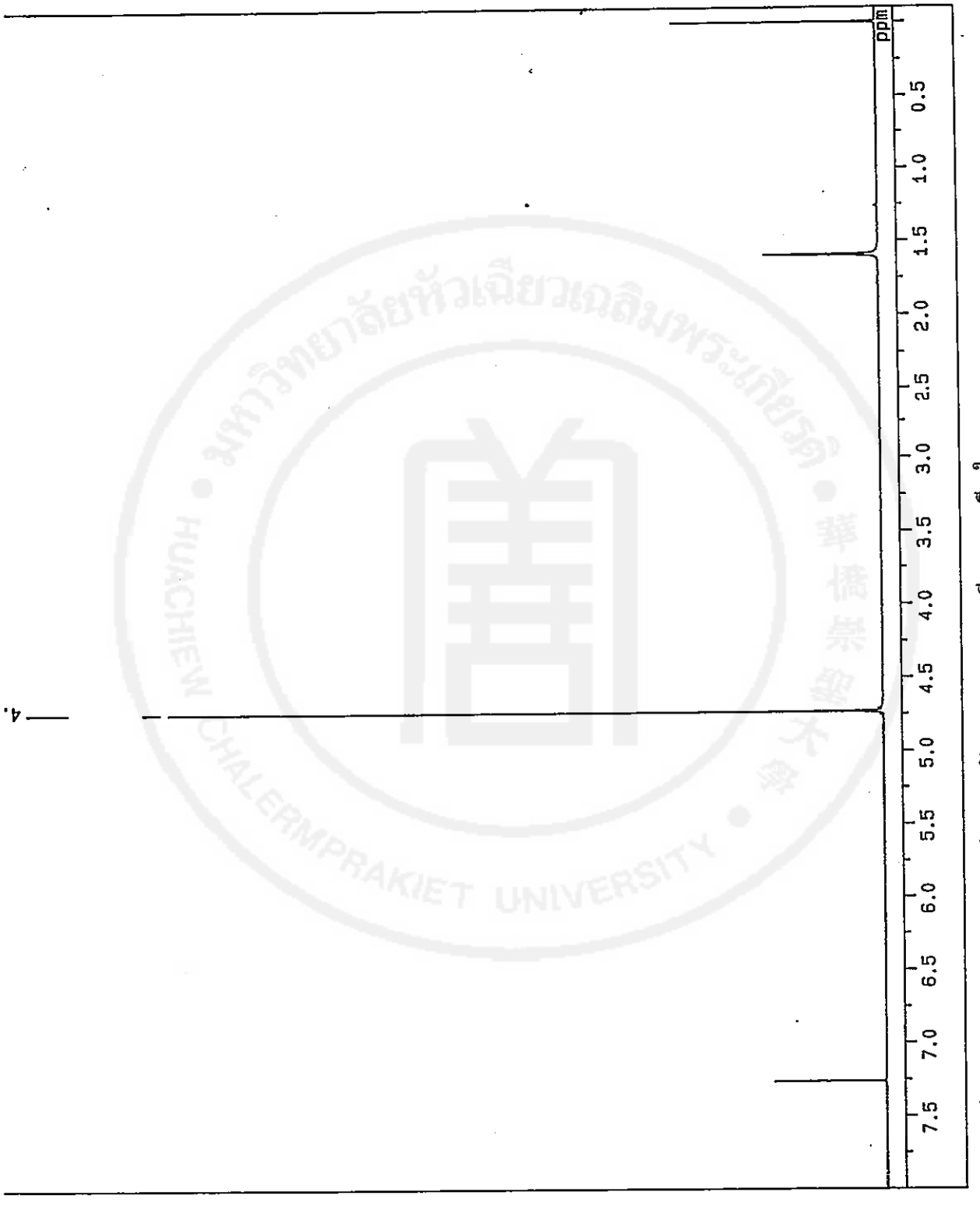
รูปที่ 3.1 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัม ของยาชินหาโรซีน ใน $CDCl_3$

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學



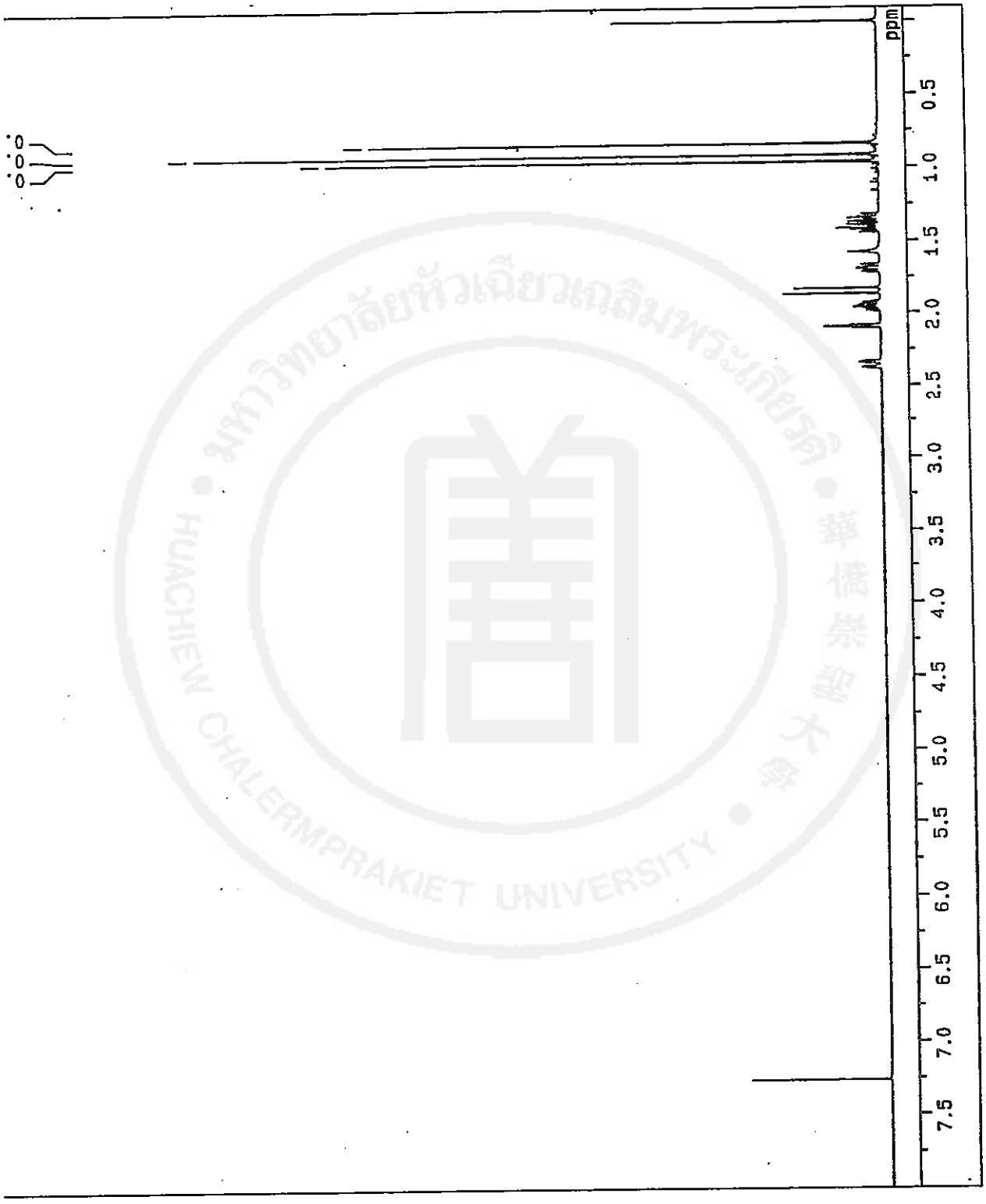
รูปที่ 3.2 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัม ของไกลอล ใน $CDCl_3$

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY



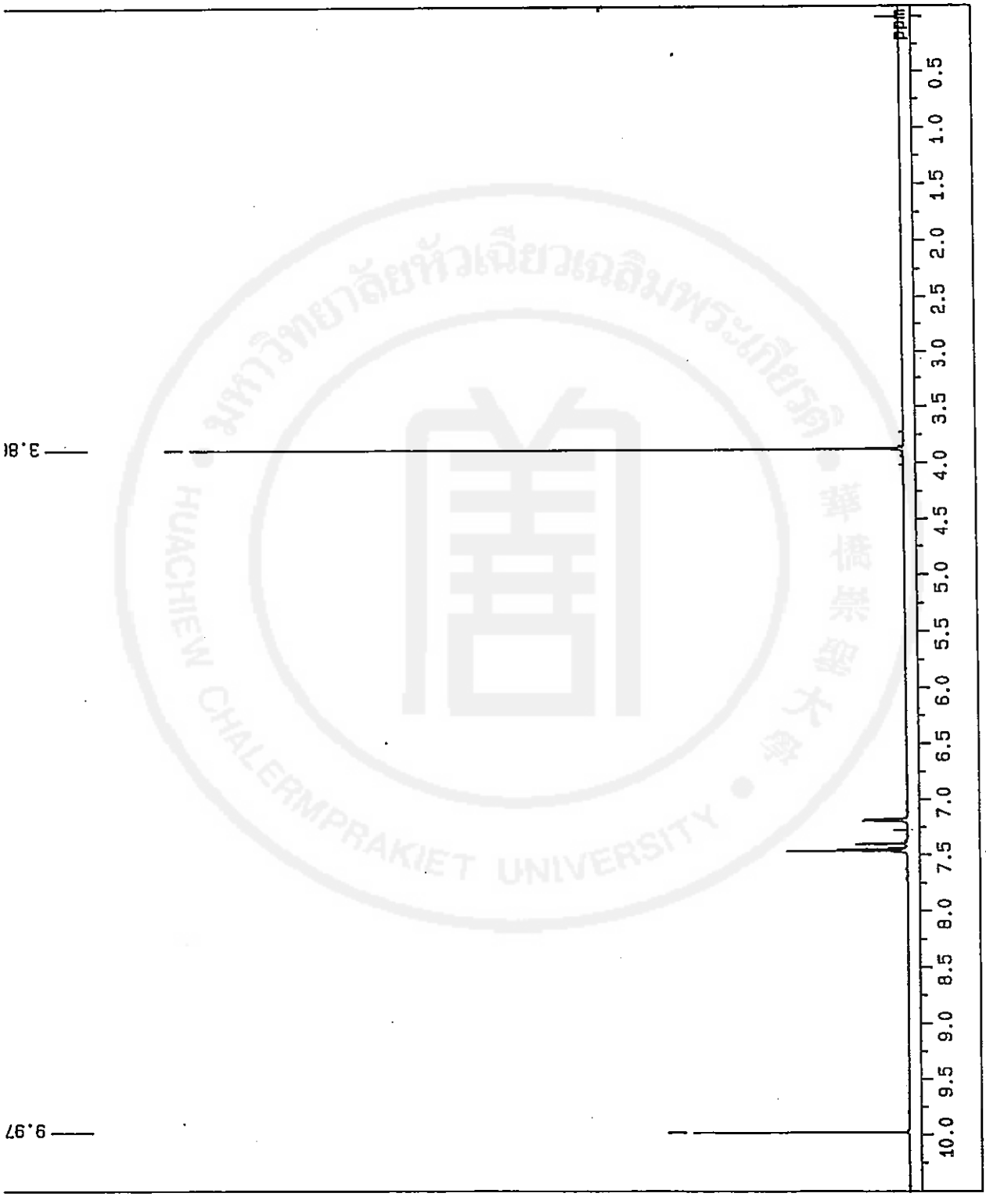
รูปที่ 3.3 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัม ของเลกาซะเมธิลีนเตตรามีน ใน $CDCl_3$

