

**26.1**

**มกราคม-เมษายน 2563**

**ISSN 0858-6454**

# **สารตำรายา**

**Pharmacopoeial Newsletter**

**กลุ่มจัดทำตำรายาของประเทศไทย**

**สำนักยาและวัตถุเสพติด**

**กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์**

# วารสารยา

## Pharmacopoeial Newsletter

ที่ปรึกษา	สุรัชนี้ เสวตศิลา, นันทนา สิทธิชัย, นิตาพรรณ เรืองฤทธิพันธ์
บรรณาธิการอำนวยการ	สิริชัย กระจ่างศรี
บรรณาธิการ	ศศิวิมล พัฒเสมา
ผู้ช่วยบรรณาธิการ	กรวิกา จารุพันธ์, สันติ นิ่มน้อย, ธนิตา ปัทมจินดา, ษษิพิมล บุญทวี
คณะที่ปรึกษาด้านวิชาการ	วัลลภา ทาทอง ภาคภูมิ เต็งอำนวย คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สันทนา สุธาดารัตน์ คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง มนัส อัดตวิชัย ศศิดา อยู่สุข วิมลณี คงสุข สำนักยาและวัตถุเสพติด ศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม

เจ้าของ	สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
สำนักงาน	กลุ่มจัดทำตำรายาของประเทศไทย สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซอยโรงพยาบาลบาราศนราตราบ นนทบุรี 11000 โทร. 0-2951-0000 ต่อ 99120 โทรสาร 0-2580-5733

### วัตถุประสงค์

- เป็นสื่อเผยแพร่ผลงานของกลุ่มจัดทำตำรายาของประเทศไทย คณะกรรมการจัดทำตำรายาของประเทศไทยและคณะอนุกรรมการที่เกี่ยวข้อง
- เสนอความก้าวหน้าในการปรับปรุงแก้ไขตำรายาของต่างประเทศและตำรายาของประเทศไทย
- เผยแพร่ความรู้เรื่องยา วิทยาศาสตร์การแพทย์และวิชาการที่เกี่ยวข้อง
- เป็นสื่อกลางในการแสดงความคิดเห็นของผู้ใช้และผู้จัดทำตำรายาของประเทศไทย

# การส่งเรื่องลงพิมพ์ในสารตำรายา

สารตำรายารับจัดพิมพ์บทความประเภทต่างๆ ดังนี้

1. **นิพนธ์ต้นฉบับ (Original Article)** เป็นรายงานผลการวิจัยด้านเภสัชศาสตร์ แพทยศาสตร์ วิทยาศาสตร์ การแพทย์ และวิทยาศาสตร์ทั่วไปที่ยังไม่เคยพิมพ์ที่ไหนมาก่อน
2. **บทความปริทัศน์ (Review Article)** เป็นบทความที่เรียบเรียงจากผลงานด้านวิทยาศาสตร์ที่เคยพิมพ์มาแล้ว กล่าวถึงความก้าวหน้าของเรื่องนั้น โดยเฉพาะ
3. **รายงานวิจัยสั้น (Short Communications)** เป็นบทความที่เรียบเรียงจากรายงานผลทางห้องปฏิบัติการ ด้านเภสัชศาสตร์ แพทยศาสตร์ วิทยาศาสตร์ และวิทยาศาสตร์ทั่วไปที่ยังไม่เคยพิมพ์ที่ไหนมาก่อน
4. **ภาคสาระสังเขป (Abstract)** เป็นการแปลเรื่องย่อของบทความด้านวิทยาศาสตร์ที่พิมพ์แล้วและเป็นเรื่องที่มีสาระสำคัญน่าสนใจ
5. **ข่าววิทยาศาสตร์ (Scientific News)** เป็นบทความสั้นๆ เกี่ยวกับวิทยาศาสตร์ทั่วไปที่กำลังอยู่ในความสนใจ
6. **ปกิณฑกะ (Miscellaneous)** เป็นความรู้จากประสบการณ์ทางด้านเภสัชศาสตร์ วิทยาศาสตร์การแพทย์ และความรู้ทั่วไป

## หลักเกณฑ์การเขียนต้นฉบับ

1. บทความทุกประเภทจะเขียนเป็นภาษาไทย หรือ ภาษาอังกฤษก็ได้ เพื่อความสะดวกอาจจัดส่งต้นฉบับในแผ่นดิสก์คอมพิวเตอร์ โดยบันทึกเป็นแฟ้มของโปรแกรม MS Word
2. บทความที่เป็นรายงานการวิจัย (original article) ต้องมีบทคัดย่อ (abstract) ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ท้ายบทคัดย่อให้มีคำสำหรับทำดรรชนี (key word) ไม่เกิน 5 คำ เป็นภาษาอังกฤษและให้จัดโครงสร้างของบทความเรียงตามลำดับดังนี้ บทนำ (Introduction) วัสดุและวิธีการ (Materials and Methods) ผลการวิจัย (Results) วิจารณ์ผล (Discussion) บทสรุป (Conclusion) และเอกสารอ้างอิง (References)
3. การอ้างอิงเอกสารให้ชี้หมายเลขกำกับ และเรียงตามลำดับของการอ้างอิง ชื่อย่อของวารสาร ให้ใช้ตาม U.S. National Library of Medicine in Index Medicus และคู่มือการเตรียมบทความและรายงานทางวิทยาศาสตร์เพื่อตีพิมพ์ในวารสารของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
4. การเขียนเอกสารอ้างอิงให้เรียงลำดับตามตัวอย่าง
  - (1) Beckett, A.H. and Stenlake, J.B. 1988. Practical Pharmaceutical Chemistry, 4<sup>th</sup> ed. Part I. The Athlone Press, London. P.26-7.
  - (2) Carmona, M., Silva, M. and perezbendito, D. 1992. Determination of Nitrazepam in Tablets. Analytical Letters. 25(7): 1261-74.
  - (3) เต็ม สมิตินันท์. 2533. ชื่อพันธุ์ไม้แห่งประเทศไทย. กรมป่าไม้ บางเขน กรุงเทพฯ. หน้า 67-8.

## การส่งบทความ

ผู้เขียนส่งต้นฉบับจริง 1 ชุด กองบรรณาธิการถือสิทธิ์ในการปรับปรุงแก้ไขเพื่อความสมบูรณ์ของบทความ โดยจะแจ้งให้ผู้เขียนทราบอีกครั้ง

## บรรณาธิการแถลง

สารตำราปีที่ 26 ฉบับที่ 1 ขอนำเสนอบทความนิพนธ์ต้นฉบับ 3 เรื่อง เรื่องแรกเป็นเรื่องการพัฒนา และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณนอร์ฟลอกซาซินในวัตถุดิบ ด้วยยูพีแอลซี โดย ญญ.จารุบล ชัยชนะ ญญ.เมทินี หลิมศิริวงษ์ และ ญญ.ปัทมรส แซ่มชมดาว โดยการศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณนอร์ฟลอกซาซิน ที่ง่าย รวดเร็ว มีความจำเพาะเจาะจง มีความแม่นยำ ความเที่ยง ความทน ผลการวิเคราะห์ที่มีความน่าเชื่อถือ สามารถลด เวลาในการทำงาน ประหยัดค่าใช้จ่าย ลดปริมาณการใช้สารเคมี มีความเหมาะสมสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานการ วิเคราะห์ปริมาณนอร์ฟลอกซาซินในวัตถุดิบยาได้ เรื่องที่สองเป็นเรื่อง การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ ยาแคปซูลคลอราซีเพท ไดโพลเทสซีมโดย ญญ.วิชรณีย์ ทองสิมา นางสาวยุพา เมืองชุม และ ญญ.ณปภา สิริศุกกฤตกุล เป็นวิธีที่ใช้สำหรับตรวจเอกลักษณ์ ปริมาณตัวยาสำคัญ หาปริมาณ related compounds ความสม่ำเสมอของตัวยาคอ แคปซูล และการละลายของตัวยา เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการ ผลทดสอบพบว่ามีความถูกต้องของ ความจำเพาะเจาะจง ความเป็นเส้นตรง ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธี ทั้งนี้ได้ศึกษาถึงปริมาณต่ำสุดที่หาปริมาณได้ ผลกระทบของตัวกรอง และความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานและ/หรือสารละลายตัวอย่าง พบว่าอยู่ในช่วงเกณฑ์ การยอมรับทุกหัวข้อ วิธีนี้จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้วิเคราะห์คุณภาพยาแคปซูลคลอราซีเพท ไดโพลเทสซีมได้ ส่วนเรื่องสุดท้ายเป็นเรื่อง การศึกษาคุณภาพของยาแคปซูลจิงที่มีจำหน่ายในประเทศไทย โดย ญญ.สาธิตินิ ฌ ระนอง ญญ.ประภาพรธรรม สุขพรรณม์ นางสาวอนัญญา สุพันธ์วัฒน์ และ ญญ.จิรานุช แจ่มทวีกุล ที่ได้ทำการศึกษาคุณภาพ ยาแคปซูลจิงที่มีจำหน่ายในประเทศไทย โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างยาแคปซูลจิง จากร้านยาและโรงพยาบาลที่เข้าร่วมการ ศึกษาตรวจวิเคราะห์คุณภาพ ตามวิธีและเกณฑ์มาตรฐานของตำราฟาร์มาโคเปียของสหรัฐอเมริกา ฉบับที่ 38 ใน หัวข้อ การตรวจเอกลักษณ์ การหาความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย การหาปริมาณสารสำคัญ gingerols, gingerdione, gingerdiol, และ shogaols การหาปริมาณน้ำมันหอมระเหย และการทดสอบการละลาย ทั้งนี้วิธีการหาปริมาณสาร สำคัญได้มีการทวนสอบความถูกต้องของวิธีก่อนการทดสอบ นอกจากนี้ยังมีการตรวจหาการปนเปื้อนของโลหะหนัก และเชื้อจุลินทรีย์ตามวิธีและเกณฑ์มาตรฐานของตำราของประเทศไทย เล่ม 2 ปีพ.ศ. 2554 ส่วนผลการศึกษาจะเป็น เช่นไรนั้น ติดตามอ่านได้ในบทความ

สุดท้ายนี้คณะบรรณาธิการวารสารสารตำราขอขอบคุณผู้ทบทวน (Reviewer) ที่ได้พิจารณา ให้คำแนะนำ และข้อเสนอแนะต้นฉบับบทความก่อนลงตีพิมพ์เผยแพร่ ขอขอบคุณผู้เขียนทุกท่านที่เผยแพร่ผลงานเพื่อเป็นวิทยาทาน รวมทั้งผู้อ่านทุกท่านที่สนับสนุนมาโดยตลอด หากพบข้อผิดพลาดประการใดทางคณะบรรณาธิการฯ ต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

# สารบัญ

## นิพนธ์ต้นฉบับ Original Article

<< การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณนอร์ฟลอกซาซินในวัตถุดิบด้วยยูพีแอลซี .....	1
(Development and Method Validation for the Determination of Norfloxacin Raw Material by UPLC)	
<< การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ยาแคปซูลคลอราซีเพท ไดโปแทสเซียม .....	18
(Method Development and Validation of Clorazepate Dipotassium Capsules)	
<< การศึกษาคุณภาพของยาแคปซูลขิงที่จำหน่ายในประเทศไทย .....	36
Study of the quality of ginger capsules available in Thailand	

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

จารุบล ชัยชนะ\*  
เมทินี หลิมศิริวงษ์\*  
ปวีณรส แซ่มขมดาว\*

**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 41<sup>th</sup> 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  $2.1 \times 100$  มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.7 ไมโครเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส สารละลายตัวพาเป็นสารละลายกรดไตรฟลูออโรอะซิติก ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และอะเซโทไนไตรล์ผสมกันแบบเกรเดียน อัตราการไหล 0.4 มิลลิตรต่อนาที 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 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.99998 การทดสอบความถูกต้องของวิธีแสดงด้วยค่าร้อยละการคืนกลับของนอร์ฟลอกซาซิน ที่ 3 ระดับความเข้มข้น 5, 15 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร 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 ซึ่ดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณเท่ากับ 0.06 และ 0.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ วิธีวิเคราะห์ปริมาณนอร์ฟลอกซาซินในวัตถุขี้ด้วยยูพีแอลซีจึงเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว มีความจำเพาะเจาะจง มีความแม่นยำ ความเที่ยง ความทน ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความน่าเชื่อถือ สามารถลดเวลาในการทำงาน ประหยัดค่าใช้จ่าย ลดปริมาณการใช้สารเคมี นอกจากนี้ การใช้งานคอลัมน์ที่อุณหภูมิไม่สูงเกินไปยังสามารถยืดอายุคอลัมน์ วิธีที่พัฒนาขึ้นจึงมีความเหมาะสมสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณนอร์ฟลอกซาซินในวัตถุขี้ยาได้

**กุญแจคำ:** 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 ด้วยวิธีไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (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  $4.6 \times 250$  มิลลิเมตร, 5 ไมครอน อุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส สารละลายตัวพา (mobile phase) เป็นระบบ gradient ประกอบด้วยสารละลายน้ำ pH 2.0 และ acetonitrile อัตราการไหล (flow

rate) 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรการฉีด 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร วิธีดังกล่าวใช้คอลัมน์พิเศษที่ไม่มีในห้องปฏิบัติการทั่วไป อุณหภูมิคอลัมน์สูงถึง 60 องศาเซลเซียส มีผลทำให้อายุการใช้งานของคอลัมน์สั้นลง และใช้เวลานาน 25 นาทีต่อการฉีดสารแต่ละครั้ง สภาวะดังกล่าวเพื่อให้พีค Norfloxacin ที่อยู่ใกล้กับพีคสารละลายตัว Norfloxacin related compound E สามารถแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ ไม่ co-elute โดยข้อกำหนดความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟกำหนดค่า 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 ผู้วิจัยจึงได้นำข้อกำหนดความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟจาก USP41 มาพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วย 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) ซึ่งเป็นการแปลงผลจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ (spectra) มาอยู่ในรูปเวกเตอร์ (vector) และเปรียบเทียบปริมาณที่แตกต่างของเวกเตอร์ดังกล่าว เวกเตอร์มีคุณสมบัติ 2 ประการคือ ความยาว (length) และทิศทาง (direction) ความยาวเป็นสัดส่วนตามปริมาณความเข้มข้น ส่วนทิศทางไม่ขึ้นกับความเข้มข้นได้จาก relative absorbance ที่ทุกความยาวคลื่น ค่าของมุมที่ใช้เปรียบเทียบและประเมินผล peak purity ได้แก่ spectral contrast angle, purity angle และ purity threshold โดย spectral contrast angle คือ การหาค่ามุมในรูปแบบเวกเตอร์ที่กระทำทุกๆ ความยาวคลื่นที่ต้องการและจะกระทำที่ทุกพื้นที่พีคที่เกิดขึ้นของสารประกอบนั้น 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) และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นตาม ICH guideline(4) UPLC มีหลักการแยกสารเช่นเดียวกับ HPLC แต่มีประสิทธิภาพในการแยกดีกว่า 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, ตู้ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ 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

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

ปีเปิด 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 ใช้สถานะดังนี้

คอลัมน์: Acquity UPLC BEH C18 ขนาด  $2.1 \times 100$  มิลลิเมตร อนุภาค 1.7 ไมโครเมตร

อุณหภูมิของคอลัมน์: 30 องศาเซลเซียส

สารละลายตัวพา: เป็นระบบ gradient

นาทีที่	อัตราการใช้ (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 ระหว่างพีค Norfloxacin related compound E และ Norfloxacin ไม่น้อยกว่า 2.0 (2), ค่า resolution ระหว่างพีค 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 จากนั้นเปิดสารละลายดังกล่าว 3.0 มิลลิลิตร ทำให้สลายตัวในสภาวะต่างๆ ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเป็น 10.0 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำมาฉีดซ้ำ 2 ครั้ง ตรวจสอบการสลายตัวที่เกิดขึ้น ค่า retention time และ resolution ของสารสลายตัวที่เกิดขึ้นจะต้องแยกจากพีค Norfloxacin อย่างชัดเจน สภาวะต่างๆ ที่ทดสอบ มีดังนี้

1. เติม hydrochloric acid 37% จำนวน 2.0 มิลลิลิตร ตั้งที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
2. เติม 0.1N sodium hydroxide solution จำนวน 5.0 มิลลิลิตร ตั้งที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3. เติม hydrogen peroxide 30% จำนวน 4.0 มิลลิลิตร ตั้งที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
4. ตั้งที่อุณหภูมิ 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) จากนั้นเปิดสารละลายดังกล่าว 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 กับพื้นที่ใต้พีค 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) หาค่าเฉลี่ยของการคืนกลับ และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ของการคืนกลับ ทุกระดับความเข้มข้น ค่าร้อยละของการคืนกลับควรอยู่ในช่วง 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 นับจำนวนครั้งที่ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างในการทดสอบทั้งหมด

##### 7.2 ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาวะของระบบ UPLC

สภาวะที่เปลี่ยนแปลงต่างๆ ของเครื่อง UPLC มีดังนี้

7.2.1 เปลี่ยนคอลัมน์ โดยใช้คอลัมน์จำนวน 2 รุ่นการผลิตของ Acquity UPLC BEH C18 ขนาด  $2.1 \times 100$

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 มิลลิลิตรต่อนาที

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

ทดสอบโดยการฉีดสารละลายสำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ ฉีดสภาวะละ 3 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบความเหมาะสมของระบบในสภาวะที่เปลี่ยนแปลงต่างๆ ของ UPLC ดูค่าพารามิเตอร์ retention time, tailing factor, theoretical plate และ resolution

สารละลายสำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบควรมีค่า resolution ระหว่างพีก Norfloxacin กับ Norfloxacin related compound E ไม่น้อยกว่า 2.0 (2) และค่า resolution ระหว่างพีก 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  $\sigma$  = 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. การทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ (Chromatographic system suitability)

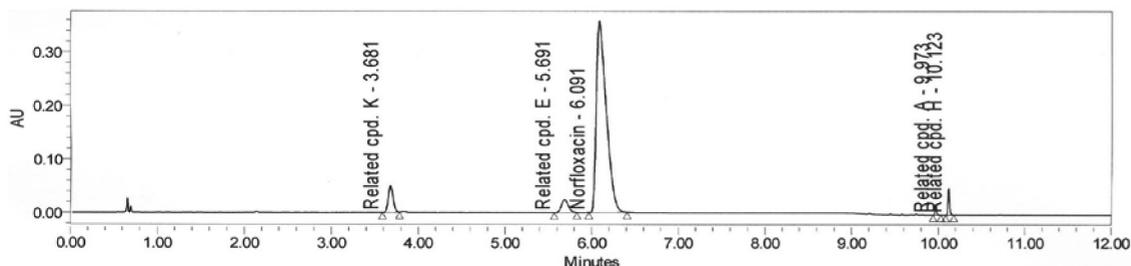
จากการฉีดสารละลายสำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ พบว่าระบบโครมาโทกราฟ สามารถแยกพีก Norfloxacin ออกจากพีก Related compounds ทั้ง 4 ชนิดจากกันได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 1) ประกอบกับการใช้เครื่องตรวจวัดชนิด Photo Diode Array (PDA) เป็นการยืนยันว่า Spectrum ของพีก Norfloxacin มีความบริสุทธิ์ (spectrally homogeneous) โดยมีค่า purity angle น้อยกว่า purity threshold นอกจากนี้ Spectrum ของพีก Related compounds ทั้ง 4 ชนิดก็มีความบริสุทธิ์ทุกพีกเช่นกัน

