บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. การทดลองเพื่อหาสภาวการที่เหมาะสมในการบันทึกโพลาโรแกรม

ความเร็วของกระดาษ

อัตราเร็ว	5 นิ้ว/นาที	จะให้ wave ห่าง
"	2 "	ให้ wave ที่พอเหมาะ
"	1 "	wave จะชอยถี่

ความเร็วของ voltage

อัตราเร็ว	50 % /นาที	ระยะของหนึ่งโพลาโรแกรม = 4 นิ้วใช้เวลา 2 นาที
"	20 "	" " = 10 " 5 "
"	10 "	" " = 20 " 10 "

โพลาโรแกรมขนาด 4 นิ้วจะมีขนาดเหมาะสม และเสียเวลาน้อย

Voltage Range	$E_{\frac{1}{2}}$ ของไรโบฟลาวินใน phosphate buffer = − 0.47 V. ในช่วง 0 → − 1 V. $E_{\frac{1}{2}}$ จะอยู่ค่อนกลาง wave พอดี
ความสูงของระดับปรอท	ระดับ 80.5 มม. จะทำให้อัตราการหยดของปรอทในสารละลายไรโบฟลาวินมาตรฐาน (ใน phosphate buffer) เท่ากับ 1 หยด/3 วินาที
ความดันของไนโตรเจน	โดยทั่วไป = 20 ปอนด์/นิ้ว^2
ระยะเวลาในการผ่านไนโตรเจน	เวลาน้อยที่สุดที่จะไม่พบ maxima บนโพลาโรแกรม = 10 นาที
Damping	off จะให้ wave ที่มีช่วงยาวมาก 1, 2 " " ที่มีขนาดเหมาะสม

Compensation Current	0.1, 0.2 μA จะแก้ไขให้ได้ limiting current plateau แต่ถ้าสูงกว่า 0.2μAจะลด limiting current
ความเข้มข้นของไรโบฟลาวิน	สำหรับโพลาโรกราฟิค เทคนิค ใช้ในช่วง $10^{-4} - 10^{-3}$ M คิดเทียบเท่ากับ 3.76 – 37.6 มก.% แต่ส่วนใหญ่ทำการทดลองในขนาดต่ำ ๆ เพียง 4 – 10 มก. % เท่านั้น เพราะต้องการใช้ความเข้มข้นน้อยที่ให้โพลาโรแกรมที่ดี

พบว่าสภาวการที่เหมาะสมคือ

ความเร็วของกระดาษ	2 นิ้ว / นาที
ความเร็วของ voltage	50 % / นาที
Voltage range	0 → – 1 โวลท์
ความสูงของระดับปรอท	80.5 มม.
ความดันของไนโตรเจน	20 ปอนด์ / $นิ้ว^2$
ระยะเวลาในการผ่านไนโตรเจน	10 นาที
Damping	1, 2
Compensation current	0.1, 0.2 μA
Current Sensitivity	เปลี่ยนแปลงไปตามความเหมาะสม
ความเข้มข้นที่ใช้	3.76 – 37.6 มก. % ไรโบฟลาวิน แต่ส่วนใหญ่ใช้ 4 – 10 มก. %

จะให้ polarographic wave ที่ดี ดังแสดงในรูปที่ 5

2. ศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของ pH ที่มีต่อ $E_{\frac{1}{2}}$

ใช้สารละลายไวตามินบี 2 มาตรฐาน ความเข้มข้น = 4 มิลลิกรัม % ใน phosphate buffer pH ต่าง ๆ กัน นำไปบันทึกโพลาโรแกรม และคำนวณหา $E_{\frac{1}{2}}$ ของแต่ละ pH

ตารางที่ 1

ความสัมพันธ์ระหว่าง pH และ $E_{\frac{1}{2}}$ ของสารละลายไรโบฟลาวิน

pH	$E_{\frac{1}{2}}$	pH	$E_{\frac{1}{2}}$
7	- 0.3711	10	- 0.4199
8	- 0.3937	10.1	- 0.4411
9	- 0.4126	10.2	-

เมื่อ pH เพิ่มขึ้น ค่า $E_{\frac{1}{2}}$ จะเป็นลบเพิ่มขึ้น ดังในตารางที่ 1 แต่ค่า $E_{\frac{1}{2}}$ ในตารางนี้ยังไม่ใช่ค่าที่แท้จริงเพราะไม่ได้วัดเทียบกับ S.C.E. (Saturated Calomel Electrode) เมื่อให้สารละลาย pH 10 อยู่ในที่สว่าง 1 ชม. ค่า $E_{\frac{1}{2}}$ จะยิ่งเป็นลบมากขึ้น (10.1) แต่เมื่อทิ้งสารละลาย pH 10 นี้ไว้ 1 คืน เมื่อนำมาบันทึกอีกครั้ง ปรากฏว่าไม่ให้ current voltage curve ในช่วง 0 → - 1 V. เลย

3. ศึกษาเกี่ยวกับการละลายของไรโบฟลาวิน

3.1 ลักษณะของสารละลายไรโบฟลาวินใน pH ต่าง ๆ กัน

เตรียมสารละลายมาตรฐานของไรโบฟลาวินที่มีความเข้มข้นเท่า ๆ กันใน buffer pH 8 , 9 , 10 , 11 และ 12 สังเกตดูลักษณะของสารละลาย สำหรับ pH 8 , 12 เตรียม 2 วิธี คือ วิธีแรก ละลายไรโบฟลาวินในด่างจนใสแล้วจึงปรับ pH ตามที่ต้องการ อีกวิธีก็ละลายใน buffer และเขย่าผสมกันเลยทีเดียว

