

การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณนอร์ฟลอกซาซิน
ในวัตถุดิบด้วยยูพีแอลซี
(Development and Method Validation for the Determination of Norfloxacin
Raw Material by UPLC)

จารุบล ชัยชนะ*
เมทินี หลิมศิริวงษ์*
ปวีณรส เข้มชมดาว*

Abstract The Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) was developed and validated for determination of Norfloxacin raw material. The chromatographic conditions using Acquity UPLC BEH C18 column, 2.1 × 100 mm, 1.7 μm, column maintained at 30 °C, using 0.1% trifluoroacetic acid solution and acetonitrile mixed by gradient system as a mobile phase, flow rate 0.4 mL/min, runtime 14 minutes per injection and PDA detector at 265 nm. The chromatographic system suitability meets the suitability requirements of the United States Pharmacopoeia 41th revision (USP41). The specificity and selectivity were proved by good separation of Norfloxacin from other related compounds including Norfloxacin related compound A, Norfloxacin related compound E, Norfloxacin related compound H, Norfloxacin related compound K and degradation products. The relationship between concentration and area under curve was linear over the range of 5 to 25 μg of Norfloxacin per mL with the correlation coefficient of 0.99998. The accuracy of the results assessed by percentage recoveries of three concentration levels i.e. 5, 15 and 25 μg/mL were 100.05, 100.83 and 101.12, respectively. The system precision, performed by 3 standard solutions gave % RSD of 0.10, 0.16 and 0.15. The intermediate precision was no statistical difference of the results when the analysts, instruments and days were changed. The variations of different batches of column, column temperature, injection volume, concentration of acid in mobile phase, and flow rate did not affect the chromatographic system suitability. Limit of detection and limit of quantitation were 0.06 and 0.18 μg/mL, respectively. The UPLC method for determination of Norfloxacin raw material is simple, specific, accurate, precise, and robust. It reduces working time and reagent expense. In addition, the advantage of using not extremely high column temperature is to prolong the column life time. Therefore, the proposed method is suitable for use as a standard method for the determination of Norfloxacin raw material.

Key words: Norfloxacin, UPLC

บทคัดย่อ การวิเคราะห์ปริมาณนอร์ฟลอกซาซินในวัตถุขี้ด้วยเทคนิคยูพีแอลซีได้พัฒนาขึ้นและผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ระบบยูพีแอลซีที่พัฒนาขึ้นใช้คอลัมน์ Acquity UPLC BEH ชนิด C18 ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.7 ไมโครเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส สารละลายตัวพาเป็นสารละลายกรดไตรฟลูออโรอะซีติก ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และอะเซโทไนไตรล์ผสมกันแบบเกรเดียนต์ อัตราการไหล 0.4 มิลลิเมตรต่อนาที และตรวจวัดด้วยโฟโตไดโอดแอเรย์ที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร ใช้เวลา 14 นาทีต่อการฉีดสารแต่ละครั้ง วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟีตามข้อกำหนดของตำราของสหรัฐอเมริกาฉบับพิมพ์ครั้งที่ 41 (USP41) ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีพบว่า มีความจำเพาะเจาะจงกับนอร์ฟลอกซาซิน สามารถแยกออกจากสารละลายตัวต่างๆ ได้แก่ Norfloxacin related compound A, Norfloxacin related compound E, Norfloxacin related compound H, Norfloxacin related compound K และอื่นๆ ช่วงความเข้มข้นที่นำไปสร้างเส้นกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของนอร์ฟลอกซาซินและพื้นที่ใต้พีคพบว่าเป็นสัดส่วนโดยตรงตลอดช่วง 5 ถึง 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.99998 การทดสอบความถูกต้องของวิธีแสดงด้วยค่าร้อยละการคืนกลับของนอร์ฟลอกซาซิน ที่ 3 ระดับความเข้มข้น 5, 15 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร เท่ากับร้อยละ 100.05, 100.83 และ 101.12 ตามลำดับ การทดสอบความแม่นยำของระบบด้วยสารละลายมาตรฐาน 3 ตัวอย่าง มีค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.10, 0.16 และ 0.15 การทดสอบความเที่ยงโดยการเปลี่ยนแปลงวัน นักวิเคราะห์ และเครื่องมือพบว่าผลการวิเคราะห์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ วิธีวิเคราะห์มีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะการทดสอบได้แก่ การเปลี่ยนรุ่นการผลิตของคอลัมน์ อุณหภูมิของคอลัมน์ ปริมาตรสารละลายที่ฉีด ความเข้มข้นของกรดในสารละลายตัวพา และอัตราการไหลของสารละลายตัวพา จิตจำกัของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณเท่ากับ 0.06 และ 0.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ วิธีวิเคราะห์ปริมาณนอร์ฟลอกซาซินในวัตถุขี้ด้วยยูพีแอลซีจึงเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว มีความจำเพาะเจาะจง มีความแม่นยำ ความเที่ยง ความทน ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความน่าเชื่อถือ สามารถลดเวลาในการทำงาน ประหยัดค่าใช้จ่าย ลดปริมาณการใช้สารเคมี นอกจากนี้ การใช้งานคอลัมน์ที่อุณหภูมิไม่สูงเกินไปยังสามารถยืดอายุคอลัมน์ วิธีที่พัฒนาขึ้นจึงมีความเหมาะสมสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณนอร์ฟลอกซาซินในวัตถุขี้ยาได้

กัญญา คำ: นอร์ฟลอกซาซิน, ยูพีแอลซี

บทนำ

นอร์ฟลอกซาซิน (Norfloxacin) เป็นยาปฏิชีวนะกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolone) มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ผ่านกระบวนการยับยั้งเอนไซม์ดีเอ็นเอไจเรส (DNA gyrase) นอร์ฟลอกซาซินเป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีการใช้แพร่หลายในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ ได้แก่ การติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะและอวัยวะสืบพันธุ์ เช่น กระเพาะปัสสาวะอักเสบ กรวยไตอักเสบ หนองใน และการติดเชื้อของระบบทางเดินอาหาร (1)

การวิเคราะห์ปริมาณนอร์ฟลอกซาซินในวัตถุขี้ตามตำราของสหรัฐอเมริกาฉบับพิมพ์ครั้งที่ 41 (USP41) (2) กำหนดปริมาณนอร์ฟลอกซาซินในวัตถุขี้ไม่น้อยกว่าร้อยละ 98.0 และไม่เกินร้อยละ 102.0 ของ norfloxacin, calculated on the dried basis ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ใช้คอลัมน์ชนิด L60 ที่มีอนุภาคเป็น spherical, porous silica gel, the surface has been covalently modified with alkyl amide groups and endcapped ขนาด 4.6×250 มิลลิเมตร, 5 ไมครอน อุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส สารละลายตัวพา (mobile phase) เป็นระบบ gradient ประกอบด้วยสารละลายน้ำ pH 2.0 และ acetonitrile อัตราการไหล (flow