Retention time ของพีก 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 ระหว่างพีก Norfloxacin กับ Norfloxacin related compound E เท่ากับ 2.27 (ไม่น้อยกว่า 2.0) (2) และค่า resolution ระหว่างพีก 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 โครมาโทแกรมสำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ

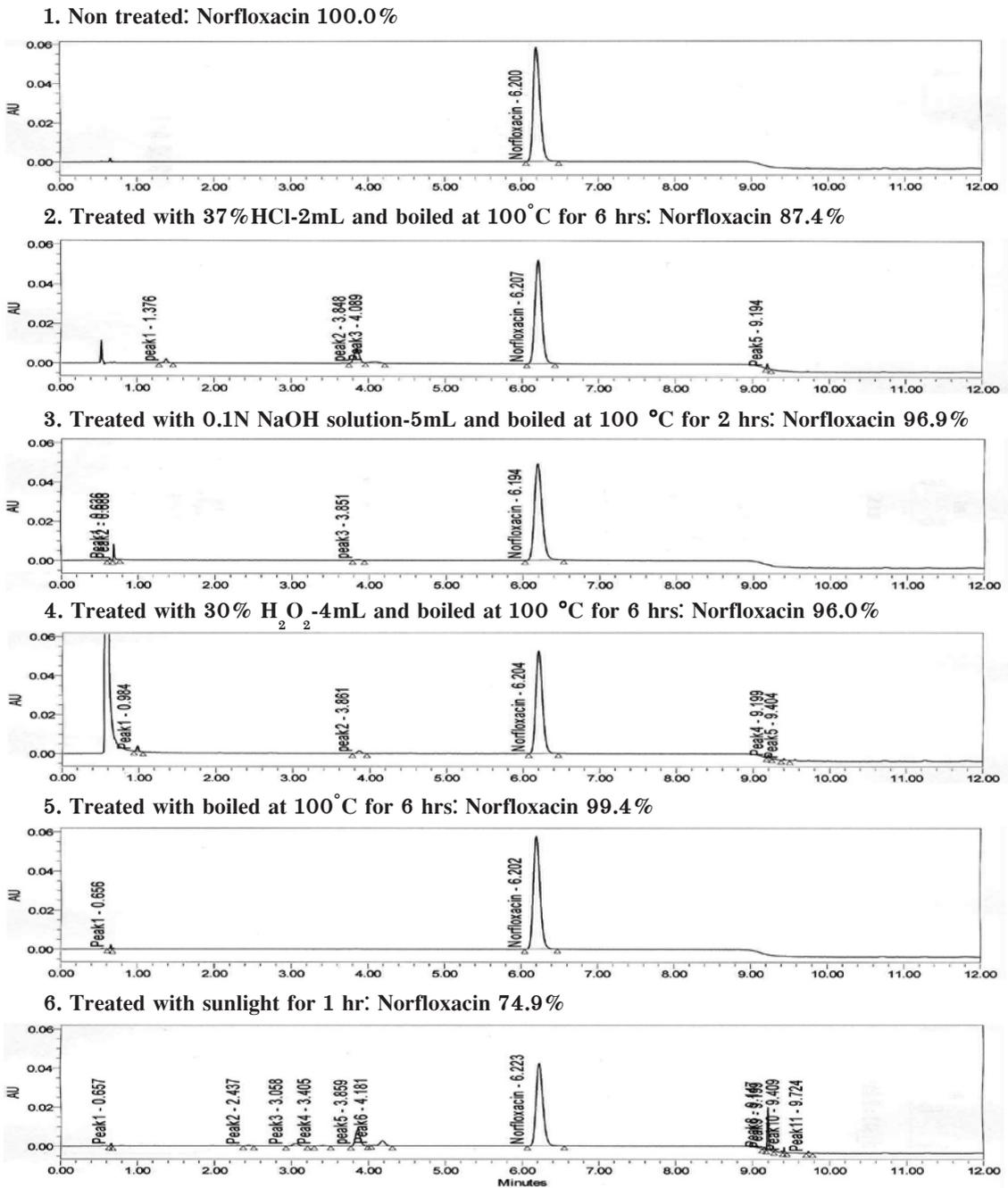
## 2. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity / Specificity)

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

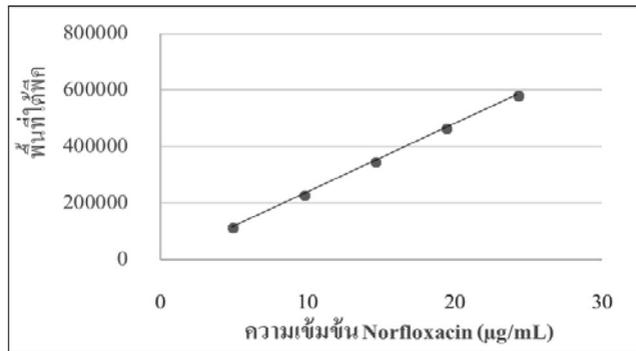
สภาวะ	ร้อยละ NFX	ร้อยละของสารสลายตัวที่เกิดขึ้นที่ relative retention time ต่างๆ												
		0.10	0.11	0.16	0.22	0.39	0.49	0.55	0.62	0.67	1.47	1.48	1.51	1.56
HCl 37% + ต้ม 100 °C, 6 ชม.	87.4	-	-	-	1.4	-	-	-	9.1	1.3	-	0.8	-	-
0.1N NaOH + ต้ม 100 °C, 2 ชม.	96.9	0.4	2.3	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 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



รูปที่ 2 โครมาโทแกรมของสารละลายตัวที่เกิดขึ้นในสภาวะต่างๆ เปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของสารละลาย Norfloxacin ในสภาวะปกติ

### 3. การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

จากการนิตสารละลายมาตรฐาน 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 และฉีดซ้ำ 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		

**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 ของสารละลายมาตรฐาน ไม่เกิน 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

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 สูงกว่า 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 พบว่าพีค Norfloxacin บริสุทธิ์สามารถแยกจากพีคที่อยู่ติดกันได้อย่างสมบูรณ์ โดยค่า resolution ระหว่างพีค Norfloxacin และพีค Norfloxacin related compound E มีค่ามากกว่า 2.0 (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงผลของการเปลี่ยนแปลงสภาวะของเครื่อง UPLC

สภาวะของเครื่อง UPLC		Resolution	
		Norfloxacin related compound E V/S Norfloxacin (NLT 2.0)	Norfloxacin related compound A V/S Norfloxacin 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 Norfloxacin คำนวณได้จาก slope และ Y-intercept ของสมการเส้นตรงจากผลในข้อ 3. แสดงรายละเอียดในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การคำนวณขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณของ Norfloxacin

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

โดยค่า LOD, LOQ ที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธีดังกล่าวใช้เป็นแนวทางเพื่อพิสูจน์หาค่า LOD และ LOQ ของ Norfloxacin ตามวิธีการข้อ 8.2

8.2 จากการทดสอบฉีดสารละลาย Norfloxacin 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)

## 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 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม 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 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม 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) ผลการศึกษาสภาวะต่างๆ ที่ทำให้เกิดการสลายตัว (forced degradation studies) (6) พบว่าสารสลายตัวที่เกิดขึ้นจากสภาวะต่างๆ ไม่รบกวนพีค Norfloxacin และเมื่อดูค่า peak purity ของ Norfloxacin มีค่า purity angle น้อยกว่า purity threshold นั่นคือพีค Norfloxacin บริสุทธิ์ ไม่มีการปนเปื้อนของสารอื่นในพีคนี้ ปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการสลายตัวสูงสุดคือสภาวะภายใต้แสงแดดเป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง มีการสลายตัวของ Norfloxacin ร้อยละ 25.1 และร้อยละ 100 ตามลำดับ สภาวะเป็นกรดภายใต้ความร้อนพบการสลายตัวร้อยละ 12.6 สภาวะออกซิเดชันภายใต้ความร้อน และสภาวะด่างภายใต้ความร้อนมีการสลายตัวร้อยละ 4.0 และ 3.1 ตามลำดับ Norfloxacin มีความทนต่อสภาวะภายใต้ความร้อน (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) โดยการศึกษาคะพราะของการเปลี่ยนแปลงรุ่นการผลิตคอลัมน์ การเปลี่ยนแปลงสถานะของระบบ UPLC ได้แก่ อุณหภูมิของคอลัมน์ ปริมาตรการฉีด อัตราการไหลของสารละลายตัวพา และร้อยละของ Trifluoroacetic acid ในสารละลายตัวพา พบว่ามีความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟีตามข้อกำหนดของ USP41 (2) และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ (peak purity testing) พบว่าพิก Norfloxacin บริสุทธิ์ (spectrally homogeneous) ไม่มี co-elute นั่นคือไม่มีการปนเปื้อนของสารอื่นในพิกนี้ 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 และสารละลายตัวอื่นๆอย่างมีประสิทธิภาพ 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.นิดาพรธม เรื่องอุททินนทร์ เป็นอย่างสูงที่ให้คำแนะนำการทำงานวิจัย และเป็นทีปรีษาด้านวิชาการ

## เอกสารอ้างอิง

1. Martindale. The Extra Pharmacopoeia. 29<sup>th</sup> ed. The Pharmaceutical Press; London. p. 108.
2. The United States Pharmacopeia, 41<sup>th</sup>, 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](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>

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original Article

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ยาแคปซูลคลอราซีเพท ไดโพลเทสเซียม  
(Method Development and Validation of Clorazepate Dipotassium Capsules)

วิชรณีย์ ทองติมา-

ยุพา เมืองชุม-

ณปภา สิริสุภกฤตกุล\*

**Abstract** Clorazepate dipotassium is a drug in benzodiazepine group of the treatment of anxiety disorders. They are available in Thailand as capsule, but USP has only monograph of tablet. Bureau of Drug and Narcotic was necessary to evaluated according to various drug registration. Thus, analytical procedure for identification, assay, related compounds, uniformity of dosage units (content uniformity) and dissolution were developed and were validated in order that determine to Standard Operating Procedure (SOP). In this study, Identification, assay and content uniformity for clorazepate dipotassium could be obtained under the following HPLC condition: column Acclaim C18 5  $\mu$ m 4.6  $\times$  100 mm, mobile phase composition of buffer solution pH 7.5:acetonitrile (7:3). Related compounds-method I for nordiazepam could be obtained under the following HPLC condition: column Mightysil RP-18 GP 5  $\mu$ m 4.6  $\times$  150 mm, mobile phase composition of water: acetonitrile: phosphate buffer solution pH 8.0 (5:4:1). Related compounds-method II for 2-amino-5-chlorobenzophenone and unknown impurity could be obtained under the following HPLC condition: column Mightysil RP-18 GP 5  $\mu$ m 4.6  $\times$  150 mm, mobile phase composition of water:acetonitrile:1M Tetrabutylammonium hydroxide in methanol (110:90:1). Dissolution condition was 0.01 N Hydrochloric acid as dissolution medium, paddle as apparatus at speed 50 rpm, time of 30 min and using UV spectrophotometry. The results of specificity, linearity, accuracy, precision, intermediate precision, filter effect and stability of standard solution and/or sample solution were all comply with acceptance criteria. This indicates the suitability for the laboratory and the specific analytical method of intended use for quality assessment of clorazepate dipotassium capsules.

**Keywords:** HPLC, Clorazepate dipotassium capsules

**บทคัดย่อ** ยาคลอราซีเพท ไดโพลแทสเซียมจัดเป็นยากลุ่มเบนโซไดอาซีปีนส์ ใช้ลดอาการวิตกกังวล ในประเทศไทยมีเฉพาะรูปแบบแคปซูล แต่ตำรายาสหรัฐอเมริกามีวิธีมาตรฐานสำหรับยาเม็ดคลอราซีเพท ไดโพลแทสเซียมเท่านั้น สำนักงานและวัตถุประสงค์จะต้องวิเคราะห์ยาโดยใช้วิธีแต่ละทะเบียนตำรับยาที่แตกต่างกัน จึงได้พัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยาแคปซูลคลอราซีเพท ไดโพลแทสเซียมสำหรับตรวจเอกลักษณ์ ปริมาณตัวยาสำคัญ ปริมาณ related compounds ความสม่ำเสมอของตัวยาคือแคปซูล และการละลายของตัวยา เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการ ได้ผลดังนี้ วิธีตรวจเอกลักษณ์ ปริมาณตัวยาสำคัญ และความสม่ำเสมอของตัวยา ใช้ HPLC เฟสคงที่ Acclaim C18 5  $\mu\text{m}$  4.6  $\times$  100 mm เฟสเคลื่อนที่ สารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.5 : Acetonitrile (7:3) การหา related compounds วิธีที่ 1 (ปริมาณนอร์ไดอาซีเพม) ใช้ HPLC เฟสคงที่ Mightysil RP-18 GP 5  $\mu\text{m}$  4.6  $\times$  150 mm เฟสเคลื่อนที่ น้ำ: Acetonitrile : สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต pH 8.0 (5:4:1) การหา related compounds วิธีที่ 2 (ปริมาณ 2-อะมิโน-5-คลอโรเบนโซฟีโนน และสารอื่นๆ) ใช้ HPLC เฟสคงที่ Mightysil RP-18 GP 5  $\mu\text{m}$  4.6  $\times$  150 mm เฟสเคลื่อนที่ น้ำ: Acetonitrile : 1 M Tetrabutylammonium hydroxide in methanol (110:90:1) และวิธีหาค่าการละลายของตัวยานใน 0.01 N Hydrochloric acid ใช้ paddle ความเร็ว 50 rpm วัดด้วย UV spectrophotometry ผลทดสอบความถูกต้องของความจำเพาะเจาะจง ความเป็นเส้นตรง ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธี ปริมาณต่ำสุดที่หาปริมาณได้ ผลกระทบของตัวกรองและความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานและ/หรือสารละลายตัวอย่าง พบว่าอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับทุกหัวข้อ วิธีนี้จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้วิเคราะห์คุณภาพยาแคปซูลคลอราซีเพท ไดโพลแทสเซียมได้

**กัญญ์:** เอกซ์พีแอลซี, ยาแคปซูลคลอราซีเพท ไดโพลแทสเซียม

## บทนำ

คลอราซีเพท ไดโพลแทสเซียมเป็นตัวยานในกลุ่ม Benzodiazepines มีโครงสร้างหลักทางเคมีเป็น benzene ring เชื่อมต่อกันกับ diazepine ring ออกฤทธิ์ต่อสมองโดยจับกับ BZ-receptor แล้วส่งผลให้ Gamma amino butyric acid (GABA) ที่มีอยู่ทำงานได้ดีขึ้น (1) จัดเป็นวัตถุออกฤทธิ์ประเภท 4 ตามพระราชบัญญัติวัตถุที่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท พ.ศ. 2559

ยาแคปซูลคลอราซีเพท ไดโพลแทสเซียม เป็นยานับัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2561 บัญชี ข (2) เป็นยาที่นิยมใช้กันมาก ในประเทศไทยมีจำหน่ายเฉพาะในรูปแบบยาแคปซูล ไม่มีในรูปแบบยาเม็ด แต่ตำรายาสหรัฐอเมริกา (USP) มีวิธีมาตรฐานสำหรับยาเม็ดคลอราซีเพท ไดโพลแทสเซียมเท่านั้น (3) ปัจจุบันสำนักงานและวัตถุประสงค์จึงได้ทำการวิเคราะห์เพื่อควบคุมคุณภาพยาแคปซูลคลอราซีเพท ไดโพลแทสเซียม โดยใช้วิธีตามทะเบียนตำรับยา พบว่ามีความแตกต่างกันไปในแต่ละผู้ผลิต จึงได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาแคปซูล คลอราซีเพท ไดโพลแทสเซียมสำหรับการตรวจเอกลักษณ์ หาปริมาณตัวยาสำคัญ ปริมาณ related compounds ความสม่ำเสมอของตัวยาคือแคปซูล และการละลายของตัวยา โดยปรับจากวิธีวิเคราะห์ยาเม็ดคลอราซีเพท ไดโพลแทสเซียมตามตำรายาสหรัฐอเมริกา ฉบับที่ 41 (USP 41) (3) และตำรายญี่ปุ่น ฉบับที่ 17 (JP 17) (4) ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ โดยทำการทดสอบความเป็นเส้นตรง ความจำเพาะเจาะจง ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธี ปริมาณต่ำสุดที่หาปริมาณได้ ผลกระทบของตัวกรองและความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานและ/หรือสารละลายตัวอย่าง เพื่อให้ได้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้อง เชื่อถือได้ และนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ห้องปฏิบัติการในการศึกษาคุณภาพยาแคปซูลคลอราซีเพท ไดโพลแทสเซียมต่อไป

## วัสดุและวิธีการ

### 1. สารมาตรฐาน

- Clorazepate Dipotassium (DMSc Reference Standard)
- Nordiazepam (DMSc Reference Standard)
- 2-Amino-5-chlorobenzophenone (DMSc Reference Standard)

### 2. ตัวอย่าง

- ตัวอย่าง Clorazepate Dipotassium 5 mg per capsule
- Placebo ของตัวอย่าง

### 3. เครื่องมือ

- High Performance Liquid Chromatography, Diode Array Detector (Dionex, Ultimate 3000 RS)
- UV-VIS Spectrophotometer (Perkin Elmer Lambda 35)
- 708-DS Dissolution apparatus (Agilent Technologies)

## การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ (Method development)

ศึกษาข้อมูล เอกสารที่เกี่ยวข้อง จัดเตรียมสารเคมี, เครื่องมือและอุปกรณ์ ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยนำวิธีวิเคราะห์สำหรับยาเม็ดคลอราซีเพท ไดโพลแทสเซียม ตามตำรายาของสหรัฐอเมริกาฉบับที่ 41 (3) ในหัวข้อตรวจเอกลักษณ์ ปริมาณตัวยาสำคัญ ปริมาณ related compounds และความสม่ำเสมอของตัวยาคู่แคปซูล มาปรับความยาวของคอลัมน์ HPLC เพื่อให้ใช้ระยะเวลาสั้นลง ควบคุมอุณหภูมิใน autosampler เป็น 15 °C เพื่อให้สารละลายมาตรฐานและตัวอย่าง ในการหาปริมาณตัวยาสำคัญและความสม่ำเสมอของตัวยามีความคงสภาพได้ดีขึ้น นำวิธีวิเคราะห์สำหรับยาแคปซูล คลอราซีเพท ไดโพลแทสเซียม ตามตำรายาของญี่ปุ่นฉบับที่ 17 (4) ในหัวข้อการทดสอบการละลายของตัวยามาปรับ medium เป็น 0.01 N Hydrochloric acid เพื่อให้แสดง  $\lambda_{max}$  ของความยาวคลื่นได้

