

23.1

มกราคม-เมษายน 2560

ISSN 0858-6454

สารตำรายา

Pharmacopoeial Newsletter

กลุ่มจัดทำตำรายาของประเทศไทย

สำนักยาและวัตถุเสพติด

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

สารตำรายา

Pharmacopoeial Newsletter

ที่ปรึกษา	สุรัชนี้ เศวตศิลา, วิยะดา อัครวุฒิ, นิดาพรรณ เรืองฤทธิพันธ์, เยาวลักษณ์ วรรณะพิศิษฐ์, นันทนา สิทธิชัย
บรรณาธิการอำนวยการ	สิริชัย กระป๋องศรี
บรรณาธิการ	ศศิวิมล พัฒเสมา
ผู้ช่วยบรรณาธิการ	กรวิกา จารุพันธ์, สันติ นิ่มน้อย, ษษิมล บุญทวี
คณะที่ปรึกษาด้านวิชาการ	วัลลภา ทาทอง ภาคภูมิ เต็งอำนวย คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชุตินา เพ็ชรประยูร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สันทนา สุธาดารัตน์ คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง มนัส อัตตวิชัย ศศิตา อยู่สุข วิมลณี คงสุข สำนักยาและวัตถุเสพติด ศิริวรรณ ชัยสมบุญพันธ์ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม
เจ้าของ	สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
สำนักงาน	กลุ่มจัดทำตำรายาของประเทศไทย สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซอยโรงพยาบาลบาราตรนคราตุร นนทบุรี 11000 โทร. 0-2951-0000 ต่อ 99120 โทรสาร 0-2580-5733
อัตราค่าสมาชิก	เล่มละ 80 บาท

วัตถุประสงค์

- เป็นสื่อเผยแพร่ผลงานของกลุ่มจัดทำตำรายาของประเทศไทย คณะกรรมการจัดทำตำรายาของประเทศไทยและคณะอนุกรรมการที่เกี่ยวข้อง
- เสนอความก้าวหน้าในการปรับปรุงแก้ไขตำรายาของต่างประเทศและตำรายาของประเทศไทย
- เผยแพร่ความรู้เรื่องยา วิทยาศาสตร์การแพทย์และวิชาการที่เกี่ยวข้อง
- เป็นสื่อกลางในการแสดงความคิดเห็นของผู้ใช้และผู้จัดทำตำรายาของประเทศไทย

การส่งเรื่องลงพิมพ์ในสารตำรายา

สารตำรายารับจัดพิมพ์บทความประเภทต่างๆ ดังนี้

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

หลักเกณฑ์การเขียนต้นฉบับ

1. บทความทุกประเภทจะเขียนเป็นภาษาไทย หรือ ภาษาอังกฤษก็ได้ เพื่อความสะดวกอาจจัดส่งต้นฉบับใน แผ่นดิสก์คอมพิวเตอร์ โดยบันทึกเป็นแฟ้มของโปรแกรม MS Word
2. บทความที่เป็นรายงานการวิจัย (original article) ต้องมีบทคัดย่อ (abstract) ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ท้ายบทคัดย่อให้มีคำสำหรับทำดัชนี (key word) ไม่เกิน 5 คำ เป็นภาษาอังกฤษและให้จัดโครงสร้างของบทความ เรียงตามลำดับดังนี้ บทนำ (Introduction) วัสดุและวิธีการ (Materials and Methods) ผลการวิจัย (Results) วิเคราะห์ผล (Discussion) บทสรุป (Conclusion) และเอกสารอ้างอิง (References)
3. การอ้างอิงเอกสารให้ใช้หมายเลขกำกับ และเรียงตามลำดับของการอ้างอิง ชื่อย่อของวารสาร ให้ใช้ตาม U.S. National Library of Medicine in Index Medicus และคู่มือการเตรียมบทความและรายงานทางวิทยาศาสตร์เพื่อตีพิมพ์ ในวารสารของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
4. การเขียนเอกสารอ้างอิงให้เรียงลำดับตามตัวอย่าง
 - (1) Beckett, A.H. and Stenlake, J.B. 1988. Practical Pharmaceutical Chemistry, 4th 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

สารตำราษาปีที่ 23 ฉบับที่ 1 ขอนำเสนอบทความนิพนธ์ต้นฉบับ 2 เรื่อง ได้แก่ เรื่อง “การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ Sildenafil รูปแบบยาเม็ด” โดย ภค.ประสิทธิ์ โอภาส ภญ.สุภาณี ดวงธีรปรีชา และ จิตติมา ดาบทอง ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณ sildenafil รูปแบบยาเม็ดในโครงการสร้างหลักประกันคุณภาพและมาตรฐานบริการด้านยา ประจำปีงบประมาณ 2560 ได้ ส่วนเรื่อง “Semi-quantification of aggregates in erythropoietin pharmaceutical formulations using size exclusion chromatography/SDS-PAGE/Western Blotting” โดย ภญ.ญานิกา รัตน์สุวรรณ ภญ.ภิญญาภัทร รัชญ์สิน และ ดร.ภญ.บุญชริกา บุญญาภิวัดน์ เป็นการนำเทคนิควิธีการวิเคราะห์ถึง 3 เทคนิคมาใช้ในการวิเคราะห์หาการเกาะกลุ่ม (aggregate) ในตัวยาริโทรโพอิติน ได้แก่ เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแยกตามขนาดโมเลกุล (size exclusion chromatography) เทคนิค SDS-PAGE และเทคนิค Western Blotting เนื่องจากการเกาะกลุ่ม (aggregate) ในยาริโทรโพอิตินเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ความแรงของยาลดลง และยังทำให้เกิดปฏิกิริยา anaphylactoid รวมถึงอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาแก่ผู้ป่วย ซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง และเรื่องสุดท้ายเป็นเรื่อง “นวัตกรรมการแพทย์เกียรติยศ ประจำปี 2560” ตามที่มูลนิธิกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ริเริ่มให้มีการจัดตั้งรางวัลนวัตกรรมการแพทย์เกียรติยศตั้งแต่ปี พ.ศ. 2558 เพื่อเชิดชูเกียรติบุคลากรในวงการวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยผู้ที่ได้รับรางวัลนวัตกรรมการแพทย์เกียรติยศ ประจำปี 2560 ได้แก่ ได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์พลรัตน์ วิไลรัตน์ ในโอกาสนี้วารสารสารตำราษาฯ จึงขอเชิดชูเกียรติโดยการนำประวัติและผลงานด้านวิชาการที่สำคัญของท่าน มาเผยแพร่ให้ผู้อ่านได้รับทราบ ในฐานะที่ท่านเป็นผู้อุทิศตนด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในงานวิจัยโรคมะเร็ง โดยเฉพาะผลการวิจัยโรคแทรกซ้อนในมาลาเรียชนิดรุนแรง และการพัฒนาสูตรผสมที่มีผลต่อการรักษาและการป้องกัน อันเป็นประโยชน์อย่างกว้างขวางในประเทศไทยและทั่วโลก ควรค่าแก่ผู้อ่านทุกท่านที่จะใช้เป็นแบบอย่างในความมุ่งมั่นทำงานด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ของท่านต่อไป