สารตำรายา ปีที่ 26 ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน 2563 3

rate) 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรการฉีด 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร วิธีดังกล่าว ใช้คอลัมน์พิเศษที่ไม่มีในห้องปฏิบัติการทั่วไป อุณหภูมิคอลัมน์สูงถึง 60 องศาเซลเซียส มีผลทำให้อายุการใช้งานของ คอลัมน์สั้นลง และใช้เวลานาน 25 นาทีต่อการฉีดสารแต่ละครั้ง สภาวะดังกล่าวเพื่อให้พีค Norfloxacin ที่อยู่ใกล้กับพีค สารละลายตัว Norfloxacin related compound E สามารถแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ ไม่ co-elute โดยข้อกำหนด ความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟีกำหนดค่า resolution ระหว่าง Norfloxacin และ Norfloxacin related compound E ไม่น้อยกว่า 2.0 (2) และค่า resolution ระหว่าง Norfloxacin related compound A กับ Norfloxacin related compound H ไม่น้อยกว่า 3.0 (2)

จากปัจจัยดังกล่าว ผู้วิจัยจึงได้นำข้อกำหนดความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟีจาก USP41 มาพัฒนาวิธี วิเคราะห์ด้วย Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) ใช้คอลัมน์ UPLC ชนิด C18 และเครื่องตรวจวัดชนิด Photo Diode Array (PDA) เพื่อสามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์ (spectral purity testing) ของพีค Norfloxacin และ Related compounds ทั้ง 4 ชนิดที่แยกได้ โดยใช้ทฤษฎี Spectral Contrast Principles (3) ซึ่งเป็นการแปลงผลจากค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ (spectra) มาอยู่ในรูปเวกเตอร์ (vector) และเปรียบเทียบปริมาณที่แตกต่างของเวกเตอร์ ดังกล่าว เวกเตอร์มีคุณสมบัติ 2 ประการคือ ความยาว (length) และทิศทาง (direction) ความยาวเป็นสัดส่วนตาม ปริมาณความเข้มข้น ส่วนทิศทางไม่ขึ้นกับความเข้มข้นได้จาก relative absorbance ที่ทุกความยาวคลื่น ค่าของมุมที่ใช้ เปรียบเทียบและประเมินผล peak purity ได้แก่ spectral contrast angle, purity angle และ purity threshold โดย spectral contrast angle คือ การหาค่ามุมในรูปแบบเวกเตอร์ที่กระทำทุกๆ ความยาวคลื่นที่ต้องการและจะกระทำที่ทุกพื้นที่พีค ที่เกิดขึ้นของสารประกอบนั้น purity angle คือค่าเฉลี่ยถ่วงน้ำหนักของ spectral contrast angle ทั้งหมด ส่วน purity threshold คือผลรวมของการหาค่ามุมในรูปแบบเวกเตอร์ที่กระทำทุกๆ ความยาวคลื่นในส่วนที่เป็นผลมาจาก detector noise, photometric error, ตัวทำละลายที่ใช้ หรือการวิเคราะห์ที่สารละลายมีความเข้มข้นสูงกว่า 1 AU โดยหาก purity angle มีค่าน้อยกว่า purity threshold แปลว่า spectrum peak นั้นบริสุทธิ์ (spectrally homogeneous) และตรวจสอบ ความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นตาม ICH guideline(4) UPLC มีหลักการแยกสารเช่นเดียวกับ HPLC แต่มีประสิทธิภาพ ในการแยกดีกว่า ใช้ปริมาณของสารละลายตัวพาน้อยกว่า และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์สั้นกว่า HPLC

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Ultra Performance Liquid Chromatograph ผลิตภัณฑ์ของ Acquity UPLC® H-Class System, Waters สหรัฐอเมริกา ประกอบด้วย Quaternary Solvent Manager, Sample Manager FTN, Photo Diode Array Detector, ตู้ควบคุม อุณหภูมิของคอลัมน์ และโปรแกรมประมวลผล Empower III
2. คอลัมน์ Acquity UPLC BEH C18 ขนาด 2.1 × 100 มิลลิเมตร บรรจุอนุภาคขนาด 1.7 ไมโครเมตร ผลิตภัณฑ์ของ Waters สหรัฐอเมริกา Batch No. 0216330731 และ 0347392551
3. Ultra-Microbalance ความละเอียด 0.0001 มิลลิกรัม ผลิตภัณฑ์ของ Mettler Toledo สวิตเซอร์แลนด์
4. ตู้อบร้อนแบบสูญญากาศ ผลิตภัณฑ์ของ Heraeus เยอรมนี
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ผลิตภัณฑ์ของ Metrohm สวิตเซอร์แลนด์

สารเคมี

1. น้ำ HPLC-quality Type I
2. Acetonitrile, HPLC grade ผลิตภัณฑ์ของ Honeywell

4 สารตำรายา ปีที่ 26 ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน 2563

3. Trifluoroacetic acid (TFA) 99% AR grade ผลิตภัณฑ์ของ Sigma Aldrich
4. Hydrochloric acid 37% AR grade ผลิตภัณฑ์ของ Carlo Erba
5. Hydrogen peroxide 30% AR grade ผลิตภัณฑ์ของ Merck
6. Sodium hydroxide AR grade ผลิตภัณฑ์ของ Merck
7. ortho-Phosphoric acid 85% AR grade ผลิตภัณฑ์ของ Merck

สารมาตรฐาน

1. Norfloxacin USPRS Lot I0M497 ความบริสุทธิ์ 0.994 mg of $C_{16}H_{18}FN_3O_3$ per mg on the dried basis
2. Norfloxacin impurity A Ph.Eur.RS Batch no. 1.3
3. Norfloxacin related compound E USPRS Lot F000E0 ความบริสุทธิ์ 100.0% on the as is basis
4. Norfloxacin related compound K USPRS Lot F000G0 ความบริสุทธิ์ 100.0% on the as is basis
5. Norfloxacin related compound H USPRS Lot F000F0 ความบริสุทธิ์ 100.0% on the as is basis

ตัวอย่าง

Norfloxacin Batch No. 130701 จาก Zhejiang Xinchang Guobang Vet-Pharma, China

การเตรียมสารละลาย

- การเตรียมสารละลาย 0.1% Trifluoroacetic acid

ปิเปต Trifluoroacetic acid 0.5 มิลลิลิตร ในน้ำ และปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำ กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

- การเตรียมตัวทำละลาย

ผสมสารละลายน้ำที่ปรับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.0 ด้วย phosphoric acid และ acetonitrile ในสัดส่วน 95:5

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง UPLC H-Class ใช้สภาวะดังนี้