## การตรวจเอกลักษณ์ (Identification) และปริมาณตัวยาสำคัญ (Assay) (3)

- สารละลายมาตรฐาน Clorazepate Dipotassium (ความเข้มข้น 0.05 mg/ml)
- สารละลายตัวอย่าง (ความเข้มข้น 0.05 mg/ml)
- Chromatographic condition:
  - Mobile phase: Buffer solution pH 7.5 : Acetonitrile = 7 : 3 (Isocratic)
  - Column: Acclaim 120, C18, 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  100 mm (Dionex, USA)
  - Column temperature: 25 °C
  - Autosampler temperature: 15 °C
  - Detector: UV 230 nm
  - Flow rate: 2.0 ml/min
  - Injection volume: 20  $\mu$ l
- System suitability: Standard solution

%RSD for 5 injections of Clorazepate Dipotassium: NMT 2.0%

Asymmetry of Clorazepate Dipotassium: NMT 2.0

เกณฑ์การยอมรับ: 90.0-110.0% of the labeled amount of Clorazepate Dipotassium

**Related compounds-Method I (3)**

- สารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0.01056 mg/ml)
  - สารละลายตัวอย่าง (ความเข้มข้น 0.6 mg/ml)
  - Chromatographic condition:
    - Mobile phase: Ultrapure water : Acetonitrile : Phosphate buffer solution pH 8.0 = 5 : 4 : 1 (Isocratic)
    - Column: Mightysil RP-18 GP, 5  $\mu$ m, 4.6 mm  $\times$  150 mm (Kanto Chemical Co., Inc., Japan)
    - Column temperature: 25 $^{\circ}$ C
    - Autosampler temperature: Ambient
    - Detector: UV 232 nm
    - Flow rate: 1.5 ml/min
    - Injection volume: 20  $\mu$ l
    - Run time: About 32 min (Not less than twice the retention time of Nordiazepam)
  - System suitability: Standard solution
    - %RSD for 5 injections of Nordiazepam: NMT 2.0%
    - Asymmetry of Nordiazepam: NMT 2.0
- เกณฑ์การยอมรับ: Not more than 2.0% of Nordiazepam

**Related compounds-Method II (3)**

- สารละลายมาตรฐาน 2-Amino-5-chlorobenzophenone (ความเข้มข้น 0.0075 mg/ml)
  - สารละลายตัวอย่าง (ความเข้มข้น 1.5 mg/ml)
  - Chromatographic condition:
    - Mobile phase: Ultrapure water : Acetonitrile : 1M Tetrabutylammonium hydroxide in methanol = 110 : 90 : 1 (Isocratic)
    - Column: Mightysil RP-18 GP, 5  $\mu$ m, 4.6 mm  $\times$  150 mm (Kanto Chemical Co., Inc., Japan)
    - Column temperature: 25 $^{\circ}$ C
    - Autosampler temperature: Ambient
    - Detector: UV 238 nm
    - Flow rate: 1.5 ml/min
    - Injection volume: 20  $\mu$ l
  - System suitability: Standard solution
    - %RSD for 5 injections of 2-Amino-5-chlorobenzophenone: NMT 2.0%
    - Asymmetry of 2-Amino-5-chlorobenzophenone: NMT 2.0
- เกณฑ์การยอมรับ: The sum of all impurities, other than Nordiazepam, found in Method I and Method II is not more than 0.5%

**ความสม่ำเสมอของตัวยาต่อแคปซูล (Uniformity of dosage units, Content uniformity) (3)**

- ใช้สารละลายบัฟเฟอร์, mobile phase, สารละลายมาตรฐาน และ Chromatographic condition เหมือนใน Assay
- สารละลายตัวอย่าง (ความเข้มข้น 0.05 mg/ml)
- เกณฑ์การยอมรับ:
  - Acceptance value (AV) of 10 units is less than or equal to L1
  - Acceptance value (AV) of 30 units is less than or equal to L1 and no individual content of any unit is less than  $[1-(0.01)(L2)]M$  nor more than  $[1+ (0.01)(L2)]M$

**การละลายของตัวยา (Dissolution) (3, 4)**

- สารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0.0055 mg/ml)
- สารละลายตัวอย่าง (ความเข้มข้น 0.0056 mg/ml)
- Dissolution condition:
  - Medium: 0.01 N Hydrochloric acid, 900 ml
  - Apparatus: 2 (paddle), 50 rpm
  - Time: 30 minutes
  - Procedure: วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างด้วยวิธี UV โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 240 nm เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานในตัวทำละลายเดียวกัน
  - Tolerance: Not less than 80% (Q) of the labeled amount of Clorazepate Dipotassium is dissolved in 30 minutes

**วิธีการทดสอบความถูกต้องและเกณฑ์การยอมรับ (Validation Procedure and Acceptance Criteria) (5)**

นำตัวอย่างยาแคปซูล Clorazepate Dipotassium 5 mg per capsule จำนวน 200 แคปซูล บดให้ละเอียดและผสมเป็นเนื้อเดียวกัน และเตรียมผงยา Placebo ของตัวอย่าง เพื่อใช้ในการทดสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจเอกลักษณ์ (Identification), หาปริมาณตัวยาสำคัญ (Assay), ความสม่ำเสมอของตัวยาต่อแคปซูล (Uniformity of dosage units, Content uniformity), Related compounds-Method I, Related compounds-Method II และการละลายของตัวยา (Dissolution)

**การทดสอบความถูกต้องของวิธีตรวจเอกลักษณ์ (Identification), หาปริมาณตัวยาสำคัญ (Assay), ความสม่ำเสมอของตัวยาต่อแคปซูล (Uniformity of dosage units, Content uniformity) (5)****1) Specificity:**

- เปรียบเทียบ retention time และ spectrum ของ Clorazepate Dipotassium ในสารละลายมาตรฐานและตัวอย่าง ดู peak purity ของ peak ตัวยาสำคัญ และดูการรบกวนของ placebo peak
- เกณฑ์การยอมรับ: Retention time และ spectrum ของสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างไม่แตกต่างกัน ไม่มีการรบกวนของ impurity อื่นๆ และ placebo peak

**2) Precision:**

- เตรียมตัวอย่างจำนวน 6 ซ้ำ, วิเคราะห์หาปริมาณ Clorazepate Dipotassium เทียบกับสารละลายมาตรฐาน
- เกณฑ์การยอมรับ: %RSD  $\leq$  2.0% (n = 6)

### 3) Intermediate precision:

- เปรียบเทียบสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างเหมือนในหัวข้อ precision โดยเตรียมตัวอย่างจำนวน 6 ซ้ำ สำหรับนักวิเคราะห์แต่ละคน, วิเคราะห์หาปริมาณ Clorazepate Dipotassium เทียบกับสารละลายมาตรฐาน

- กำหนดค่า %RSD (n = 6) ของแต่ละนักวิเคราะห์ ทำการเปรียบเทียบ system suitability และ %RSD (n = 12) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยนักวิเคราะห์ทั้ง 2 คน

- เกณฑ์การยอมรับ:

1. System suitability: Standard solution

%RSD for 5 injections of Clorazepate Dipotassium: NMT 2.0%

Asymmetry of Clorazepate Dipotassium: NMT 2.0

2. %RSD (n = 12)  $\leq$  2.0%

### 4) Accuracy:

- เปรียบเทียบสารละลาย Spiked placebo: เตรียมความเข้มข้น 5 ระดับ (0.025-0.075 mg/ml, 50-150%) ระดับละ 3 ซ้ำ, วิเคราะห์หาปริมาณ Clorazepate Dipotassium ที่เติมลงไป โดยฉีดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เทียบกับสารละลายมาตรฐาน

- เกณฑ์การยอมรับ: %Recovery มีค่า 98-102%

### 5) Linearity:

#### 5.1) Linearity ของ system:

- เปรียบเทียบสารละลายมาตรฐาน Clorazepate Dipotassium ในระดับความเข้มข้น 0.025, 0.04, 0.05, 0.06 และ 0.075 mg/ml (50-150%) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และสร้างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง peak area และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

- เกณฑ์การยอมรับ: The correlation coefficient มีค่า 0.995

#### 5.2) Linearity ของ method:

- นำผลการหาปริมาณ Clorazepate Dipotassium ที่เติมลงไป ในระดับความเข้มข้น 0.025, 0.04, 0.05, 0.06 และ 0.075 mg/ml (50-150%) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากหัวข้อ Accuracy และสร้างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง peak area และความเข้มข้นของ Clorazepate Dipotassium

- เกณฑ์การยอมรับ: The correlation coefficient มีค่า 0.995

### 6) Range:

นำผลที่ได้จากการทำ Linearity accuracy และ precision มากำหนดช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์

### 7) Filter effect:

- เปรียบเทียบค่า peak area ของ Clorazepate Dipotassium ระหว่างสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างที่ centrifuge แล้ว (ไม่ผ่านการกรองด้วย membrane filter) และสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างที่กรองด้วย membrane filter ชนิด PVDF (VentriPure) 17 mm ขนาด 0.45  $\mu$ m หรือชนิด Nylon (VentriPure) 17 mm ขนาด 0.45  $\mu$ m

- เกณฑ์การยอมรับ: %Difference  $\leq$  2%

### 8) Stability test: ศึกษาความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

- เปรียบเทียบสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างเหมือนในหัวข้อ Precision และนำมาศึกษาความคงสภาพที่ 2 สภาวะ คือ เก็บใน autosampler ของเครื่อง HPLC ที่ 15°C และเก็บใน ตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 2-8°C นำมาวิเคราะห์เทียบกับสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้นใหม่ในแต่ละวัน

- เกณฑ์การยอมรับ: เปรียบเทียบปริมาณ Clorazepate Dipotassium ที่เหลืออยู่ในชั่วโมงที่ 24 และ 48 โดยจะต้องแตกต่างกับสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่เตรียมขึ้นในเวลา 0 ไม่เกิน 2% (%Difference  $\leq$  2%)

**การทดสอบความถูกต้องของวิธี Related compounds-Method I (5)****1) Specificity:**

- เปรียบเทียบ retention time และ spectrum ของ Nordiazepam ในสารละลายมาตรฐานและตัวอย่าง ดู peak purity ของ peak ตัวยาสำคัญ และดูการรบกวนของ placebo peak

- เกณฑ์การยอมรับ: Retention time และ spectrum ของสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างไม่แตกต่างกัน ไม่มีการรบกวนของ impurity อื่นๆ และ placebo peak

**2) Precision:**

- เตรียมตัวอย่างจำนวน 6 ซ้ำ, วิเคราะห์หาปริมาณ Nordiazepam เทียบกับสารละลายมาตรฐาน

- เกณฑ์การยอมรับ: %RSD  $\leq$  5.3% (n = 6)

**3) Intermediate precision:**

- เตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างเหมือนในหัวข้อ precision โดยเตรียมตัวอย่างจำนวน 6 ซ้ำ สำหรับนักวิเคราะห์แต่ละคน, วิเคราะห์หาปริมาณ Nordiazepam เทียบกับสารละลายมาตรฐาน

- คำนวณหา %RSD (n = 6) ของแต่ละนักวิเคราะห์ ทำการเปรียบเทียบ system suitability และ %RSD (n = 12) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยนักวิเคราะห์ทั้ง 2 คน

- เกณฑ์การยอมรับ:

1. System suitability: Standard solution

%RSD for 5 injections of Nordiazepam: NMT 2.0%

Asymmetry of Nordiazepam: NMT 2.0

2. %RSD (n = 12)  $\leq$  5.3%

**4) Accuracy:**

- เตรียมสารละลาย Spiked placebo: เตรียมความเข้มข้น 11 ระดับ (0.012-21.0  $\mu\text{g/ml}$ , 0.1-175%) ระดับละ 3 ซ้ำ, วิเคราะห์หาปริมาณ Nordiazepam ที่เติมลงไป โดยฉีดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เทียบกับสารละลายมาตรฐาน

- เกณฑ์การยอมรับ: - Accuracy 0.1-5.0%: %Recovery มีค่า 80-110%

- Accuracy 20-175%: %Recovery มีค่า 90-107%

**5) Linearity:****5.1) Linearity ของ system:**

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน Nordiazepam ในระดับความเข้มข้น 0.012, 0.024, 0.06, 0.12, 0.24, 0.6, 2.4, 7.2, 12.0, 14.4 และ 21.0  $\mu\text{g/ml}$  (0.1-175%) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และสร้างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง peak area และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

- เกณฑ์การยอมรับ: The correlation coefficient มีค่า 0.995

**5.2) Linearity ของ method:**

- นำผลการหาปริมาณ Nordiazepam ที่เติมลงไป ในระดับความเข้มข้น 0.012, 0.024, 0.06, 0.12, 0.24, 0.6, 2.4, 7.2, 12.0, 14.4 และ 21.0  $\mu\text{g/ml}$  (0.1-175%) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากหัวข้อ Accuracy และสร้างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง peak area และความเข้มข้นของ Nordiazepam

- เกณฑ์การยอมรับ: The correlation coefficient มีค่า 0.995

**6) LOQ:**

- เตรียม Spiked placebo ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ LOQ จำนวน 10 ซ้ำ ฉีดอย่างละ 1 ซ้ำ, วิเคราะห์หาปริมาณ

สารตำรายา ปีที่ 26 ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน 2563 25

Nordiazepam ที่เติมลงไป โดยฉีดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เทียบกับสารละลายมาตรฐาน

- เกณฑ์การยอมรับ: %Recovery มีค่า 80-110% และ %RSD (n = 10)  $\leq$  7.3%

#### 7) Range:

นำผลที่ได้จากการทำ Linearity accuracy precision และ LOQ มากำหนดช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์

#### 8) Filter effect:

- เปรียบเทียบค่า peak area ของ Nordiazepam ระหว่างสารละลายมาตรฐานที่ centrifuge แล้ว (ไม่ผ่านการกรองด้วย membrane filter) และสารละลายมาตรฐานที่กรองด้วย membrane filter ชนิด PVDF (VentriPure) 17 mm ขนาด 0.45  $\mu$ m หรือชนิด Nylon (VentriPure) 17 mm ขนาด 0.45  $\mu$ m

- เกณฑ์การยอมรับ: %Difference  $\leq$  2%

#### 9) Stability test: ศึกษาความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

- เตรียมสารละลายมาตรฐานเหมือนในหัวข้อ Precision และนำมาศึกษาความคงสภาพที่ 2 สถานะ คือ เก็บใน autosampler ของเครื่อง HPLC ที่ 25 °C และเก็บใน ตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 2-8 °C นำมาวิเคราะห์เทียบกับสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้นใหม่ในแต่ละวัน

- เกณฑ์การยอมรับ: เปรียบเทียบปริมาณ Nordiazepam ที่เหลืออยู่ในชั่วโมงที่ 24, 48 และ 72 โดยจะต้องแตกต่างกับสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้นในเวลา 0 ไม่เกิน 2% (%Difference  $\leq$  2%)

### การทดสอบความถูกต้องของวิธี Related compounds-Method II (5)

#### 1) Specificity:

- เปรียบเทียบ retention time และ spectrum ของ 2-Amino-5-chlorobenzophenone ในสารละลายมาตรฐานและตัวอย่าง ดู peak purity ของ peak ตัวยาสำคัญ และดูการรบกวนของ placebo peak

- เกณฑ์การยอมรับ: Retention time และ spectrum ของสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างไม่แตกต่างกัน ไม่มีการรบกวนของ impurity อื่นๆ และ placebo peak

#### 2) Precision:

- เตรียมตัวอย่างจำนวน 6 ซ้ำ, วิเคราะห์หาปริมาณ 2-Amino-5-chlorobenzophenone เทียบกับสารละลายมาตรฐาน

- เกณฑ์การยอมรับ: %RSD  $\leq$  5.3% (n = 6)

#### 3) Intermediate precision:

- เตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างเหมือนในหัวข้อ precision โดยเตรียมตัวอย่างจำนวน 6 ซ้ำ สำหรับนักวิเคราะห์แต่ละคน, วิเคราะห์หาปริมาณ 2-Amino-5-chlorobenzophenone เทียบกับสารละลายมาตรฐาน

- คำนวณหา %RSD (n = 6) ของแต่ละนักวิเคราะห์ ทำการเปรียบเทียบ system suitability และ %RSD (n = 12) ที่ได้จาก การวิเคราะห์ด้วยนักวิเคราะห์ทั้ง 2 คน

- เกณฑ์การยอมรับ:

1. System suitability: Standard solution

%RSD for 5 injections of 2-Amino-5-chlorobenzophenone: NMT 2.0%

Asymmetry of 2-Amino-5-chlorobenzophenone: NMT 2.0

2. %RSD (n = 12)  $\leq$  5.3%

#### 4) Accuracy:

- เตรียมสารละลาย Spiked placebo: เตรียมความเข้มข้น 11 ระดับ (0.0375-12.0  $\mu$ g/ml, 0.5-160%) ระดับละ 3 ซ้ำ,

วิเคราะห์หาปริมาณ 2-Amino-5-chlorobenzophenone ที่เติมลงไป โดยฉีดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เทียบกับสารละลายมาตรฐาน

- เกณฑ์การยอมรับ: - Accuracy 0.5-60%: %Recovery มีค่า 80-110%
- Accuracy 100-160%: %Recovery มีค่า 90-107%

## 5) Linearity:

### 5.1) Linearity ของ system:

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน 2-Amino-5-chlorobenzophenone ในระดับความเข้มข้น 0.0375, 0.045, 0.06, 0.075, 0.15, 0.375, 1.5, 4.5, 7.5, 9.0, 12.0 µg/ml (0.5-160%) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และสร้างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง peak area และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

- เกณฑ์การยอมรับ: The correlation coefficient มีค่า 0.995

### 5.2) Linearity ของ method:

- นำผลการหาปริมาณ 2-Amino-5-chlorobenzophenone ที่เติมลงไป ในระดับความเข้มข้น 0.0375, 0.045, 0.06, 0.075, 0.15, 0.375, 1.5, 4.5, 7.5, 9.0, 12.0 µg/ml (0.5-160%) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากหัวข้อ Accuracy และสร้างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง peak area และความเข้มข้นของ 2-Amino-5-chlorobenzophenone

- เกณฑ์การยอมรับ: The correlation coefficient มีค่า 0.995

## 6) LOQ:

- เตรียม Spiked placebo ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ LOQ จำนวน 10 ซ้ำ ฉีดอย่างละ 1 ซ้ำ, วิเคราะห์หาปริมาณ 2-Amino-5-chlorobenzophenone ที่เติมลงไป โดยฉีดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เทียบกับสารละลายมาตรฐาน