สำหรับสมาชิกที่ได้ลงทะเบียนสมัครสมาชิกไว้แล้วทางกลุ่มจัดทำตำราษาฯ จะจัดส่งวารสารไปให้ตามที่อยู่ที่ได้แจ้งไว้ ส่วนผู้ที่สนใจทั้งในส่วนของวารสารฉบับที่ผ่านมาหรือตำราษาของประเทศไทย (Thai Pharmacopoeia) รวมถึงตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia) สามารถติดต่อได้ที่กลุ่มจัดทำตำราษาของประเทศไทย สำนักยาและวัตถุเสพติด หมายเลขโทรศัพท์ 02 9510503 ทุกวันในเวลาราชการหรือสามารถดาวน์โหลดแบบฟอร์มใบสั่งซื้อได้ที่ http://dmsc2.dmsc.moph.go.th/webroot/drug/PRODUCTS/form/TP_order_form.pdf

สุดท้ายนี้คณะบรรณาธิการสารตำราษาขอขอบคุณผู้ทบทวน (Reviewer) ที่ได้พิจารณา ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะต้นฉบับบทความก่อนลงตีพิมพ์เผยแพร่ ขอขอบคุณผู้เขียนทุกท่านที่เผยแพร่ผลงานเพื่อเป็นวิทยาทาน รวมทั้งผู้อ่านทุกท่านที่สนับสนุนมาโดยตลอด หากพบข้อผิดพลาดประการใดทางคณะบรรณาธิการฯ ต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

สารบัญ

นิพนธ์ต้นฉบับ Original Article

<< การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ Sildenafil รูปแบบยาเม็ด	1
<< Semi-quantification of aggregate in erythropoietin pharmaceutical formulations using size exclusion chromatography/SDS-PAGE/Western Blotting	15

บทความปกิณกะ Miscellaneous

<< นักวิทยาศาสตร์การแพทย์เกียรติยศ ประจำปี พ.ศ. 2560	23
--	----

การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์
Sildenafil รูปแบบยาเม็ด

ประสิทธิ์ โอภาส*
สุภาณี ดวงธีรปรีชา*
จิตติมา ดาบทอง*

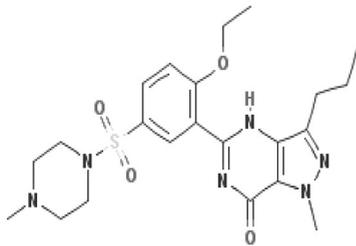
Abstract Determination of sildenafil in tablet formulations using high performance liquid chromatography method was developed. The chromatograph was equipped with PDA detector at a wavelength of 254 nm. The analysis was performed on Hypersil Gold C18, 5- μ m, 4.6- x 150-mm column by isocratic elution using a mixture of methanol and 0.01 M ammonium acetate (60:40, v/v) as a mobile phase at a flow rate of 1.2 ml per minute. Validation was conducted according to the ICH guideline Topic Q2(R1) Validation of Analytical Procedures. Specificity indicated that sildenafil peak was not interfered by its degradation product peaks from any stress conditions. Linearity was demonstrated over the concentration range of 0.15-0.35 mg per ml of sildenafil with correlation coefficient (r) equal to 0.99999. Recovery performed at three concentration levels of sildenafil were in the range of 80.0-120.0%. The percentage mean recovery of sildenafil was 99.9 (%RSD = 0.2). Precision was achieved as repeatability was 0.2% and intermediate precision was 0.3%. The method was robust when HPLC conditions such as the HPLC column, the ratio of mobile phase, the column temperature and even the flow rate, were changed. This method was successfully validated and useful for the quantitative assay and quality control of sildenafil products under the project “The Quality Assurance of Medicine for the Universal Health Care Coverage Scheme” in fiscal year 2560.

Key words : sildenafil tablets, HPLC, method validation

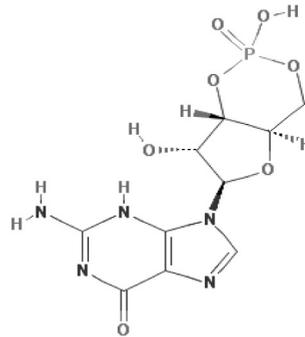
บทคัดย่อ วิธีโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูงที่พัฒนาขึ้นสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ sildenafil รูปแบบยาเม็ด ประกอบด้วยคอลัมน์ชนิด Hypersil Gold C18 ขนาด 4.6- × 150-มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร สารละลายตัวพาประกอบด้วยส่วนผสมของ methanol และ 0.01 M ammonium acetate ในอัตราส่วน 60 : 40 โดยปริมาตร อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด PDA ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตามแนวทางของ ICH-Q2 (R1) พบว่าวิธีมีความจำเพาะเจาะจง ไม่พบการรบกวนการวิเคราะห์จากสารละลายตัวของ sildenafil ที่เกิดจากการเร่งให้สลายตัวด้วยสภาวะต่างๆ ความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.15-0.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.9999 การทดสอบความแม่นยำที่ความเข้มข้นสามระดับในช่วง 80.0-120.0% พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของการกลับคืนเท่ากับ 99.9 (%RSD = 0.2) การทดสอบความเที่ยงของวิธีพบว่า ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์จากการทดสอบความทวนซ้ำได้ เท่ากับ 0.2 และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์จากการทดสอบ intermediate precision เท่ากับ 0.3 วิธีวิเคราะห์มีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ ที่ทดสอบ คือ คอลัมน์ อุณหภูมิคอลัมน์ อัตราส่วนของสารละลายตัวพาและอัตราการไหลของสารละลายตัวพา จากผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีบ่งชี้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นได้มาตรฐาน สามารถนำวิธีดังกล่าวไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณ sildenafil รูปแบบยาเม็ดในโครงการสร้างหลักประกันคุณภาพและมาตรฐานบริการด้านยา ประจำปีงบประมาณ 2560

บทนำ

ยา sildenafil รู้จักแพร่หลายในชื่อการค้า Viagra® โดยยาดังกล่าวออกสู่ท้องตลาดในปี พ.ศ. 2541 ใช้เพื่อรักษาโรคหย่อนสมรรถภาพทางเพศในเพศชาย จัดเป็นยาในกลุ่ม Phosphodiesterase-5 inhibitors (PDE-5 inhibitors) มีโครงสร้างหลักเป็น heterocyclic nitrogen-containing double-bond system ซึ่งคล้ายกับ purine base ในโครงสร้างของ cyclic guanosine monophosphate (cGMP)(1) ดังภาพที่ 1 ทำให้ยากลุ่มนี้ยับยั้งเอนไซม์ PDE-5 ในตำแหน่งเดียวกับ cGMP แบบแข่งขัน (reversible competitive antagonist) ซึ่งการยับยั้ง PDE-5 จะทำให้ไม่มีการทำลาย cGMP นำไปสู่การขยายของหลอดเลือดแดงและเลือดไหลเข้าไปใน corpora cavernosum มากขึ้นเกิดการแข็งตัวขององคชาตตามมา ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ยาควบคุมพิเศษ ฉบับที่ 35 ข้อ 1 จัดยาในกลุ่ม PDE-5 inhibitors เป็นยาควบคุมพิเศษ(3) ต้องใช้ภายใต้การดูแลของแพทย์หรือสั่งจ่ายโดยแพทย์เท่านั้นและในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2559 จัดยา sildenafil อยู่ในประเภท ง จากข้อมูลของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ณ วันที่ 17 มีนาคม 2559 มีทะเบียนยาจำนวน 14 เลขทะเบียน ที่ผ่านมาไม่พบข้อมูลด้านคุณภาพยาดังกล่าวในประเทศไทย อาจเนื่องจากยังไม่มีวิธีวิเคราะห์ทั้งในตำรายาของประเทศสหรัฐอเมริกา (USP) หรือตำรายาของประเทศสหราชอาณาจักร (BP) หรือตำรายาอื่นที่รัฐมนตรีประกาศ จากการสำรวจความต้องการของผู้มีส่วนเกี่ยวข้องในกรณีศึกษา พบว่าโรงพยาบาลมีความต้องการทราบคุณภาพยา sildenafil ชนิดเม็ดที่มีใช้ในโรงพยาบาล ดังนั้นสำนักยาและวัตถุเสพติดจึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญดังกล่าวในโครงการสร้างหลักประกันคุณภาพและมาตรฐานบริการด้านยา ประจำปีงบประมาณ 2560 วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ดัดแปลงมาจากวิธีตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ยากลุ่ม PDE-5 inhibitors ในของกลางยาดีซึ่งผู้พิมพ์ได้ดำเนินการเสร็จสมบูรณ์แล้ว และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตามแนวทาง International Conference on Harmonization of Technical Requirement for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Geneva: ICH Steering Committee(4) (ICH-Q2 (R1))