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學



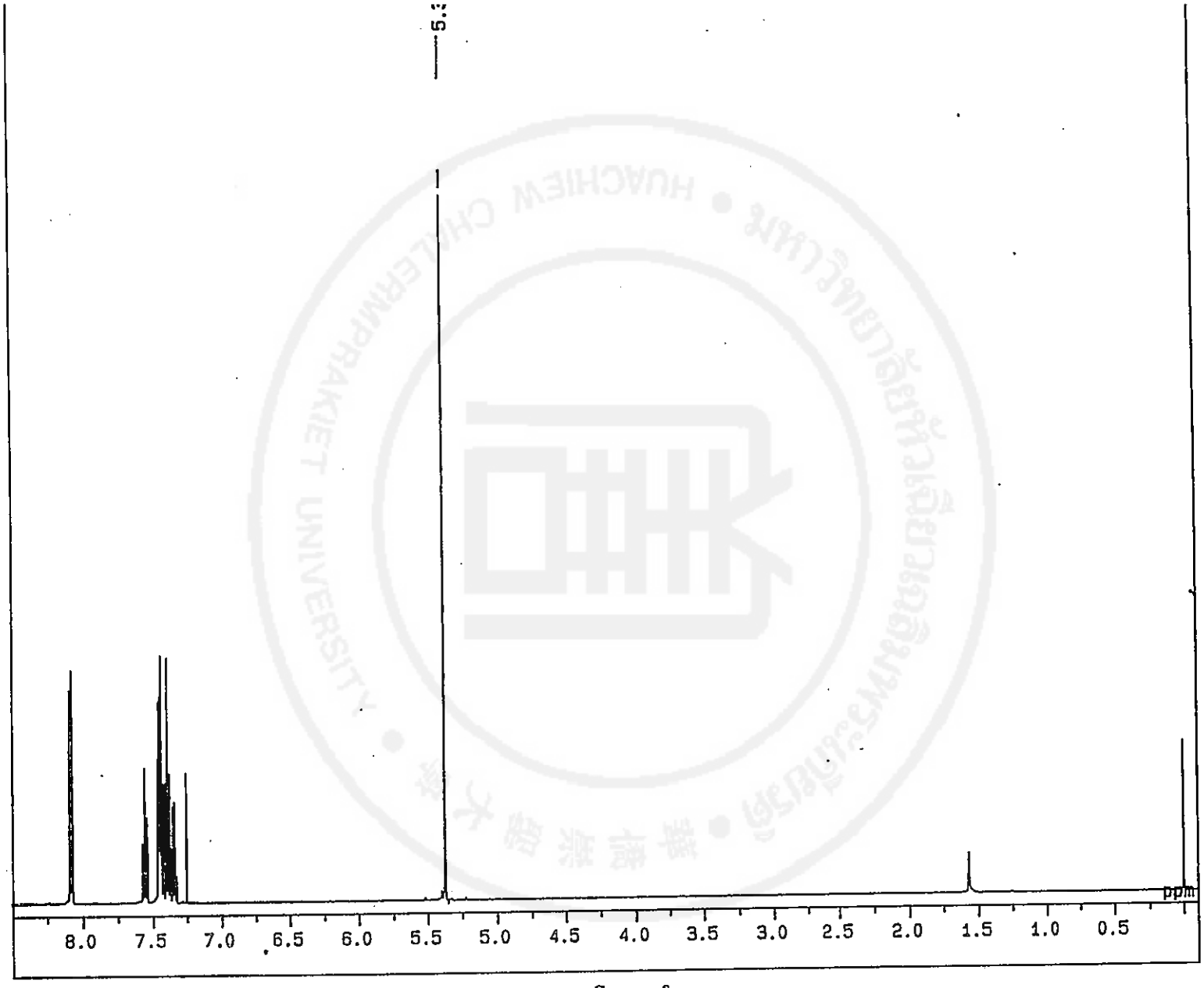
รูปที่ 3.4 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัม ของแคมเฟอรี่ ใน $CDCl_3$

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

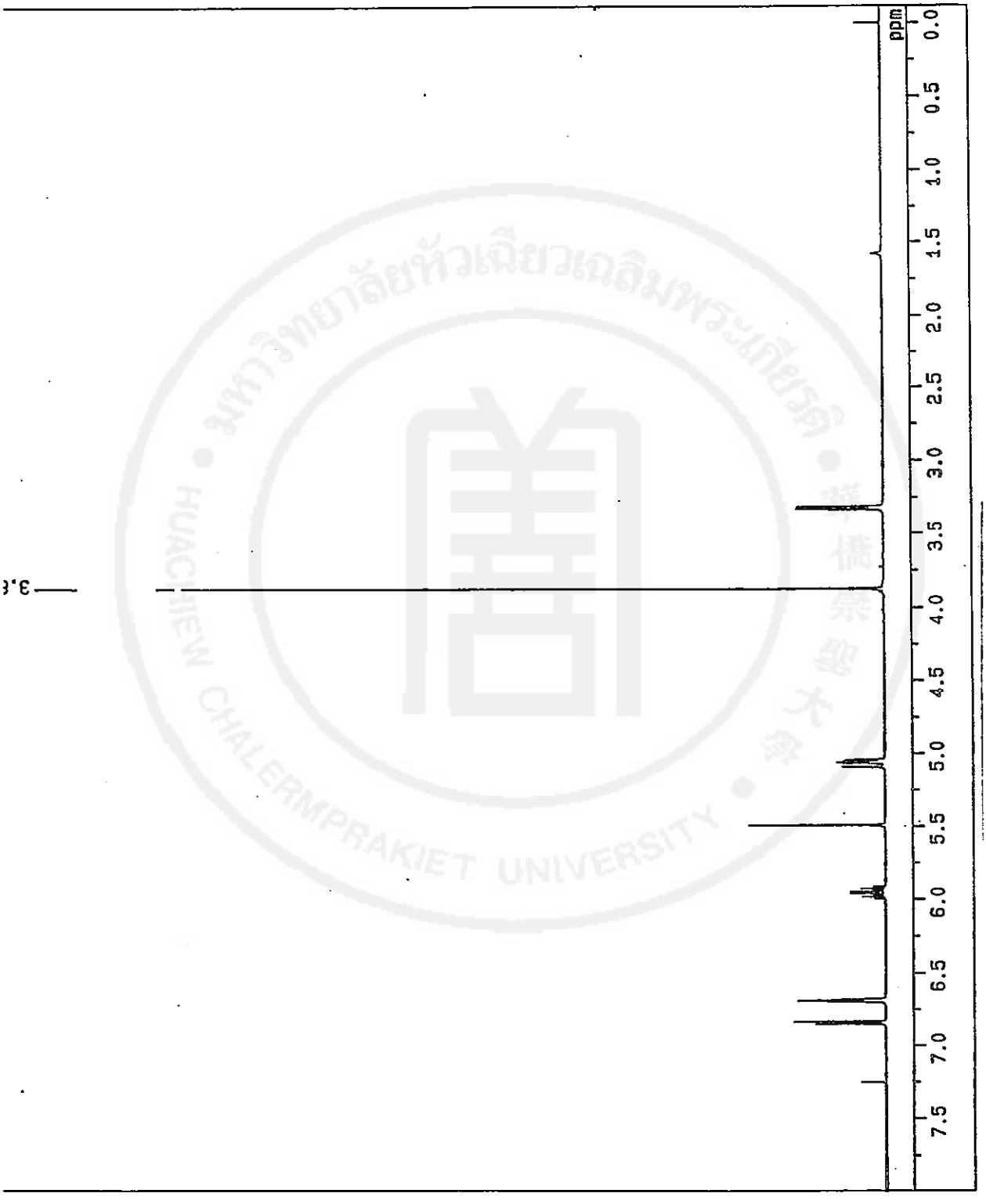


รูปที่ 3.5 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัม ของ 3-เมธอกซีเบนซาลดีไฮด์ ใน $CDCl_3$

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學



รูปที่ 3.6 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัม ของเบนซิลเบนโซเอต ใน $CDCl_3$



รูปที่ 3.7 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัม ของยูจีนอล ใน $CDCl_3$

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY

<u>ส่วนที่ 3</u> พัฒนาวิธีวิเคราะห์และประเมินวิธีวิเคราะห์ซินนาไรซีนในยาเม็ด และในสารมาตรฐาน

ก. <u>บันทึกสเปคตรัมของซินนาไรซีนกับอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดที่เลือกไว้</u>

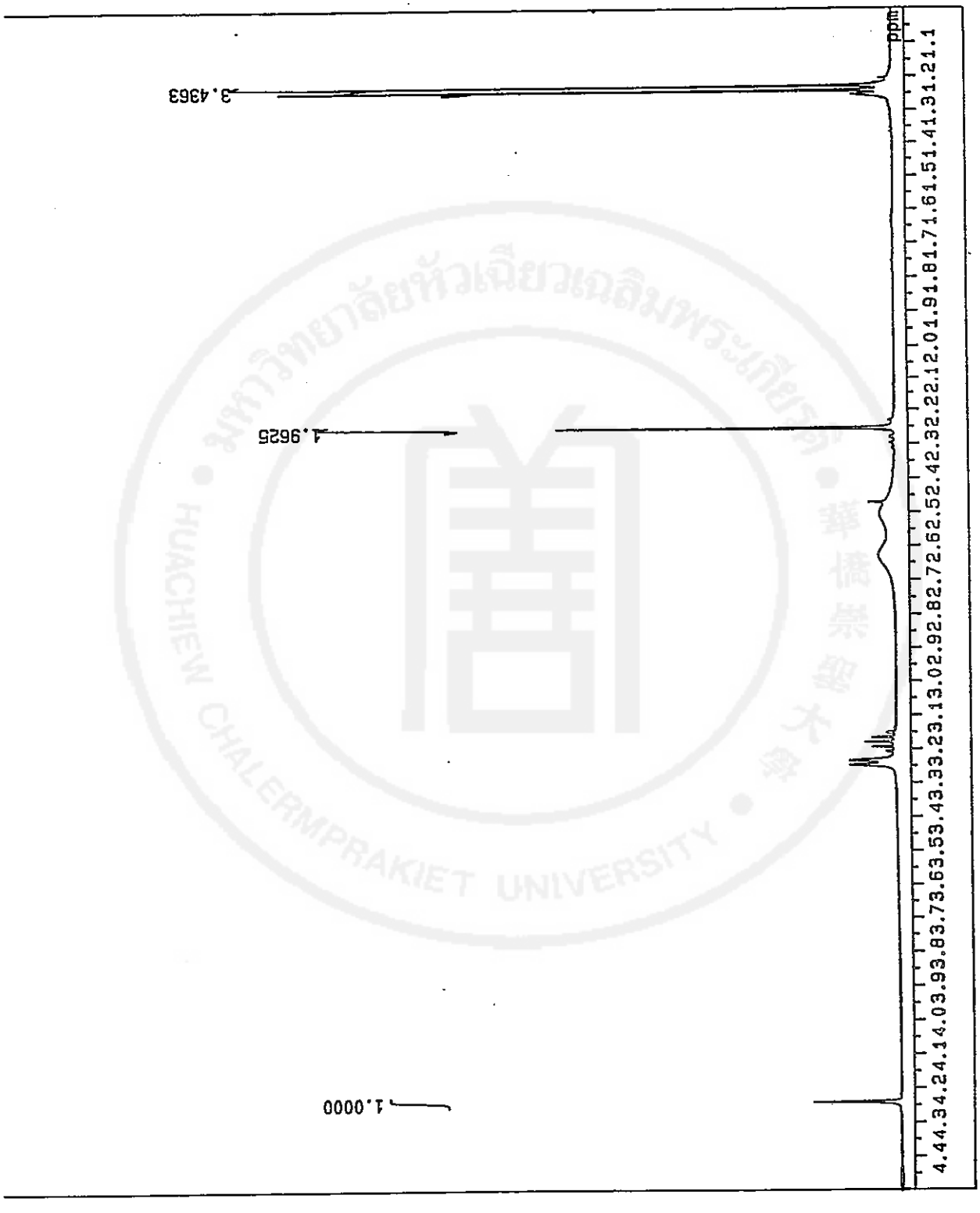
เมื่อทำการทดลองผสม อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ทั้งสองชนิดกับผงยาซินนาไรซีน และทำการสกัดโดยเขย่าด้วยเครื่องผสมวอร์เทกซ์เป็นเวลา 5 นาที และนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 4500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสชั้นบนด้วยหลอดหยดปลายแหลมใส่ลงในหลอด เอ็น.เอ็ม.อาร์ ให้สารละลายมีความสูง 2.5 ซม. และทำการบันทึกสเปคตรัม