พบว่าถ้าชั่งไรโบฟลาวินแล้วเขย่ากับ buffer pH 8 (KH_2PO_4, NaOH) จะไม่ได้สารละลาย

ที่ใส แต่ถ้านำไรโบฟลาวินไปใส่ 0.2 N NaOH บริมาตรเท่าในกรณีแรกจนละลายหมดแล้ว จึงเติม KH_2PO_4 ให้ได้ pH 8 จะได้สารละลายใส แต่ถ้าใช้ buffer pH 12 ไม่ว่าจะละลายในด่างก่อนหรือไม่ ก็จะให้สารละลายสุดท้ายใสเหมือนกันทั้ง 2 วิธี เพียงแต่ถ้าละลายใน buffer pH 12 เลย ก็ต้องเขย่าสักครู่จึงจะใส

ลักษณะของสารละลาย pH 11 จะใสเช่นเดียวกับ pH 12 และมีสีเหลืองทอง ส่วนสารละลาย pH 8 , 9 , 10 จะมีสีเหลืองออกเขียว ๆ เรืองแสงและขุ่นเล็กน้อย

3.2 อิทธิพลของเวลาที่มีต่อการละลาย

ใช้ไรโบฟลาวินจำนวนเท่ากัน ละลายใน 0.2 N NaOH โดยทิ้งไว้นาน 30 นาที ในที่มืด (1) 3 ชม. ในที่มืด (2) และ 3 ชม. ในที่สว่าง (3) ทำใน pH 8 และ 12 เปรียบเทียบค่า diffusion current

ตารางที่ 2

เปรียบเทียบการละลายของไรโบฟลาวินใน buffer pH 8 และ 12

pH	นาน 30 นาทีในที่มืด	นาน 3 ชม. ในที่มืด	นาน 3 ชม. ในที่สว่าง
	(1)	(2)	(3)
8	1.730	1.776	1.406
12	1.383	1.370	1.168

สารละลาย pH 8 ที่อยู่ในที่มืด ให้ค่ากระแสของสารละลายที่ 2 สูงกว่าที่ 1 เล็กน้อย แต่ถ้าทิ้งไว้นานถึง 3 ชม. ในที่สว่าง กระแสจะลดลง

ส่วนใน pH 12 ค่าของกระแสที่ได้จากสารละลายที่ 1 และ 2 มีค่าใกล้เคียงกัน แต่ต่ำกว่าของสารละลายที่ 1 เล็กน้อย ส่วนที่ทิ้งไว้ในที่สว่างนาน 3 ชม. พบว่ากระแสลดต่ำลงมาก

4. ทดลองใช้ sodium salicylate เป็น stabilizer

ใช้ไรโบฟลาวินจำนวนเท่ากัน ในสารละลายมี sodium salicylate 3 % เป็น stabilizer เปรียบเทียบค่าของกระแสที่ได้จากการละลายในตัวทำละลายและเวลาที่ต่างกัน ทำการทดลองในที่สว่าง

ตารางที่ 3

เปรียบเทียบค่าของกระแสที่ได้จากการละลายในสภาวการต่าง ๆ โดยมี sod. salicylate เป็น stabilizer

สภาวการต่าง ๆ	i_d - μA
ละลายไวตามินบี 2 ใน 0.2 N NaOH โดยทิ้งไว้นาน 1 ชม.	1.475
" " " " " 2 "	1.444
" ใน buffer pH 12	1.698
" " " " ทิ้งไว้ 2 ชม.	0.94

จะเห็นว่าใช้ sod. salicylate ช่วยป้องกันการสลายตัวของไรโบฟลาวินไม่ได้ เพราะเมื่ออยู่ในด่างนานขึ้น กระแสจะค่อย ๆ ลดลง และค่าของกระแสที่ได้จากการบันทึกโพลาโรแกรมทันทีที่เตรียมเสร็จจะสูงสุด

5. Reproducibility

นำยาฉีดไวตามินบี 2 ขนาดบรรจุ 2 มล./ขวด (ขวดละ 10 มก. บี 2) มาผสมกัน หาปริมาณของไรโบฟลาวิน ทำการทดลอง 20 ครั้ง ผลแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4

reproducibility ของไวตามินบี 2 ในยาฉีด

ครั้งที่	ปริมาณไรโบฟลาวินในตัวอย่าง (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ครั้งที่	ปริมาณไรโบฟลาวินในตัวอย่าง (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
1	36.50	11	37.78
2	37.87	12	37.69
3	36.41	13	38.15
4	37.69	14	38.05
5	37.05	15	37.78
6	37.96	16	37.78
7	38.05	17	36.50
8	37.32	18	37.23
9	36.14	19	37.23
10	37.78	20	37.87

ค่าเฉลี่ยของไรโบฟลาวินในยาฉีด = 37.44 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

พิสัยเฉลี่ย = 1.30 " "

ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 0.56 " "

สัมประสิทธิ์ของความเบี่ยงเบน = $\frac{0.56 \times 100}{37.44}$ = 1.49 %

ปริมาณของไรโบฟลาวินในยาฉีด = 37.44 ± 0.56 มคก./มล.

6. Standard Curve

เตรียมสารละลายไรโบฟลาวินมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 3.2 - 32.0 มิลลิกรัม % ที่ 30 °ซ. ละลายใน phosphate buffer pH 12 แล้วนำไปบันทึกโพลาโรแกรม และหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับ diffusion current (i_d) แสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 6

ตารางที่ 5

แสดงค่าของ diffusion current ของสารละลายไรโบฟลาวินมาตรฐานใน phosphate buffer pH 12 อุณหภูมิ 30 °ซ. ในความเข้มข้นระหว่าง 3.2 - 32.0 มิลลิกรัม %

ความเข้มข้นของไรโบฟลาวิน (มก. %)	i_d - μA (ค่าเฉลี่ย)	ความเข้มข้นของไรโบฟลาวิน (มก. %)	i_d - μA (ค่าเฉลี่ย)
3.2	0.17	12.0	0.69
4.0	0.22	16.0	0.91
5.0	0.28	20.0	1.12
6.0	0.33	24.0	1.40
8.0	0.46	28.0	1.61
10.0	0.59	32.0	1.88

7. การวิเคราะห์หาปริมาณไรโบฟลาวินในตัวอย่างยาเตรียมไวตามินชนิดต่าง ๆ

เตรียมสารละลายตัวอย่าง แล้วนำมาบันทึกโพลาโรแกรมเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานในความเข้มข้นเดียวกัน โดยใช้ทั้งวิธี Spectrophotometry และ โพลาโรกราฟี