Sildenafil



cGMP

ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของยา Sildenafil และ cGMP(2)

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) with PDA Detector : Model Waters 2695-1996- Empower ผลิตภัณฑ์ของ Waters, Millipore Corporation, USA
2. High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) with PDA Detector : Model Agilent 1100 Series ผลิตภัณฑ์ของ Agilent, Germany
3. Analytical Balance : Model XPE 205, Mettler Toledo, Switzerland ความละเอียด 0.00001 กรัม
Model MX5, Mettler Toledo, Switzerland ความละเอียด 0.000001 กรัม
Model MS3002S, Mettler Toledo, Switzerland ความละเอียด 0.01 กรัม
4. Column : Hypersil Gold C18, 5 mm, 4.6 x 150 mm
SunFire C18, 5 mm, 4.6 x 150 mm
5. เครื่องแก้ว class A
6. Nylon syring filter 0.45 μm

สารมาตรฐาน

Sildenafil Citrate: DMSc

สารเคมี

1. Ammonium Acetate : AR grade
2. Methanol : HPLC grade
3. Water : High Purity

ตัวอย่าง

ตัวอย่างยาเม็ด sildenafil ขนาดความแรง 100 มิลลิกรัมต่อเม็ด

Placebo ประกอบด้วยองค์ประกอบอื่นที่มีในสูตรตำรับ โดยไม่มีตัวยา sildenafil จากบริษัทผู้ผลิต

วิธีการทดสอบ

สถานะของระบบโครมาโทกราฟ

ตารางที่ 1 สถานะของระบบโครมาโทกราฟ

Column	- Hypersil Gold C18, 5 mm, 4.6 x 150 mm
Column temperature	- 30 °C
Flow rate	- 1.2 ml/minute
Mobile phase	- Methanol : 0.01 M Ammonium acetate 60 : 40 (v/v)
Detector	- PDA 254 nm
Injection volume	- 10 µl

0.01 M Ammonium acetate solution

(CH₃COONH₄ : 77.084)

ละลาย ammonium acetate ประมาณ 0.77 กรัม ในน้ำ 1000 มิลลิลิตร

Standard solution

ชั่งสารมาตรฐาน sildenafil citrate ประมาณ 5 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน volumetric flask ขนาด 20 มิลลิลิตร เติม mobile phase ประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายหมด เจือจางด้วย mobile phase จนครบปริมาตรกรองผ่านแผ่นกรอง nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

Sample solution

ชั่งเม็ดยาจำนวน 20 เม็ด บดละเอียด ชั่งผงยาให้มีตัวยา sildenafil citrate ประมาณ 50 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน volumetric flask ขนาด 200 มิลลิลิตร เติม mobile phase ประมาณ 150 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 15 นาที เจือจางด้วย mobile phase จนครบปริมาตร กรองผ่านแผ่นกรอง nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

การวิเคราะห์

นำ standard solution และ sample solution ไปฉีดวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ภายใต้สภาวะตามตารางที่ 1

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

1. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)

Standard solution : ชั่งสารมาตรฐาน sildenafil citrate ประมาณ 5 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน volumetric flask ขนาด 20 มิลลิลิตร เติม mobile phase ประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายหมด เจือจางด้วย mobile phase จนครบปริมาตร กรองผ่านแผ่นกรอง nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

Sample solution1 : ชั่ง placebo ให้มีน้ำหนักเทียบเท่ากับน้ำหนักตัวอย่างที่มีตัวยา sildenafil citrate ประมาณ 5 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน volumetric flask ขนาด 20 มิลลิลิตร เติม mobile phase ประมาณ 15 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 20 นาที เจือจางด้วย mobile phase จนครบปริมาตร กรองผ่านแผ่นกรอง nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

Sample solution2 : ชั่ง placebo ให้มีน้ำหนักใกล้เคียง Sample solution1 และสารมาตรฐาน sildenafil citrate ประมาณ 5 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน volumetric flask ขนาด 20 มิลลิลิตร เติม mobile phase ประมาณ 15 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 20 นาที เจือจางด้วย mobile phase จนครบปริมาตร กรองผ่านแผ่นกรอง

สารตำรายา ปีที่ 23 ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน 2560 5

nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

Stress test : ซึ่งสารมาตรฐาน sildenafil citrate ประมาณ 5 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน test tube นำมาทำให้สลายตัวในสถานะต่างๆหลังจากนั้น pipet mobile phase ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงใน test tube เขย่าจนละลายหมดกรองสารละลายผ่านแผ่นกรอง nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

สถานะต่างๆที่ทำให้เกิดการสลายตัว(5)

- Moisture : เติมน้ำ 2-3 หยด ผสมให้เข้ากันและนำไปทำให้ร้อนประมาณ 80 °C เวลา 6 ชั่วโมง
- Temperature degradation : นำไปทำให้ร้อนประมาณ 80 °C เวลา 6 ชั่วโมง
- Oxidation : เติม 3% hydrogen peroxide 2-3 หยด ผสมให้เข้ากันและนำไปทำให้ร้อนประมาณ 80 °C เวลา 35 นาที
- Acid hydrolysis : เติม 3 N hydrochloric acid 2-3 หยด ผสมให้เข้ากันและนำไปทำให้ร้อนประมาณ 80 °C เวลา 6 ชั่วโมง แบ่งมาทำให้เป็นกลางด้วย Sodium hydroxide solution ก่อนฉีดเข้า HPLC
- Basic hydrolysis : เติม 5 N Sodium hydroxide 2-3 หยด ผสมให้เข้ากันและนำไปทำให้ร้อนประมาณ 80 °C เวลา 6 ชั่วโมง แบ่งมาทำให้เป็นกลางด้วย hydrochloric acid solution ก่อนฉีดเข้า HPLC
- Photolysis : นำตัวอย่างไปฉายแสงโดยวางใต้หลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิดเดไลท์ 8 ชั่วโมง
- Blank สำหรับทดสอบการเร่งการสลายตัวของยา sildenafil citrate ในสถานะ oxidation, acid hydrolysis และ basic hydrolysis เตรียมเหมือนกับการเตรียมการทดสอบในแต่ละสถานะดังกล่าว ยกเว้นไม่ใส่สารมาตรฐาน