- เกณฑ์การยอมรับ: %Recovery มีค่า 80-110% และ %RSD (n = 10) ≤ 11%

## 7) Range:

นำผลที่ได้จากการทำ Linearity accuracy precision และ LOQ มากำหนดช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์

## 8) Filter effect:

- เปรียบเทียบค่า peak area ของ 2-Amino-5-chlorobenzophenone ระหว่างสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างที่ centrifuge แล้ว (ไม่ผ่านการกรองด้วย membrane filter) และสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างที่กรองด้วย membrane filter ชนิด PVDF (VentriPure) 17 mm ขนาด 0.45 µm หรือชนิด Nylon (VentriPure) 17 mm ขนาด 0.45 µm

- เกณฑ์การยอมรับ: %Difference ≤ 2%

## 9) Stability test: ศึกษาความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

- เตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างเหมือนในหัวข้อ Precision และนำมาศึกษาความคงสภาพที่ 2 สถานะคือ เก็บใน autosampler ของเครื่อง HPLC ที่ 25 °C และเก็บใน ตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 2-8 °C นำมาวิเคราะห์เทียบกับสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้นใหม่ในแต่ละวัน

- เกณฑ์การยอมรับ: เปรียบเทียบปริมาณ 2-Amino-5-chlorobenzophenone ที่เหลืออยู่ในชั่วโมงที่ 24, 48 และ 72 โดยจะต้องแตกต่างกับสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่เตรียมขึ้นในเวลา 0 ไม่เกิน 2% (%Difference ≤ 2%)

## การทดสอบความถูกต้องของวิธีการละลายของตัวยา (Dissolution) (5)

### 1) Specificity:

- เปรียบเทียบ UV spectrum ของ Clorazepate Dipotassium ในสารละลายมาตรฐาน สารละลายตัวอย่างและสารละลายผสม

- เกณฑ์การยอมรับ: UV spectrum ของสารละลายมาตรฐาน สารละลายตัวอย่างและสารละลายผสมไม่แตกต่างกัน

และไม่มีการรบกวนอย่างมีนัยสำคัญของ placebo และเปลือกแคปซูล

## 2) Precision:

- เตรียมตัวอย่างจำนวน 6 ซ้ำ, วิเคราะห์หาปริมาณ Clorazepate Dipotassium เทียบกับสารละลายมาตรฐาน
- เกณฑ์การยอมรับ: %RSD  $\leq$  2.0% (n = 6)

## 3) Intermediate precision:

- เตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างเหมือนในหัวข้อ precision โดยเตรียมตัวอย่างจำนวน 6 ซ้ำ สำหรับนักวิเคราะห์แต่ละคน, วิเคราะห์หาปริมาณ Clorazepate Dipotassium เทียบกับสารละลายมาตรฐาน
- คำนวณหา %RSD (n = 6) ของแต่ละนักวิเคราะห์ ทำการเปรียบเทียบ %RSD (n = 12) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยนักวิเคราะห์ทั้ง 2 คน
- เกณฑ์การยอมรับ: %RSD (n = 12)  $\leq$  2.0%

## 4) Accuracy:

- เตรียมสารละลาย Spiked placebo: เตรียมความเข้มข้น 5 ระดับ (0.0028-0.0083 mg/ml, 50-150%) ระดับละ 3 ซ้ำ, วิเคราะห์หาปริมาณ Clorazepate Dipotassium ที่เติมลงไป เทียบกับสารละลายมาตรฐาน
- เกณฑ์การยอมรับ: %Recovery มีค่า 98-102%

## 5) Linearity:

### 5.1) Linearity ของ system:

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน Clorazepate Dipotassium ในระดับความเข้มข้น 0.0028, 0.0044, 0.0056, 0.0067 และ 0.0083 mg/ml (50-150%) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และสร้างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง UV absorbance และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน
- เกณฑ์การยอมรับ: The correlation coefficient มีค่า 0.995

### 5.2) Linearity ของ method:

- นำผลการหาปริมาณ Clorazepate Dipotassium ที่เติมลงไป ในระดับความเข้มข้น 0.0028, 0.0044, 0.0056, 0.0067 และ 0.0083 mg/ml (50-150%) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากหัวข้อ Accuracy และสร้างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง UV absorbance และความเข้มข้นของ Clorazepate Dipotassium
- เกณฑ์การยอมรับ: The correlation coefficient มีค่า 0.995

## 6) Range:

นำผลที่ได้จากการทำ Linearity accuracy และ precision มากำหนดช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์

## 7) Filter effect:

- เปรียบเทียบค่า UV absorbance ของ Clorazepate Dipotassium ระหว่างสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างที่ centrifuge แล้ว (ไม่ผ่านการกรองด้วย membrane filter) และสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างที่กรองด้วย full flow filter ชนิด UHMWPE (Agilent) ขนาด 10  $\mu$ m และชนิด PVDF (VetriPure) 17 mm ขนาด 0.45  $\mu$ m
- เกณฑ์การยอมรับ: %Difference  $\leq$  2%

## 8) Stability test: ศึกษาความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานที่เวลา 2, 4 และ 5 ชั่วโมง

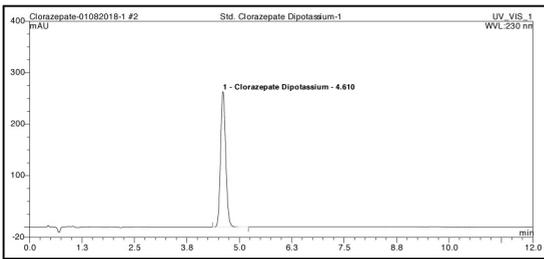
- เตรียมสารละลายมาตรฐานเหมือนในหัวข้อ Precision และนำมาศึกษาความคงสภาพที่ 25°C นำมาวิเคราะห์เทียบกับสารละลายมาตรฐานที่วัดทันทีหลังเตรียมเสร็จ
- เกณฑ์การยอมรับ: เปรียบเทียบปริมาณ Clorazepate Dipotassium ที่เหลืออยู่ในชั่วโมงที่ 2, 4 และ 5 โดยจะต้องแตกต่างกับสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้นในเวลา 0 ไม่เกิน 2% (%Difference  $\leq$  2%)

### การทดสอบวิธีวิเคราะห์กับตัวอย่างผลิตภัณฑ์

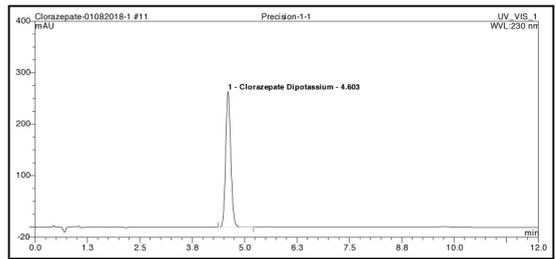
นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์จำนวน 18 ตัวอย่าง มาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น เพื่อทดสอบว่าวิธีนี้สามารถใช้ตรวจเอกลักษณ์ หาปริมาณตัวยาสำคัญ ปริมาณ related compounds ความสม่ำเสมอของตัวยาต่อแคปซูล และการละลายของตัวยาได้

#### ผลการศึกษา

เมื่อใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น พบว่า สามารถแยกสารสำคัญออกจากสารอื่นๆ ได้ ไม่มีการปนเปื้อนของสารอื่น และไม่มีการรบกวนของ placebo (ดังรูปที่ 1 ถึง 4)

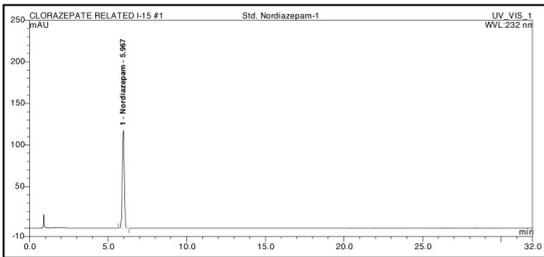


สารละลายมาตรฐาน

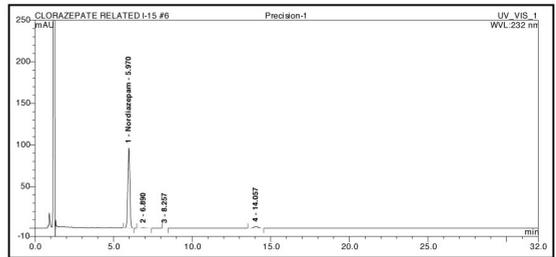


สารละลายตัวอย่าง

รูปที่ 1 แสดง HPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างสำหรับวิธีตรวจเอกลักษณ์ หาปริมาณตัวยาสำคัญ และความสม่ำเสมอของตัวยาต่อแคปซูล

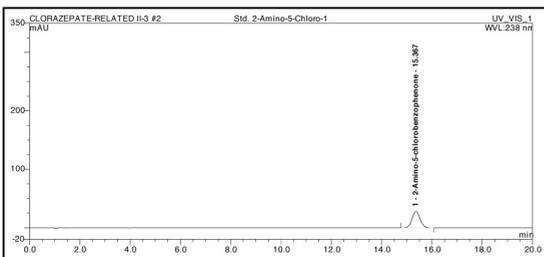


สารละลายมาตรฐาน

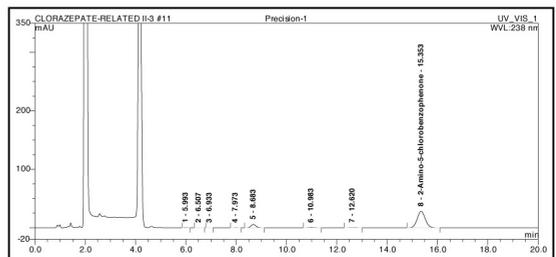


สารละลายตัวอย่าง

รูปที่ 2 แสดง HPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างสำหรับวิธีหาปริมาณ Related compounds- Method I

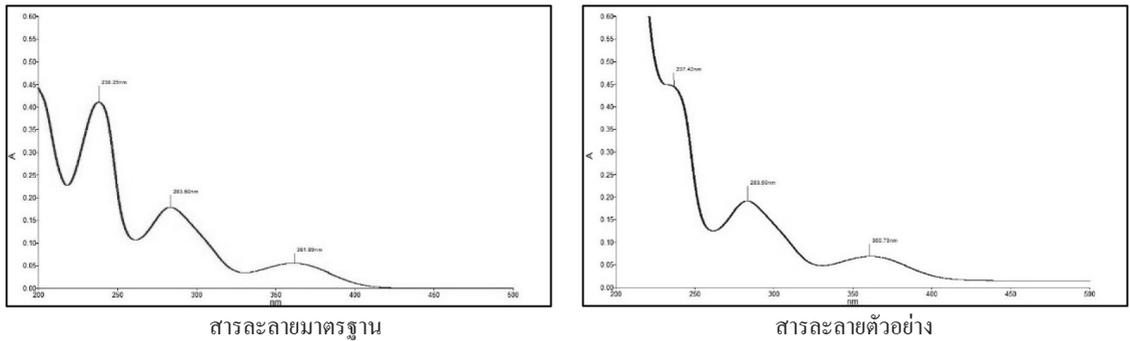


สารละลายมาตรฐาน



สารละลายตัวอย่าง

รูปที่ 3 แสดง HPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างสำหรับวิธีหาปริมาณ Related compounds- Method II



รูปที่ 4 แสดง UV spectrum ของสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างสำหรับวิธีหาค่าการละลายของตัวยา

ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีตรวจเอกลักษณ์ หาปริมาณตัวยาสำคัญ ปริมาณ related compounds ความสม่ำเสมอของตัวยาต่อแคปซูล และการละลายของตัวยา ในหัวข้อความเป็นเส้นตรง ความจำเพาะเจาะจง ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธี ปริมาณต่ำสุดที่หาปริมาณได้ ทดสอบความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานและ/หรือสารละลายตัวอย่าง พบว่าอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับทุกหัวข้อ

ตัวกรองชนิด PVDF และ nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ซึ่งใช้ในหาปริมาณตัวยาสำคัญ ความสม่ำเสมอของตัวยาต่อแคปซูล ปริมาณ related compounds และชนิด UHMWPE ขนาด 10 ไมโครเมตร เมื่อใช้ร่วมกับ PVDF ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ซึ่งใช้ในการละลายของตัวยา ไม่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์ (ดังตารางที่ 1, 2, 3, 4 และรูปที่ 5, 6, 7, 8)

**ตารางที่ 1** แสดงผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีตรวจเอกลักษณ์ (Identification) หาปริมาณตัวยาสำคัญ (Assay) และความสม่ำเสมอของตัวยาต่อแคปซูล (Uniformity of dosage units, Content uniformity)

Test	Acceptance Criteria	Result	Conclusion
<b>Specificity</b>	No interference	No interference	Pass
<b>Precision</b>			
- Repeatability	% RSD (n = 6) ≤ 2.0%	1.5%	Pass
- Intermediate precision (Different analysts and Different days)	% RSD (n = 12) ≤ 2.0%	1.5%	Pass
<b>Accuracy (50-150%) (0.025-0.075 mg/ml)</b>	The mean of %Recovery = 98-102%	100%	Pass
<b>Linearity</b>			
- Linearity of system (50-150%) (0.025-0.075 mg/ml)	R = 0.995-1.000	1.000	Pass
- Linearity of method (50-150%) (0.025-0.075 mg/ml)	R = 0.995-1.000	1.000	Pass
<b>Range</b>		50-150% (0.025-0.075 mg/ml)	Pass
<b>Filter effect (0.45 µm PVDF)</b>			
- Standard solution	%Difference ≤ 2%	0%	Pass
- Sample solution	%Difference ≤ 2%	0%	Pass
<b>Filter effect (0.45 µm Nylon)</b>			
- Standard solution	%Difference ≤ 2%	0%	Pass
- Sample solution	%Difference ≤ 2%	1%	Pass
<b>Stability at 15°C for 24 hours</b>			
- Standard solution	%Difference ≤ 2%	-2%	Pass
- Sample solution	%Difference ≤ 2%	-2%	Pass
<b>Stability at 15°C for 48 hours</b>			
- Standard solution	%Difference ≤ 2%	-2%	Pass
<b>Stability at 2-8°C for 48 hours</b>			
- Standard solution	%Difference ≤ 2%	0%	Pass
- Sample solution	%Difference ≤ 2%	-1%	Pass

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี Related compounds-Method I

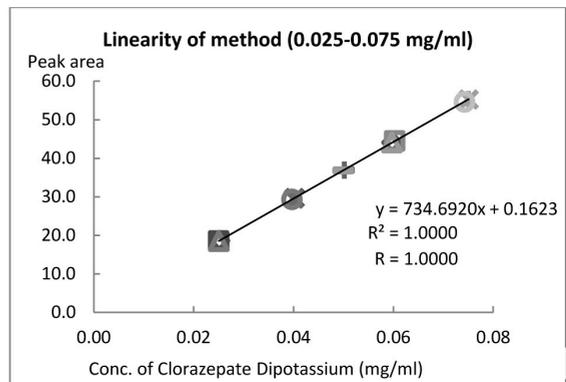
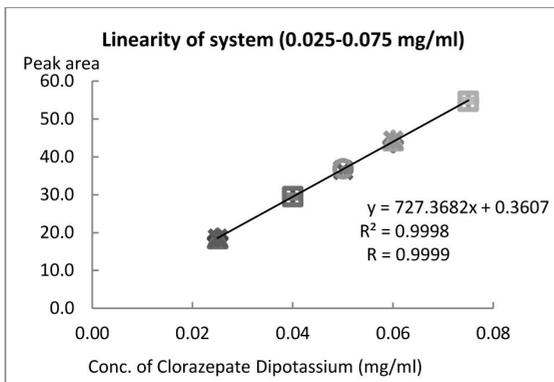
Test	Acceptance Criteria	Result	Conclusion
<b>Specificity</b>	No interference	No interference	Pass
<b>Precision</b>			
- Repeatability	% RSD (n = 6) ≤ 5.3%	2.8%	Pass
- Intermediate precision (Different analysts and Different days)	% RSD (n = 12) ≤ 5.3%	2.8%	Pass
<b>Accuracy</b>			
- Accuracy (0.2-5.0%) (0.024-0.60 µg/ml)	The mean of %Recovery = 80-110%	100-110%	Pass
- Accuracy (20-175%) (2.4-21.0 µg/ml)	The mean of %Recovery = 90-107%	100-101%	Pass
<b>Linearity</b>			
- Linearity of system (0.1-175%) (0.012-21.0 µg/ml)	R = 0.995-1.000	1.000	Pass
- Linearity of method (0.2-175%) (0.024-21.0 µg/ml)	R = 0.995-1.000	1.000	Pass
<b>Range</b>		0.3-175% (0.036-21.0 µg/ml)	Pass
<b>LOQ (0.3%) (0.036 µg/ml)</b>			
- Signal-to-noise ratio	Signal-to-noise ratio ≥ 10	34	Pass
- Precision	%RSD (n = 10) ≤ 7.3%	3.0%	Pass
- Accuracy	The mean of %Recovery = 80-110%	105%	Pass
<b>Filter effect (0.45 µm PVDF)</b>			
- Standard solution	%Difference ≤ 2%	0%	Pass
<b>Filter effect (0.45 µm Nylon)</b>			
- Standard solution	%Difference ≤ 2%	0%	Pass
<b>Stability at 25 °C for 72 hours</b>			
- Standard solution	%Difference ≤ 2%	-2%	Pass
<b>Stability at 2-8 °C for 72 hours</b>			
- Standard solution	%Difference ≤ 2%	1%	Pass

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี Related compounds-Method II