ผลปรากฏว่าอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดทั้งสอง แสดงพีคที่เข้ากับสเปคตรัมของซินนาไรซีนได้ดี (รูปที่ 3.8 และ 3.9) แต่ไธมอลมีปัญหาตรง สัญญานที่ 2.27 ppm. กับที่ 1.24 ppm. โดยมีอัตราส่วนพื้นที่ไม่สอดคล้องกัน โดยอัตราส่วนควรจะใกล้เคียง 3 : 6 หรือ 1 : 2 พีค singlet ที่ 2.27 ppm. อาจมีการซ้อนทับกับสัญญานบางส่วนของช่วง 2.7 - 2.4 ppm ของซินนาไรซีน ทำให้พื้นที่ใต้พีคเพิ่มขึ้น ส่วน เฮกซะเมธลีนเตตรามีน มีเพียงพีคเดียวอยู่ในย่าน 4.5 - 6.0 ppm. ไม่ถูกรบกวนโดยสัญญานใดๆ และยังเป็นสารที่เคยมีรายงานการใช้เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด[10] จึงเลือกสารดังกล่าวทำการทดลองในขั้นต่อไป

จากการทดลองผสม เฮกซะเมธลีนเตตรามีน ในปริมาณ 10 มก. ผสมกับสารมาตรฐานซินนาไรซีน 100มก. และทำการบันทึก เอ็น.เอ็ม.อาร์. สเปคตรัม ดังรูปที่ 3.10 จะเห็นได้ว่าปริมาณของเฮกซะเมธลีนเตตรามีน สูงเกินไป จากการคำณวนปริมาณที่เหมาะสมของ เฮกซะเมธลีนเตตรามีน ในการเป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด โดยอัตราส่วนระหว่าง ซินนาไรซีน ต่อ เฮกซะเมธลีนเตตรามีน เป็น 368.5 (FW/1H) ต่อ 11.683 (FW/12H) ดังนั้นเมื่อทอนลงเป็นสัดส่วนอย่างง่ายจะได้เท่ากับ 31.54 ต่อ 1 ดังนั้นเมื่อต้องการวิเคราะห์ซินนาไรซีนจำนวน 100 มก. ควรจะใช้ เฮกซะเมธลีนเตตรามีนเท่ากับ 100/31.54 = 3.17 มก. หรือประมาณ 1 มก./มล. ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองบันทึกสเปคตรัมของสารมาตรฐานซินนาไรซีน 100 มก. และเฮกซะเมธลีนเตตรามีน ซึ่งเป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด 3.17 มก. ดังรูปที่ 3.9 พบว่าจะได้ความสูงของพีคใกล้เคียงกับพีคของซินนาไรซีน

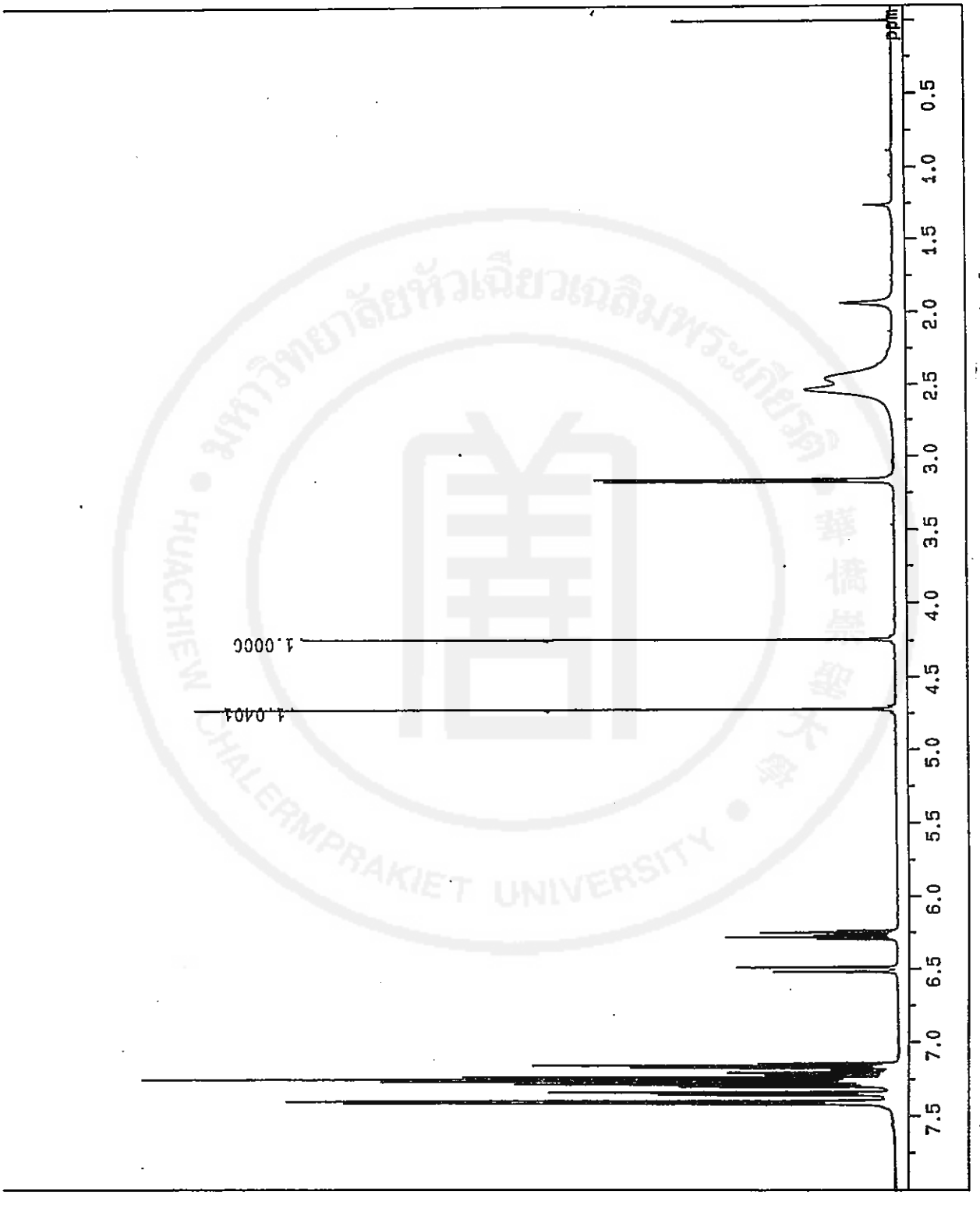
ข. <u>การทดสอบสารอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดกับผงยาซินนาไรซีน</u>

จากผลการทดลองบันทึกสเปคตรัมของผงยาซินนาไรซีนและเฮกซะเมธลีนเตตรามีนดังรูปที่ 3.9 เมื่อเปรียบเทียบกับสเปคตรัมของสารมาตรฐานซินนาไรซีนในรูปที่ 3.10 พบว่าแทบไม่มีความแตกต่างของทั้งสองสเปคตรัม สารอื่นๆที่ประกอบอยู่ในยาเม็ดไม่รบกวนสัญญานตลอดช่วงการบันทึกและในช่วง 4.5 - 6.0 ppm. ที่จะใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ ทำให้วิธีนี้จัดได้ว่ามีความจำเพาะเจาะจง(Selectivity)ของการวิเคราะห์ที่ดี



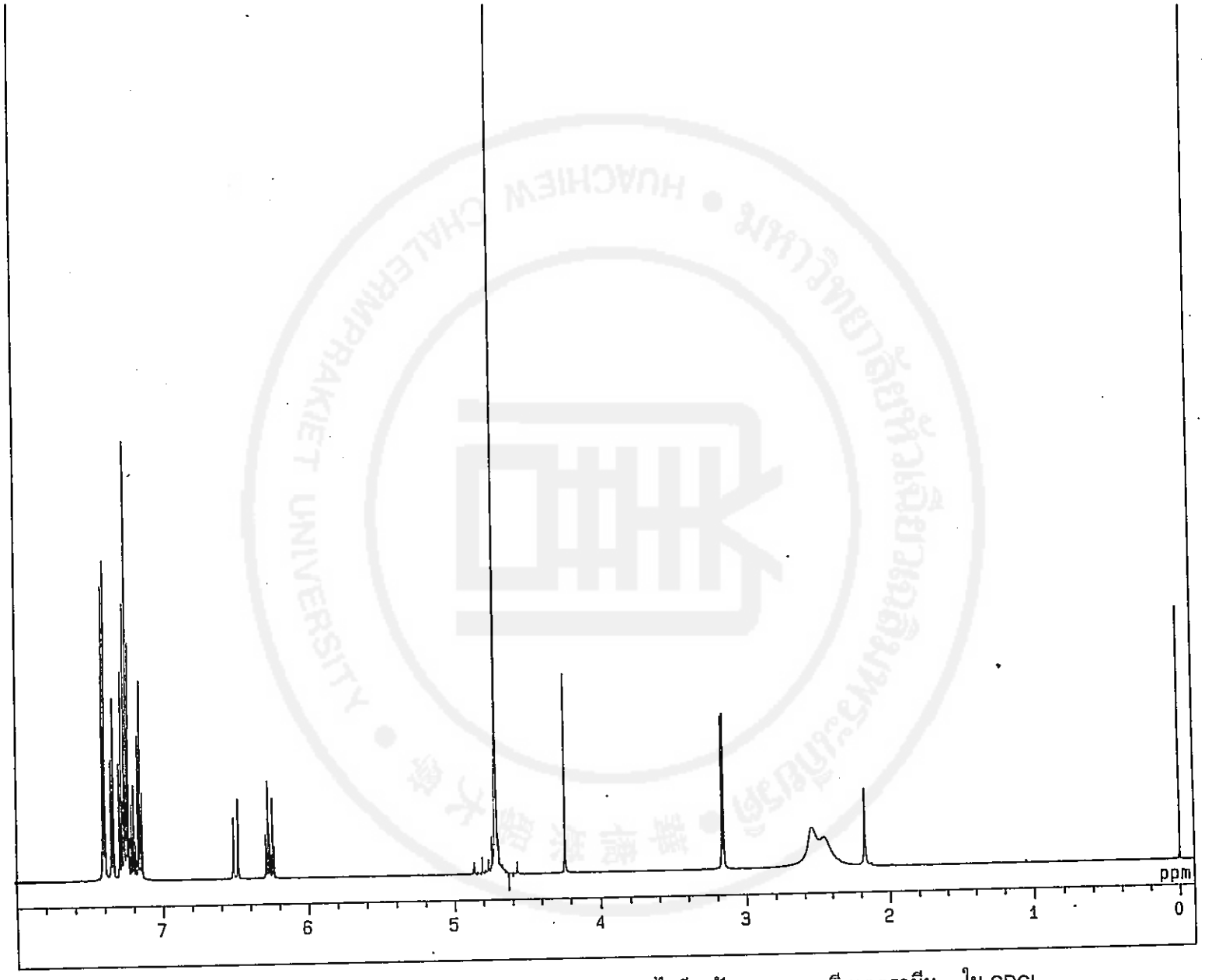
รูปที่ 3.8 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัม ของผงยาซิทหาโรซีน ก้น ในตัวทำละลาย $CDCl_3$