คอลัมน์: Acquity UPLC BEH C18 ขนาด 2.1 × 100 มิลลิเมตร อนุภาค 1.7 ไมโครเมตร

อุณหภูมิของคอลัมน์: 30 องศาเซลเซียส

สารละลายตัวพา: เป็นระบบ gradient

นาทีที่	อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)	% (0.1% trifluoroacetic acid)	% acetonitrile
0	0.4	89	11
7.5	0.4	88	12
8	0.4	48	52
11	0.4	48	52
11.5	0.4	10	90
12	0.4	89	11
14	0.4	89	11

เครื่องตรวจวัด: PDA 265 นาโนเมตร

ปริมาตรที่ฉีด: 2 ไมโครลิตร

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

1. การทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี (Chromatographic system suitability)

สารละลายสำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี (System suitability solution) คือ สารละลายผสมของสารมาตรฐาน Norfloxacin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Related compounds 4 ชนิด คือ Norfloxacin impurity A (Norfloxacin related compound A), Norfloxacin related compound E, Norfloxacin related compound H และ Norfloxacin related compound K ในตัวทำละลาย โดยความเข้มข้นของ Related compounds แต่ละชนิดเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

ฉีดสารละลายสำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี และสารละลายแต่ละชนิดสำหรับตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ ตรวจสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์และพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น retention time, resolution, tailing factor และ theoretical plate ซึ่งคำนวณตามวิธีของ USP โดยโปรแกรมอัตโนมัติของเครื่อง UPLC โดยค่า resolution ระหว่างพีก Norfloxacin related compound E และ Norfloxacin ไม่น้อยกว่า 2.0 (2), ค่า resolution ระหว่างพีก Norfloxacin related compound A และ Norfloxacin related compound H ไม่น้อยกว่า 3.0 (2), ค่า tailing factor ไม่เกิน 2.0 และ theoretical plate ไม่น้อยกว่า 5,000 (ต่อ 10 เซนติเมตร)

2. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity / Specificity)

ชั่งสารมาตรฐาน Norfloxacin 5 มิลลิกรัม (ซึ่งให้มีความถูกต้อง 0.0001 มิลลิกรัม) ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย จากนั้นปิเปตสารละลายดังกล่าว 3.0 มิลลิลิตร ทำให้สลายตัวในสถานะต่างๆ ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเป็น 10.0 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำมาฉีดซ้ำ 2 ครั้ง ตรวจสอบการสลายตัวที่เกิดขึ้น ค่า retention time และ resolution ของสารสลายตัวที่เกิดขึ้นจะต้องแยกจากพีก Norfloxacin อย่างชัดเจน สถานะต่างๆ ที่ทดสอบ มีดังนี้

1. เติม hydrochloric acid 37% จำนวน 2.0 มิลลิลิตร คัมที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
2. เติม 0.1N sodium hydroxide solution จำนวน 5.0 มิลลิลิตร คัมที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3. เติม hydrogen peroxide 30% จำนวน 4.0 มิลลิลิตร คัมที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
4. คัมที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
5. ตั้งไว้ให้ถูกแสงแดด 1 และ 2 ชั่วโมง

3. การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Norfloxacin ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลาย (ซึ่งให้มีความถูกต้อง 0.0001 มิลลิกรัม) จากนั้นปิเปตสารละลายดังกล่าว 2.0, 4.0, 6.0 และ 8.0 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 10.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย ได้สารละลายมาตรฐาน Norfloxacin ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

ฉีดสารละลายมาตรฐาน Norfloxacin ทั้ง 5 ระดับความเข้มข้น แต่ละความเข้มข้นฉีดซ้ำ 6 ครั้ง ทดสอบซ้ำ 3 วัน สร้างเป็นกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Norfloxacin กับพื้นที่ใต้พีก คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ค่าที่ได้ควรมีค่าใกล้เคียงหรือเท่ากับ 1 คำนวณค่าความลาดเอียงของกราฟ (slope) และจุดที่เส้นกราฟตัดแกน Y (y-intercept)

4. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Norfloxacin มีวิธีเตรียมตามข้อ 3. Linearity and Range

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

เตรียมสารละลายตัวอย่าง Norfloxacin ความเข้มข้น 5, 15 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลาย (ซึ่งให้มีความถูกต้อง 0.0001 มิลลิกรัม) เตรียมแต่ละระดับความเข้มข้นจำนวน 3 ซ้ำ (9 determinations) กรองสารละลายผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

ฉีดสารละลายตัวอย่าง Norfloxacin ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น แต่ละสารละลายตัวอย่างฉีดซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณปริมาณ Norfloxacin ที่ตรวจพบในแต่ละระดับจากเส้นกราฟมาตรฐานในวันเดียวกัน เป็นค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ค่าเฉลี่ยของการคืนกลับ และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ของการคืนกลับ ทุกระดับความเข้มข้น ค่าร้อยละของการคืนกลับควรรอยู่ในช่วง 98.0-102.0 และ %RSD ไม่เกิน 2.0 (5)

5. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

5.1 ความทวนซ้ำได้ (Repeatability)

5.1.1 ความเที่ยงของระบบ (System precision)

ฉีดสารละลายมาตรฐาน Norfloxacin ที่มีความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ซึ่งให้มีความถูกต้อง 0.0001 มิลลิกรัม) จำนวน 3 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างฉีดซ้ำ 6 ครั้ง คำนวณค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีค และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ โดย % RSD ต้องไม่เกิน 0.73 (2) และค่า tailing factor ไม่เกิน 2.0 (2)

5.1.2 ความเที่ยงของวิธี (Method precision)

คำนวณค่า %RSD ของร้อยละของการคืนกลับของสารละลายทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นของการทดสอบความแม่นยำในข้อ 4. โดย % RSD ต้องไม่เกิน 2.0

5.2 Intermediate precision

ฉีดสารละลายมาตรฐาน Norfloxacin และสารละลายตัวอย่าง ที่มีความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบ 2 วัน วันละ 10 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างฉีดซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้นักวิเคราะห์ 2 คน 2 คอลัมน์ และ 2 เครื่องมือ คำนวณร้อยละของปริมาณ Norfloxacin เทียบกับสารละลายมาตรฐาน, % RSD ของแต่ละวัน และ % RPD ระหว่างวัน

6. การทดสอบความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง

ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง Norfloxacin ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทุกๆ 1 ชั่วโมง ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง คำนวณปริมาณ Norfloxacin เปรียบเทียบกับปริมาณที่เวลา 0 ชั่วโมง โดยให้ปริมาณที่ 0 ชั่วโมง (การฉีดครั้งที่ 1) คิดเป็น 100% ปริมาณที่พบในเวลาต่างๆ ไม่ควรน้อยกว่า 98% การทดสอบนี้เพื่อศึกษาความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างในระหว่างทำการทดสอบ

7. การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

ทดสอบความทนของวิธีวิเคราะห์โดยการปรับเปลี่ยนสภาวะของระบบ UPLC การเปลี่ยนเครื่อง UPLC และนักวิเคราะห์