7.1 การวิเคราะห์หาปริมาณไรโบฟลาวินในยาเม็ดไวตามินบี 2

ตารางที่ 6

% L.A. ของไรโบฟลาวินในยาเม็ดไวตามินบี 2 ที่วิเคราะห์โดย Spectrophotometry และ โพลาโรกราฟี

เลขที่	ปริมาณบี 2 (มก./เม็ด)	วิธีวิเคราะห์	% L.A.		
			A	B	ค่าเฉลี่ย
1	10	Spectrophotometry	109.32	110.94	110.13
		Polarography	109.87	109.84	109.86
2	10	" ---- "	111.02	111.37	111.70
3	10	" ---- "	94.14	94.15	94.15
4	10	" ---- "	109.47	109.49	109.48
5	10	" ---- "	109.78	107.16	108.47
6	25	" ---- "	112.58	112.90	112.74

% L.A. โดยเฉลี่ยของตัวอย่างที่ 1 วิธี Spectrophotometry สูงกว่าโพลาโรกราฟี 0.27 % และ % L.A. ทั้ง 6 ตัวอย่างจะเข้ามาตรฐานตามเภสัชตำรับ

7.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไรโบฟลาวินในยาฉีดไวตามินบี 2

ตัวอย่างที่พบมีเพียงบริษัทเดียว นำไปทำ Reproducibility

7.3 การวิเคราะห์หาปริมาณไรโบฟลาวินในยาเม็ดไวตามินบีคอมเพล็กซ์

ตารางที่ 7

% L.A. ของไรโบฟลาวินในยาเม็ดไวตามินบีคอมเพล็กซ์ที่วิเคราะห์โดย Spectrophotometry และ โพลาโรกราฟี

เลขที่	ปริมาณไรโบฟลาวิน (มก./เม็ด)	วิธีวิเคราะห์	% L.A.		
			A	B	ค่าเฉลี่ย
1	0.5	Spectrophotometry	119.5	118.3	118.9
		Polarography	119.0	119.2	119.1
2	2	" --- "	110.2	109.0	109.5
3	2	" --- "	97.52	97.38	97.45

7.4 การวิเคราะห์ยาน้ำเชื่อมไวตามินบีคอมเพล็กซ์

ไม่ให้โพลาโรแกรม

7.5 การวิเคราะห์ยาฉีดไวตามินบีคอมเพล็กซ์

ตารางที่ 8

% L.A. ของไรโบฟลาวินในยาฉีดไวตามินบีคอมเพล็กซ์โดยโพลาโรกราฟี

เลขที่	ปริมาณไรโบฟลาวิน (มก./มล.)	วิธีวิเคราะห์	% L.A.		
			A	B	ค่าเฉลี่ย
1	2	Polarography	106.3	105.5	105.9
2	1	" --- "	104.7	101.3	103.0

7.6 การวิเคราะห์ยาเม็ดมัลติไวตามิน

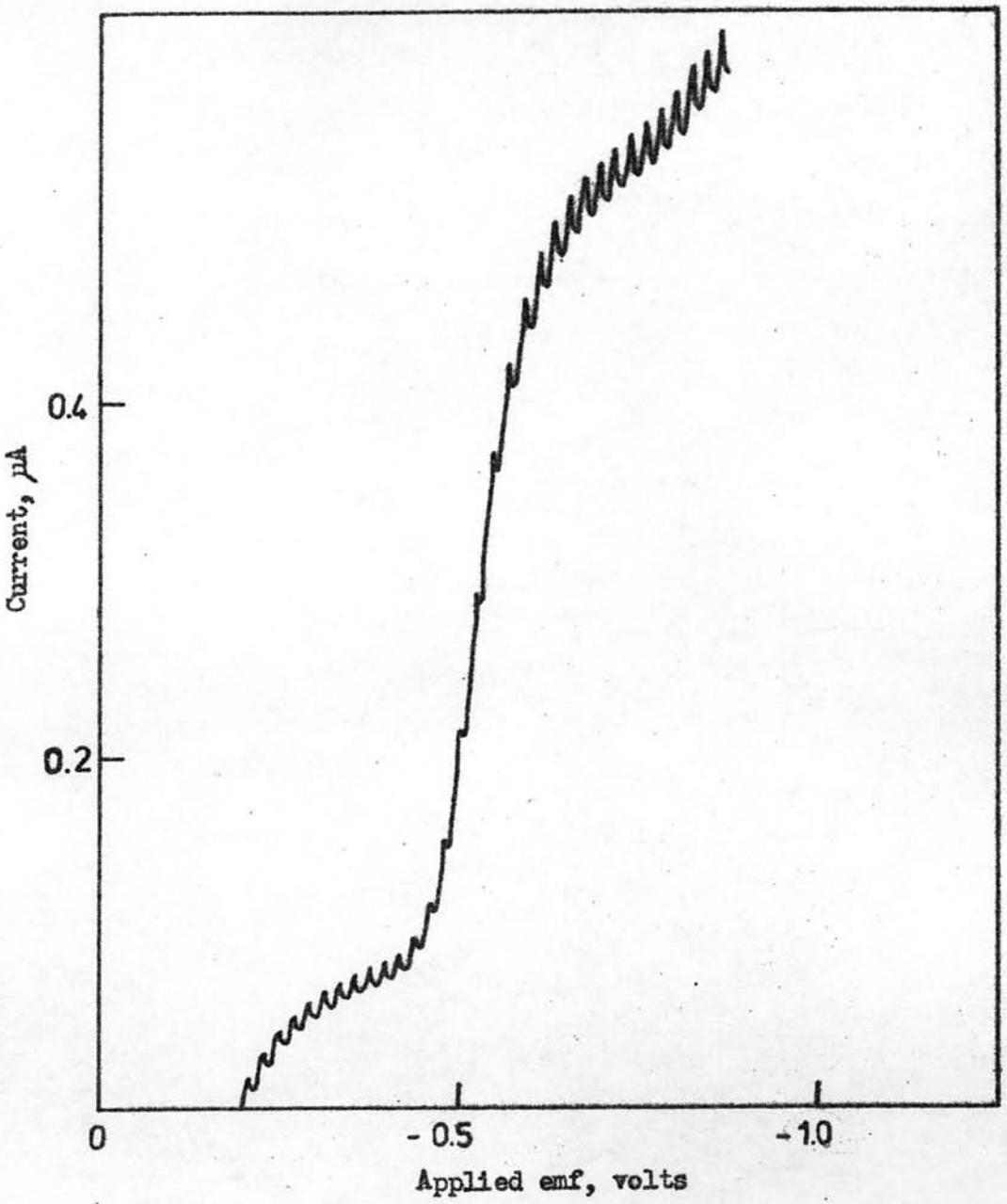
เมื่อนำไปบันทึกโพลาโรแกรม จะถูกรบกวนจากพวกไวตามินที่ละลายได้ในน้ำมัน และไม่ให้โพลาโรแกรม (รูปที่ 9) เมื่อนำไปสกัดไวตามินเหล่านั้นออกโดยใช้ chloroform (3 x 25 มล.) ปรากฏว่าสามารถหาปริมาณของไรโบฟลาวินได้ (รูปที่ 10)