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學



รูปที่ 3.9 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัม ของผงยาชินหน่าไรซีน กับ เฮกซะเมธิลีนเตตรามีน ใน $CDCl_3$

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學



รูปที่ 3.10 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมของสารมาตรฐานซินนาไรซีน กับ เฮกซะเมธลีนเตตรามีน ใน $CDCl_3$

ค. การทดสอบปริมาตรที่เหมาะสมของตัวทำละลาย

จากการทดลองสกัดผงยาซินนาไรซีนด้วย $CDCl_3$ จำนวน 2 มล. เปรียบเทียบกับ 3 มล. พบว่าผลการวิเคราะห์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($t_{0.05}$ test = 0.1713 (1.860)) ดังข้อมูลในตารางที่ 3.1 และ 3.2 แต่ปริมาตรที่มากกว่าจะสะดวกในการดูดสารละลายเพื่อใส่ลงในหลอด เอ็น.เอ็ม.อาร์. ก่อนการบันทึกสเปคตรัม จึงเลือกใช้ $CDCl_3$ 3 มล.

ตารางที่ 3.1 ผลการสกัดผงยาซินนาไรซีนโดยใช้ $CDCl_3$ ขนาด 3 มล.

ตัวอย่าง	ปริมาณซินนาไรซีนในผงยา (มก.)	ปริมาณซินนาไรซีนที่วิเคราะห์ได้ (มก.)	% Label claim	ปริมาณของ IS (มก.)
1	100.30	102.49	102.18	2.80
2	99.61	101.98	102.38	2.80
3	100.50	100.23	99.73	2.80
4	101.54	101.10	99.46	4.01
5	138.03	142.05	102.91	4.01
		mean	101.33	
		SD	1.61	

ตารางที่ 3.2 ผลการสกัดผงยาซินนาไรซีนโดยใช้ $CDCl_3$ ขนาด 2 มล.

ตัวอย่าง	ปริมาณซินนาไรซีนในผงยา (มก.)	ปริมาณซินนาไรซีนที่วิเคราะห์ได้ (มก.)	% Label claim	ปริมาณของ IS (มก.)
1	100.10	102.98	102.88	1.90
2	100.20	105.34	105.13	1.90
3	100.30	100.46	100.16	1.90
4	97.71	97.80	100.09	2.67
5	97.76	98.18	100.43	2.67
		mean	101.73	
		SD	2.22	

ง. การทดสอบการวิเคราะห์สารมาตรฐานซินนาไรซีน

จากการทดลองหาเปอร์เซนต์การกลับคืน(% recovery) ของสารมาตรฐาน ปรากฏว่า เปอร์เซนต์การกลับคืนมีค่าเท่ากับ 100.52 ± 0.60 โดยแสดงข้อมูลในตารางที่ 3.3 ดังนี้

ตารางที่ 3.3 ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืน(% recovery) ของสารมาตรฐาน

ตัวอย่าง	ปริมาณยาที่ใส่ (มก.)	ปริมาณยาที่วิเคราะห์ได้ (มก.)	เปอร์เซนต์การกลับคืน (%)	ปริมาณของ IS (มก.)
1	54.80	54.77	99.94	2.62
2	72.80	72.85	100.07	2.62
3	91.11	92.12	101.11	2.62
4	123.30	124.51	100.98	2.62
		mean	100.52	
		SD	0.60	

จ.การหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าอัตราส่วนพื้นที่การอินติเกตกับค่าความเข้มข้นของซินนาไร-ซีน

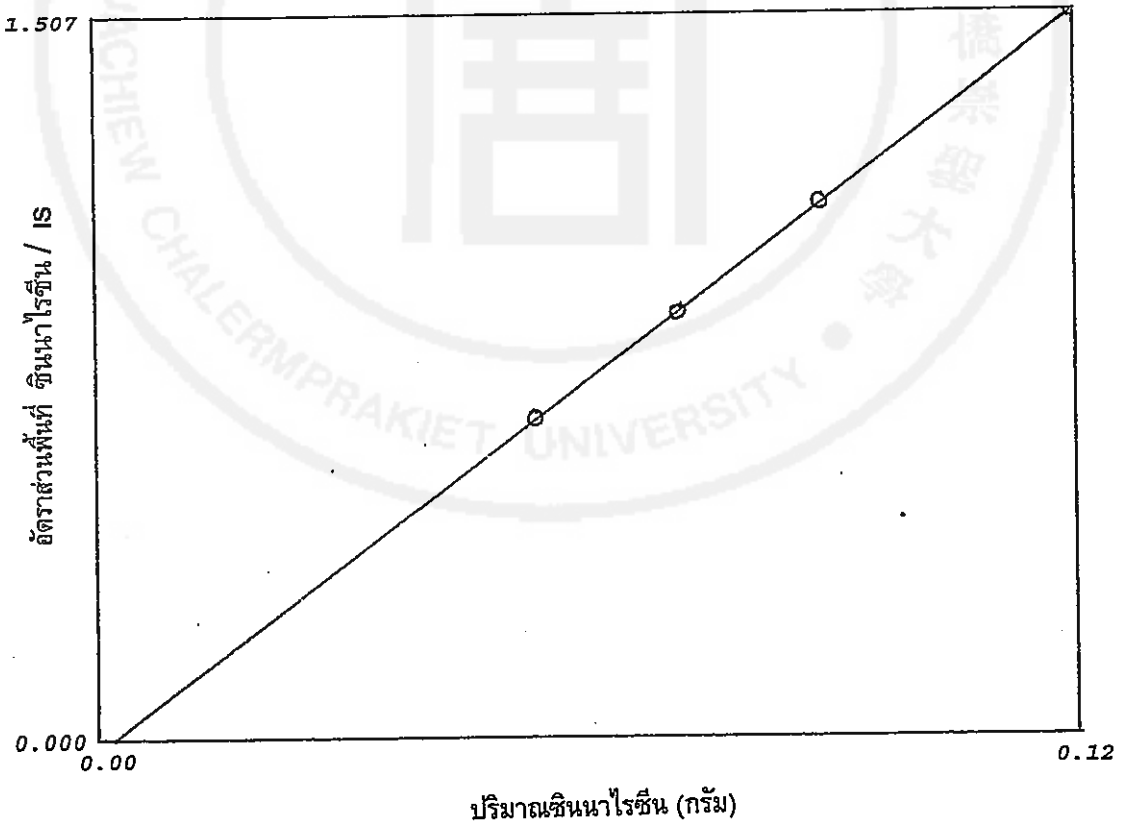
จากผลการทดลองในข้อ ง. นำข้อมูลมาหาความสัมพันธ์โดยวิธี Linear regression ดังตารางที่ 3.4 ผลการคำนวณปรากฏว่า ค่าปริมาณของซินนาไรซีนที่จะวิเคราะห์ กับค่าอัตราส่วนพื้นที่การอินติเกรตระหว่างซินนาไรซีนและอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง กราฟความสัมพันธ์ดังกล่าวแสดงในรูปที่ 3.10 และสมการเส้นตรงแสดงได้ดังนี้

$$Y = 12.44 X - 0.022$$

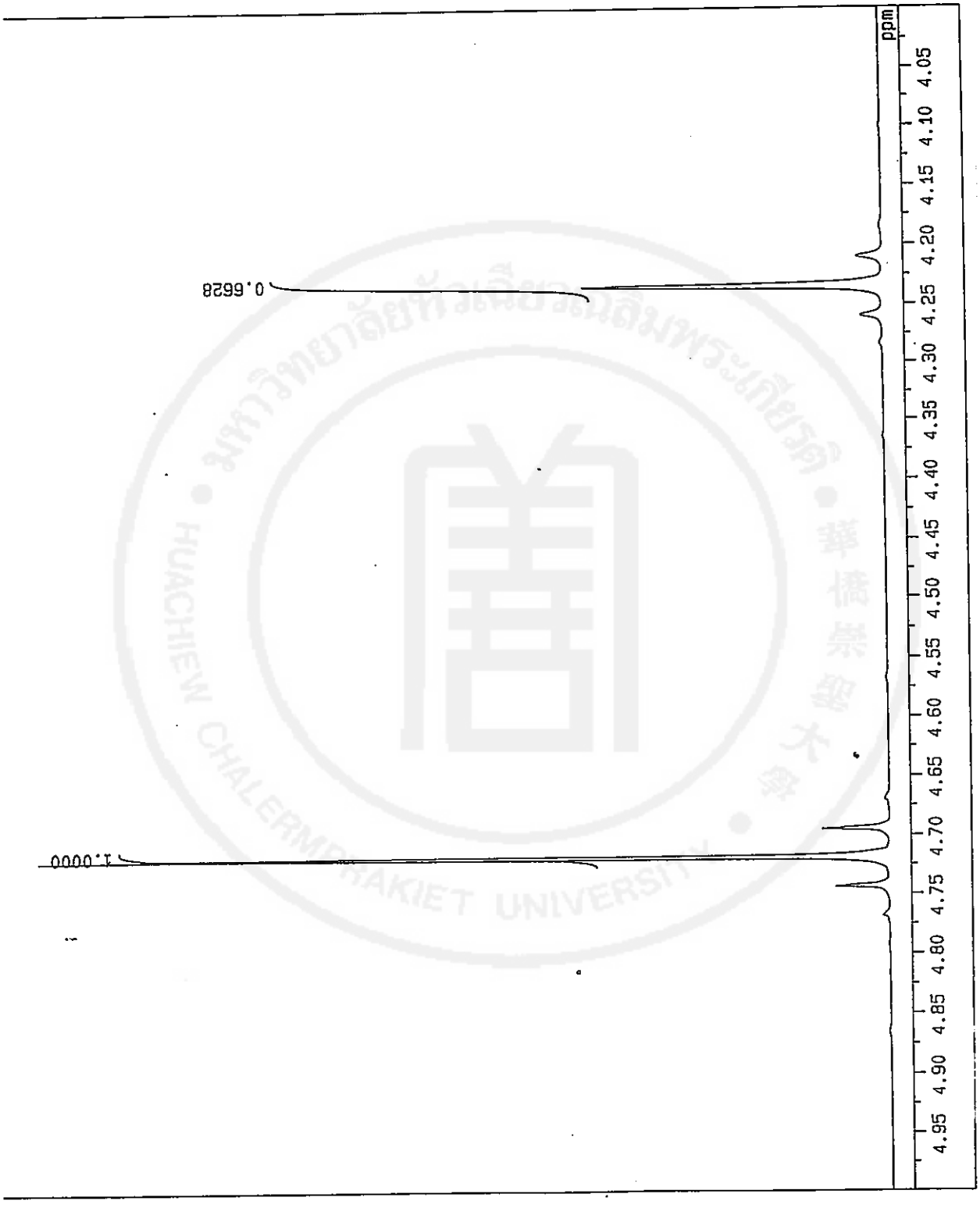
ค่า r (Correlation coefficient) = 0.9999