7.1 ความคงสภาพของคอลัมน์

ตรวจสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ โดยทำการบันทึกค่า Theoretical plate ในวันเริ่มต้น และในระหว่างการทำทดสอบจนจบการทดลอง ซึ่งควรมีค่าไม่น้อยกว่า 5,000 นับจำนวนครั้งที่ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ในการทดสอบทั้งหมด

7.2 ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาวะของระบบ UPLC

สภาวะที่เปลี่ยนแปลงต่างๆ ของเครื่อง UPLC มีดังนี้

7.2.1 เปลี่ยนคอลัมน์ โดยใช้คอลัมน์จำนวน 2 รุ่นการผลิตของ Acquity UPLC BEH C18 ขนาด 2.1 × 100

สารตำรายา ปีที่ 26 ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน 2563 7

มิลลิเมตร บรรจุนุภาค 1.7 ไมโครเมตร ผลิตจาก Waters ไอร์แลนด์ ได้แก่ คอลัมน์ Batch No. 0216330731 และ 0347392551

7.2.2 อุณหภูมิของคอลัมน์ เป็น 29 °C, 30 °C และ 31 °C

7.2.3 ปริมาตรของสารละลายที่ฉีดเป็น 1, 2 และ 2.5 ไมโครลิตร

7.2.4 อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 0.35, 0.4 และ 0.45 มิลลิตรต่อนาที

7.2.5 ความเข้มข้นของ trifluoroacetic acid ในสารละลายตัวพาเป็น 0.09%, 0.1% และ 0.11%

ทดสอบโดยการฉีดสารละลายสำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี ฉีดสภาวะละ 3 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบความเหมาะสมของระบบในสภาวะที่เปลี่ยนแปลงต่างๆ ของ UPLC คู่ค่าพารามิเตอร์ retention time, tailing factor, theoretical plate และ resolution

สารละลายสำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบควรมีค่า resolution ระหว่างพีค Norfloxacin กับ Norfloxacin related compound E ไม่น้อยกว่า 2.0 (2) และค่า resolution ระหว่างพีค Norfloxacin related compound A กับ Norfloxacin related compound H ไม่น้อยกว่า 3.0 (2)

8. ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection) และขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation)

การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

8.1 การคำนวณจาก slope และ intercept ของเส้นกราฟมาตรฐาน(4) ในข้อ 3. ซึ่งค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) คำนวณได้จากสมการที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

$$\text{Limit of Detection} = 3.3\sigma / S \quad (1)$$

$$\text{Limit of Quantitation} = 10\sigma / S \quad (2)$$

โดย σ = SD ของ Y-intercept

S = ค่าเฉลี่ยของ slope

ค่าที่ได้จากการคำนวณดังกล่าวจะเป็นแนวทางการนำไปฉีดพิสูจน์เพื่อหาค่า LOD และ LOQ ตามวิธีการข้อ 8.2

8.2 ค่า LOD และ LOQ ได้จากการทดสอบหาความเข้มข้นของสารละลาย Norfloxacin ที่ฉีดแล้วให้ค่า signal-to-noise เท่ากับหรือมากกว่า 3 และ 10 ตามลำดับ

ผลการทดสอบ

1. การทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี (Chromatographic system suitability)

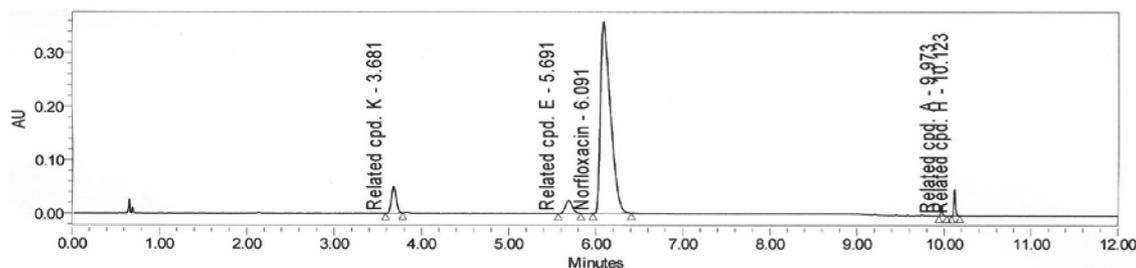
จากการฉีดสารละลายสำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี พบว่าระบบโครมาโทกราฟีสามารถแยกพีค Norfloxacin ออกจากพีค Related compounds ทั้ง 4 ชนิดจากกันได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 1) ประกอบกับการใช้เครื่องตรวจวัดชนิด Photo Diode Array (PDA) เป็นการยืนยันว่า Spectrum ของพีค Norfloxacin มีความบริสุทธิ์ (spectrally homogeneous) โดยมีค่า purity angle น้อยกว่า purity threshold นอกจากนี้ Spectrum ของพีค Related compounds ทั้ง 4 ชนิดก็มีความบริสุทธิ์ทุกพีคเช่นกัน

Retention time ของพีค Norfloxacin related compound K, Norfloxacin related compound E, Norfloxacin, Norfloxacin related compound A และ Norfloxacin related compound H เท่ากับ 3.68, 5.69, 6.09, 9.97 และ 10.12 นาที ตามลำดับ

Resolution ระหว่างพีค Norfloxacin กับ Norfloxacin related compound E เท่ากับ 2.27 (ไม่น้อยกว่า 2.0) (2) และค่า resolution ระหว่างพีค Norfloxacin related compound A กับ Norfloxacin related compound H เท่ากับ 4.29 (ไม่น้อยกว่า 3.0) (2)

Tailing factor ของทุกพีคน้อยกว่า 2.0

Theoretical plate ของพีค Norfloxacin related compound K, Norfloxacin related compound E, Norfloxacin, Norfloxacin related compound A และ Norfloxacin related compound H เท่ากับ 22894, 29988, 14231, 1489343 และ 1356990 ตามลำดับ (มากกว่า 5,000 ต่อ 10 เซนติเมตร)



รูปที่ 1 โครมาโทแกรมสำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี

2. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity / Specificity)