7.7 การวิเคราะห์ยาเม็ดมัลติไวตามินผสมเกลือแร่

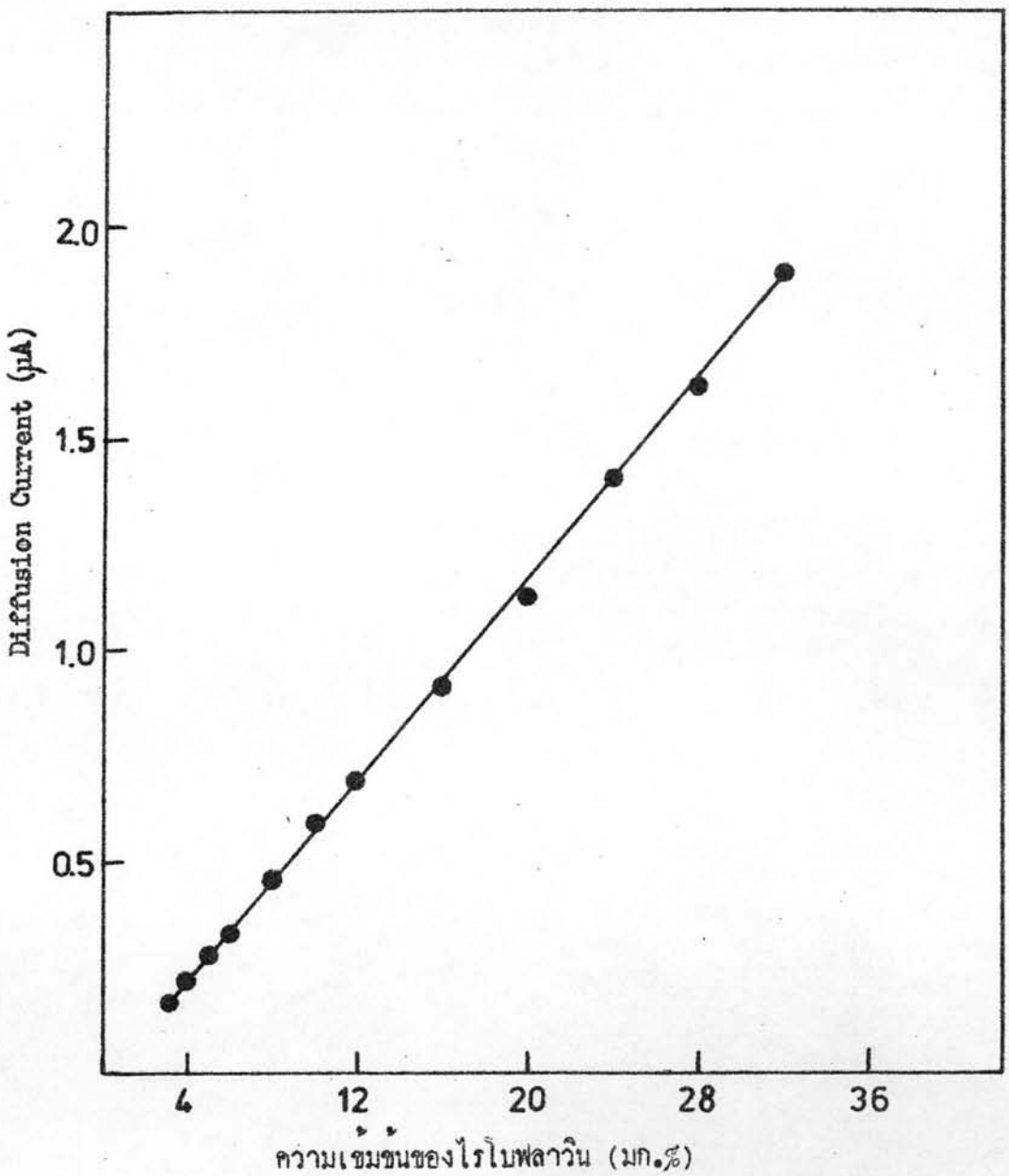
ไม่ให้โพลาโรแกรม มีอยู่ชนิดหนึ่งที่ให้ current voltage curve แต่ค่า i_d น้อยมาก อาจเป็นเพราะเกลือแร่นั้นมีจำนวนน้อย จึงมีบางส่วนของไรโบฟลาวินให้กระแสได้บ้าง (รูปที่ 12)