ตารางที่ 3.4 ค่าอัตราส่วนพื้นที่อินติเกตกับปริมาณของซินนาไรซีน

ตัวอย่าง	ปริมาณของซินนาไรซีน (กรัม)	พื้นที่อินติเกตของซินนาไรซีน	พื้นที่อินติเกตของ IS	อัตราส่วนพื้นที่ของซินนาไรซีน/ IS
1	0.055	0.663	1.000	0.663
2	0.073	0.882	1.000	0.882
3	0.091	1.115	1.000	1.115
4	0.123	1.507	1.000	1.507

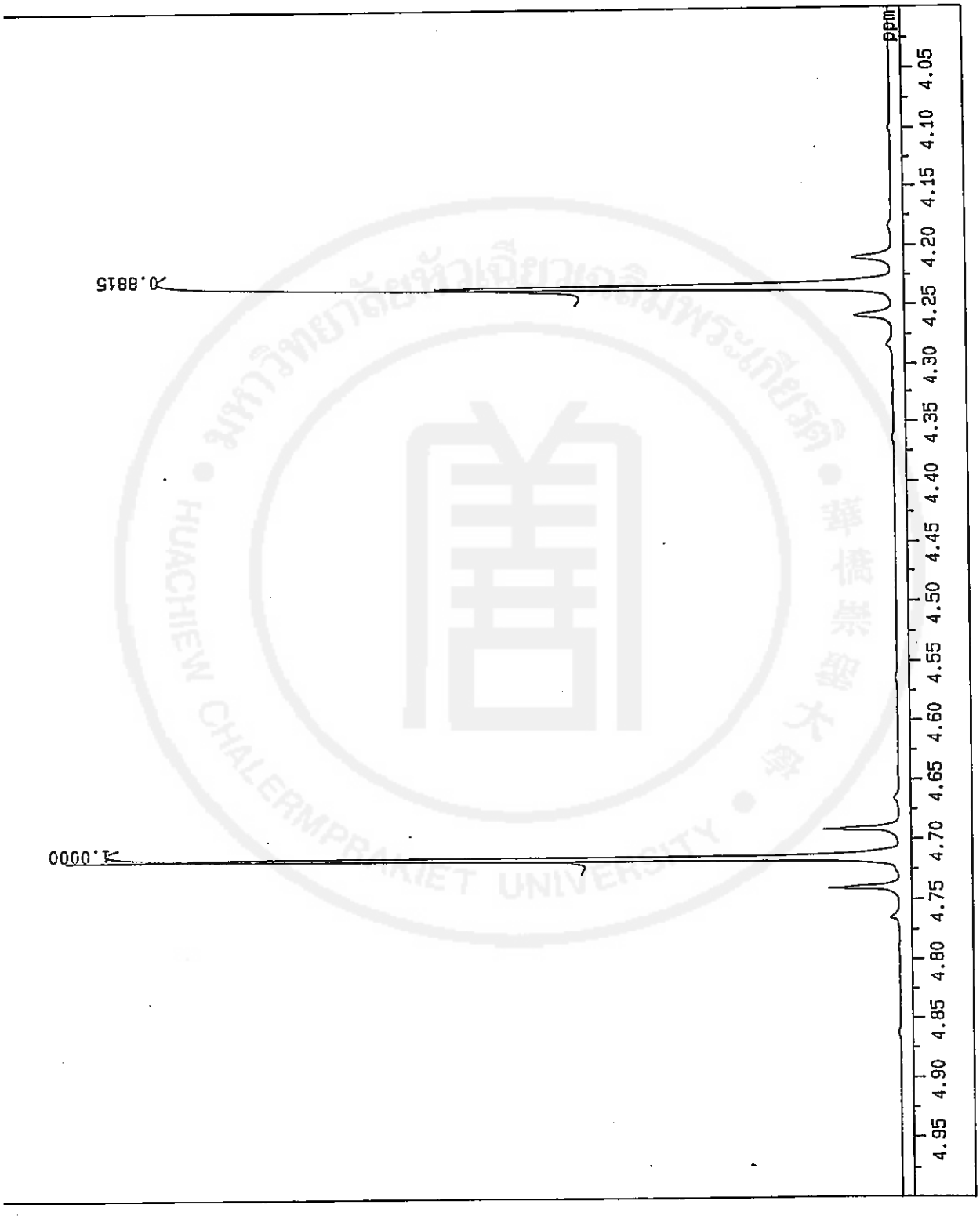


รูปที่ 3.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่พีค(สารมาตรฐาน/อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด) กับปริมาณซินนาไรซีน

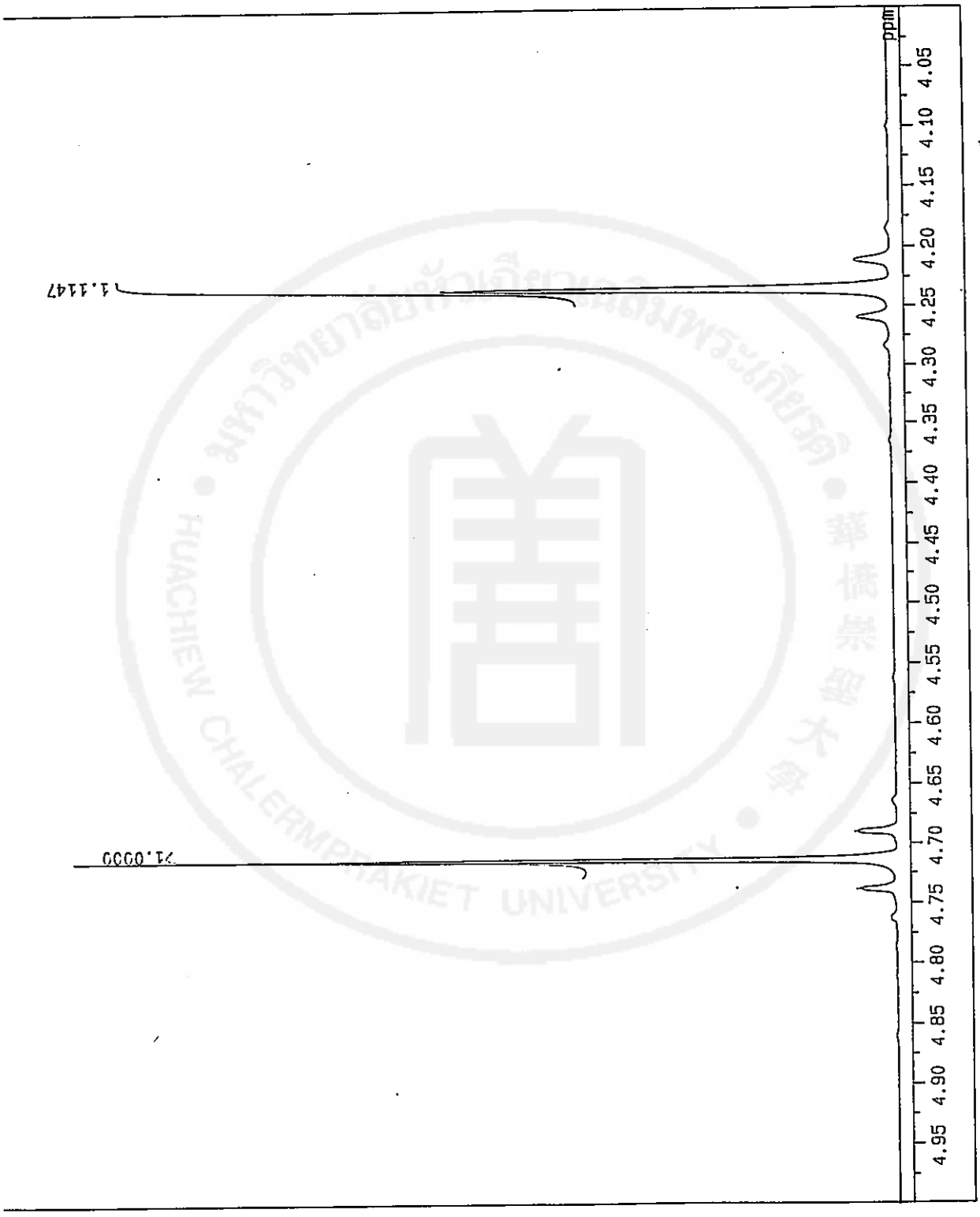


รูปที่ 3.11 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมของสารมาตรฐานซินนาไรซีน (0.055 กรัม) กับ อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด

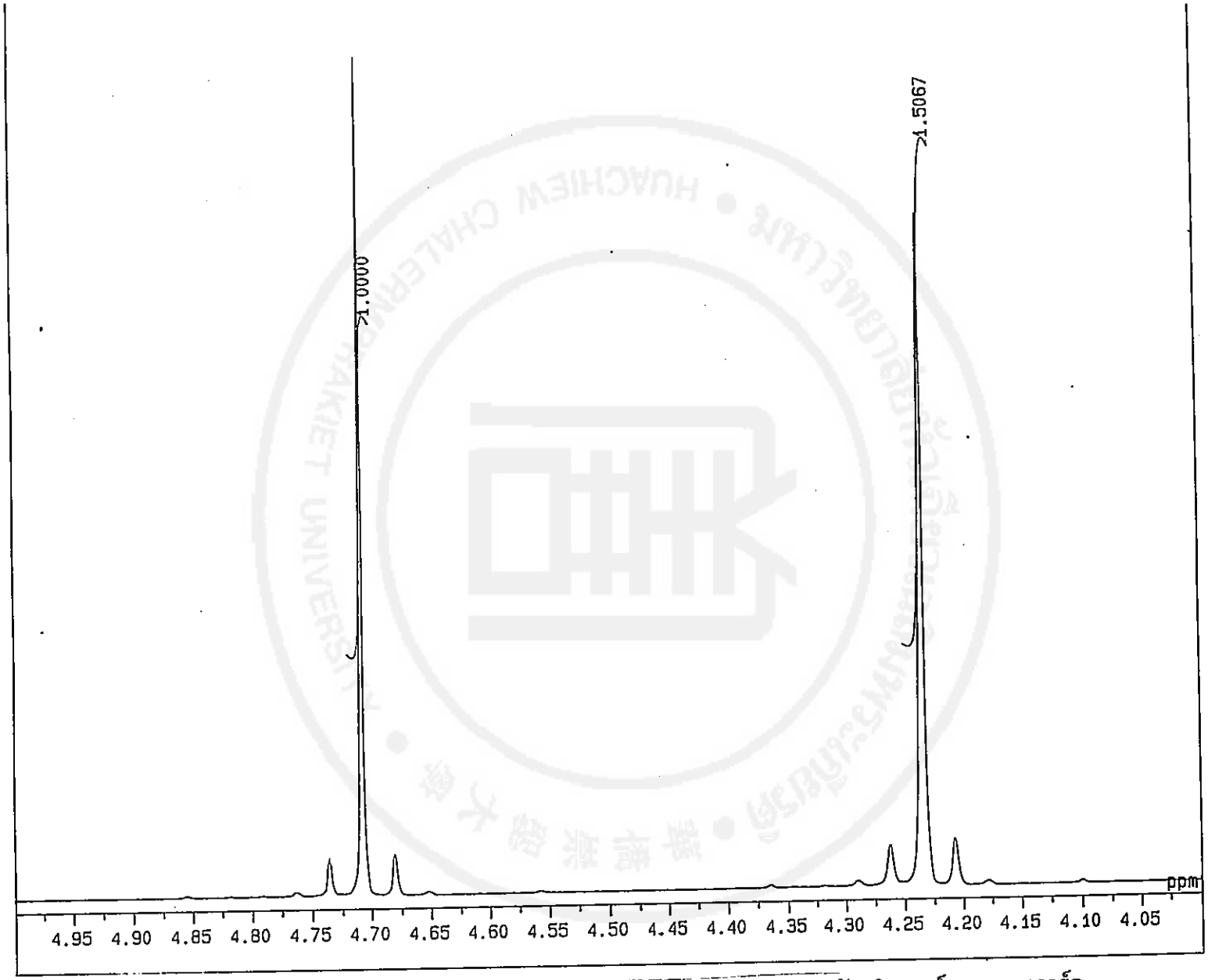
มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學