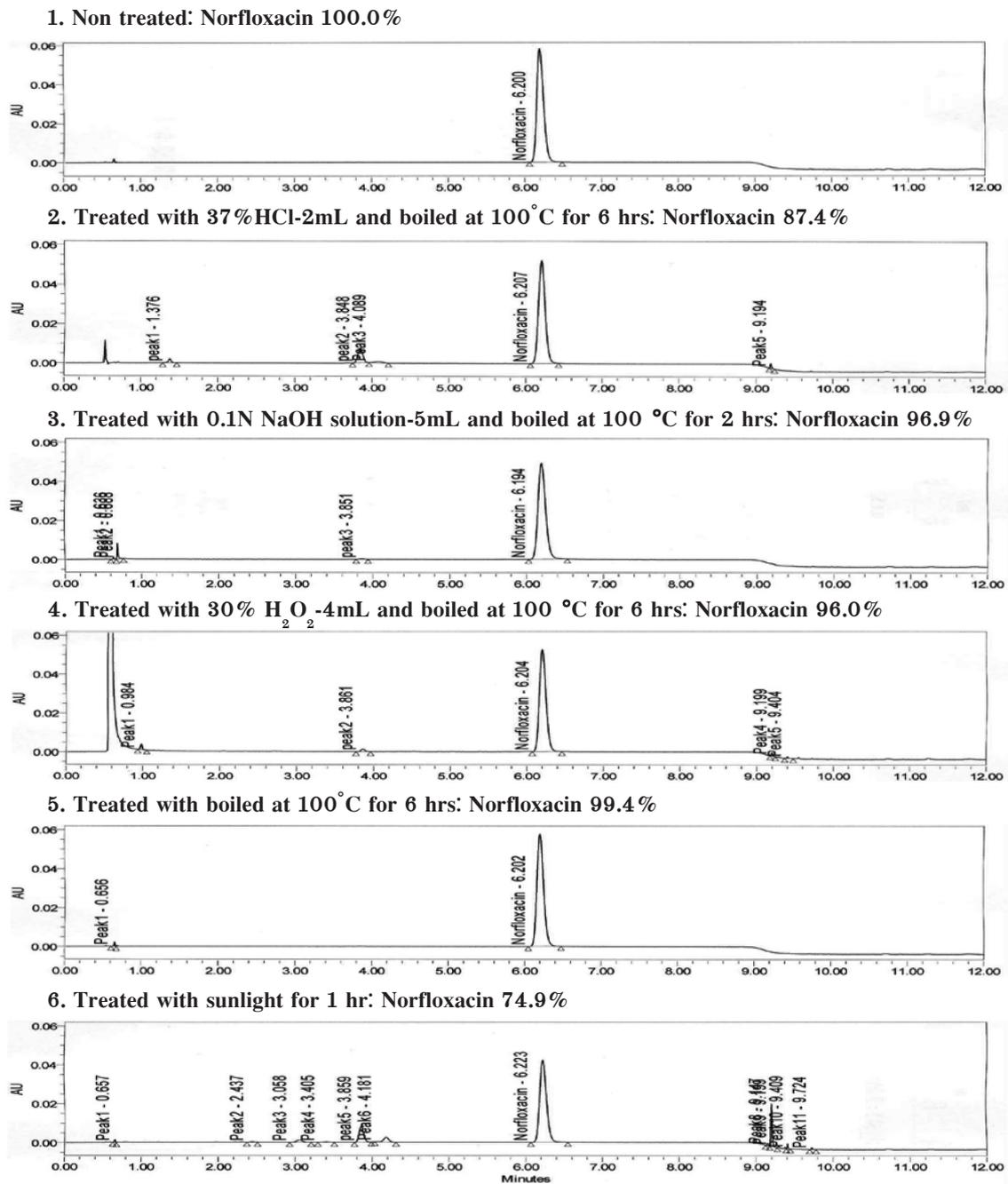
จากการนำสารละลายมาตรฐาน Norfloxacin ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาทำให้สลายตัวในสภาวะต่างๆ คำนวณหาปริมาณ Norfloxacin เทียบกับสารละลายที่ไม่ถูกทำให้สลายตัว พบการสลายตัวสูงสุดภายใต้สภาวะแสงแดดเป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง มีการสลายตัวของ Norfloxacin ร้อยละ 25.1 และร้อยละ 100 ตามลำดับ สภาวะเป็นกรดภายใต้ความร้อนพบการสลายตัวร้อยละ 12.6 สภาวะออกซิเดชันภายใต้ความร้อน และสภาวะด่างภายใต้ความร้อนมีการสลายตัวร้อยละ 4.0 และ 3.6 ตามลำดับ Norfloxacin มีความทนต่อสภาวะภายใต้ความร้อน (ต้ม 100 °C, 6 ชั่วโมง) มีการสลายตัวเพียงร้อยละ 0.6 ของปริมาณ Norfloxacin เริ่มต้น (ตารางที่ 1, รูปที่ 2)

จากสภาวะของระบบ UPLC ที่ได้ พบว่าสารสลายตัวที่เกิดขึ้นในสภาวะต่างๆ ไม่รบกวนพีคของ Norfloxacin แสดงว่าระบบมีความจำเพาะเจาะจงกับ Norfloxacin และค่า peak purity ของพีค Norfloxacin มีความบริสุทธิ์ ไม่มีการปนเปื้อนของสารอื่น (no co-elute) โดยมีค่า purity angle น้อยกว่า purity threshold

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณของ Norfloxacin (NFX) และร้อยละของสารสลายตัวที่เกิดขึ้นในสภาวะต่างๆ

สภาวะ	ร้อยละ NFX	ร้อยละของสารสลายตัวที่เกิดขึ้นที่ relative retention time ต่างๆ												
		0.10	0.11	0.16	0.22	0.39	0.49	0.55	0.62	0.67	1.47	1.48	1.51	1.56
HCl 37% + ต้ม 100 °C, 6 ชม.	87.4	-	-	-	1.4	-	-	-	9.1	1.3	-	0.8	-	-
0.1N NaOH + ต้ม 100 °C, 2 ชม.	96.9	0.4	2.3	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-
H ₂ O ₂ 30% + ต้ม 100 °C, 6 ชม.	96.0	-	-	1.5	-	-	-	-	1.6	-	-	0.6	0.3	-
ต้ม 100 °C, 6 ชม.	99.4	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
แสงแดด 1 ชม.	74.9	-	0.4	-	-	0.3	2.0	0.3	9.9	3.4	0.5	7.4	0.6	0.3

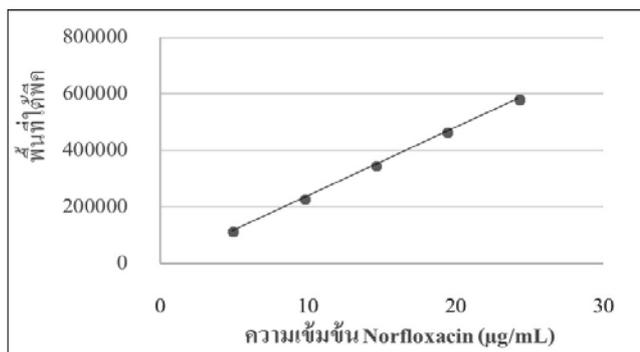
สารตำรายา ปีที่ 26 ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน 2563 9



รูปที่ 2 โครมาโทแกรมของสารละลายตัวที่เกิดขึ้นในสภาวะต่างๆ เปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของสารละลาย Norfloxacin ในสภาวะปกติ

3. การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

จากการนําสารละลายมาตรฐาน Norfloxacin ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทำซ้ำ 3 วัน แล้วสร้างกราฟมาตรฐาน พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Norfloxacin และพื้นที่ใต้พีคมีลักษณะเป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.99999, 0.99996 และ 0.99999 ตามลำดับ (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Norfloxacin และพื้นที่ใต้พีค

4. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

สารละลายตัวอย่าง Norfloxacin 3 ระดับความเข้มข้น 5, 15 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเตรียมระดับความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง และนําดูซ้ำ 3 ครั้ง กำหนดปริมาณ Norfloxacin ในสารละลายตัวอย่างที่ตรวจพบจากเส้นกราฟสารละลายมาตรฐานในวันเดียวกัน กำหนดร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) พบว่าค่าร้อยละของการคืนกลับในทุกระดับความเข้มข้นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ในช่วง 98.0 - 102.0 และ %RSD ไม่เกิน 2.0 (5) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงร้อยละของการคืนกลับ

ระดับ	ความเข้มข้น (µg/mL)	ความเข้มข้นที่ตรวจพบ (µg/mL)	ร้อยละของการคืนกลับ (%recovery)	Average %recovery	% RSD
Low	5.3781	5.3500	99.48	100.05	0.61
	5.4011	5.4384	100.69		
	5.4098	5.4093	99.99		
Medium	14.9856	15.0895	100.69	100.83	0.13
	15.5040	15.6366	100.86		
	16.3610	16.5159	100.95		
High	27.4666	27.7681	101.10	101.12	0.20
	26.1963	26.4412	100.93		
	26.3966	26.7487	101.33		

สารตำรายา ปีที่ 26 ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน 2563 11

5. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

5.1 ความทวนซ้ำได้ (Repeatability)

5.1.1 ความเที่ยงของระบบ (System precision)

จากการฉีดสารละลายมาตรฐาน Norfloxacin ความเข้มข้นประมาณ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ซึ่งให้มีความถูกต้อง 0.0001 มิลลิกรัม) ในตัวทำละลาย จำนวน 3 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างฉีดซ้ำ 6 ครั้ง พบว่า %RSD ของพื้นที่ใต้พีค Norfloxacin ไม่เกิน 0.73 (2) (ตารางที่ 3) และค่า tailing factor ของสารละลายมาตรฐานไม่เกิน 2.0 (2) โดยค่า tailing factor เท่ากับ 1.20, 1.19, 1.20 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความเที่ยงของระบบ (System Precision)

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีค Norfloxacin		
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3
1	401878.59	373876.41	352033.13
2	401883.33	373428.82	352235.29
3	401290.44	373532.89	350839.08
4	401494.02	374868.31	351944.71
5	401864.02	373899.03	352159.49
6	402486.84	374605.29	351815.45
Mean	401816.21	374035.12	351837.86
% RSD	0.10	0.16	0.15

5.1.2 ความเที่ยงของวิธี (Method precision)

คำนวณ % RSD ของร้อยละของการคืนกลับทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นของ Norfloxacin จากการทดสอบความถูกต้องในข้อ 4 ได้เท่ากับ 0.61, 0.13 และ 0.20 ตามลำดับ

5.2 Intermediate Precision

จากการทดสอบความแม่นยำแบบการทำซ้ำ โดยวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างชุดเดียวกันวันละ 10 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างฉีดซ้ำ 3 ครั้ง ทำการทดสอบ 2 วัน ใช้นักวิเคราะห์ 2 คน 2 คอลัมน์ 2 เครื่องมือ คำนวณร้อยละของปริมาณ Norfloxacin เทียบกับสารละลายมาตรฐาน พบว่า % RSD ของการทดสอบภายในวันเท่ากับ 0.40 และ 0.36 ตามลำดับ และ % RPD ระหว่างวันเท่ากับ 0.23 แสดงว่ามีความแม่นยำในการทำซ้ำดี (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความเที่ยง (Intermediate Precision)

ครั้งที่	ปริมาณ Norfloxacin (%)	
	วันที่ 1, นักวิเคราะห์ 1, เครื่องที่ 1, คอลัมน์ที่ 1	วันที่ 2, นักวิเคราะห์ 2, เครื่องที่ 2, คอลัมน์ที่ 2
1	100.25	99.21
2	100.11	99.64
3	99.44	99.46
4	99.76	100.26
5	99.41	99.11
6	99.57	99.82
7	99.69	100.12
8	100.40	99.46
9	100.45	99.67
10	99.56	99.59
ค่าเฉลี่ย	99.87	99.63
% RSD	0.40	0.36
ค่าเฉลี่ยระหว่างวัน	99.75	
% RPD ระหว่างวัน	0.23	

6. ความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง

จากการทดสอบฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของ Norfloxacin ที่ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทุกๆ 1 ชั่วโมง ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารละลายทั้งสองมีความคงสภาพตลอดการทดสอบระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยปริมาณ Norfloxacin ที่เวลา 24 ชั่วโมง ของสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง เท่ากับ 99.60% และ 99.65% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณที่จุดเริ่มต้น

7. การทดสอบความทนของวิธีวิเคราะห์ (Robustness)

7.1 ความคงสภาพของคอลัมน์

จากการตรวจสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ Acquity UPLC BEH C18 ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้โดยบันทึกค่า theoretical plate ของ Norfloxacin ที่ระดับความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเริ่มต้นใช้ เท่ากับ 24,000 (ต่อ 10 เซนติเมตร) หลังจากจบการทดสอบพบว่า ฉีดสารละลายต่างๆ มากกว่า 2,000 ครั้ง ค่า theoretical plate ลดลงเหลือประมาณ 95% เมื่อเปรียบเทียบกับค่า theoretical plate เริ่มต้น แสดงถึงความทนของคอลัมน์

7.2 ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสถานะของระบบ UPLC

จากการทดลองเปลี่ยนแปลงสถานะต่างๆ ของระบบ UPLC และฉีดสารละลายตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ แต่ละสถานะฉีดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วตรวจสอบค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น retention time, resolution, tailing factor และ theoretical plate มีผลการทดสอบดังนี้

สารตำรายา ปีที่ 26 ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน 2563 13

7.2.1 การใช้คอลัมน์ 2 รุ่นการผลิตของ Acquity UPLC BEH C18 ขนาด 2.1 × 100 มิลลิเมตร บรรจุอนุภาค ขนาด 1.7 ไมโครเมตร พบว่าคอลัมน์ทั้งสองสามารถแยกพีค Norfloxacin ออกจากพีคอื่นๆ ได้ดี มีค่า resolution ระหว่าง พีค Norfloxacin และ Norfloxacin related compound E มากกว่า 2.0, ค่า resolution ระหว่างพีค Norfloxacin related compound A และ Norfloxacin related compound H มากกว่า 3.0, tailing factor ไม่เกิน 2.0 และ theoretical plate สูง กว่า 10,000 (ต่อ 10 เซนติเมตร) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงผลของการเปลี่ยน Batch ของคอลัมน์