7.8 การวิเคราะห์ยาน้ำเชื่อมมัลติไวตามิน

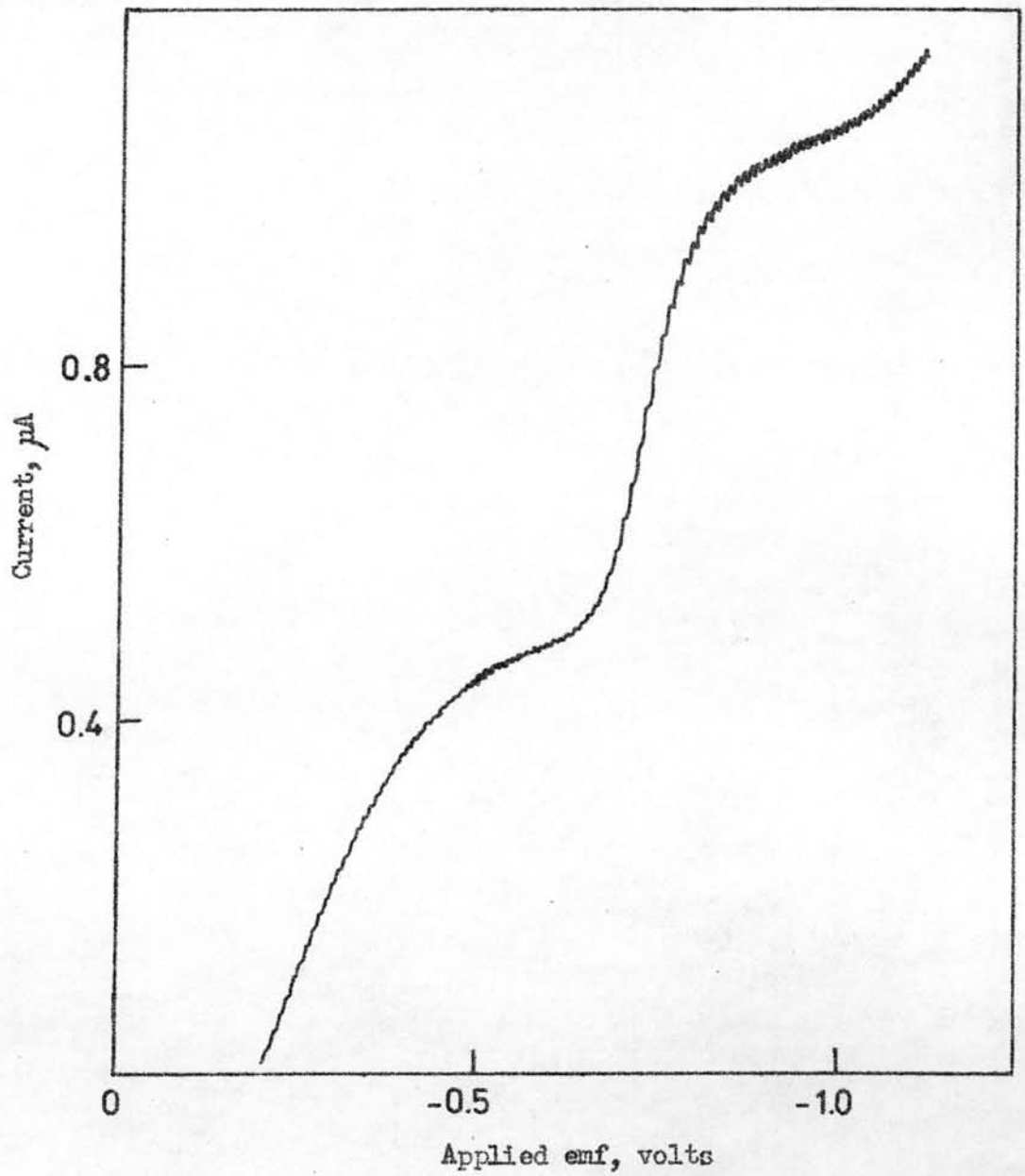
ไม่ให้โพลาโรแกรม



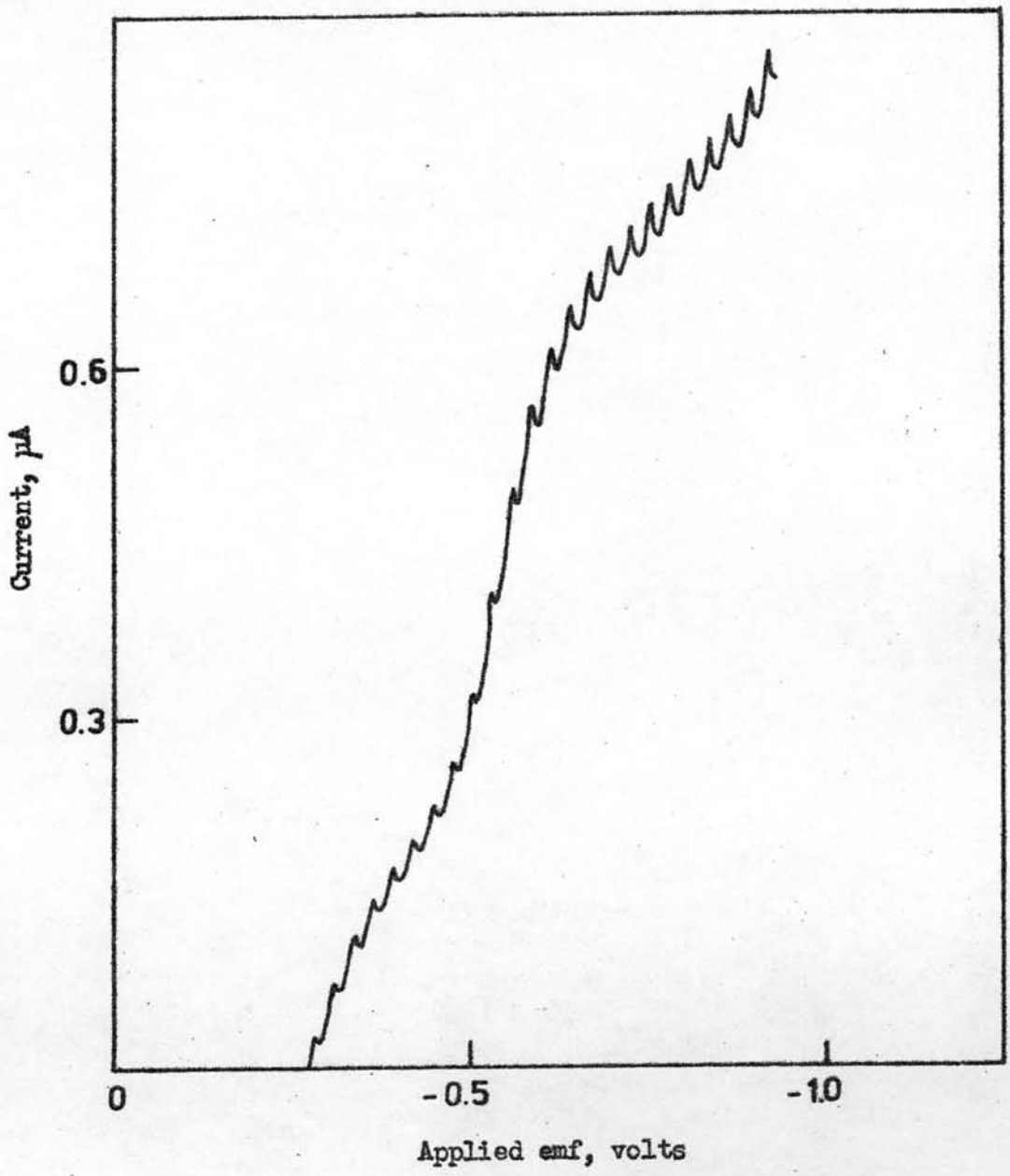