การวิเคราะห์

นำ standard solution, sample solution1, sample solution2 และ standard solution ที่ถูกเร่งให้สลายตัวด้วยสถานะต่างๆ ไปฉีดวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ภายใต้อุณหภูมิตามตารางที่ 1

เกณฑ์การยอมรับ

Peak ของ sildenafil ไม่ถูกรบกวนจาก peak อื่นๆ โดยพิจารณา จากค่า resolution ไม่น้อยกว่า 2.0 และ peak มีความบริสุทธิ์

2. การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

ซึ่งสารมาตรฐาน sildenafil citrate ประมาณ 100 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำ mobile phase ประมาณ 70 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายหมด เจือจางด้วย mobile phase จนครบปริมาตร จากนั้น pipet สารละลายดังกล่าวปริมาตร 3, 4, 5, 6 และ 7 ml แยกใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 20 ml ปรับปริมาตรด้วย mobile phase ซึ่งจะได้สารละลายมาตรฐาน 5 ความเข้มข้นได้แก่ 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 และ 0.35 mg/ml ตามลำดับ ทำการเตรียมความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ กรองสารละลายผ่านแผ่นกรอง nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

การวิเคราะห์

นำ standard solution ทั้ง 5 ความเข้มข้นไปฉีดวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ภายใต้อุณหภูมิตามตารางที่ 1

การคำนวณ

นำค่าพื้นที่ใต้ peak ที่ได้จากการฉีด standard solution แต่ละระดับความเข้มข้นมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและนำไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้ peak แล้วคำนวณหาสมการเส้นตรง ค่าความลาดเอียงของกราฟ (slope) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r)

เกณฑ์การยอมรับ

ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ไม่น้อยกว่า 0.995

3. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

Standard solution : เตรียมเหมือนกับการเตรียม standard solution ในหัวข้อการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี

Sample solution : ทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์โดยการ spiked placebo ที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือ 0.2, 0.25 และ 0.3 โดยชั่ง placebo ให้มีน้ำหนักเทียบเท่ากับน้ำหนักตัวอย่างที่มีตัวยา sildenafil citrate ประมาณ 50 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) และสารมาตรฐาน sildenafil citrate ประมาณ 40, 50 และ 60 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน volumetric flask ขนาด 200 มิลลิลิตร เติม mobile phase ประมาณ 150 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 30 นาที เจือจางด้วย mobile phase จนครบปริมาตร กรองผ่านแผ่นกรอง nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์

นำ standard solution และ sample solution ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นไปฉีดวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ภายใต้อุณหภูมิตามตารางที่ 1

การคำนวณ

คำนวณหา %Recovery ดังนี้

$$\% \text{Recovery} = \frac{\text{ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ใน Spiked placebo}}{\text{ปริมาณสารที่เติมลงไป}} \times 100$$

เกณฑ์การยอมรับ

ค่าเฉลี่ยร้อยละของการกลับคืนอยู่ในช่วง 98.0-102.0 และ %RSD ไม่มากกว่า 2.0

4. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

4.1 ความทวนซ้ำได้ (Repeatability)

Standard solution : เตรียมเหมือนกับการเตรียม standard solution ในหัวข้อการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี

Sample solution : บดเม็ดยาจำนวน 20 เม็ด ชั่งผงยาให้มียา sildenafil citrate ประมาณ 50 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน volumetric flask ขนาด 200 มิลลิลิตร เติม mobile phase ประมาณ 150 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 15 นาที เจือจางด้วย mobile phase จนครบปริมาตร กรองผ่านแผ่นกรอง nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ทำการทดสอบจำนวน 6 ซ้ำ

การวิเคราะห์

นำ standard solution และ sample solution ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ภายใต้อุณหภูมิตามตารางที่ 1

การคำนวณ

คำนวณปริมาณต่อหน่วยของ sildenafil ในแต่ละตัวอย่าง คำนวณค่าเฉลี่ยปริมาณต่อหน่วยและคำนวณค่า relative standard deviation (%RSD)

เกณฑ์การยอมรับ

ค่า relative standard deviation (%RSD) ไม่มากกว่า 2.0

4.2 Intermediate precision

ดำเนินการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบความทวนซ้ำได้โดยเปลี่ยนนักวิเคราะห์ วันที่วิเคราะห์ และเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ (HPLC) คำนวณค่าเฉลี่ยปริมาณต่อหน่วยของ sildenafil และคำนวณค่า relative standard deviation (%RSD)

เกณฑ์การยอมรับ

ค่า relative standard deviation (%RSD) ไม่มากกว่า 2.0

5. การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

ศึกษาผลกระทบต่อการวิเคราะห์ยาจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆของระบบโครมาโทกราฟ คือ คอลัมน์ อัตรากวนของสารละลายตัวพา อุณหภูมิของคอลัมน์และอัตราการไหลของสารละลายตัวพา โดยวิเคราะห์ปริมาณ sildenafil รูปแบบยาเม็ดในสภาวะต่างๆดังกล่าว และศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆที่อาจมีผลกระทบต่อความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ เช่น retention time, tailing factor, theoretical plates เปรียบเทียบกับสภาวะหลักของวิธี

6. การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)

เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 ที่กำหนดให้มีการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด ดังนั้นในการศึกษาจึงทำการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ โดยคำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนทุกแหล่ง และเป็นไปตามแนวทางการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ด้านยาและวัตถุเสพติด(6,7) ความไม่แน่นอนของการวัดเป็นค่ารวมของผลกระทบทั้งหมดที่มีต่อผลทดสอบเชิงปริมาณ โดยแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ปริมาณ sildenafil รูปแบบยาเม็ด พิจารณาได้จากสูตรคำนวณดังนี้

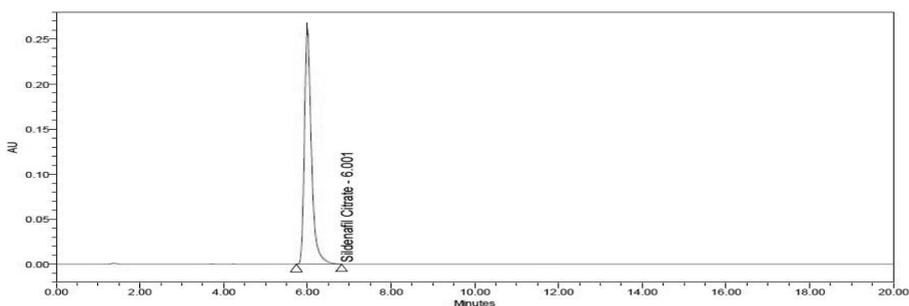
$$\text{ปริมาณ sildenafil (มิลลิกรัมต่อเม็ด)} = \frac{A_u}{A_s} \times \frac{W_{t_{std}}}{V_{20}} \times \frac{P}{100} \times V_{200} \times \frac{474.58}{666.70} \times \frac{Av.Wt/tablet}{Wt. taken}$$

- A_u = พื้นที่ใต้พีค sildenafil ในสารละลายตัวอย่าง
- A_s = พื้นที่ใต้พีค sildenafil ในสารละลายมาตรฐาน
- $W_{t_{std}}$ = น้ำหนักของสารมาตรฐาน (มิลลิกรัม)
- V_{20} = Volumetric flask ขนาด 20 มิลลิลิตร
- P = ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน (% purity)
- V_{200} = Volumetric flask ขนาด 200 มิลลิลิตร
- 474.58 = น้ำหนักโมเลกุลของ sildenafil
- 666.70 = น้ำหนักโมเลกุลของ sildenafil citrate
- Av.Wt/tablet = น้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ด (กรัม)
- Wt. taken = น้ำหนักผงยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ (กรัม)