Acquity BEH C18	Peak	RRT	Resolution	Tailing factor	Theoretical plate
Batch No. 0216330731	Norfloxacin related compound K	0.61	-	1.13	22894
	Norfloxacin related compound E	0.94	17.53	1.09	29988
	Norfloxacin	1.0	2.27	1.79	14231
	Norfloxacin related compound A	1.45	24.84	1.10	1489343
	Norfloxacin related compound H	1.47	4.29	1.13	1356990
Batch No. 0347392551	Norfloxacin related compound K	0.60	-	1.07	20688
	Norfloxacin related compound E	0.93	16.04	1.07	24197
	Norfloxacin	1.0	2.62	1.38	17601
	Norfloxacin related compound A	1.59	33.42	1.12	1315828
	Norfloxacin related compound H	1.61	4.21	1.13	1225132

7.2.2 ผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะอื่นๆ ประเมินโดยค่า resolution ระหว่างพีค Norfloxacin กับ Norfloxacin related compound E และค่า resolution ระหว่างพีค Norfloxacin related compound A กับ Norfloxacin related compound H ของสารละลายสำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ พบว่ามีค่า resolution มากกว่า 2.0 และ 3.0 ตามลำดับ และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ (peak purity testing) (3) ของพีค Norfloxacin ในสารละลายตัวอย่าง พบว่า พีค Norfloxacin บริสุทธิ์สามารถแยกจากพีคที่อยู่ติดกันได้อย่างสมบูรณ์ โดยค่า resolution ระหว่างพีค Norfloxacin และ พีค Norfloxacin related compound E มีค่ามากกว่า 2.0 (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงผลของการเปลี่ยนแปลงสภาวะของเครื่อง UPLC

สภาวะของเครื่อง UPLC		Resolution	
		Norfloxacine related compound E V/S Norfloxacine (NLT 2.0)	Norfloxacine related compound A V/S Norfloxacine related compound H (NLT 3.0)
อุณหภูมิของคอลัมน์ (°C)	29	2.37	4.27
	30	2.22	4.41
	31	2.09	4.51
ปริมาตรของ สารละลายที่ฉีด (ไมโครลิตร)	1.0	2.63	4.38
	2.0	2.22	4.41
	2.5	2.05	4.38
อัตราการไหลของ สารละลายตัวพา (มิลลิลิตรต่อนาที)	0.35	2.37	4.39
	0.40	2.22	4.41
	0.45	2.08	4.68
% TFA ใน สารละลายตัวพา	0.09	2.08	4.43
	0.10	2.22	4.41
	0.11	2.28	4.39

8. ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection) และขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation)

8.1 เมื่อคำนวณขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณของ Norfloxacine จำนวนได้จาก slope และ Y-intercept ของสมการเส้นตรงจากผลในข้อ 3. แสดงรายละเอียดในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การคำนวณขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณของ Norfloxacine

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and Range)				การคำนวณ LOD และ LOQ
Standard Curve	Correlation Coefficient	Slope	Y-intercept	
วันที่ 1	0.99999	24189.37	2019.77	LOD = $3.3\sigma / S$ = 0.21 $\mu\text{g/mL}$
วันที่ 2	0.99996	24277.27	-1127.52	LOQ = $10\sigma / S$ = 0.65 $\mu\text{g/mL}$
วันที่ 3	0.99999	24179.05	228.29	
ค่าเฉลี่ย	0.99998	24215.23	373.51	σ = SD ของ Y-intercept
SD			1578.66	S = ค่าเฉลี่ยของ slope

โดยค่า LOD, LOQ ที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธีดังกล่าวใช้เป็นแนวทางเพื่อพิสูจน์ค่า LOD และ LOQ ของ Norfloxacine ตามวิธีการข้อ 8.2

8.2 จากการทดสอบฉีดสารละลาย Norfloxacine พบว่า Limit of Detection (LOD) มีค่าเท่ากับ 0.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (S/N = 3.36) และ Limit of Quantitation (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (RSD = 2.79%, n = 6, S/N = 10.81)

สารตำราฯ ปีที่ 26 ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน 2563 15

9. การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์

จากการทดสอบหาปริมาณ Norfloxacin ในตัวอย่างอื่นของผู้ผลิตต่างบริษัท จำนวน 1 ตัวอย่าง พบว่าวิธีวิเคราะห์ด้วย UPLC นี้สามารถแยกพีค Norfloxacin ออกจากพีคอื่นๆได้อย่างสมบูรณ์ Spectrum ของพีค Norfloxacin มีความบริสุทธิ์ (spectrally homogeneous) มีค่า purity angle น้อยกว่า purity threshold

วิจารณ์ผล

ผู้วิจัยได้นำข้อกำหนดความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี (Suitability requirements) ของการวิเคราะห์หัวข้อ Organic impurities และ Assay ของมอโนกราฟี Norfloxacin USP41 มาเป็นแนวทางการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ Norfloxacin ในวัตถุดิบด้วย UPLC โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิด PDA และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นตาม ICH guideline ข้อกำหนดความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟีมีความสำคัญอย่างยิ่งเนื่องจากแสดงถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธี ผู้วิจัยได้เตรียมความเข้มข้นของสารละลายสำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟีสำหรับการวิเคราะห์ด้วย UPLC ให้มีความเข้มข้นเท่ากับที่ระบุในมอโนกราฟี Norfloxacin USP41 สารละลายสำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟีประกอบด้วย สารละลายผสมของสารมาตรฐาน Norfloxacin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Related compounds 4 ชนิด ได้แก่ Norfloxacin related compound A, Norfloxacin related compound E, Norfloxacin related compound H และ Norfloxacin related compound K ความเข้มข้นของ Related compounds แต่ละชนิดเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายสำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟีมีความเข้มข้นของ Norfloxacin สูงกว่า Related compounds ประมาณ 10 เท่า โดยมีข้อกำหนดคือค่า resolution ระหว่างพีค Norfloxacin กับ Norfloxacin related compound E ไม่น้อยกว่า 2.0 และค่า resolution ระหว่างพีค Norfloxacin related compound A กับ Norfloxacin related compound H ไม่น้อยกว่า 3.0 จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์พบว่าระบบที่พัฒนาขึ้นโดยใช้คอลัมน์ UPLC ชนิด C18 และควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 30 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟีตามข้อกำหนด คือพีค Norfloxacin มีความบริสุทธิ์ (Spectrally homogeneous) สามารถแยกพีค Norfloxacin กับพีค Norfloxacin related compound E ได้อย่างสมบูรณ์ มีค่า resolution มากกว่า 2.0 และพีค Norfloxacin related compound A กับพีค Norfloxacin related compound H มีค่า resolution มากกว่า 4.0 นอกจากนี้ related compounds ทั้ง 4 ชนิดก็มีความบริสุทธิ์ทุกพีคเช่นกัน วิธีวิเคราะห์ปริมาณ Norfloxacin ในวัตถุดิบด้วย UPLC นี้จึงสามารถนำไปพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Organic impurities ในวัตถุดิบ Norfloxacin ต่อไปได้