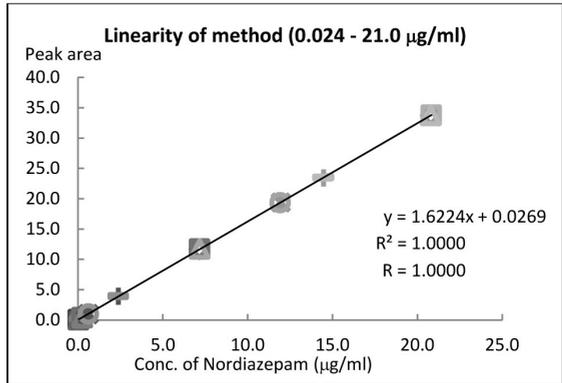
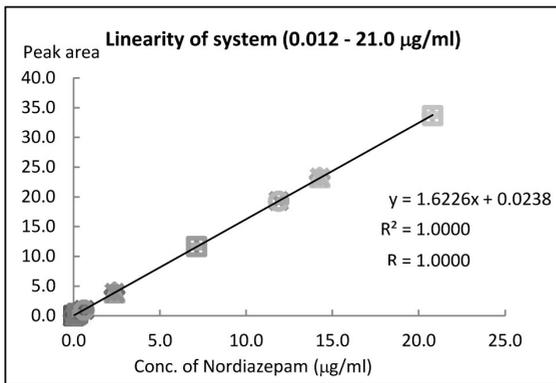
Test	Acceptance Criteria	Result	Conclusion
<b>Specificity</b>	No interference	No interference	Pass
<b>Precision</b>			
- Repeatability	% RSD (n = 6) $\leq$ 5.3%	0.1%	Pass
- Intermediate precision (Different analysts and Different days)	% RSD (n = 12) $\leq$ 5.3%	0.3%	Pass
<b>Accuracy</b>			
- Accuracy (0.6-60%) (0.045-4.5 $\mu$ g/ml)	The mean of %Recovery = 80-110%	96-103%	Pass
- Accuracy (100-160%) (7.5-12.0 $\mu$ g/ml)	The mean of %Recovery = 90-107%	100-101%	Pass
<b>Linearity</b>			
- Linearity of system (0.5-160%) (0.0375-12.0 $\mu$ g/ml)	R = 0.995-1.000	1.000	Pass
- Linearity of method (0.6-160%) (0.045-12.0 $\mu$ g/ml)	R = 0.995-1.000	1.000	Pass
<b>Range</b>		0.6-160% (0.045-12.0 $\mu$ g/ml)	Pass
<b>LOQ (0.6%) (0.045 <math>\mu</math>g/ml)</b>			
- Signal-to-noise ratio	Signal-to-noise ratio $\geq$ 10	11	Pass
- Precision	%RSD (n = 10) $\leq$ 11%	3%	Pass
- Accuracy	The mean of %Recovery = 80-110%	106%	Pass
<b>Filter effect (0.45 <math>\mu</math>m PVDF)</b>			
- Standard solution	%Difference $\leq$ 2%	0%	Pass
- Sample solution	%Difference $\leq$ 2%	0%	Pass
<b>Filter effect (0.45 <math>\mu</math>m Nylon)</b>			
- Standard solution	%Difference $\leq$ 2%	0%	Pass
- Sample solution	%Difference $\leq$ 2%	0%	Pass
<b>Stability at 25°C for 72 hours</b>			
- Standard solution	%Difference $\leq$ 2%	-1%	Pass
- Sample solution	%Difference $\leq$ 2%	1%	Pass
<b>Stability at 2-8°C for 72 hours</b>			
- Standard solution	%Difference $\leq$ 2%	-1%	Pass
- Sample solution	%Difference $\leq$ 2%	0%	Pass

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีการละลายของตัวยา (Dissolution)

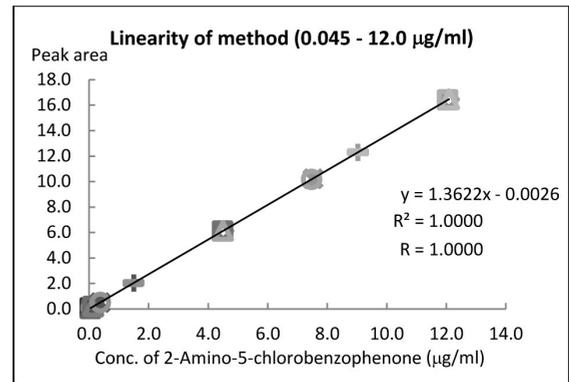
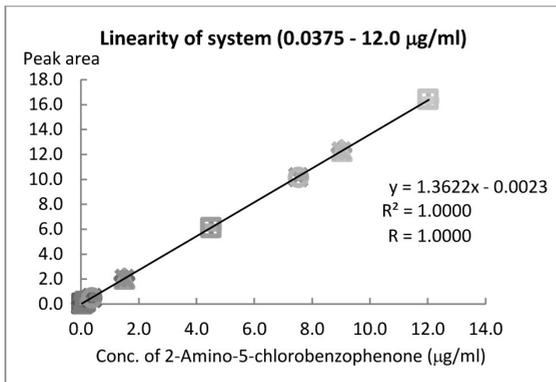
Test	Acceptance Criteria	Result	Conclusion
<b>Specificity</b>	No interference	No interference	Pass
<b>Precision</b>			
- Repeatability	% RSD (n = 6) ≤ 2.0%	1.0%	Pass
- Intermediate precision (Different analysts and Different days)	% RSD (n = 12) ≤ 2.0%	0.9%	Pass
<b>Accuracy (50-150%) (0.0028-0.0083 mg/ml)</b>	The mean of %Recovery = 98-102%	99-101%	Pass
<b>Linearity</b>			
- Linearity of system (50-150%) (0.0028-0.0083 mg/ml)	R = 0.995-1.000	1.000	Pass
- Linearity of method (50-150%) (0.0028-0.0083 mg/ml)	R = 0.995-1.000	1.000	Pass
<b>Range</b>		50-150% (0.0028-0.0083 mg/ml)	Pass
<b>Filter effect (10 µm UHMWPE and 0.45 µm PVDF)</b>			
- Standard solution	%Difference ≤ 2%	0%	Pass
- Sample solution	%Difference ≤ 2%	-1%	Pass
<b>Stability at 25°C for 5 hours</b>			
- Standard solution	%Difference ≤ 2%	-2%	Pass



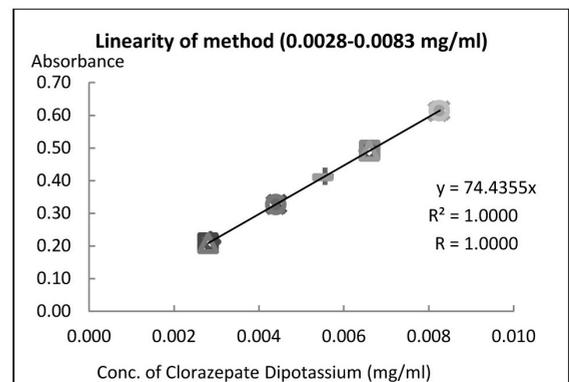
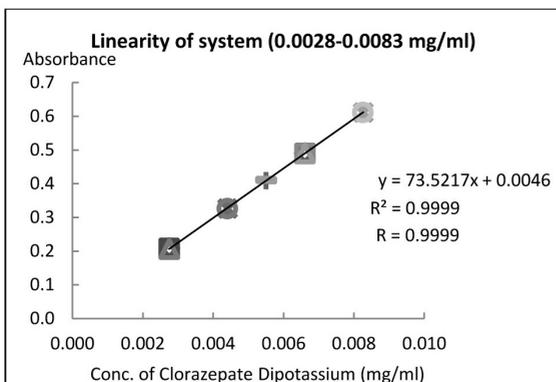
รูปที่ 5 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง peak area และความเข้มข้นของ Clorazepate Dipotassium ของวิธีตรวจเอกลักษณ์ (Identification) หาปริมาณตัวยาสำคัญ (Assay) และความสม่ำเสมอของตัวยาต่อแคปซูล (Uniformity of dosage units, Content uniformity)



รูปที่ 6 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง peak area และความเข้มข้นของ Nordiazepam ของวิธี Related compounds-Method I



รูปที่ 7 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง peak area และความเข้มข้นของ 2-Amino-5-chlorobenzophenone ของวิธี Related compounds-Method II



รูปที่ 8 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง absorbance และความเข้มข้นของ Clorazepate Dipotassium ของวิธีการละลายของตัวยา (Dissolution)

เมื่อนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ขนาดความแรง 5 มิลลิกรัม จำนวน 18 ตัวอย่าง จากแหล่งผลิต 3 แห่ง มาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ในหัวข้อการตรวจเอกลักษณ์ หาปริมาณตัวยาสำคัญ ปริมาณ related compounds ความสม่ำเสมอของตัวยาคู่แคปซูล และการละลายของตัวยา พบว่า วิธีวิเคราะห์นี้สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์คุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ โดยพบว่าตัวอย่างผ่านมาตรฐานทุกหัวข้อจำนวน 16 ตัวอย่าง (ร้อยละ 89) เมื่อพิจารณาตามหัวข้อที่วิเคราะห์พบว่า ปริมาณตัวยาสำคัญ ปริมาณ Related compounds-Method II และการละลายของตัวยา เข้ามาตรฐานทุกตัวอย่าง ส่วนปริมาณ Related compounds-Method I พบตัวอย่างผิดมาตรฐาน จำนวน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 6) และหัวข้อความสม่ำเสมอของตัวยาคู่แคปซูล พบตัวอย่างผิดมาตรฐาน จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 11) (ดังตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบวิธีวิเคราะห์กับตัวอย่างผลิตภัณฑ์

ผลการวิเคราะห์	วิธีวิเคราะห์				
	ปริมาณตัวยาสำคัญ (18 ตัวอย่าง)	ปริมาณ Related compounds-Method I (18 ตัวอย่าง)	ปริมาณ Related compounds-Method II (18 ตัวอย่าง)	ความสม่ำเสมอของตัวยา (18 ตัวอย่าง)	การละลายของตัวยา (18 ตัวอย่าง)
เข้ามาตรฐาน	18 (100%)	17 (94%)	18 (100%)	16 (89%)	18 (100%)
ผิดมาตรฐาน	0 (0%)	1 (6%)	0 (0%)	2 (11%)	0 (0%)

## บทสรุป

จากการศึกษาพบว่า วิธีวิเคราะห์นี้มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพยาแคปซูลคลอราซีเพท ไดโพรแทสเซียมได้

## เอกสารอ้างอิง

1. อรพรรณ มาตังคสมบัติ, ยาลดอาการวิตกกังวล, เกสซ์วิทยา เล่ม 1, ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2540, พิมพ์ครั้งที่ 2, กรุงเทพมหานคร: บริษัท นิวไทยมิตรการพิมพ์ (1996) จำกัด. หน้า 114-119.
2. ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2561. (2561, 19 มกราคม). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 135 ตอนพิเศษ 55 ง. ภาคผนวก 1 รายการยาในบัญชียาสำหรับโรงพยาบาลและสถานบริการสาธารณสุขตามบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2561. หน้า 22.
3. The United States Pharmacopeia USP41, The National Formulary, 36. 2018. The United States Pharmacopeia Convention, Inc.; Rockville, USA. หน้า 1038.
4. The Japanese Pharmacopeia JP17. 2016. The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. หน้า 1869.
5. สมศักดิ์ สุนทรพาณิชย์. SOP No. 2213003 Revision no. 1 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โครมาโตกราฟี (Method Validation of Chromatographic Methods). 2015. สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. หน้า 1-21.

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original Article

การศึกษาคุณภาพของยาแคปซูลขิงที่จำหน่ายในประเทศไทย  
Study of the quality of ginger capsules available in Thailand

---

นางสาวสาตินี ธีระนอง\*

นางสาวประภาพรธรรม สุขพรรณณ์\*

นางสาวอัญญา สุพันธ์วิชัย\*

นางสาวจิราภุช แจ่มทวีกุล\*

**Abstract** Ginger capsules are an herbal product which has been widely used in clinical trials in recent ten years for treatment of a variety of symptoms such as dysmenorrhea, nausea and vomiting caused by chemotherapy. In fiscal year 2016, a study of the quality of ginger capsules available in Thailand was carried out by the Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences. Twelve samples were randomly collected from drug stores and government hospitals which joined this study. All the samples were analyzed for identification, weight variation, contents of active ingredients including gingerols, gingerdione, and shogaols, content of volatile oil, and dissolution regarding the United States Pharmacopeia (USP), 38<sup>th</sup> edition. Moreover, the method of determination for the contents of active ingredients was verified before testing. In addition, the heavy metals and microbial contaminations were analyzed. As the results, 66.67% of the ginger capsules did not meet the standard requirements for identification, weight variation, content of volatile oil, dissolution, and heavy metals and microbial contaminations.

**Keywords:** Ginger capsules, Study of the quality

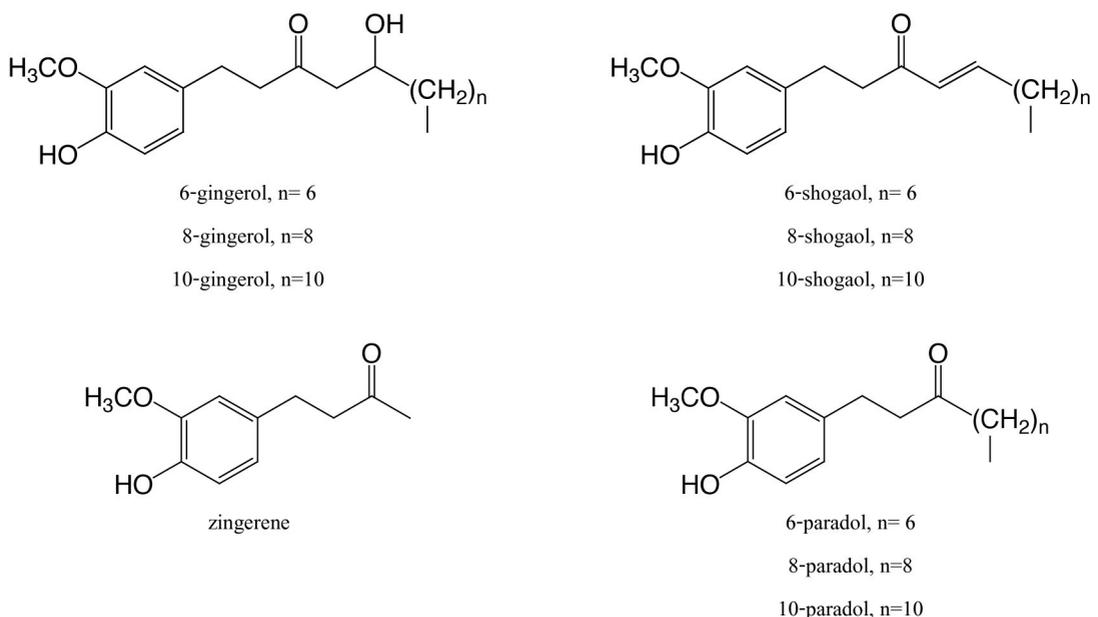
**บทคัดย่อ** ยาแคปซูลจึงเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีการใช้อย่างแพร่หลายสำหรับการทดลองทางคลินิกในช่วงสิบปีที่ผ่านมา โดยมีการนำมาใช้รักษาอาการต่างๆ เช่น อาการปวดประจำเดือน อาการคลื่นไส้ อาเจียนจากการใช้ยาเคมีบำบัด ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ทำการศึกษาคุณภาพยาแคปซูลจึงที่มีจำหน่ายในประเทศไทย โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างยาแคปซูลจึง จำนวน 12 ตัวอย่าง จากร้านยาและโรงพยาบาลที่เข้าร่วมการศึกษานี้ ตัวอย่างทั้งหมดได้นำมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพตามวิธีและเกณฑ์มาตรฐานของตำราฟาร์มาโคเปียของสหรัฐอเมริกา ฉบับที่ 38 ในหัวข้อ การตรวจเอกลักษณ์ การหาความแตกต่างจากน้ำหนักร้อยละ การหาปริมาณสารสำคัญ gingerols, gingerdione, และ shogaols การหาปริมาณน้ำมันระเหยง่าย และการทดสอบการละลาย ทั้งนี้วิธีการหาปริมาณสารสำคัญได้มีการทวนสอบความถูกต้องของวิธีก่อนการทดสอบ นอกจากนี้ยังมีการตรวจหาการปนเปื้อนของโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ ผลการศึกษาพบว่ามียาแคปซูลจึงที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานสูงถึงร้อยละ 66.67 ในหัวข้อ การตรวจเอกลักษณ์ การหาความแตกต่างจากน้ำหนักร้อยละ การหาปริมาณน้ำมันระเหยง่าย การทดสอบการละลาย และการปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์

**กุญแจคำ:** ยาแคปซูลจึง, การศึกษาคุณภาพ

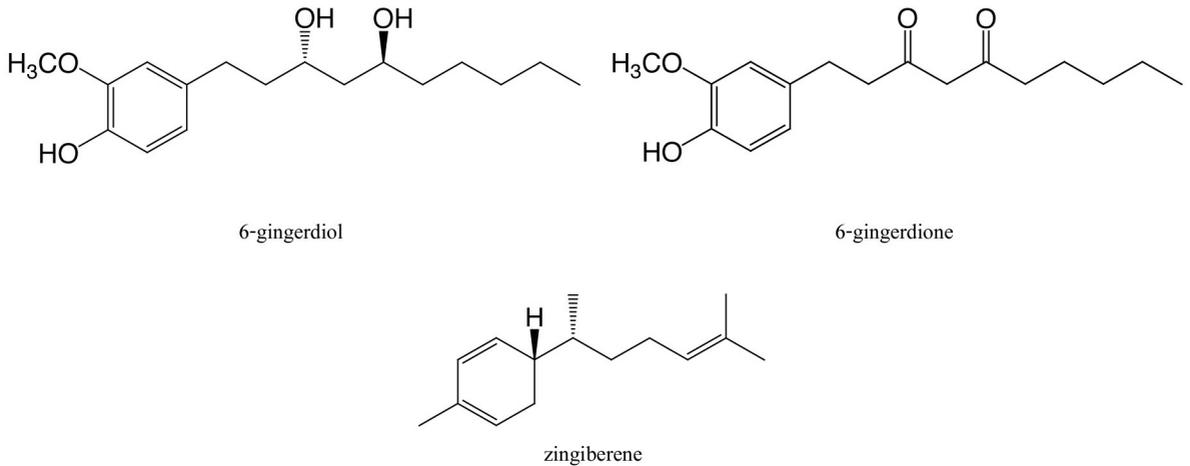
## บทนำ

จึงถูกนำมาใช้เป็นยาแผนโบราณมานานในหลายประเทศ เช่น จีน ญี่ปุ่น อินเดีย โดยมีข้อบ่งใช้ในการรักษาอาการอาหารไม่ย่อย ท้องอืด ท้องผูก คลื่นไส้ ปวดศีรษะ ข้ออักเสบ หัวใจ และไอ (1) ในประเทศไทยจึงจัดอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ กลุ่มยาพัฒนาจากสมุนไพร ซึ่งส่วนที่ใช้คือเหง้า ใช้บรรเทาอาการท้องอืด แน่นจุกเสียด คลื่นไส้ เมารถ เมาเรือ และป้องกันอาการคลื่นไส้หลังผ่าตัด โดยเป็นยาที่อยู่ในรูปแบบแคปซูล ชาซง และผงแห้ง (2)

สารสำคัญที่ได้จากเหง้าจึงสามารถแยกเป็น 2 ชนิดใหญ่ ๆ ได้แก่ oleoresins ซึ่งได้จากการสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ และน้ำมันระเหยง่าย (volatile oil) ซึ่งได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำ โดยสารสำคัญ oleoresins ที่พบมีหลายกลุ่ม เช่น gingerols, gingerdiols, gingerdiones, shogaols, paradols, และ zingerone ซึ่งพบสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ 6-gingerol ส่วนในน้ำมันระเหยง่ายพบสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ zingiberene (1) ดังแสดงในรูปที่ 1



**รูปที่ 1** โครงสร้างสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของเหง้าจึง



รูปที่ 1 โครงสร้างสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของเหง้าขิง (ต่อ)

มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารกลุ่ม oleoresins ในระดับ *in vitro* และ *in vivo* เช่น ฤทธิ์การต้านการอักเสบของ 6-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol, และ 8-shogaol (3, 4) ฤทธิ์ในการต้านเบาหวานโดยการเพิ่ม glucose uptake ของ 6-gingerol และ 8-gingerol (5) และการเพิ่มปริมาณอินซูลินในกระแสเลือดของ 6-gingerol (6) ฤทธิ์การต้านความอ้วนโดยการลดการสะสม oil droplet ของ 6-gingerol (7) ฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดของ 6-gingerol และ 6-shogaol (8) ฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Helicobacter pylori* ของ 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, และ 6-shogaol (9) ฤทธิ์ในการต้านอาการคลื่นไส้อาเจียนโดยการยับยั้ง serotonin receptor ของ 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, และ 6-shogaol (10)

นอกจากรายงานการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในระดับ *in vitro* และ *in vivo* แล้ว ยังพบรายงานการศึกษาประสิทธิภาพของขิงในระดับคลินิกที่สอดคล้องกัน เช่น การลดอาการปวดประจำเดือน (11) การลดดัชนีมวลกาย การเพิ่มปริมาณอินซูลิน (12) การเพิ่มปริมาณน้ำนมหลังคลอดบุตร (13) ฤทธิ์ในการลดอาการคลื่นไส้อาเจียนจากยาเคมีบำบัด (14) โดยรูปแบบยาที่ใช้ในการศึกษาเหล่านี้คือยาแคปซูลขิง ซึ่งเป็นการนำเหง้าขิงแห้ง มาบดละเอียด แล้วบรรจุในแคปซูลเจลาตินชนิดแข็ง

แม้จะพบว่าการใช้ยาแคปซูลขิงมีประสิทธิภาพที่ดีในการรักษาหลายอาการ แต่ประสิทธิภาพในการรักษาเหล่านั้นไม่ได้เกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอทุกครั้งที่ทำกรทดลอง ตัวอย่างเช่นการศึกษาฤทธิ์ในการลดอาการคลื่นไส้อาเจียนในผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัด จากการศึกษาของ Manusirivithaya และคณะในปี ค.ศ. 2004 รายงานว่ายาแคปซูลขิงไม่มีผลช่วยลดอาการคลื่นไส้อาเจียนหลังได้รับยาเคมีบำบัดใน acute phase แต่ช่วยลดอาการคลื่นไส้อาเจียนได้ใน delayed phase (14) ต่อมาในปี ค.ศ. 2009 Zick และคณะรายงานการศึกษายาแคปซูลขิงว่าไม่มีประสิทธิภาพในการช่วยลดอาการคลื่นไส้อาเจียนในผู้ป่วยทั้งใน acute phase และ delayed phase (15) จากผลการทดลองที่ขัดแย้งกันดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงได้ตั้งข้อสังเกตเกี่ยวกับคุณภาพของยาแคปซูลขิง เนื่องจากพบว่าในการทดลองเหล่านั้นไม่ได้มีการควบคุมคุณภาพของยาแคปซูลขิงก่อนนำมาทดลอง ทำให้ไม่ทราบปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ผู้ป่วยรับประทานในแต่ละครั้ง เมื่อปริมาณยาที่ได้รับไม่เท่ากัน จึงอาจทำให้ประสิทธิภาพในการรักษาต่างกัน เป็นที่มาให้ทางคณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาคุณภาพของยาแคปซูลขิงที่มีจำหน่ายในประเทศไทย

จากรายงานการศึกษาคุณภาพยาแคปซูลจิงในประเทศไทยในอดีตพบว่ามีการศึกษาเฉพาะปริมาณน้ำมันระเหยง่าย และส่วนประกอบในน้ำมันระเหยง่าย (16) แต่ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาหาปริมาณสารกลุ่ม oleoresins ซึ่งเป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์ และยังไม่มีรายงานการศึกษาคุณภาพด้านอื่นๆของยาแคปซูลจิงตามวิธีและเกณฑ์มาตรฐานของตำราฟาร์มาโคเปียของสหรัฐอเมริกา ฉบับที่ 38 ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้จัดทำการศึกษาคุณภาพยาแคปซูลจิงที่มีจำหน่ายในประเทศไทย เพื่อชี้ให้เห็นถึงคุณภาพยาแคปซูลจิงที่มีจำหน่ายในประเทศไทย ซึ่งจะนำไปสู่การดำเนินการปรับปรุงกระบวนการผลิตของผู้ผลิตเพื่อให้ได้ยาแคปซูลจิงที่มีคุณภาพตามมาตรฐานสากล ที่จะสามารถสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ

## วัสดุและวิธีการ

### 1. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1.1 TLC silica gel 60G F254 25, Glass Plates 20 x 20 cm (Merck)
- 1.2 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (Waters รุ่น 2695), Photo Diode Array Detector (Waters รุ่น 2996) และ software (Empower 1)
- 1.3 เครื่องชั่ง (Mettler Toledo รุ่น AT261 และ รุ่น MX5)
- 1.4 เครื่องกรองน้ำ (Millipore รุ่น Milli-Q)
- 1.5 Column C18, 4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m (Shisedo รุ่น Capcell Pak C18 MG-II)
- 1.6 Membrane filter ชนิด Nylon 0.45  $\mu$ m (National Scientific)
- 1.7 Syringe filter ชนิด Nylon 0.45  $\mu$ m (Vertipure)
- 1.8 เครื่อง Dissolution (Vankel VK 7000)
- 1.9 Oil bath (WiseBath model WHB-11)
- 1.10 เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (PerkinElmer Analyst 800)
- 1.11 กระดาษกรอง Whatman® No. 1

### 2. สารเคมี

- 2.1 มาตรฐานที่ใช้ในการตรวจเอกลักษณ์ และหาปริมาณสารสำคัญ ได้แก่ USP Capsaicin RS (Lot No. I0L046) ความบริสุทธิ์ร้อยละ 94.1, USP Ginger Constituent Mixture RS (Lot No. F0E129), USP Powdered Ginger RS (Lot No. F04421)
- 2.2 มาตรฐานที่ใช้ในการหา Relative Retention Time (RRT) ได้แก่ 6-gingerol (Lot No. PRF7012805), 8-gingerol (Lot No. PRF7012806), 10-gingerol (Lot No. 15010602), 6-shogaol (Lot No. 16011504), 8-shogaol (Lot No. PRF7031503) ของยี่ห้อ Chengdu Biopurify Phytochemicals
- 2.3 สารเคมี HPLC grade ได้แก่ Acetonitrile ยี่ห้อ Macron Fine Chemicals, USA; Methanol ยี่ห้อ Macron Fine Chemicals, USA; Ethanol ยี่ห้อ Carlo Erba, Switzerland
- 2.4 สารเคมี analytical grade ได้แก่ Ether ยี่ห้อ Lab Supplies, UK; Hexane ยี่ห้อ Merck, Germany; Phosphoric acid ยี่ห้อ Merck, Germany; Xylene ยี่ห้อ Baker Chemical, UK; Hydrochloric acid ยี่ห้อ Carlo Erba, Switzerland; Sulfuric acid ยี่ห้อ Carlo Erba, Switzerland; Nitric acid ยี่ห้อ Carlo Erba, Switzerland
- 2.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ ยี่ห้อ Scharlau, Spain ได้แก่ Neutralizing Fluid, Levine Eosin-Methylene Blue Agar; ยี่ห้อ Becton Dickinson and Company, USA ได้แก่ Tryptic Soy Agar, Sabouraud Dextrose Agar with Antibiotics, Tryptic Soy Broth, TAT Broth Base, MacConkey Agar, Brilliant Green Agar, Xylose-Lysine-Deoxycholate Agar, Bismuth

Sulfite Agar, Columbia Agar, Reinforced Medium for Clostridia; ยี่ห้อ Merck, Germany ได้แก่ Enterobacteria Enrichment Broth-Mossel, Crytal Violet-Neutral Red-Bile-Dextrose Agar, MacConkey Broth, Tetrathionate Brilliant Green Broth, Rappaport Vassiliadis Broth

### 3. ตัวอย่างที่ใช้

ตัวอย่างยาแคปซูลจิงที่สุ่มเก็บในประเทศไทย จากร้านยาแผนปัจจุบัน ร้านยาที่จำหน่ายผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่ตั้งอยู่ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล และโรงพยาบาลของรัฐ รวม 12 ตัวอย่าง ซึ่งมาจากผู้ผลิต 7 ราย โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ยาแคปซูลจิงที่ใช้ในการศึกษาคุณภาพ

ตัวอย่าง	ผู้ผลิต	รุ่นการผลิต	ชื่อตัวอย่าง	บรรจุภัณฑ์ (capsules)	ปริมาณผงยา (mg/capsule)	วันผลิต	วันหมดอายุ
1	A	I	A(I)	ขวด (100)	500	13 ก.พ. 58	13 ก.พ. 61
2	B	I	B(I)	บลิสเตอร์ (1×10×10)	500	19 พ.ค. 58	19 พ.ค. 61
3	B	II	B(II)	บลิสเตอร์ (1×10×10)	500	1 ต.ค. 57	1 ต.ค. 60
4	C	I	C(I)	ขวด (100)	500	15 ม.ค. 58	15 ม.ค. 63
5	D	I	D(I)	ขวด (70)	500	12 มิ.ย. 58	12 มิ.ย. 60
6	D	II	D(II)	ขวด (70)	500	14 พ.ย. 58	14 พ.ย. 60
7	D	III	D(III)	ขวด (70)	500	10 ธ.ค. 58	10 ธ.ค. 60
8	E	I	E(I)	ขวด (100)	500	13 ก.พ. 58	13 ก.พ. 62
9	F	I	F(I)	ขวด (60)	500	18 พ.ค. 58	18 พ.ค. 60
10	F	II	F(II)	ขวด (60)	500	12 ก.พ. 59	12 ก.พ. 61
11	F	III	F(III)	ขวด (60)	500	10 มี.ค. 59	10 มี.ค. 61
12	G	I	G(I)	ขวด (100)	500	29 ม.ค. 59	ไม่ระบุ

หมายเหตุ เลือกตัวอย่าง D(III) ในการทวนสอบความถูกต้องของวิธีในการหาปริมาณสารสำคัญ ได้แก่ 6-gingerol, 8-gingerol, 6-shogaol, 6-gingerdione, 10-gingerol, และ 8-shogaol

### 4. วิธีการ

#### 4.1 การตรวจเอกลักษณ์ (Identification) (17)

ตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดผิบบาง (Thin-Layer Chromatography, TLC)

4.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน A โดยละลาย USP Powder Ginger RS จำนวน 500 มิลลิกรัม ด้วย methanol จำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

4.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน B โดยละลาย USP Ginger Constituent Mixture RS ซึ่งเป็นสารผสมที่ประกอบด้วย 6-gingerol และ 6-shogaol จำนวน 0.6 มิลลิกรัม ด้วยสารละลาย USP Capsaicin RS ความเข้มข้น 0.1

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิกรัม โดยในสารละลายมาตรฐาน B จะประกอบด้วย 6-gingerol, 6-shogaol, และ capsaicin

4.1.3 เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยละลายตัวอย่าง จำนวน 200 มิลลิกรัม ด้วย methanol จำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

4.1.4 เตรียมสารละลายตัวพาซึ่งประกอบด้วย ether และ hexane ในอัตราส่วน 7:3

4.1.5 นำสารละลายมาตรฐาน A สารละลายมาตรฐาน B และสารละลายตัวอย่าง จำนวน 20, 40, และ 20 ไมโครลิตร ตามลำดับหยดลงบนแผ่น TLC แล้วนำไปวางในถังโครมาโตกราฟี ปล่อยให้สารละลายตัวพาเคลื่อนที่ 15 เซนติเมตรจากจุดที่หยดสารละลายที่ต้องการทดสอบ จากนั้นนำแผ่น TLC ไปฝั่งให้แห้งในตู้ดูดควัน และตรวจสอบแผ่น TLC ภายใต้อัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

4.1.6 นำแผ่น TLC มาพ่นด้วยสารละลาย 10% sulfuric acid ใน 95% ethanol จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4.2 การหาความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย (Weight variation) (17)

4.2.1 ชั่งน้ำหนักยาแต่ละแคปซูลจำนวน 20 แคปซูล แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของน้ำหนักแต่ละแคปซูลเทียบกับค่าเฉลี่ยต้องอยู่ในช่วง 90-110% (stage I)

4.2.2 หากมีแคปซูลใดอยู่นอกช่วงที่กำหนด ให้นำน้ำหนักของผงยาในแต่ละแคปซูลจำนวน 20 แคปซูล แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของน้ำหนักผงยาในแต่ละแคปซูลเทียบกับค่าเฉลี่ย ต้องไม่มากกว่า 2 แคปซูลที่มีความแตกต่างเกินช่วง 90-125% (stage II)

4.2.3 หากมีมากกว่า 2 แคปซูลที่มีความแตกต่างเกินช่วง 10-25% แต่ไม่ถึง 6 แคปซูล ให้นำน้ำหนักของผงยาในแต่ละแคปซูลเพิ่มอีก 40 แคปซูล แล้วหาค่าเฉลี่ย จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของน้ำหนักผงยาในแต่ละแคปซูลเทียบกับค่าเฉลี่ยของน้ำหนักผงยา 60 แคปซูล ต้องมีไม่มากกว่า 6 จาก 60 แคปซูลที่มีความแตกต่างเกิน 10% และไม่มีแคปซูลใดที่มีความแตกต่างเกิน 25% (stage III)

4.3 การหาปริมาณสารสำคัญ (Contents of active ingredients) และการทวนสอบวิธี (Verification method) ในการหาปริมาณสารสำคัญ (17)

4.3.1 การหาปริมาณ gingerols, gingerdione, และ shogaols ตามหัวข้อความแรง (Strength) ในตำราฟาร์มาโคเปียของสหรัฐอเมริกา ฉบับที่ 38 โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

4.3.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน

4.3.1.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน USP Capsaicin RS ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน methanol

4.3.1.1.2 เตรียมสารละลายสำหรับทดสอบ system suitability โดยละลาย USP Ginger Constituent Mixture RS ด้วยสารละลายมาตรฐาน capsaicin จากข้อ 4.3.1.1.1 จำนวน 1 มิลลิลิตร

4.3.1.2 เตรียมสารละลายตัวอย่าง

4.3.1.2.1 แกะผงยาออกจากแคปซูลจิง จำนวน 20 แคปซูล นำผงยามาร้อนผ่านร่ง mesh no. 80

4.3.1.2.2 ชั่งผงยาที่ผ่านร่งแล้ว จำนวน 2 กรัม ใส่ Glass-stoppered conical flask ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเปิด 95% ethanol จำนวน 50 มิลลิลิตรใส่ใน flask เขย่าทุก 30 นาทีเป็นเวลา 8 ชั่วโมง และตั้งทิ้งไว้โดยไม่เขย่าอีก 16 ชั่วโมง

4.3.1.2.3 กรองสารละลายตัวอย่างด้วยหัวกรอง nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนฉีดเข้าเครื่อง

## 4.3.1.3 สภาวะของเครื่อง HPLC

- คอลัมน์: Capcell Pak C18 MG-II (Shisedo) ขนาด 4.6×250 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร
- อัตราการไหล: 1 มิลลิลิตรต่อนาที
- อุณหภูมิของคอลัมน์: 30 องศาเซลเซียส
- ปริมาตรที่ฉีด: 25 ไมโครลิตร
- เครื่องตรวจวัด: Diode array ที่ความยาวคลื่น 282 นาโนเมตร
- สารละลายตัวพา: สารละลาย A ประกอบด้วย acetonitrile, 0.01% phosphoric acid ใน water, methanol ในอัตราส่วน 55:44:1 สารละลาย B ประกอบด้วย acetonitrile โดยสัดส่วน gradient ที่ใช้แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สัดส่วนของ gradient ที่ใช้แยกสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง

เวลา (นาที)	สารละลาย A	สารละลาย B
0	100	0
75	100	0
77	0	100
87	0	100
89	100	0
110	100	0

## 4.3.1.4 หาปริมาณสารสำคัญ

4.3.1.4.1 ทำ system suitability โดยฉีดสารละลาย system suitability 1 เข้ม และฉีดสารละลายมาตรฐานจำนวน 6 เข้ม ซึ่งค่าต่างๆ ต้องอยู่ในเกณฑ์ดังนี้

- resolution ระหว่าง 6-gingerol กับ capsaicin  $\geq 3$
- resolution ระหว่าง capsaicin กับ 6-shogaol  $\geq 10$
- tailing factors ของพีคของ 6-gingerol, capsaicin, และ 6-shogaol  $\leq 2$
- % RSD ของ capsaicin หลังฉีด standard solution 6 เข้ม  $\leq 2.5\%$

4.3.1.4.2 วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ โดยเตรียมสารละลายแต่ละตัวอย่าง 2 ครั้ง (A กับ B) แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

## 4.3.1.5 กำหนดปริมาณสารสำคัญ

4.3.1.5.1 กำหนดปริมาณรวมของ gingerols, gingerdione, และ shogaols ในรูปมิลลิกรัมต่อแคปซูล โดยพิจารณาจากค่า Relative Retention Time (RRT) คือ 6-gingerol = 0.8, 8-gingerol = 1.6, 6-shogaol = 2.0, 6-gingerdione = 2.9, 10-gingerol = 3.9, และ 8-shogaol = 4.9 โดยเทียบ retention time กับ capsaicin (RRT = 1.0) เพื่อระบุตำแหน่ง และใช้ค่าพื้นที่ใต้พีค นำไปคำนวณปริมาณรวมของสารสำคัญ ดังสมการ

$$\text{Result} = (r_T/r_S) \times C_S \times (V/W_U) \times A_{wc}$$

$r_T$  = ผลรวมของพื้นที่ใต้พีคของ gingerols, gingerdione, และ shogaols ในสารละลายตัวอย่าง,  $r_S$  = พื้นที่ใต้พีคของ capsaicin ในสารละลายมาตรฐาน,  $C_S$  = ความเข้มข้นของ capsaicin ในสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร),

$V$  = ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร),  $W_U$  = น้ำหนักของตัวอย่าง (มิลลิกรัม),  $A_{wc}$  = น้ำหนักเฉลี่ยของปริมาณผงยาที่บรรจุในแคปซูล (มิลลิกรัม)

4.3.1.5.2 จำนวนปริมาณ 6-gingerol ( $G_0$ ) ในแต่ละแคปซูล ในหน่วยมิลลิกรัมต่อแคปซูล โดยใช้ค่าพื้นที่ใต้พีคของ 6-gingerol ที่มีค่า  $RRT = 0.8$  ซึ่งจำนวนปริมาณ 6-gingerol ดังสมการ

$$G_0 = (r_U/r_S) \times (C_S/W) \times V \times A$$

$r_U$  = พื้นที่ใต้พีคของ 6-gingerol ในสารละลายตัวอย่าง,  $r_S$  = พื้นที่ใต้พีคของ capsaicin ในสารละลายมาตรฐาน,  $C_S$  = ความเข้มข้นของ capsaicin ในสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร),  $W$  = น้ำหนักของตัวอย่าง (มิลลิกรัม),  $V$  = ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร),  $A$  = น้ำหนักเฉลี่ยของปริมาณผงยาที่บรรจุในแคปซูล (มิลลิกรัม)