ผล

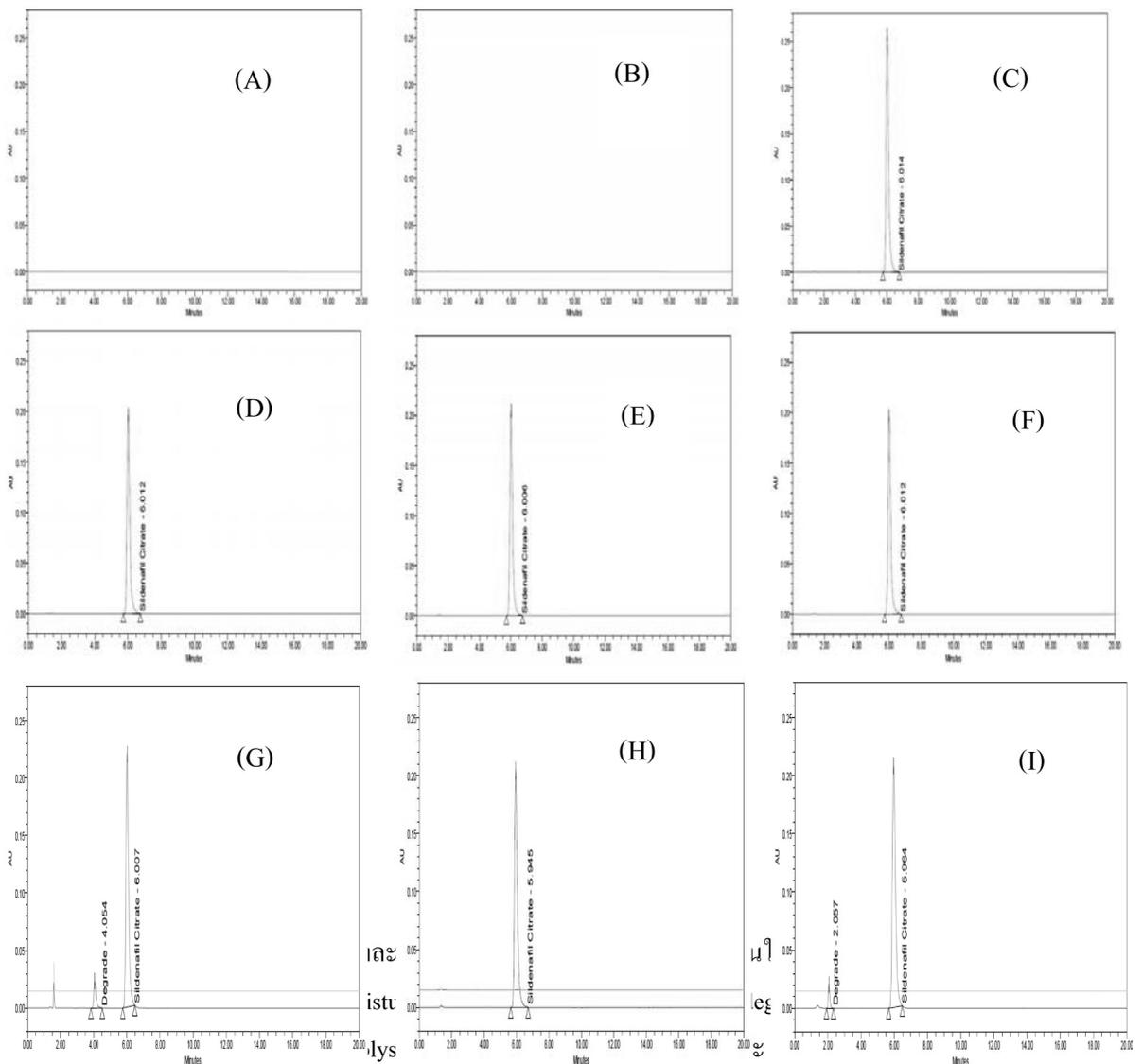
1. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)

ภายใต้สภาวะของระบบโครมาโทกราฟที่พัฒนาขึ้นพบพีคของ sildenafil ที่เวลาประมาณ 6.0 นาที (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน

จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยการฉีด placebo, diluent และ sildenafil citrate ที่เร่งให้เกิดการสลายตัวที่สภาวะต่างๆ เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน sildenafil citrate พบว่าพีคของ sildenafil ไม่ถูกรบกวนจาก diluent และ placebo ดังภาพที่ 3 (A) ถึง 3 (C) สามารถแยกสารสลายตัวของ sildenafil ที่เกิดการสลายตัวจากสภาวะ oxidation และ acid hydrolysis ออกจากพีคของ sildenafil ได้อย่างสมบูรณ์ด้วยค่า resolution เท่ากับ 7.6 และ 15.0 ตามลำดับ ดังภาพที่ 3 (G) และ 3 (I) ตามลำดับ ที่สภาวะ moisture, temperature, photolysis และ basic hydrolysis ตรวจไม่พบสารสลายตัว ดังภาพที่ 3 (D) ถึง 3 (F) และ 3 (H) พีคของ sildenafil บริสุทธิ์ทุกสภาวะการทดสอบดังตารางที่ 2



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของตัวทำละลาย (A), placebo (B), สารมาตรฐานใน placebo (C), สารมาตรฐานในสภาวะเร่งให้เกิดการสลายตัวด้วย moisture hydrolysis (D), temperature degradation (E), photolysis (F), oxidation และ blank (G), basic hydrolysis และ blank (H), acid hydrolysis และ blank (I)

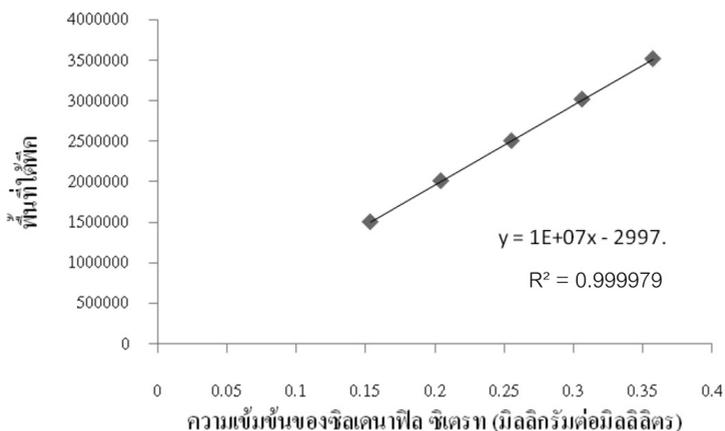
ตารางที่ 2 แสดงสถานะที่ศึกษาการสลายตัวของ sildenafil และสารสลายตัวที่ตรวจพบ

Stress condition	Retention time degraded substances (mins)	degraded substances (%)	Purity of sildenafil peak			Match spectrum of sildenafil		
			Purity Angle	Purity Threshold	Purity Flag	PDA match Angle	PDA match Threshold	PDA match Flag
Moisture	ND*	-	0.032	0.254	no	0.035	1.012	no
Temperature	ND	-	0.035	0.249	no	0.033	1.012	no
Oxidation	4.05	8.06	0.034	0.253	no	0.031	1.013	no
Acid	2.06	4.82	0.033	0.254	no	0.033	1.013	no
Base	ND	-	0.033	0.251	no	0.032	1.013	no
Photolysis	ND	-	0.035	0.250	no	0.041	1.013	no