การทดสอบความเที่ยงของระบบ (System precision) จากการฉีดสารละลายมาตรฐาน Norfloxacin จำนวน 3 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างฉีดซ้ำ 6 ครั้ง พบว่า %RSD ของพื้นที่ใต้พีค Norfloxacin ทั้ง 3 ตัวอย่างไม่เกิน 0.73(2) แสดงถึงความเที่ยงของระบบที่ดี และมีค่า tailing factor ไม่เกิน 2.0 (2) ผลการศึกษาสถานะต่างๆ ที่ทำให้เกิดการสลายตัว (forced degradation studies) (6) พบว่าสารสลายตัวที่เกิดขึ้นจากสถานะต่างๆ ไม่รบกวนพีค Norfloxacin และเมื่อดูค่า peak purity ของ Norfloxacin มีค่า purity angle น้อยกว่า purity threshold นั่นคือพีค Norfloxacin บริสุทธิ์ ไม่มีการปนเปื้อนของสารอื่นในพีคนี้ ปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการสลายตัวสูงสุดคือสถานะภายใต้แสงแดดเป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง มีการสลายตัวของ Norfloxacin ร้อยละ 25.1 และร้อยละ 100 ตามลำดับ สถานะเป็นกรดภายใต้ความร้อนพบการสลายตัวร้อยละ 12.6 สถานะออกซิเดชันภายใต้ความร้อน และสถานะด่างภายใต้ความร้อนมีการสลายตัวร้อยละ 4.0 และ 3.6 ตามลำดับ Norfloxacin มีความทนต่อสถานะภายใต้ความร้อน (ต้ม 100°C, 6 ชั่วโมง) มีการสลายตัวน้อยกว่าร้อยละ 1.0 ของปริมาณเริ่มต้น

ผลทดสอบความเป็นเส้นตรงในช่วง 5 ถึง 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ มากกว่า 0.99995 แสดงถึงความเป็นเส้นตรงที่ดีของระบบโครมาโทกราฟีตลอดช่วงที่ทำการศึกษา การทดสอบความถูกต้องได้ค่าร้อยละการคืนกลับที่ 3 ระดับความเข้มข้น (low, medium, high) เท่ากับ 100.05, 100.83 และ 101.12 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ไม่เกินร้อยละ 98.0-102.0)(5) การทดสอบความเที่ยง พบว่ามีความเที่ยงของระบบ (system precision) และมีความเที่ยงของวิธี (method precision) มีการทวนซ้ำได้ ไม่มีความแตกต่างของการทดสอบจากการวิเคราะห์ซ้ำ 2 วัน โดยนักวิเคราะห์ 2 คน ด้วยเครื่องมือต่างชุดกัน

จากผลการทดสอบความคงสภาพของสารละลาย Norfloxacin สามารถใช้เป็นแนวทางในการกำหนดระยะเวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่าง สารละลาย Norfloxacin มีความคงสภาพในระหว่างการทดสอบนาน 24 ชั่วโมง โดยมีปริมาณมากกว่าร้อยละ 99.0 เมื่อเทียบกับปริมาณที่จุดเริ่มต้น สำหรับวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 14 นาทีต่อการฉีดสารแต่ละครั้ง จึงไม่เกิดปัญหาการสลายตัวของยาระหว่างการวิเคราะห์ การทดสอบความทนของวิธีวิเคราะห์ (Robustness) โดยการศึกษาผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงรุ่นการผลิตคอลัมน์ การเปลี่ยนแปลงสถานะของระบบ UPLC ได้แก่ อุณหภูมิของคอลัมน์ ปริมาตรการฉีด อัตราการไหลของสารละลายตัวพา และร้อยละของ Trifluoroacetic acid ในสารละลายตัวพา พบว่ามีความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟีตามข้อกำหนดของ USP41 (2) และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ (peak purity testing) พบว่าพีก Norfloxacin บริสุทธิ์ (spectrally homogeneous) ไม่มี co-elute นั่นคือไม่มีการปนเปื้อนของสารอื่นในพีกนี้ การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณของ Norfloxacin มีค่าเท่ากับ 0.06 และ 0.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

วิธี UPLC ที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ใช้เวลาวิเคราะห์น้อย สามารถลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) การใช้งานคอลัมน์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสซึ่งไม่สูงเกินไปจึงเป็นการยืดอายุคอลัมน์

บทสรุป

วิธีวิเคราะห์ปริมาณ Norfloxacin ในวัตถุดิบด้วย UPLC ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟีตามข้อกำหนดของตำราของสหรัฐอเมริกาฉบับพิมพ์ครั้งที่ 41 (USP41) มีความจำเพาะเจาะจงของวิธี (selectivity/specificity) สามารถแยก Norfloxacin ออกจาก Related compounds 4 ชนิดได้แก่ Norfloxacin related compound A, Norfloxacin related compound E, Norfloxacin related compound H, Norfloxacin related compound K และสารสลายตัวอื่นๆ อย่างมีประสิทธิภาพ มีความแม่นยำ (accuracy) ความเที่ยง (precision) ความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ (linearity and range) รวมทั้งความทน (robustness) ตามหลักเกณฑ์การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของ ICH guideline วิธีมีความถูกต้องน่าเชื่อถือ สะดวก ใช้เวลาวิเคราะห์น้อย สามารถลดปริมาณการใช้สารเคมี วิธีวิเคราะห์ปริมาณ Norfloxacin ในวัตถุดิบด้วย UPLC สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ญ.นิดาพรรณ เรื่องอุทิศินันท์ เป็นอย่างสูงที่ให้คำแนะนำการทำงานวิจัย และเป็นที่ปรึกษาด้านวิชาการ

สารตำรายา ปีที่ 26 ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน 2563 17

เอกสารอ้างอิง

1. Martindale. The Extra Pharmacopoeia. 29th ed. The Pharmaceutical Press; London. p. 108.
2. The United States Pharmacopeia, 41th, The National Formulary, 36.2018. The United States Pharmacopeia Convention, Inc.; Rockville, USA. p. 2976.
3. Waters Corporation. PDA Software User's Guide. Milford, MA: Waters Corporation; 1994.
4. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). ICH Steering Committee.
5. AOAC International, 2016, Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements [online] 2016 [cited 2019 Nov 28]; [18 screens]. Available from: URL:https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf
6. John D. O, Ira S. K. and Michael E. S. Validation of Impurity Methods, Part II. [online]. [cited 2019 May 14]; [5 screens]. Available from: URL:<https://www.chromatographyonline.com>