รูปที่ 5 โพลาโรแกรมของไรโบฟลาวิน



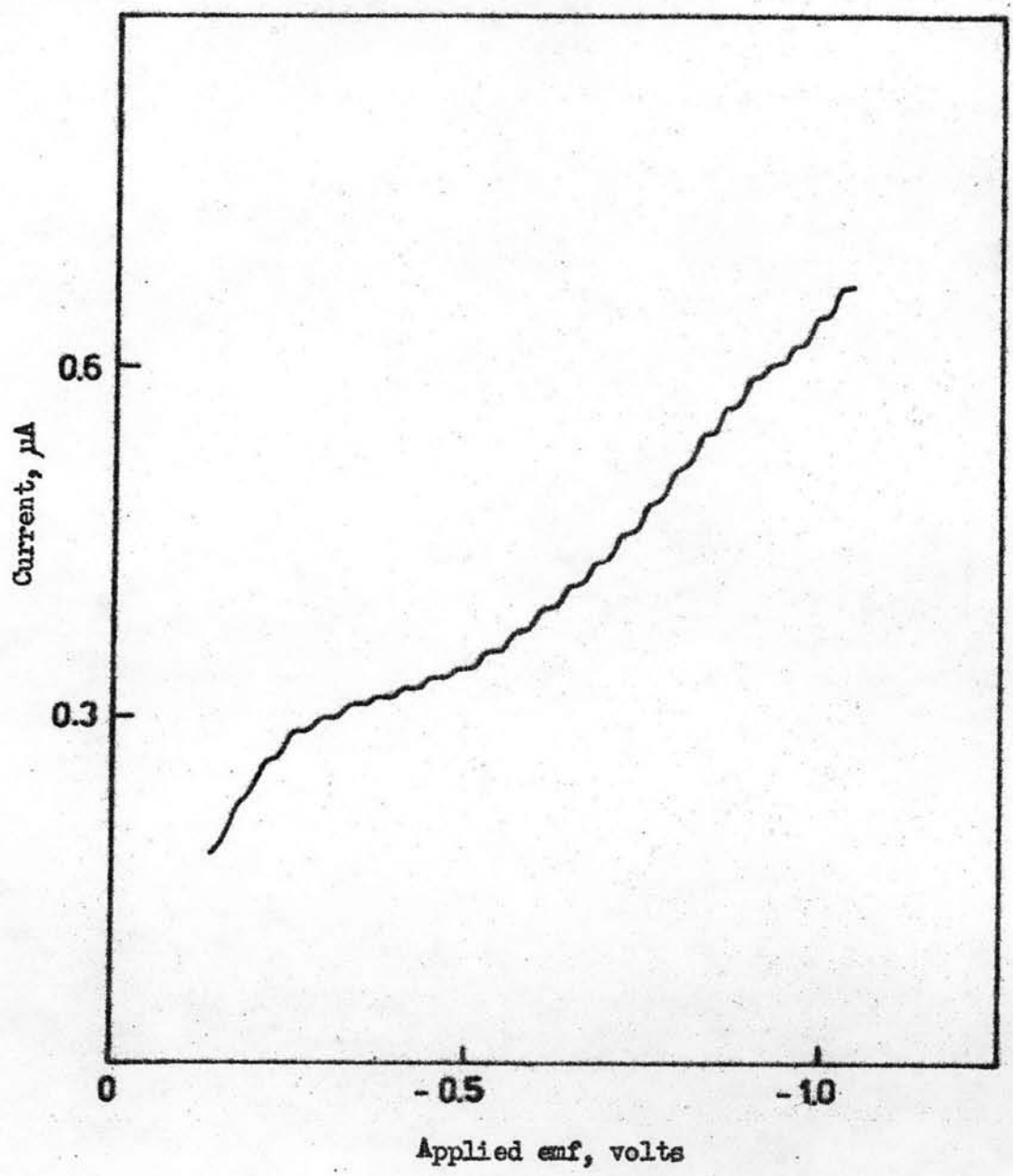
รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไรโบฟลาวินกับ diffusion current



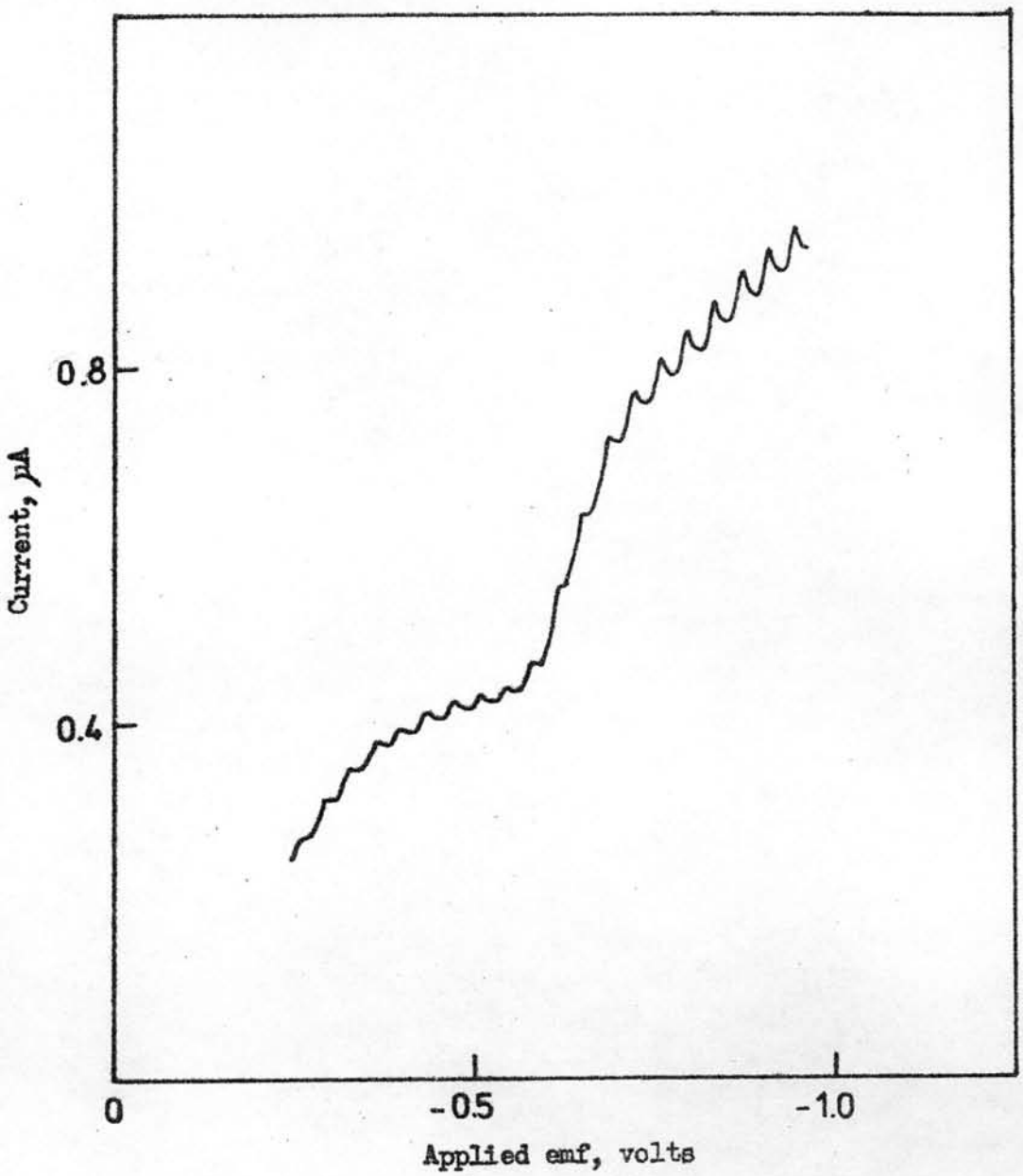
รูปที่ 7 โพลาโรแกรมของยาฉีดไวตามินบี 2



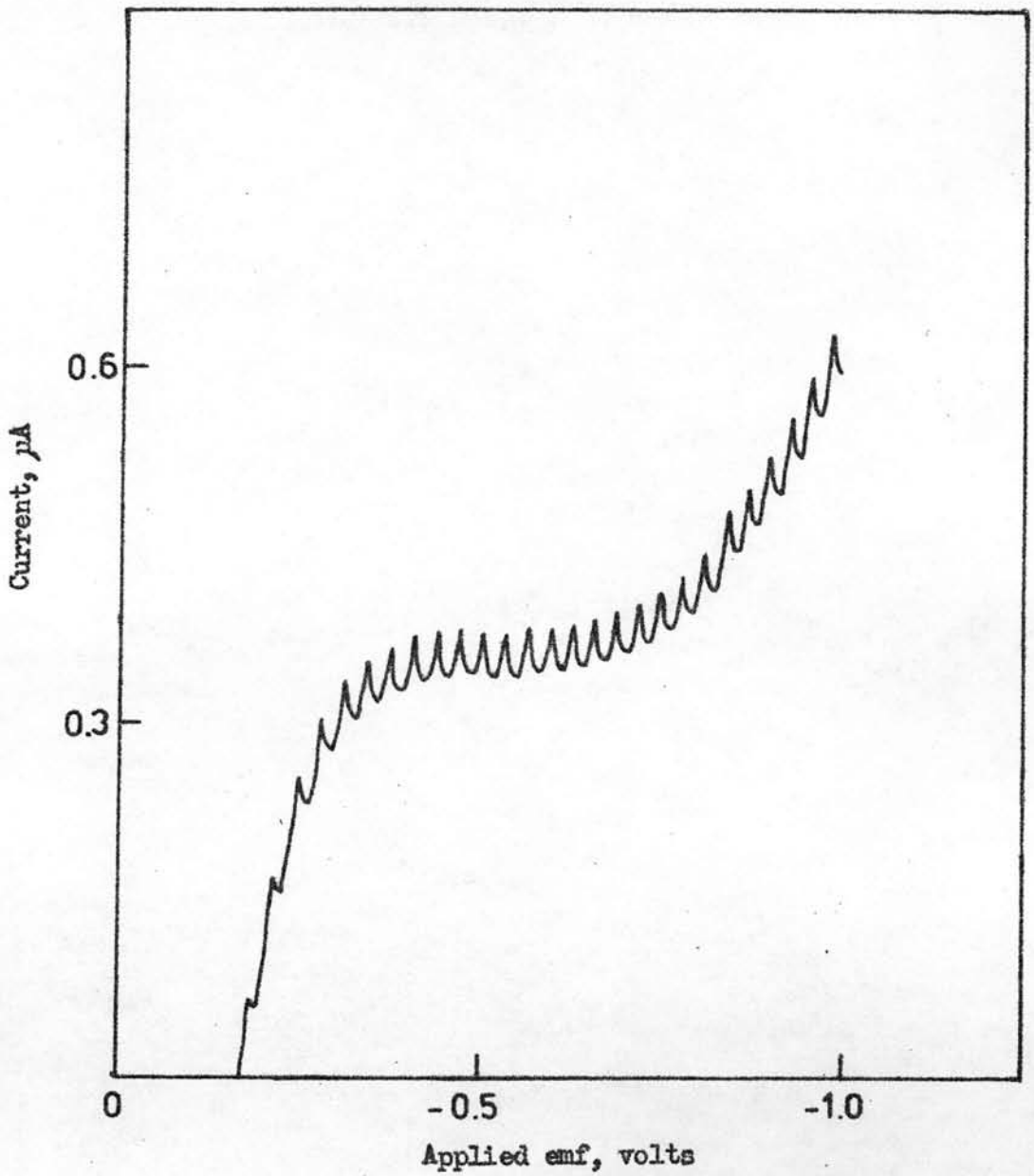
รูปที่ 8 โพลาโรแกรมของยาเม็ดไวตามินบีคอมเพล็กซ์