*Not detected

2. ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

มื่อนิตสารละลายมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 และ 0.35 mg/ml ตามลำดับ พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีคมีลักษณะเป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้นที่วิเคราะห์ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.99999 (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีคของ sildenafil citrate

3. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ผลจากการนิตสารละลาย placebo ที่เติมสารมาตรฐาน sildenafil citrate ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ ร้อยละ 80, 100 และ 120 แสดงค่าร้อยละของการคืนกลับดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ระดับความเข้มข้น (ร้อยละของความ เข้มข้นที่ทดสอบ)	ปริมาณ สารมาตรฐานที่เติม (มิลลิกรัม)	ปริมาณ สารมาตรฐานที่ ตรวจพบ (มิลลิกรัม)	ร้อยละ ของการคืนกลับ	ค่าเฉลี่ย	%RSD
80	44.57	44.66	100.19	99.98	0.20
	42.14	42.12	99.96		
	44.98	44.88	99.78		
	52.00	52.03	100.07		
100	50.68	50.69	100.02	100.00	0.08
	50.93	50.89	99.91		
120	60.98	60.82	99.74	99.79	0.14
	61.36	61.33	99.95		
	61.93	61.74	99.69		
ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ 99.92 0.16					

4. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

4.1 ความทวนซ้ำได้ (Repeatability)

ผลการนิตสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นประมาณ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 6 ตัวอย่าง โดยคำนวณหาปริมาณของ sildenafil ต่อเม็ด และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความทวนซ้ำได้

ตัวอย่างที่	ปริมาณ sildenafil (มิลลิกรัมต่อเม็ด)
1	90.99
2	91.33
3	91.55
4	91.34
5	91.40
6	91.31
เฉลี่ย	91.32
%RSD	0.20

4.2 Intermediate precision

เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่าง 1 สูตรตำรับ โดยเปลี่ยนแปลง วันที่ เครื่องมือและนักวิเคราะห์ ผลการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบ Intermediate precision

รายการ ที่ทดสอบ	ปริมาณ sildenafil (มิลลิกรัมต่อเม็ด)									
	1	2	3	4	5	6	เฉลี่ย	%RSD	เฉลี่ย	%RSD
นักวิเคราะห์ที่ 1 เครื่องที่ 1	90.99	91.33	91.55	91.34	91.40	91.31	91.32	0.20	91.5367	0.32
นักวิเคราะห์ที่ 2 เครื่องที่ 2	91.51	91.82	91.60	91.65	92.11	91.82	91.75	0.23		

5. การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

การทดสอบความทนของวิธีโดยเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆของระบบโครมาโทกราฟี วิเคราะห์ปริมาณ sildenafil รูปแบบยาเม็ดที่สภาวะต่างๆดังกล่าว และศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆที่มีผลกระทบต่อความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี เช่น retention time, tailing factor, theoretical plates เปรียบเทียบกับสภาวะหลักของวิธี ผลการทดสอบดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความทนของวิธี

สภาวะของระบบโครมาโทกราฟี		ผลการทดสอบความทนของวิธี				
		Retention time	Theoretical plates	Tailing factor	ปริมาณซิลเดนาฟิล (มิลลิกรัมต่อเม็ด)	
					ค่าเฉลี่ย (n = 6)	%RSD
HPLC column	No.1*	6.18	6609	1.4	91.32	0.20
	No.2	10.95	6553	1.1	91.41	0.17
อุณหภูมิของ column (°C)	25	6.72	5983	1.5	91.27	0.18
	30*	6.18	6609	1.4	91.32	0.20
	35	5.71	7207	1.3	91.25	0.11
Flow rate (ml/minute)	1.0	7.40	7398	1.5	91.39	0.16
	1.2*	6.18	6609	1.4	91.32	0.20
	1.4	5.30	5982	1.3	91.25	0.22
MeOH : Buffer	55:45	9.99	7016	1.5	91.29	0.30
	60:40*	6.18	6609	1.4	91.32	0.20
	65:35	4.12	6255	1.4	91.25	0.38

*หมายถึง สภาวะหลักของระบบโครมาโทกราฟีที่ใช้เปรียบเทียบเมื่อเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ

6. การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดของวิธีวิเคราะห์ ได้แหล่งที่มาของความไม่แน่นอนดังนี้ จากการซึ่งสารมาตรฐานและตัวอย่าง เครื่องแก้ววัดปริมาตรที่ใช้ สัญญาณการตรวจวัดของเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ และ ความทนซ้ำได้ของวิธี (repeatability) ผลการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ ได้ค่าความไม่แน่นอนเท่ากับ 0.8520 และค่าความไม่แน่นอนขยาย ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (k = 2) เท่ากับ 1.7% เมื่อผลตรวจวิเคราะห์ปริมาณ sildenafil เท่ากับ 92.6% ของปริมาณที่แจ้ง ดังนั้นจึงรายงานผลการตรวจวิเคราะห์เป็น $92.6 \pm 1.7\%$ ของปริมาณที่แจ้ง ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ sildenafil รูปแบบยาเม็ด

Components	Value, xi	Unit	Standard uncertainty, u(xi)	Relative standard uncertainty, u(xi)/xi
1. Standard				
Wstd	6.270	mg	0.000000502	0.0000000801
Volumetric flaskstd	20	ml	0.067330033	0.0033665020
Peak area (As)	3035732	-	5123.6	0.0000168776
Purity	-	-	-	-
2. Sample				
Av. Wt/unit	0.50991	g	0.000000794	0.0000015581
Wsample	0.25915	g	0.000007778	0.0000300142
Volumetric flasksample	200	ml	0.351188458	0.0017555942
Peak area (Au)	3247599.5	-	2711	0.0008347700
3. Repeatability				
	91.32	mg/tablet	0.745624	0.0081649750
Sumsquare relative standard uncertainty				0.0000846298
Combine standard uncertainty				0.0091994440
Standard uncertainty (Uc): 0.0091994440 x 92.62			0.8520837940	
Expanded uncertainty (U): k = 2, 2 x 0.8520837940				1.7041675890
Report value: 92.6 ± 1.7% la.				