รูปที่ 3.13 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมของสารมาตรฐานซินนาไรซีน (0.073 กรัม) ที่ม



รูปที่ 3.14 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมของสารมาตรฐานพีนาโรซีน (0.091 กรัม)/กิ๊ป อิมเพอร์เนอลสแตนดาร์ด



รูปที่ 3.15 โปรตอน เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมของสารมาตรฐานซินนาไรซีน (0.123 กรัม) กับ อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด

ฉ. การทดสอบความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารซินนาไรซีนในยาเม็ด แสดงในตารางที่ 3.5 จะเห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความเที่ยงตรงที่ดี โดย % Label claim ของสารอยู่ในช่วง 97.48 - 101.04 % และมีค่าเฉลี่ยเป็น 99.00 $\pm$ 1.20 %

ตารางที่ 3.5 ค่า % Label claim ของการวิเคราะห์ยาเม็ดซินนาไรซีน

ตัวอย่าง	ปริมาณซินนาไซีน ที่ระบุ (มก.)	ปริมาณซินนาไรซีน ที่วิเคราะห์ได้ (มก.)	% Label claim	ปริมาณ IS (มก.)
1	50.50	50.06	99.13	3.936
2	70.90	69.11	97.48	3.936
3	89.80	88.89	98.99	3.936
4	122.80	122.34	99.63	3.936
5	49.03	48.13	98.16	4.010
6	76.12	74.38	97.71	4.010
7	103.97	105.05	101.04	4.010
8	105.73	105.62	99.90	4.010
		mean	99.00	
		SD	1.20	
		% CV	1.21	

ช. การทดสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy)

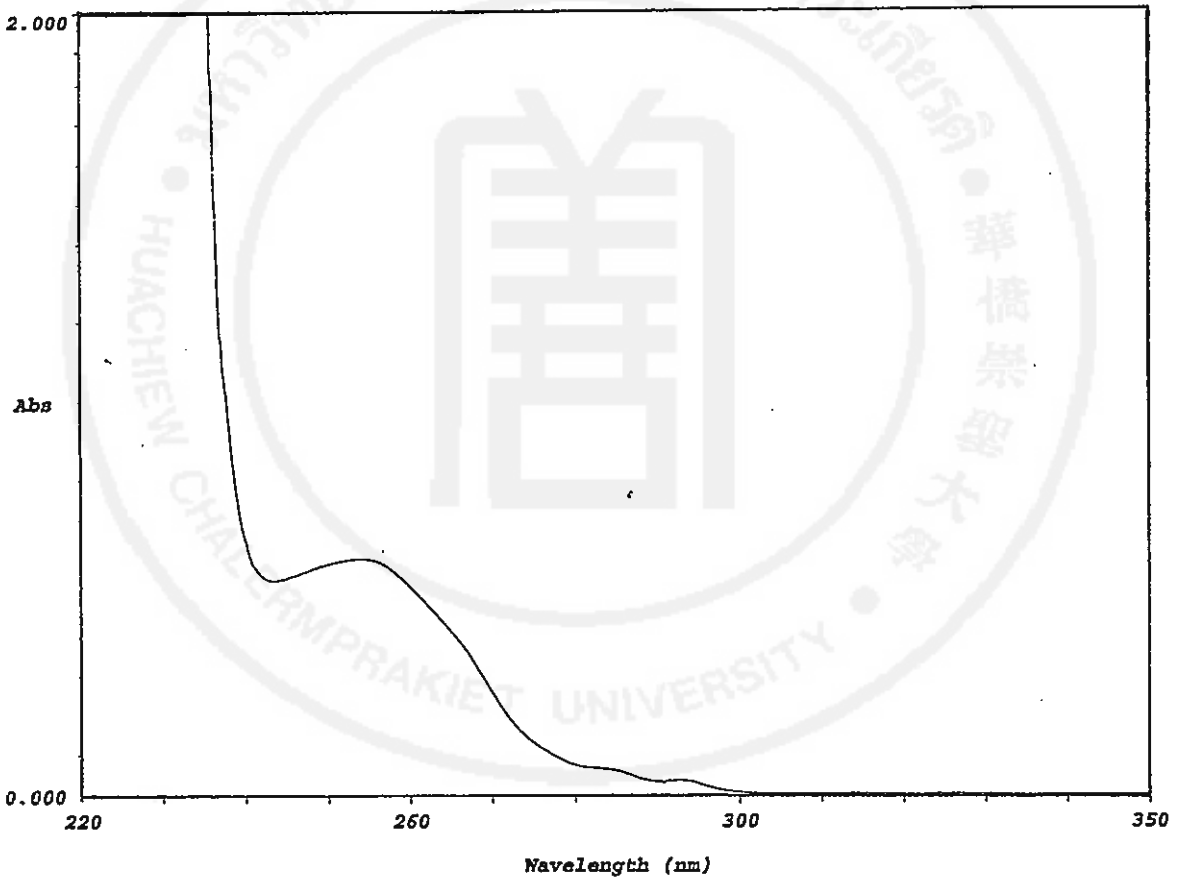
ผลการทดลองศึกษาความถูกต้องของการวิเคราะห์ในลักษณะ Standard addition โดยการพิจารณาค่าการกลับคืนของสารมาตรฐานที่เติมลงไปในปริมาณที่แน่นอน พบค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 99.80 $\pm$ 1.82 % แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมามีความถูกต้องดี ข้อมูลดังกล่าวแสดงในตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 เปอร์เซนต์การกลับคืนของซินนาไรซีนโดยวิธี Standard addition

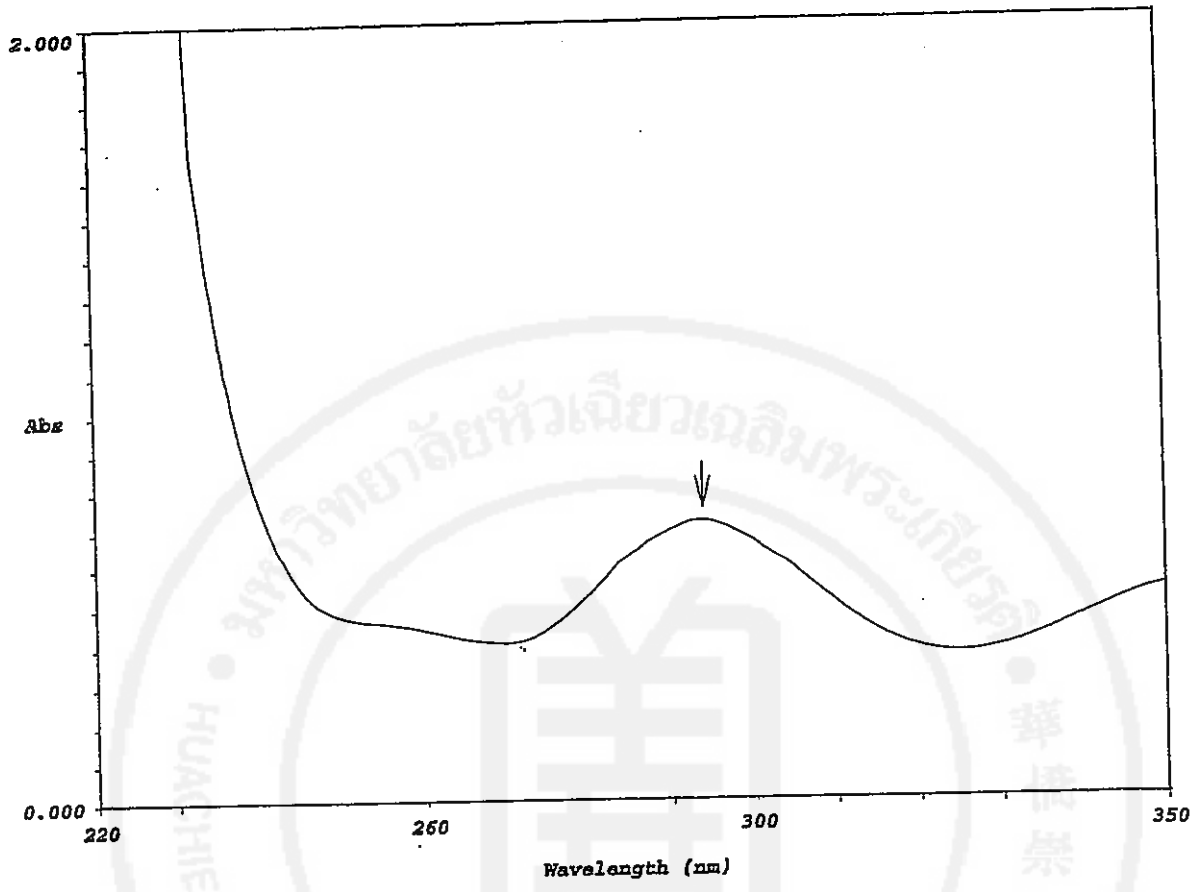
อย่าง	ปริมาณซินนาไซีนในตัวอย่าง (มก.)	ปริมาณซินนาไรซีนที่เติม (มก.)	ปริมาณซินนาไรซีนรวมที่วิเคราะห์ได้ (มก.)	เปอร์เซนต์การกลับคืน (%)	ปริมาณ IS (มก.)
1	76.69	25.1	101.39	98.41	4.80
2	79.36	21.3	100.84	100.84	4.30
3	96.57	16.10	113.08	102.54	4.60
4	123.87	18.50	142.11	98.59	4.60
5	118.40	12.60	130.83	98.65	3.70
			mean	99.80	
			SD	1.82	

<u>ส่วนที่ 4</u> การวิเคราะห์ยาเม็ดซินนาไรซีน โดยวิธี ปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนแบบ ชาร์จ-ทรานสเฟอร์ (Charge-transfer complex reaction) เพื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์

ซินนาไรซีนสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 254 นาโนเมตร ซึ่งช่วงแถบการดูดกลืนแสงดังกล่าวอาจถูกสารช่วยบางชนิดในตำรับยาเม็ดรบกวน Saleh G.A.และคณะ[5] จึงได้ปรับปรุงวิธีวิเคราะห์โดยใช้ปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนแบบ ชาร์จ-ทรานสเฟอร์ (Charge-transfer complex reaction) ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตรเลื่อนมาอยู่ที่ 295 นาโนเมตร ซึ่งแถบการดูดกลืนแสงมีความกว้างของแถบ (Band width) ลดลงทำให้ Sensitivity เพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 4.1 - 4.2



รูปที่ 4.1 อุลตราไวโอเลตสเปคตรัมของ ซินนาไรซีน ใน $CHCl_3$



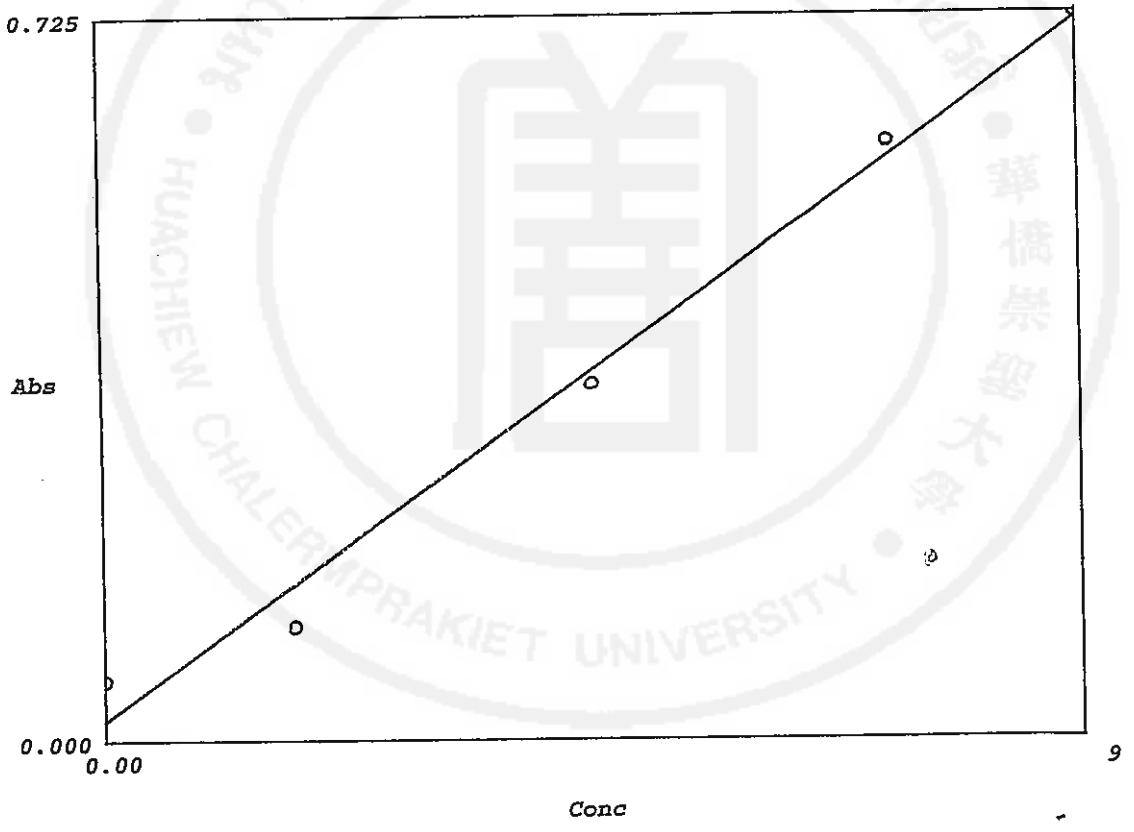
รูปที่ 4.2 อุลตราไวโอเลตสเปคตรัมของ สารประกอบเชิงซ้อนแบบชาร์จ-ทรานสเฟอร์ ระหว่าง ซินนาไรซีนกับ ไอโอดีน ใน 1,2 - Dichloroethane

ก. <u>การหาช่วงความเข้มข้นของการวิเคราะห์ที่เป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer's law)</u>

จากการทดลองหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ สารละลายมาตรฐาน ซินนาไรซีน กับค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนของซินนาไรซีนกับไอโอดีน พบว่าค่าทั้งสองมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.853 - 9.264 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังรูป 4.2 และแสดงข้อมูลในตารางที่ 4.1 ซึ่งจากการหาความสัมพันธ์โดยใช้ Linear regression สมการของเส้นตรงที่ได้คือ Y = 0.076 X + 0.021 เมื่อ Y คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนของซินนาไรซีนกับไอโอดีน และ X เป็นค่าความเข้มข้นของ สารละลายมาตรฐานซินนาไรซีน ค่า Correlation coefficient (r) = 0.9935

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าความเข้มข้นของซินนาไรซีนกับค่าการดูดกลืนแสง

สารมาตรฐาน	ค่าความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 295 นาโนเมตร
1	0.000	0.062
2	1.853	0.114
3	4.632	0.356
4	7.411	0.597
5	9.264	0.725



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนซินนาไรซีน-ไอโอดีน กับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 295 นาโนเมตร

สมการของเส้นตรง Y = 0.076 X + 0.021

ค่า Correlation coefficient = 0.9935

ค. การทดสอบความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

จากผลการทดลองพบว่าวิธีการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนแบบชาร์จ - ทรานสเฟอร์ ระหว่าง ซินนาไรซีน กับ ไอโอดีน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 295 นาโนเมตร มีความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ดี ดังข้อมูลแสดงในตารางที่ 4.2 % Label claim มีค่าอยู่ในช่วง 96.52 - 98.27 โดยมีค่าเฉลี่ย 97.34 ± 0.66 %

ตารางที่ 4.2 การทดสอบความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์การเกิดสารประกอบ เชิงซ้อนแบบชาร์จ-ทรานสเฟอร์ ระหว่าง ซินนาไรซีน กับ ไอโอดีน

ตัวอย่าง	ปริมาณซินนาไรซีนที่ระบุ (มก.)	ปริมาณซินนาไรซีนที่วิเคราะห์ได้(มก.)	% Label claim
1	8.32	8.06	96.88
2	8.86	8.65	97.63
3	10.84	10.60	97.79
4	10.98	10.79	98.27
5	11.50	11.10	96.52
6	13.40	12.99	96.94
		mean	97.34
		SD	0.66
		% CV	0.68

ศูนย์บรรณสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ง. การทดสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์

จากการทดลองพบว่าวิธีการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนแบบชาร์จ-ทรานสเฟอร์ ระหว่าง ซินนาไรซีน กับ ไอโอดีน และ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 295 นาโนเมตร มีความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ดี ดังข้อมูลในตารางที่ 4.3 โดยมีค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนอยู่ในช่วง 100.22 - 104.71 และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 102.24 ± 1.62 %

ตารางที่ 4.3 การทดสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์การเกิดสารประกอบ เชิงซ้อนแบบชาร์จ-ทรานสเฟอร์ ระหว่าง ซินนาไรซีน กับ ไอโอดีน

ตัวอย่าง	ปริมาณซินนาไรซีนที่ระบุ (มก.)	ปริมาณซินนาไรซีนที่เติม (มก.)	ปริมาณซินนาไรซีนที่วิเคราะห์ได้ (มก.)	ปริมาณการกลับคืน (มก.)	เปอร์เซนต์การกลับคืน (%)
1	8.23	13.36	21.86	13.63	102.02
2	9.11	12.10	21.78	12.67	104.71
3	9.65	9.10	18.77	9.12	100.22
4	9.88	12.22	22.40	12.52	102.45
5	10.38	11.80	22.39	12.01	101.78
				mean	102.24
				SD	1.62

จ. เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ระหว่างวิธี เอ็น.เอ็ม.อาร์ กับวิธี สารประกอบเชิงซ้อนแบบชาร์จ-ทรานสเฟอร์

จากข้อมูลการวิเคราะห์ของทั้งสองวิธี เมื่อเปรียบเทียบโดยใช้ Student's t test และ F test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ พบว่าผลการวิเคราะห์ของทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ระหว่าง วิธี เอ็น.เอ็ม.อาร์ กับ วิธีชาร์จ - ทรานสเฟอร์

	วิธี เอ็น.เอ็ม.อาร์ (^{1}H-NMR)	วิธีชาร์จ - ทรานสเฟอร์
mean	99.00	97.34
SD	1.20	0.66
% CV	1.21	0.68
จำนวนตัวอย่าง	8	6
Student's $t_{0.05}$ test	2.052 (2.179)	
$F_{0.05}$ test	3.30 (5.60)	

จะเห็นได้ว่าวิธีทาง เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคโตรสโคปี ให้ผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้เทคนิคการวิเคราะห์ที่แตกต่าง โดยสังเกตจากค่า studen's t test ซึ่งมีค่า 2.052 ค่าดังกล่าวยังอยู่ในขอบเขตที่กำหนดไว้คือ 2.179 (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์) แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค เอ็น.เอ็ม.อาร์ เป็นที่น่าเชื่อถือแม้จะทำการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ด้วยวิธีวิเคราะห์อื่นที่ใช้เทคนิคที่แตกต่าง เมื่อสังเกตขั้นตอนการวิเคราะห์พบว่ามีขั้นตอนที่ง่ายปราศจากการเจือจางสารตัวอย่างเมื่อเทียบกับวิธีอื่น ระยะเวลาที่ใช้ต่อตัวอย่างสั้น และจุดเด่นคือไม่ต้องเตรียมสารมาตรฐานมาเปรียบเทียบ . ข้อจำกัดของเทคนิคนี้จุดใหญ่อยู่ตรงส่วนของเครื่องมือซึ่งปกติเครื่อง เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคโตรมิเตอร์ ยังมีใช้กันน้อยในประเทศไทยซึ่งคาดว่าในอนาคตอันใกล้คงมีการใช้อย่างแพร่หลายมากขึ้น อย่างไรก็ตามจากการศึกษาวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวสามารถประยุกต์ใช้ วิธีทางเอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคโตรสโคปี ไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ยาฟลูนาไรซีน(Flunarizine) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของซินนาไรซีน และ ซินนาไรซีน ที่ผสมกับ วิตามิน บี6 โดยทำการปรับปรุงสภาวะการทดลองตรงส่วนของระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของยากับอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด นอกจากนั้นผู้วิจัยยังมองการประยุกต์ใช้ในการเตรียมสารมาตรฐานของสารสกัดจากสมุนไพรไทย