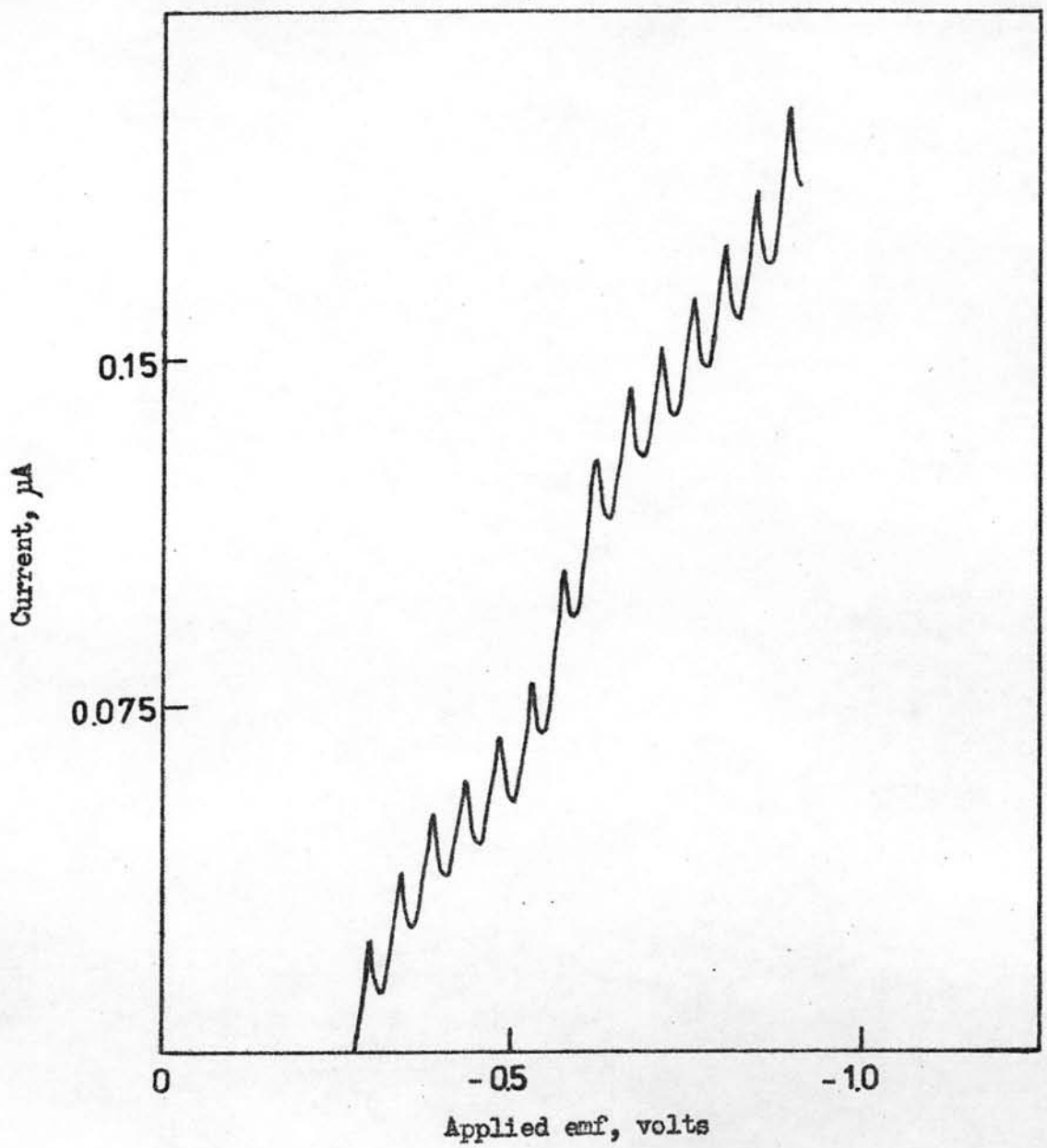
รูปที่ ๑ โพลาโรแกรมของยาเม็ดมัลติไวตามิน



รูปที่ 10 โพลาโรแกรมของยาเม็ดมัลติไวตามินภายหลังการสกัดด้วย คลอโรฟอร์ม



รูปที่ 11 โพลาโรแกรมของยาน้ำเชื่อมไวตามินบีคอมเพล็กซ์



รูปที่ 12 โพลาโรแกรมของยาเม็ดมัลติไวตามินผสมเกลือแร่