4.3.1.5.3 เกณฑ์การยอมรับ คือ ปริมาณรวมของ gingerols, gingerdione, และ shogaols ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 90 และไม่เกินร้อยละ 110 ของปริมาณที่ระบุไว้ในฉลาก

#### 4.3.2 การทวนสอบวิธีหาปริมาณสารสำคัญ

ทวนสอบวิธีหาปริมาณสารสำคัญก่อนหาปริมาณสารสำคัญในข้อ 4.3.1 โดยใช้สถานะของเครื่อง HPLC ตามข้อ 4.3.1.3 และเลือกตัวอย่าง D(III) ในการทวนสอบความถูกต้องของวิธี

##### 4.3.2.1 ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี

ทำโดยการหาค่า Relative Retention Time (RRT) ของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง โดยนำ Retention Time (RT) ของสารแต่ละตัวมาเทียบกับ RT ของ capsaicin โดยสารแต่ละตัวมีค่า RRT ดังนี้ Capsaicin = 1, 6-gingerol = 0.8, 8-gingerol = 1.6, 6-shogaol = 2.0, 6-gingerdione = 2.9, 10-gingerol = 3.9, และ 8-shogaol = 4.9

##### 4.3.2.2 ทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคและระดับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน capsaicin ที่ความเข้มข้น 0.02, 0.10, 0.20, 0.60, และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient:  $r$ ) ต้องไม่น้อยกว่า 0.9995 และ ค่า Y-intercept ต้องไม่มากกว่าร้อยละ 0.2

##### 4.3.2.3 ทดสอบความเที่ยง

###### 4.3.2.3.1 repeatability

เตรียมสารละลายตัวอย่าง จำนวน 6 ตัวอย่าง แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ โดยนำค่าพื้นที่ใต้พีคของสารสำคัญในสารละลายตัวอย่างเทียบกับสารละลายมาตรฐาน และนำค่าปริมาณสารสำคัญทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ย (mean) จำนวน %RSD โดย %RSD ที่ได้ต้องมีค่าไม่มากกว่าร้อยละ 2

###### 4.3.2.3.2 intermediate precision

ทำการทดสอบเหมือนกับ repeatability แต่เปลี่ยนนักวิเคราะห์ และทำการวิเคราะห์คนละวัน %RSD ต้องมีค่าไม่มากกว่าร้อยละ 2

#### 4.4 การทดสอบการละลาย (Dissolution) (17)

ใช้วิธีหาปริมาณเช่นเดียวกับการหาปริมาณสารสำคัญ 6-gingerol

##### 4.4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน

4.4.1.1 ชั่งสารมาตรฐาน USP Capsaicin RS จำนวน 1 มิลลิกรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร ด้วย methanol ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

4.4.1.2 ปิ่ตสารละลายมาตรฐาน USP Capsaicin RS มา 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 20 มิลลิลิตร ด้วย 0.1 N hydrochloric acid

## 4.4.2 เตรียมสารละลายตัวอย่าง

4.4.2.1 คำนวณจำนวนแคปซูลที่ทำให้มีปริมาณ gingerols, gingerdione, และ shogaols รวม 20 มิลลิกรัม เพื่อใส่ในแต่ละ vessel ในการทดสอบการละลาย

4.4.2.2 ใช้ Apparatus II paddle และตัวทำละลาย คือ 0.1 N hydrochloric acid จำนวน 500 มิลลิกรัม

4.4.2.3 นำแคปซูลแต่ละแคปซูลใส่ในขวดทดสอบริง ใส่ลงไปในแต่ละ vessel แล้วไปปั่นที่ความเร็ว 75 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที

4.4.2.4 หลังครบกำหนดเวลา ให้เปิดสารละลายตัวอย่างขึ้นมา vessel ละ 4 มิลลิกรัม ใส่ลงใน centrifuge tube เดียวกัน แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที กรองสารละลายด้วยหัวกรองชนิด nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

4.4.3 สภาพของเครื่อง HPLC เหมือนกับการหาปริมาณสารสำคัญตามข้อ 4.3.1.3

4.4.4 เกณฑ์การยอมรับ คือ ปริมาณ 6-gingerol ละลายออกมาไม่น้อยกว่า 60% ในเวลา 60 นาที

## 4.5 การหาปริมาณน้ำมันระเหยง่าย (Content of volatile oil) (17)

4.5.1 แกะผงยาออกจากแคปซูลจึง นำผงยามาร้อนผ่านร่ง mesh no. 80

4.5.2 ชั่งผงยาที่ผ่านร่งแล้ว ปริมาณ 25 กรัม ใส่ในภาชนะก้นกลมขนาด 500 มิลลิกรัม

4.5.3 เติมน้ำ จำนวน 250 มิลลิกรัม ลงในภาชนะก้นกลม เขย่าเบาๆ นำมาประกอบเข้ากับอุปกรณ์สำหรับ กลั่นที่เติมน้ำลงใน graduate tube จนถึง standard line

4.5.4 เติมน้ำ xylene จำนวน 2.0 มิลลิกรัม แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 130-150 องศาเซลเซียส จนน้ำเริ่มเดือด

4.5.5 ปรับอัตราเร็วในการกลั่นที่ 3 หยดต่อนาที เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

4.5.6 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ไข่น้ำออกข้างๆ จนระดับของ xylene ลงไปอยู่ที่ขีด 0 อ่านปริมาตรของสารละลายผสม ของ xylene และน้ำมันระเหยง่ายที่ได้หักลบกับปริมาตรของ xylene ที่เติมลงไป

4.5.7 คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณน้ำมันระเหยง่ายจากน้ำหนักของผงยาที่ปราศจากความชื้น

4.5.8 เกณฑ์การยอมรับคือ น้ำมันระเหยง่ายไม่น้อยกว่าร้อยละ 1.4 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก

4.6 การตรวจหาการปนเปื้อนของสารหนู (As) ตะกั่ว (Pb) และแคดเมียม (Cd) (Heavy metals contamination) (18, 19)

ตรวจหาการปนเปื้อนของสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ใช้วิธี Atomic Absorption Spectrophotometry, Graphite Furnace

## 4.6.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน

4.6.1.1 สารละลายมาตรฐานสารหนู 50 ส่วนในพันล้านส่วน

4.6.1.2 สารละลายมาตรฐานตะกั่ว 50 ส่วนในพันล้านส่วน

4.6.1.3 สารละลายมาตรฐานแคดเมียม 2.5 ส่วนในพันล้านส่วน

## 4.6.2 เตรียมสารละลายตัวอย่าง

4.6.2.1 แกะผงยาออกจากแคปซูลจึง จำนวน 10 แคปซูล บดให้เข้ากัน

4.6.2.2 ชั่งผงยาปริมาณ 250 มิลลิกรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิกรัม เติมน้ำ 50% nitric acid จำนวน 2.5 มิลลิกรัม ปิดบีกเกอร์ด้วยกระดาษกานาฟิกา แล้วนำไปตั้งบนอ่างอ่างร้อนน้ำ เป็นเวลา 15 นาที

4.6.2.3 เติมน้ำ concentrated nitric acid จำนวน 5 มิลลิกรัม ลงในบีกเกอร์ข้อ 4.6.2.2 ปิดบีกเกอร์ด้วยกระดาษกานาฟิกา แล้วนำไปตั้งบนอ่างอ่างร้อนน้ำต่อ เป็นเวลา 60 นาที

4.6.2.4 ถ่ายสารละลายลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิกรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ Type I

4.6.2.5 กรองสารละลายโดยใช้กระดาษกรอง Whatman® No. 1

4.6.3 เตรียมสารละลาย blank โดยเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายตัวอย่าง แต่ไม่มีส่วนผสมของสารตัวอย่าง

4.6.4 วิธีการหาปริมาณสารหนู (As) ตะกั่ว (Pb) และแคดเมียม (Cd)

สร้างกราฟมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและระดับความเข้มข้นของสารหนูและตะกั่วที่ 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 80 ส่วนในพันล้านส่วน ระดับความเข้มข้นของแคดเมียมที่ 0.15, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 และ 4.0 ส่วนในพันล้านส่วน โดยตั้งระบบการทำงานของเครื่องให้เจือจางสารละลายมาตรฐานอัตโนมัติและกำหนดให้ค่าความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานอย่างน้อยเท่ากับ 0.995 แล้ววิเคราะห์หาปริมาณสารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม ในสารละลายตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยมีสภาวะการทำให้เกิดอะตอมดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สภาวะการทำให้เกิดอะตอมในการหาปริมาณ สารหนู (As) ตะกั่ว (Pb) และแคดเมียม (Cd) ด้วยเทคนิค Atomic Absorption Spectrophotometry

สภาวะ	สารหนู	ตะกั่ว	แคดเมียม
Wavelength (nm)	193.7	283.3	228.8
Pyrolysis temp (°C)	1200	500	500
Atomize temp (°C)	2100	1500	1500
Matrix modifiers	0.005 mg Palladium	0.003 mg Magnesium nitrate	0.003 mg Magnesium nitrate

4.6.5 เกณฑ์การยอมรับ คือปริมาณการปนเปื้อนสารหนูไม่เกิน 4 ส่วนในล้านส่วน ปริมาณการปนเปื้อนตะกั่วไม่เกิน 10 ส่วนในล้านส่วน และปริมาณการปนเปื้อนแคดเมียมไม่เกิน 0.3 ส่วนในล้านส่วน

4.7 การตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (Microbial contamination) (20)

4.7.1 เตรียมสารละลายตัวอย่าง

4.7.1.1 ชั่งตัวอย่าง 10.00±0.20 กรัม

4.7.1.2 เจือจางให้เป็น 10<sup>-1</sup> ถึง 10<sup>-5</sup> ด้วย Neutralizing Fluid

4.7.2 ตรวจปริมาณ Total Aerobic Microbial Count (TAMC)

4.7.2.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 1 มิลลิลิตร ไปเพาะเชื้อใน Tryptic Soy Agar จำนวน 2 plates ต่อหนึ่งความเข้มข้น

4.7.2.2 บ่มที่ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน

4.7.2.3 นับจำนวนโคโลนี แล้วคำนวณหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่าง 1 กรัม

4.7.3 ตรวจปริมาณ Total Combined Yeasts/Moulds Count (TYMC)

4.7.3.1 ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว จำนวน 1 มิลลิลิตร ไปเพาะเชื้อใน Sabouraud Dextrose Agar with Antibiotics จำนวน 2 plates ต่อหนึ่งความเข้มข้น

4.7.3.2 บ่มที่ 20-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

4.7.3.3 นับจำนวนโคโลนี แล้วคำนวณหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่าง 1 กรัม

4.7.4 ตรวจปริมาณ Bile-Tolerant Gram-Negative Bacteria (BNB)

4.7.4.1 ชั่งตัวอย่าง 10.00±0.20 กรัม เติม Tryptic Soy Broth ให้ครบ 100 มิลลิลิตร บ่มที่ 20-25°C เป็น

เวลา 2-5 ชั่วโมง

4.7.4.2 เจือจางตัวอย่างให้เป็น  $10^{-2}$  ถึง  $10^{-4}$

4.7.4.3 ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้วนำไปเพาะเชื้อใน Enterobacteria Enrichment Broth-Mossel ความเข้มข้นละ 1 หลอด

4.7.4.4 บ่มที่ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

4.7.4.5 นำมาเพาะเชื้อบน Crystal Violet-Neutral Red-Bile-Dextrose Agar บ่มที่ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.7.4.6 แปลผลปริมาณ *Enterobacteria* ในตัวอย่าง 1 กรัม โดยอ่านค่าจากตาราง Probable Number of Bacteria

4.7.5 ตรวจปริมาณ *Escherichia coli* (*E. coli*)

4.7.5.1 ชั่งตัวอย่าง  $10.00 \pm 0.20$  กรัม เจือจางโดยการเติม Neutralizing Fluid ให้ครบ 100 มิลลิลิตร

4.7.5.2 ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ใน TAT Broth Base 100 มิลลิลิตร บ่มที่ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-48 ชั่วโมง

4.7.5.3 ปิเปตตัวอย่างที่บ่มแล้ว จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ใน MacConkey Broth 100 มิลลิลิตร บ่มที่ 42-44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.7.5.4 นำมาเพาะเชื้อบน MacConkey Agar บ่มที่ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-72 ชั่วโมง

4.7.5.5 ถ้ามีเชื้อขึ้นให้เพาะเชื้อที่สงสัยเพาะบน Levine Eosin-Methylene Blue Agar บ่มที่ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.7.6 ตรวจปริมาณ *Salmonella* spp. (*S. spp.*)

4.7.6.1 ชั่งตัวอย่าง  $25.00 \pm 0.20$  กรัม เจือจางด้วย Buffer Peptone medium จำนวน 225 มิลลิลิตร บ่มที่ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.7.6.2 แยกเพาะเชื้อต่อในหลอดทดลอง 2 หลอด ที่บรรจุ Tetrathionate Bile Brilliant Green Broth และ Rappaport Vassiliadis Broth หลอดละ 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.7.6.3 นำมาเพาะเชื้อบน Brilliant Green Agar, Xylene-Lysine-Deoxycholate Agar และ Bismuth Sulfite Agar บ่มที่ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-72 ชั่วโมง

4.7.7 ตรวจปริมาณ *Clostridium* spp. (*C. spp.*)

4.7.7.1 ชั่งตัวอย่าง  $10.00 \pm 0.20$  กรัม เจือจางด้วย Neutralizing Fluid ให้ครบ 100 มิลลิลิตร

4.7.7.2 ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ใน Reinforced Medium for Clostridia จำนวน 2 หลอด โดยหลอดแรกนำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส 10 นาที และทำให้เย็นทันที หลอดที่ 2 ให้ความร้อน นำไปบ่มที่ 30-35 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ 48 ชั่วโมง

4.7.7.3 เพาะบน Columbia Agar ที่ใส่ gentamicin บ่มที่ 30-35 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ 48 ชั่วโมง

4.7.7.4 นำเชื้อที่สงสัยเพาะบน Columbia Agar จำนวน 2 plates โดย plate แรกบ่มที่ 30-35 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ 48 ชั่วโมง และ plate ที่ 2 บ่มที่ 30-35 องศาเซลเซียส ในสภาวะมีอากาศ 48 ชั่วโมง

4.7.8 ประเมินผลการปนเปื้อนจุลินทรีย์ โดยมีเกณฑ์การยอมรับ ดังนี้

4.7.8.1 Total aerobic microbial count  $\leq 5 \times 10^5$  CFU/g

- 4.7.8.2 Yeast & Molds count  $\leq 5 \times 10^4$  CFU/g
- 4.7.8.3 Bile-tolerant gram-negative bacteria  $\leq 10^3$ /g
- 4.7.8.4 Absence of *Escherichia coli* per 10 g
- 4.7.8.5 Absence of *Clostridium* spp. per 10 g
- 4.7.8.6 Absence of *Salmonella* spp. per 25 g

## ผลการทดสอบ

การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดผิวบาง เมื่อตรวจสอบแผ่น TLC ของทุกตัวอย่าง ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบ quenching spot ของ 6-gingerol ซึ่งมีค่า  $R_f = 0.2$  และ 6-shogaol ซึ่งมีค่า  $R_f = 0.4$  เช่นเดียวกันกับในสารละลายมาตรฐาน B และเมื่อนำแผ่น TLC มาพ่นด้วยสารละลาย 10% sulfuric acid ใน 95% ethanol จะพบ spot ทั้งสองติดสีน้ำตาลส้ม ซึ่งตรงกับ spot ของ 6-gingerol และ 6-shogaol ในสารละลายมาตรฐาน B

การหาความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย พบว่ามี 8 ตัวอย่างที่น้ำหนักทั้งแคปซูลอยู่ในช่วง 90-110% (Stage I) มี 2 ตัวอย่างที่น้ำหนักผงยาในแต่ละแคปซูลมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างเกิน 10 % ไม่เกิน 2 แคปซูล (Stage II) มี 1 ตัวอย่างที่น้ำหนักผงยาในแต่ละแคปซูลมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างอยู่ในช่วง 10-25% ไม่เกิน 6 แคปซูล (Stage III) และมี 1 ตัวอย่างที่น้ำหนักผงยาในแต่ละแคปซูลมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างในช่วง 10-25% เกิน 6 แคปซูล ซึ่งผิดมาตรฐาน

การหาปริมาณรวมสารสำคัญ gingerols, gingerdione, และ shogaols อยู่ในช่วง 0.34-1.58% w/w ซึ่งก่อนการหาปริมาณสารสำคัญ ผู้วิจัยได้ทวนสอบความถูกต้องของวิธีในการหาปริมาณสารสำคัญ พบว่าวิธีมีความจำเพาะเจาะจง โดยได้ค่า RRT ใกล้เคียงกับที่กำหนด และไม่มีสารอื่นมารบกวนพิกัดสารสำคัญ การทดสอบความสัมพันธเชิงเส้นตรงของสารละลาย capsaicin ในช่วงที่ทดสอบ ได้ค่า r เท่ากับ 1.0000 การทดสอบ repeatability ได้ค่า %RSD เท่ากับ 0.3 และการทดสอบ intermediate precision ได้ค่า %RSD เท่ากับ 1.3 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับตามตำราฟาร์มาโคเปียของสหรัฐอเมริกา ฉบับที่ 38 ดังนั้นจึงสามารถใช้วิธีดังกล่าวในการหาปริมาณสารสำคัญในยาแคปซูลจึงได้

การทดสอบการละลายพบว่ามี 2 ตัวอย่าง คือ D(I) และ F(III) ที่ตกเกณฑ์มาตรฐานการละลาย โดยพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ของสาร 6-gingerol ที่ละลายออกมา 58.6 % และ 46.0% ตามลำดับ

การหาปริมาณน้ำมันระเหยง่าย พบว่ามี 2 ตัวอย่าง คือ D(III) และ F(III) ที่มีปริมาณน้ำมันระเหยง่ายที่ตกเกณฑ์มาตรฐานโดยพบเพียง 1.1% v/w

ทั้งนี้ผลการทดสอบความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย การหาปริมาณสารสำคัญ การทดสอบการละลาย และการหาปริมาณน้ำมันระเหยง่ายของทุกตัวอย่าง แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 4

การตรวจการปนเปื้อนโลหะหนัก พบว่ามี 1 ตัวอย่าง A(I) ปนเปื้อนแคดเมียมสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน

การตรวจการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ พบว่ามีตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์สูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน ได้แก่ ตัวอย่าง D(III), E(I), G(I) พบเชื้อ Total aerobic microbial count ตัวอย่าง D(II), E(I), G(I) พบเชื้อ Bile-tolerant gram-negative bacteria และ ตัวอย่าง E(I), G(I) พบเชื้อ *Clostridium* spp. ซึ่งผลการตรวจการปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ของทุกตัวอย่าง แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย การหาปริมาณสารสำคัญ การทดสอบการละลาย และ การหาปริมาณน้ำมันระเหยง่าย

ตัวอย่าง	ความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย	ปริมาณสารสำคัญ Glns+Gine+Shos		ปริมาณสารสำคัญ Glns+Gine		ปริมาณสารสำคัญ Shos		ปริมาณการละลายของ 6-gingerol (%)	ปริมาณน้ำมันระเหยง่าย (% v/w)
		(mg/cap)	(% w/w)	(mg/cap)	(% w/w)	(mg/cap)	(% w/w)		
A(I)	ผ่าน (stage I)	3.32	0.78	2.01	0.47	1.17	0.28	104.1	2.3
B(I)	ผ่าน (stage II)	4.25	0.83	2.30	0.45	1.75	0.34	86.0	2.4
B(II)	ผ่าน (stage II)	4.51	0.88	2.68	0.52	1.67	0.32	86.9	2.6
C(I)	ผ่าน (stage I)	1.42	0.34	0.67	0.16	0.63	0.15	74.7	1.4
D(I)	ผ่าน (stage I)	7.14	1.41	5.31	1.05	1.62	0.32	58.6	1.6
D(II)	ผ่าน (stage I)	6.86	1.43	5.68	1.19	0.97	0.20	88.7	1.6
D(III)	ผ่าน (stage I)	7.02	1.44	5.80	1.19	1.01	0.21	87.8	1.1
E(I)	ผ่าน (stage I)	6.77	1.58	4.81	1.12	1.66	0.39	81.5	2.4
F(I)	ไม่ผ่าน	2.88	0.63	1.51	0.33	1.22	0.27	61.8	1.6
F(II)	ผ่าน (stage I)	1.72	0.36	0.68	0.14	0.90	0.19	65.1	1.4
F(III)	ผ่าน (stage I)	2.08	0.44	1.24	0.26	0.72	0.15	46.0	1.1
G(I)	ผ่าน (stage III)	5.97	1.25	4.34	0.91	1.34	0.28	81.1	2.1

Glns = gingerols, Gine = gingerdione, Shols = Shogaols

ตารางที่ 5 ผลการตรวจปนเปื้อนของโลหะหนักและการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

ตัวอย่าง	การปนเปื้อนโลหะหนัก			การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์					
	สารหนู	ตะกั่ว	แคดเมียม	TAMC	TYMC	BNB	<i>E. coli</i>	<i>C. spp.</i>	<i>S. spp.</i>
A(I)	ผ่าน	ผ่าน	ไม่ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
B(I)	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
B(II)	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
C(I)	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
D(I)	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
D(II)	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ไม่ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
D(III)	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ไม่ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
E(I)	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ไม่ผ่าน	ผ่าน	ไม่ผ่าน	ผ่าน	ไม่ผ่าน	ผ่าน
F(I)	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
F(II)	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
F(III)	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
G(I)	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ไม่ผ่าน	ผ่าน	ไม่ผ่าน	ผ่าน	ไม่ผ่าน	ผ่าน

### วิจารณ์ผลการทดสอบ

ยาแคปซูลจึงเป็นยาสมุนไพรที่มีรายงานการศึกษาทางคลินิกที่แสดงว่ามีประสิทธิภาพในการรักษาและมีความปลอดภัยสูง (11-14) อย่างไรก็ตามพบรายงานอาการข้างเคียงจากการใช้ยาแคปซูลจึง ได้แก่ การแสบร้อนกลางอก อาเจียน และท้องอืด (21) และพบรายงานการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาแคปซูลจึงกับยาอื่นๆ เช่น การลด bioavailability ของยา cyclosporine (22)

ผลการวิเคราะห์คุณภาพยาแคปซูลจึงพบว่าไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานหลายหัวข้อ ได้แก่ ความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ยไม่ผ่านร้อยละ 8 ปริมาณการละลายไม่ผ่านร้อยละ 16.7 ซึ่งตัวอย่างที่ไม่ผ่านพบว่าผงยาอัดตัวกันเป็นแท่งที่แข็งมาก ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อ การละลาย ปริมาณน้ำมันระเหยง่ายไม่ผ่านร้อยละ 16.7 ปริมาณแคดเมียมไม่ผ่านร้อยละ 8 Total aerobic microbial count ไม่ผ่านร้อยละ 25 Bile-tolerant gram-negative bacteria ไม่ผ่านร้อยละ 25 และตรวจพบเชื้อ *Clostridium* spp. ร้อยละ 16.7 ส่วนปริมาณสารสำคัญนั้นไม่สามารถตัดสินได้ว่ายาแคปซูลจึงในแต่ละตัวอย่างผ่านเกณฑ์มาตรฐานหรือไม่ เนื่องจากตัวอย่างไม่มีการระบุปริมาณสารสำคัญบนฉลาก แต่หากพิจารณาปริมาณสารสำคัญต่อน้ำหนัก โดยใช้เกณฑ์มาตรฐานของวัตถุุดิบตามมาตรฐานตำราฟาร์มาโคเปียของสหรัฐอเมริกา ฉบับที่ 38 ที่กำหนดปริมาณ gingerols และ gingerdione รวมกันไม่ต่ำกว่า 0.8 % w/w และปริมาณ shogaols ไม่เกิน 0.18 % w/w พบว่าไม่มีตัวอย่างใดเลยที่ผ่านทั้งสองเกณฑ์มาตรฐานดังกล่าว

จากปัญหาการไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานดังกล่าวของยาแคปซูลจึงข้างต้น อาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคใน 2 ด้านหลัก คือ ด้านประสิทธิภาพของยา และด้านความปลอดภัยในการใช้ยา การรับประทานยาที่มีปริมาณสารสำคัญในผงยาน้อย ยาที่มีปริมาณผงยาไม่เท่ากันในแต่ละแคปซูล และยาที่ไม่สามารถปลดปล่อยสารสำคัญออกมาได้ภายในระยะเวลาที่เหมาะสม ทำให้ยาที่รับประทานเข้าไปนั้นไม่ให้ผลในการรักษา ส่วนการรับประทานยาที่มีปริมาณโลหะหนักแคดเมียมเกินเกณฑ์มาตรฐาน อาจทำให้เกิดการสะสมแคดเมียมที่ไต โดยแคดเมียมมีค่าครึ่งชีวิตนาน 10-30 ปี หากสะสมในปริมาณมากอาจทำให้เกิดพิษต่อไต และส่งผลกระทบต่อระบบกระดูกในเวลาต่อมาได้ (23) และการรับประทานยาที่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

เช่น *Clostridium* spp. อาจทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร และมีอาการรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ (24)

ดังนั้นการแก้ปัญหาคุณภาพยาแคปซูลจึงอาจทำได้โดยอาศัยความร่วมมือกันของเกษตรกรผู้ผลิตวัตถุดิบและโรงงานผู้ผลิตยาสมุนไพร เกษตรกรอาจต้องคำนึงเพิ่มเติมในเรื่องการปลูก เก็บเกี่ยว และการเก็บรักษาเหง้าจิง เช่น การเลือกแหล่งปลูก เพื่อป้องกันการดูดซับโลหะหนักจากพื้นที่ปลูก (25) การเลือกเก็บเหง้าจิงที่มีอายุที่เหมาะสม เพื่อให้ได้จิงที่มีสารสำคัญสูง (26) การเก็บรักษาเหง้าของสดในสถานะที่เหมาะสม เพื่อไม่ให้สารสำคัญสลายตัวก่อนนำมาผลิตเป็นยาสมุนไพร (27) ในส่วนโรงงานผู้ผลิตสมุนไพร การเตรียมวัตถุดิบก็มีความสำคัญ ควรระวังไม่ให้สารสำคัญทั้งน้ำมันระเหยง่ายและสารกลุ่ม oleoresins สลายตัวในระหว่างการแปรรูปเหง้าจิงสดเป็นผงจิงแห้ง (28-29) นอกจากนี้ผงจิงแห้งที่ดีต้องมีความชื้นเหมาะสมให้เกิดการไหลที่ดีในขั้นตอนการบรรจุลงแคปซูล (30) เพื่อให้ได้แคปซูลที่มีปริมาณผงยาสม่ำเสมอ นำมาบรรจุลงในบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมและฆ่าเชื้อต่อไป โดยกระบวนการที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ ผู้ผลิตจำเป็นต้องมีการทดลองเพิ่มเติมเพื่อหาสถานะที่เหมาะสมในแต่ละกระบวนการการผลิตเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ และเพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลิตภัณฑ์ควรมีการควบคุมคุณภาพ และควรระบุปริมาณสารสำคัญแต่ละตัวไว้บนฉลากด้วย

จากการที่ผู้ผลิตไม่ระบุปริมาณสารสำคัญบนฉลากยา นอกจากจะเกิดปัญหาในการควบคุมคุณภาพแล้ว ยังทำให้เกิดปัญหาในการบริโภคยาสมุนไพรนั้นๆด้วย เนื่องจากผู้บริโภคไม่ทราบว่าควรรับประทานยาในปริมาณเท่าไร เมื่อรับประทานยาในขนาดที่ไม่เหมาะสมก็ไม่เกิดประสิทธิภาพในการรักษา การที่ผู้ผลิตไม่ระบุปริมาณสารสำคัญบนฉลากยาอาจสืบเนื่องมาจากการที่ประเทศไทยไม่ได้มีเกณฑ์มาตรฐานปริมาณสารสำคัญของวัตถุดิบ ในอนาคตควรต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อกำหนดมาตรฐานปริมาณสารสำคัญกลุ่มต่างๆ ที่เหมาะสมกับการควบคุมคุณภาพจิงในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นแนวทางให้ผู้ผลิตได้ใช้เป็นเกณฑ์ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ต่อไป

## สรุปผลการทดสอบ

จากผลการศึกษาพบว่ามียาแคปซูลจิงที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานสูงถึงร้อยละ 66.67 ในหัวข้อการตรวจเอกลักษณ์ การหาความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย การหาปริมาณน้ำมันระเหยง่าย การทดสอบการละลาย และการปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งสะท้อนให้เห็นว่าคุณภาพของยาแคปซูลจิงที่มีจำหน่ายในประเทศไทยยังไม่ได้มาตรฐานสากล

## ข้อจำกัดในการทดสอบ

1. ไม่สามารถหาสารมาตรฐาน 6-gingerdione เพื่อนำมาคำนวณค่า RRT ในขั้นตอนการทวนสอบความจำเพาะเจาะจงได้ แต่เนื่องจากเมื่อลองวิเคราะห์สารละลายตัวอย่าง พบว่าทุกตัวอย่างมี peak ที่มีค่า RRT 2.9 ซึ่งเป็นไปในรูปแบบเดียวกันกับค่า RRT ที่ USP กำหนด จึงใช้ peak ที่ RRT = 2.9 ในการคำนวณปริมาณ 6-gingerdione
2. ไม่สามารถ integrate peak ของ 10-shogaol ที่มีค่า RRT = 5.2 ในสารละลายตัวอย่างได้ การคำนวณปริมาณ shogaols จึงไม่ได้รวมปริมาณ 10-shogaol
3. จำนวนตัวอย่างที่ใช้ทดสอบมีจำนวนน้อย เนื่องจากผู้ผลิตบางรายไม่ใช่ผู้ผลิตรายใหญ่ ซึ่งจะไม่ผลิตสินค้ารุ่นการผลิตใหม่ จนกว่าสินค้ารุ่นการผลิตเดิมจะหมด รวมทั้งข้อจำกัดในการดำเนินงานจำเป็นต้องเสร็จสิ้นภายในปีงบประมาณจึงไม่สามารถรอให้ผู้ผลิตรายย่อยผลิตยาแคปซูลจิงจนครบ 3 รุ่นการผลิตได้
4. ในประเทศไทยยังไม่มีข้อกำหนดมาตรฐานปริมาณสารสำคัญในจิง จึงไม่มีเกณฑ์ในการตัดสินว่ายาแคปซูลจิงที่ใช้ในการทดสอบนั้นมีปริมาณสารสำคัญ gingerols, gingerdione, และ shogaols ที่เข้ามาตรฐานหรือไม่

## เอกสารอ้างอิง

1. Barceloux, D.G., 2008. Medical Toxicology of Natural Substances. Chapter 68 Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). John Wiley & Sons, Inc. pp. 482-487.
2. National Drug System Development Committee. 2012. National List of Essential Medicines [online]. Available from: <http://kpo.moph.go.th/webkpo/tool/Thaimed2555.pdf> [2018, October 10]
3. Lee, S.W., et al. 2011. Phenolic Compounds Isolated from *Zingiber officinale* Roots Inhibit Cell Adhesion. Food Chemistry. 128(3): 778-782.
4. Lee, T.Y., et al. 2009. 6-Gingerol Inhibits ROS and iNOS through the Suppression of PKC-alpha and NF-kappaB Pathways in Lipopolysaccharide-stimulated Mouse Macrophages. Biochemical and Biophysical Research Communications. 382(1): 134-139.
5. Li, Y., et al. 2012. Gingerols of *Zingiber officinale* Enhance Glucose Uptake by Increasing Cell Surface GLUT4 in Cultured L6 Myotubes. Planta Medica. 78(14): 1549-1555.
6. Chakraborty, D., et al. 2012. [6]-Gingerol Isolated from Ginger Attenuates Sodium Arsenite Induced Oxidative Stress and Plays a Corrective Role in Improving Insulin Signaling in Mice. Toxicology Letters. 210(1): 34-43.
7. Tzeng, T.F. and Liu I.M. 2013. 6-gingerol Prevents Adipogenesis and the Accumulation of Cytoplasmic Lipid Droplets in 3T3-L1 Cells. Phytomedicine. 20(6): 481-487.
8. Liao, Y.R., et al. 2012. Anti-platelet Aggregation and Vasorelaxing Effects of the Constituents of the Rhizomes of *Zingiber officinale*. Molecules. 17(8): 8928-8937.
9. Mahady, G.B., et al. 2003. Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and the Gingerols Inhibit the Growth of Cag A+ Strains of *Helicobacter pylori*. Anticancer Research. 23: 3699-3702.
10. Pertz, H.H., et al. 2011. Effects of Ginger Constituents on the Gastrointestinal Tract: Role of Cholinergic M3 and Serotonergic 5-HT3 and 5-HT4 Receptors. Planta Medica. 77(10): 973-978.
11. Rahnama, P., et al. 2012. Effect of *Zingiber officinale* R. Rhizomes (Ginger) on Pain Relief in Primary Dysmenorrhea: a Placebo Randomized Trial. BMC Complementary and Alternative Medicine. 12(92): 1-8.
12. Ebrahimzadehattari, V., et al. 2016. Changes of Serum Adipocytokines and Body Weight Following *Zingiber officinale* Supplementation in Obese Women: a RCT. European Journal of Nutrition. 55(6): 2129-2136.
13. Paritakul, P., et al. 2016. The Effect of Ginger on Breast Milk Volume in the Early Postpartum Period: A Randomized, Double-Blind Controlled Trial. Breastfeeding Medicine. 11(7): 361-365.
14. Manusirivithaya, S., et al. 2004. Antiemetic Effect of Ginger in Gynecologic Oncology Patients Receiving Cisplatin. International Journal of Gynecological Cancer. 14: 1063-1069.
15. Zick, S.M., et al. 2009. Phase II Trial of Encapsulated Ginger as a Treatment for Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting. Supportive Care in Cancer. 17(5): 563-572.
16. Charoenchai, L., Saohin W., and Boonchoong, P. 2013. The Study of Chemical Compositions of Volatile Oil from Fresh Ginger Rhizomes and Ginger Capsules in Thailand. Isan Journal of Pharmaceutical Sciences. 9: 52-63.
17. United States Pharmacopeial Convention. 2015. The United States Pharmacopeia 38<sup>th</sup> -National Formular 33<sup>rd</sup>

- (USP 38-NF 33), Volume V: Ginger Capsules. Rockville, MD. pp. 6058-6060.
18. Chaiwat, C., Jamtaweekul J., and Inthongkaew P. 2014. Safety of Herbal Medicines in the National List. Bulletin of the Department of Medical Sciences. 59: 123-134.
  19. Bureau of Drug and Narcotic. Department of Medical Sciences. Determination of Heavy Metal Contamination in Traditional Medicine. SOP No. 2202168 Revision1; 23 November 2016: 1-8.
  20. British Pharmacopoeia Commission. 2015. British Pharmacopoeia: Microbiological Examination of Herbal Medicinal Products for Oral Use. The Stationery Office, London. pp. V497-V499.
  21. Arfeen, Z., et al., 1995. A Double-blind Randomized Controlled Trial of Ginger for the Prevention of Postoperative Nausea and Vomiting. *Anaesthesia and Intensive Care Journal*. 23: 449-452.
  22. Chiang, H.M., et al. 2006. Ginger Significantly Decreased the Oral Bioavailability of Cyclosporine in Rats. 34(5): 845-855.
  23. Jarup, L. and Akesson A. 2009. Current Status of Cadmium as an Environmental Health Problem. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 238(3): 201-208.
  24. Hall, A.J., et al. 2012. The Roles of *Clostridium difficile* and Norovirus among Gastroenteritis-Associated Deaths in the United States, 1999-2007. *Clinical Infectious Diseases*. 55(2): 216-223.
  25. Gupta, S., et al. 2010. Volatile (As and Hg) and Non-volatile (Pb and Cd) Toxic Heavy Metals Analysis in Rhizome of *Zingiber officinale* Collected from Different Locations of North Western Himalayas by Atomic Absorption Spectroscopy. *Food and Chemical Toxicology*. 48(10): 2966-2971.
  26. Phoungchandang, S. and Sertwasana A. 2010. Spray-drying of Ginger Juice and Physicochemical Properties of Ginger Powders. *ScienceAsia*. 36(1): 40-45.
  27. Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z.E. and Rahmat A. 2016. Changes in Antioxidant and Antibacterial Activities as well as Phytochemical Constituents Associated with Ginger Storage and Polyphenol Oxidase Activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16(1): 382-392.
  28. Marrelli, M., Menichini F., and Conforti F. 2015. A Comparative Study of *Zingiber officinale* Roscoe Pulp and Peel: Phytochemical Composition and Evaluation of Antitumour Activity. *Natural Product Research*. 29(21): 2045-2049.
  29. Jayashree, E., Visvanathan R., and John Zachariah T. 2014. Quality of Dry Ginger (*Zingiber officinale*) by Different Drying Methods. *Journal of Food Science and Technology*. 51(11): 3190-3198.
  30. Saohin, W., et al., 2006. Suitable Drying Conditions for Ginger Capsule Production. *Isan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2(2): 9-16.