ปกติแล้วสมุนไพรที่ใช้กันอยู่ในประเทศไทยล้วนอยู่ในรูปของวัตถุดิบที่นำมาบดและบรรจุแคปซูลหรือทำในรูปยาชงละลาย ปัญหาที่พบได้บ่อยในการใช้ลักษณะนี้คือความคงที่ของตัวยาที่รักษาซึ่งมักพบว่าบางครั้งก็หายบางครั้งก็ไม่หาย สาเหตุเนื่องจากปริมาณตัวยาสำคัญมีต่ำกว่าระดับการรักษาทั้งนี้เนื่องจากสมุนไพรที่ปลูกในแต่ละแห่งมีความแตกต่างของสภาพดินและสภาพอากาศ จะส่งผลโดยตรงต่อปริมาณสารเคมี(Secondary metabolites)ที่ผลิตขึ้นในต้นสมุนไพรนั้นแตกต่างกัน อีกปัญหาหนึ่งคือฤดูกาลที่แตกต่างกันทำให้บางช่วงของผลผลิตจะให้ปริมาณตัวยาที่สูงขณะที่บางช่วงปริมาณสารสำคัญจะต่ำ ดังนั้นหากไม่มีวิธีการตรวจสอบระดับสารสำคัญดังกล่าวอาจทำให้เกิดความไม่มั่นใจผลการรักษาโดยการใช้สมุนไพร การยอมรับจะยากขึ้นเรื่อย ๆ วิธีการตรวจสอบที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันส่วนใหญ่จะอาศัยการตรวจสอบส่วนของโครงสร้างหรือหมู่ฟังชัน (Functional group) ที่เป็นตัวแทนของสารหลัก ซึ่งวิธีดังกล่าวไม่สามารถทราบปริมาณสารสำคัญแต่ละชนิด จึงยังไม่ใช่วิธีการยืนยันผลการรักษาที่แท้จริง

การควบคุมคุณภาพสมุนไพรในขั้นละเอียดเป็นเรื่องที่ยากและซับซ้อน ซึ่งปัญหาที่พบมีหลายประการเช่น อาจเกิดจากการไม่ทราบว่าสารตัวใดในสมุนไพรนั้นเป็นสารที่ออกฤทธิ์เนื่องจากขาดการทดสอบฤทธิ์หรือไม่มีการรายงานฤทธิ์หรือยังไม่สามารถระบุกลไกการออกฤทธิ์ การขาดสารมาตรฐานเป็นอีกปัญหาที่พบบ่อยเนื่องจากสารมาตรฐานไม่มีจำหน่าย ส่วนใหญ่เป็นการเตรียมขึ้นใช้ในวงแคบในกลุ่มประเทศที่สนใจทางด้านนี้เช่น จีน ยุโรป และ ญี่ปุ่น นอกจากนั้นพืชที่เป็นที่สนใจในประเทศไทยอาจไม่สามารถหาสารมาตรฐานได้เนื่องจากเป็นพืชที่ทางตะวันตกไม่มีหรือไม่สนใจ ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคโตรสโคปี สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเตรียมสารมาตรฐานที่ได้จากการสกัด ซึ่งอาจจะมีความบริสุทธิ์ในเกณฑ์ที่ไม่สูงเนื่องจากทำให้บริสุทธิ์อย่างสมบูรณ์ได้ยาก ลักษณะของสารที่จะทำได้ควรมี เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัมที่เรียบง่าย ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้วิธีดังกล่าวไม่สามารถใช้กับสารได้ทุกชนิด สารที่ได้จากการสกัดจะนำมาหาปริมาณโดยเปรียบเทียบกับอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดที่เหมาะสม

และทำเป็นสารมาตรฐานในลักษณะ Working standard ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสมุนไพรโดยใช้วิธี HPTLC และ HPLC ได้

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัย

เทคนิคทาง เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคโตรสโคปี ไม่เพียงแต่จะมีประโยชน์ทางด้านการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมี แต่ยังมีประโยชน์ในด้านการวิเคราะห์หาปริมาณสารซึ่งการวิจัยครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ในการนำมาประยุกต์ใช้ในทางยา โดยมีข้อเด่นตรงที่ไม่จำเป็นต้องใช้สารมาตรฐานของตัวยาที่จะวิเคราะห์

การวิเคราะห์หาปริมาณยาเม็ดซินนาไรซีนโดยวิธี เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคโตรสโคปี ทำได้โดยชั่งผงยาให้มีตัวยาเทียบเท่าซินนาไรซีนประมาณ 100 มก. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มล. แล้วปิเปตสารละลายของอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (Hexamethylenetetramine) ใน $CDCl_3$ จำนวน 3.0 มล.(1มก/มล.) ใส่ในหลอดทดลอง ทำการสกัดด้วยเครื่องผสมวอร์เทกซ์(Vortex mixer) เป็นเวลา 5 นาที นำหลอดทดลองที่ผ่านการเขย่ามาใส่ลงในเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลาย $CDCl_3$ นำมาทำการบันทึก เอ็น.เอ็ม.อาร์ สเปคตรัม และคำณวนปริมาณของซินนาไรซีนจากค่าอินดิเกรตที่ 4.22 ppm. ของซินนาไรซีน เปรียบเทียบกับที่ 4.72 ppm. ของอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด

วิธีวิเคราะห์ยาเม็ดซินนาไรซีนที่พัฒนาขึ้นนี้มีความสะดวก รวดเร็ว มีความจำเพาะสูง ไม่ถูกรบกวนโดยสารช่วยที่มีอยู่ในตำรับ และ ไม่จำเป็นต้องใช้สารมาตรฐานของซินนาไรซีน โดยให้เปอร์เซนต์การกลับคืนเมื่อวิเคราะห์สารมาตรฐาน โดยเฉลี่ย 100.52 $\pm$ 0.60 % (n = 4) และเปอร์-เซนต์การกลับคืนเมื่อวิเคราะห์ยาเม็ด โดยเฉลี่ย 99.80 $\pm$ 1.82 % (n = 5) ผลการวิเคราะห์ยาเม็ดพบค่า % Label Claim โดยเฉลี่ย 99.00 $\pm$ 1.20 % (n = 8) และวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวได้เปรียบเทียบกับวิธีการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนแบบ ชาจซ์-ทรานสเฟอร์ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

ภาคผนวก

ข้อมูลค่าอินติเกรตสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี เอ็น.เอ็น.อาร์

ข้อมูลค่าอินติเกรตสำหรับการวิเคราะห์ซินนาไรซีนด้วยวิธี เอ็น.เอ็น.อาร์ จะแสดงในตารางที่ 1 - 5 ซึ่งสอดคล้องกับค่าในตารางที่ 3.1 - 3.6 ของบทที่ 3

ตารางที่ 1 ค่าอินติเกรตของผลการสกัดผงยาซินนาไรซีนโดยใช้ $CDCl_3$ จำนวน 3 มล.

ตัวอย่าง	ซินนาไรซีน ที่ 4.22 ppm.	IS ที่ 4.72 ppm.
1	1.1605	1.0000
2	1.1548	1.0000
3	1.1349	1.0000
4	1.0000	1.2510
5	1.1231	1.0000

ตารางที่ 2 ค่าอินติเกรตของผลการสกัดผงยาซินนาไรซีนโดยใช้ $CDCl_3$ จำนวน 2 มล.

ตัวอย่าง	ซินนาไรซีน ที่ 4.22 ppm.	IS ที่ 4.72 ppm.
1	1.7184	1.0000
2	1.7577	1.0000
3	1.6764	1.0000
4	1.1614	1.0000
5	1.1658	1.0000

ตารางที่ 3 ค่าอินติเกรตของเปอร์เซนต์การกลับคืน(% recovery) ของสารมาตรฐาน

ตัวอย่าง	ซินนาไรซีนที่ 4.22 ppm.	IS ที่ 4.72 ppm.
1	0.6628	1.0000
2	0.8815	1.0000
3	1.1147	1.0000
4	1.5067	1.0000

ตารางที่ 4 ค่าอินติเกรตของ % Label claim ของการวิเคราะห์ยาเม็ดซินนาไรซีน

ตัวอย่าง	ซินนาไรซีนที่ 4.22 ppm.	IS ที่ 4.72 ppm.
1	0.4032	1.0000
2	0.5567	1.0000
3	0.7160	1.0000
4	0.9854	1.0000
5	1.0000	2.6280
6	1.0000	1.7004
7	1.0000	1.2040
8	1.0000	1.1975

ตารางที่ 5 ค่าอินติเกรตของเปอร์เซนต์การกลับคืนของซินนาไรซีนโดยวิธี Standard addition

ตัวอย่าง	ซินนาไรซีน ที่ 4.22 ppm.	IS ที่ 4.72 ppm.
1	1.0000	1.4932
2	1.0000	1.3450
3	1.0000	1.2831
4	1.0000	1.0210
5	1.0000	0.8920

เอกสารอ้างอิง

1. จุฑามณี สุทธิสีสังข์ และ รัชนี เมฆมณี . เภสัชวิทยา เล่ม 1 . หน้า 301 - 310. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, พิมพ์ครั้งที่ 2, 2540.
2. Sane, R.T., Sahasrabudhe, S.P., Nayak, V.G., Ladage, K.D., and Kothurkar, R.M., " High-performance liquid-chromatographic determination of cinnarizine from pharmaceutical preparations", Indian Drugs, 26(9), 491 - 493 , 1989.
3. Puttermans, M., Bogaert, M., Hoogewijs, G., Dryon, L., Massart, D.L., and Vanhaelst, L., " Determination of cinnarizine in whole blood and plasma by reverse-phase h.p.l.c. and its application to pharmacokinetic study ". J. Liq. Chromatography., 7(11), 2237 - 2251 , 1984.
4. Boneva, A.S., Loginova, N.F., Mishchenko, V.V., Torosyan, Zh.K., Nin'o, N.S. and Mairanovskii, G., " Polarography of pharmaceuticals. I.Cinnarizine and Aligeron. " Chem. Farm. Zh. 17(9), 1133 - 1139, 1983.
5. Saleh, G.A., and Askal, H.F., " Spectrophotometric analysis of cinnarizine via charge-transfer complexation reaction. " Pharmazie, 45(3), 220., 1990.
6. Cai, H., and Yang, X., " Ultraviolet spectrophotometric determination of cinnarizine tablets." Yaowu Fenxi Zazhi, 6(1) , 31 - 32, 1986.
7. Wu, Q., Yu, R., and Xu, H., " An improved method for determination of filcilin and cinnarizine in tablets. " Nanjing Yaoxueyuan Xuebao, 16(2), 64 - 66, 1985.
8. Rodriguez, M.R., Pizzorno, M.T. and Albonico, S.M., " NMR Determination of Trimethoprim and Sulfamethoxazole in Tablets and Powders." J. Pharm. Sci., 66(1), 121 - 123, 1977.
9. Stromberg, R., " Determination of Phenylbutazone in Tablets by Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry " J. Pharm. Sci., 73(11), 1653 - 1655, 1984.
10. Fekety, K.B., and Medwick, T. " Quantitative Analysis of Ethchlorvynol in a capsule Dosage Form by NMR Spectroscopy " J. Pharm. Sci., 72(11), 1358 - 1360, 1983.
11. Al-Khamees, H.A., and El-Shazly, B.M. " Determination of Mebendazole and its Formulations Using ^{1}H Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry " Analyst, 113, 599 - 602, 1988.
12. Narimatsu, S., Kariya, S., Ohmori, S., Kitada, M., Hosokawa, S., Masubuchi, Y. and Suzuki, T. " Involment of CYP2D6 in oxidative metabolism of cinnarizine and flunarizine in human liver microsomes" Biochem Biophys Res Commun, 193:3, 1262-1268, 1993.

13. Kariya, S., Isozaki, S., Uchino, K., Suzuki, T., and Narimatsu, S. "Oxidative metabolism of flunarizine and cinnarizine by microsomes from B-lymphoblastoid cell lines expressing human cytochrome P450 enzymes " Biol Pharm Bull, 19:11, 1511-1514, 1996