วิจารณ์

เนื่องจากยังไม่มีวิธีวิเคราะห์ยาเม็ด sildenafil ในตำรายาของประเทศสหรัฐอเมริกา (USP 39) หรือ ตำรายาของประเทศสหราชอาณาจักร (BP 2017) หรือตำรายาอื่นที่รัฐมนตรีประกาศ จึงยังไม่มีวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าว นอกจากนี้ยังไม่เคยสำรวจคุณภาพของยาเม็ด sildenafil ที่มีในประเทศไทย ประกอบกับผู้มีส่วนเกี่ยวข้องในการจัดหาจากโรงพยาบาลต่างๆที่ต้องการทราบคุณภาพยา sildenafil ดังนั้นสำนักยาและวัตถุเสพติดจึงได้คัดเลือกยาดังกล่าวเพื่อตรวจคุณภาพในโครงการสร้างหลักประกันคุณภาพและมาตรฐานบริการด้านยา ประจำปีงบประมาณ 2560 และทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อรองรับโครงการดังกล่าว

วิธีวิเคราะห์ปริมาณ sildenafil ที่พัฒนาขึ้นนี้คือวิธีโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูงโดยใช้คอลัมน์ชนิด hypersil Gold C18 ขนาด 4.6- x 150- มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สารละลายตัวพาประกอบด้วยส่วนผสมของ methanol และ 0.01 M ammonium acetate ในอัตราส่วน 60 : 40 โดยปริมาตร อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด PDA ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

ดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณด้วย sildenafil ตามแนวทาง ICH-Q2 (R1) พบว่าวิธีมีความจำเพาะเจาะจง ไม่พบการรบกวนการวิเคราะห์จาก diluent, placebo และสารละลายตัวของ sildenafil ที่เกิดจากการเร่งให้สลายตัวด้วยสภาวะต่างๆ ที่สภาวะ oxidation พบสารสลายตัว และ sildenafil ที่ retention time เท่ากับ 4.1 และ 6.0 นาที ตามลำดับ ค่า resolution เท่ากับ 7.6 และแต่ละพีคมีความบริสุทธิ์ ที่สภาวะ acid hydrolysis พบสารสลายตัว

และ sildenafil ที่ retention time เท่ากับ 2.1 และ 6.0 นาที ตามลำดับ ค่า resolution เท่ากับ 15.0 แต่ละพีคมีความบริสุทธิ์ บ่งชี้ว่าสารละลายตัวอย่างได้สภาวะ oxidation และ acid hydrolysis ไม่รบกวน peak ของ sildenafil ที่สภาวะ moisture, temperature, photolysis และ basic hydrolysis ตรวจไม่พบสารละลายตัวและ peak ของ sildenafil มีความบริสุทธิ์

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ พบว่า มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.15-0.35 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.99999 อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ

การทดสอบความแม่นยำของวิธี พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของการกลับคืนที่ 3 ระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วง 99.7-100.0 ค่าเฉลี่ยรวมเท่ากับ 99.9 และ %RSD เท่ากับ 0.2 อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ

การทดสอบความเที่ยงของวิธี ผลการทดสอบความทวนซ้ำได้ และ intermediate precision พบว่า %RSD เท่ากับ 0.2 และ 0.3 ตามลำดับ อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ

การทดสอบความทนของวิธี โดยเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ คือ คอลัมน์ อุณหภูมิ อัตราส่วนของสารละลายตัวพา และอัตราการไหลของสารละลายตัวพาเปรียบเทียบกับสภาวะหลักของวิธี พบว่าการเปลี่ยนแปลงสภาวะดังกล่าวไม่มีผลกระทบต่อ การตรวจวิเคราะห์ปริมาณด้วย sildenafil โดยพิจารณาจาก %RPD ซึ่งไม่มากกว่า 2.0 บ่งชี้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น มีความทนต่อสภาวะที่เปลี่ยนแปลง

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 ที่กำหนดให้ การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดและต้องสามารถรายงานค่าความไม่แน่นอนของผลการทดสอบได้หากเป็น ความต้องการของลูกค้า จากการประเมินค่าความไม่แน่นอนในการวิเคราะห์ปริมาณ sildenafil รูปแบบยาเม็ดด้วยวิธี ที่พัฒนาขึ้นได้ค่าความไม่แน่นอนเท่ากับ 0.8520 และค่าความไม่แน่นอนขยาย ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($k = 2$) เท่ากับ 1.7%

สรุป

วิธีวิเคราะห์ปริมาณด้วย sildenafil ในยาเม็ด โดยวิธี HPLC ประกอบด้วย คอลัมน์ชนิด Hypersil Gold C18 ขนาด 4.6×150 -มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สารละลายตัวพาประกอบด้วย ส่วนผสมของ methanol และ 0.01 M ammonium acetate ในอัตราส่วน 60 : 40 โดยปริมาตร อัตราการไหลของ สารละลายตัวพา 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด PDA ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นวิธีที่ ได้ตรวจสอบความถูกต้องตามแนวทาง ICH-Q2 (R1) พบว่ามีความจำเพาะเจาะจง แม่นยำ ถูกต้อง สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ sildenafil ในยาเม็ดได้ตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

1. สุรศักดิ์ วิชัยโย, สุวิษญ์ เจียมโสมสิต. การสำรวจการใช้ยาในโรคห่อนสมรรถภาพทางเพศ [วารสารออนไลน์]. 2549; [สืบค้น 5 ส.ค. 2557] :[42 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL:<http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/service-research-special-abstract.php?num=41&year=2549>
2. Chemical structure of sildenafil, [cited 2015 Apr 27]; [2 screens]. Available from : URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sildenafil>
3. พระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 และฉบับแก้ไขเพิ่มเติม ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ยาควบคุมพิเศษ ฉบับที่ 35 (พ.ศ. 2551) ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 125 ตอนพิเศษ 173 ง (วันที่ 5 พฤศจิกายน 2551)

4. International Conference on Harmonization of Technical Requirement for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Geneva: ICH Steering Committee; 2005.
5. จูไรรัตน์ รัควาทิน. การศึกษาความคงสภาพของตัวยา. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2539. หน้า 67-73.
6. สุวรรณ จารุณูช และคณะ. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550. หน้า 22-31.
7. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549. หน้า 77-86.

**Semi-quantification of aggregate in erythropoietin pharmaceutical formulations
using size exclusion chromatography/SDS-PAGE/Western Blotting**

Yanika Rattanasuwan*

Pinyapat Tansin*

Boontarika Boonyapiwat*

Abstract Aggregate in erythropoietin (EPO) products may cause lower activity, anaphylactoid reaction and important adverse drug reactions in patients. The quantification of aggregate by using size exclusion chromatography (SEC) is a test item recommended in British Pharmacopoeia 2016 (BP) for erythropoietin product; however, the method cannot be used to analyze the aggregate in EPO containing human serum albumin due to the interference between albumin and aggregate peaks. The combination of three methods (SEC/SDS-PAGE/Western Blotting) was studied to analyze aggregate in EPO samples. SEC was employed to prepare 2% aggregate standard, which is the limit of aggregate for EPO production stated in BP. SDS-PAGE/Western Blotting was used for semi-quantitating aggregate in EPO samples by comparing the density of aggregate bands with that of 2% aggregate standard. The results showed that the method was specific to the aggregate in EPO samples as there was no band appearing for the human serum albumin. In this study, three EPO samples were used. Two EPO samples contained albumin, while another did not consist of albumin. The aggregate in all three EPO samples was 0.42, 0.33 and 0.27%, respectively. It demonstrated that the aggregate in three EPO products conformed to the limit of BP 2016. The results of the study confirmed that the method was reliable and applicable for semi-quantitation of aggregate in EPO sample with and without human serum albumin.

Keywords: Erythropoietin, Size exclusion chromatography, SEC, SDS-PAGE, Western Blotting, aggregate, dimers and related substances of higher molecular mass

บทคัดย่อ การเกาะกลุ่ม (aggregate) ในยาอีริโทรโพอิดินเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ความแรงของยาลดลง และยังทำให้เกิดปฏิกิริยา anaphylactoid รวมถึงอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาแก่ผู้ป่วย การตรวจวิเคราะห์ปริมาณ aggregate ตามตำราฟาร์มาโคเปียของ สหราชอาณาจักร ระบุให้ใช้หลักการโครมาโทกราฟีโดยแยกตามขนาดโมเลกุล ซึ่งหัวข้อวิเคราะห์นี้เป็นหนึ่งในหัวข้อการตรวจวิเคราะห์สำหรับยาอีริโทรโพอิดิน อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่สามารถใช้เพื่อวิเคราะห์ยาอีริโทรโพอิดินที่มีอัลบูมินเป็นส่วนประกอบในตำรับได้ เนื่องจาก peak ของอัลบูมินซ้อนทับกับ peak ของ aggregate ดังนั้นในการศึกษานี้จึงนำเทคนิควิธีการวิเคราะห์จำนวน 3 วิธีการมาใช้ ได้แก่เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแยกตามขนาดโมเลกุลสำหรับการเตรียมสารมาตรฐาน aggregate ที่ 2% ซึ่งเป็นค่าการยอมรับสูงสุดให้มีได้ในผลิตภัณฑ์ยาอีริโทรโพอิดินที่กำหนดในฟาร์มาโคเปีย เทคนิค SDS-PAGE และ เทคนิค Western Blotting สำหรับการวิเคราะห์กึ่งปริมาณโดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของแถบ aggregate ในตัวยาอีริโทรโพอิดินกับสารมาตรฐาน aggregate ที่ 2% ผลการวิเคราะห์พบว่า วิธีนี้มีความจำเพาะต่อ aggregate ของอีริโทรโพอิดิน ซึ่งไม่ปรากฏแถบของอัลบูมินเกิดขึ้น สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างยาอีริโทรโพอิดิน 3 ตัวอย่าง โดย 2 ใน 3 ตัวอย่างเป็นยาอีริโทรโพอิดินที่มีอัลบูมินในสูตรตำรับ และอีกหนึ่งตัวอย่างที่ไม่มีอัลบูมิน ผลการทดสอบตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่างพบว่า มีปริมาณ aggregate ที่ 0.42 0.33 และ 0.27% ตามลำดับ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างยาอีริโทรโพอิดิน 3 ตัวอย่างนี้มีปริมาณ aggregate เป็นไปตามมาตรฐานตำรายาของ สหราชอาณาจักร อีกทั้งวิธีนี้มีความน่าเชื่อถือและสามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์กึ่งปริมาณเพื่อหา aggregate ในตัวยาอีริโทรโพอิดินในสูตรตำรับทั้งชนิดที่มีและไม่มีอัลบูมินเป็นองค์ประกอบ

Introduction

Recombinant human erythropoietin (rhEPO), one of blockbuster biotechnological medicines, is a well-known glycoprotein hormone that regulates red blood cell formation(1, 2). Storage in inadequate physicochemical environment conditions such as high temperature can induce the formation of aggregate(3). The aggregate in EPO formulation is a possible cause of pure red cell aplasia, a fatal adverse drug reaction for EPO treatment(4). In addition, EPO aggregate may cause lower activity and anaphylactoid reaction(5, 6). Size exclusion chromatography (SEC) is recommended by British Pharmacopoeia (BP) to test dimers and related substances of higher molecular mass or aggregate in erythropoietin products(7). However, the SEC method could not be applied to analyze aggregate in erythropoietin products containing human serum albumin as a stabilizer due to the interference of albumin with aggregate peaks(7, 8). Moreover, the SEC method for the determination of aggregate in BP suggests the usage of UV detector at wavelength 280 nm which is unspecific with erythropoietin because it is a general optical absorption for all proteins including human albumin(9). Nowadays, more than 90% of EPO products in Thai pharmaceutical markets contain human serum albumin in their formulations. Therefore, SEC/SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)/Western Blotting was studied to quantify aggregate in EPO formulation. The method is based on SDS-PAGE/Western Blotting technique to solve the albumin interference problem. SDS-PAGE is a common method of separating compounds based on their molecular weights, and Western Blotting is an important analytical technique which is used to transfer protein from SDS polyacrylamide gel to an adsorbent membrane and detect protein of interest by specific antibody(10). The utilization of these three combined analytical methods has not been reported for the determination of aggregate in erythropoietin products.

Materials and Methods

Chemical and reagents

Disodium hydrogen phosphate, potassium dihydrogen phosphate, sodium hydroxide, sodium chloride, hydrochloric acid 37% were purchased from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). Potassium chloride was from Merck (Massachusetts, USA). SDS, bromophenol blue, glycine, tris, 30% acrylamide/bis solution (37.5:1), isopropanol, 2-mercaptoethanol, TEMED, ammonium persulfate, Tris, tween-20, nonfat dry milk, blotting filter paper, colorimetric AP substrate reagent kit, and Goat Anti-Mouse IgG-AP Conjugate (secondary antibody) were obtained from Bio-Rad Laboratories LTD. (California, USA). Nitrocellulose blotting membrane and molecular weight markers were from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Glycerol was bought from Sigma-Aldrich (Missouri, USA). Mouse monoclonal antibody to erythropoietin (primary antibody) was from R&D Systems, Inc. (Minnesota, USA). Erythropoietin standard was obtained from European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care, EDQM). Erythropoietin samples were received from the EPO import companies.

Size exclusion chromatography for preparation of aggregate standard

- Preparation of aggregate standard

Aggregate or dimers and related substance of higher molecular weight (DSHW) standard of EPO was prepared at the same concentration as tested samples by using reconstituted erythropoietin BRP standard with mobile phase and heated at 55 °C for 7 days.

- Preparation of mobile phase

Mobile phase consisted of 8.1 mM of disodium hydrogen phosphate, 1.5 mM of potassium dihydrogen phosphate and 4 M of sodium chloride at pH 7.4.

- Chromatographic condition

A liquid chromatography system, 214 nm UV detector was performed for size exclusion high performance liquid chromatograph method. A TSK gel G3000 SWXL column (30 cm x 7.8 mm, 5 µm particle size) with TSK gel SWXL Type guard column (4 cm x 6 mm, 7 µm particle size) was used for separation. To get the appropriate consequences, isocratic mobile phase at flow rate 0.5 ml/minute was used. SEC-HPLC was used to quantify the %DSHW standard. Afterwards, heated EPO was diluted to obtain 2%DSHW standard which is the limit of aggregate in erythropoietin injection stated in British Pharmacopoeia 2016(7).

Semi-quantification of by SDS-PAGE/Western Blotting

- SDS-PAGE

Resolving and stacking gels were prepared at the concentrations of 12.5 and 4% (w/v), respectively. The resolving gel mixture (2 gels) consisted of 4.125 ml of 30% acrylamide/bis solution (37.5:1), 2.5 ml of 2 M Tris buffer at pH 8.8, 100 µl of 10% (w/v) SDS, 3.225 ml of water, 100 µl of 10% (w/v) ammonium persulfate and 10 µl of TEMED. The stacking gel (2 gels) contained 1.32 ml of 30% acrylamide/bis solution (37.5:1), 2.5 ml of 0.5 M Tris buffer at pH 6.8, 100 µl of 10% (w/v) SDS, 6.0 ml of water, 50 µl of 10% (w/v) ammonium persulfate and 10 µl of TEMED. 5x sample buffer (10 ml) contained 1.2 ml of Tris-HCl pH 6.8, 2.5 ml of glycerol, 2 ml of 10% (w/v) SDS, 0.5 ml of 2-mercaptoethanol, 1 ml of 1% (w/v) bromophenol blue and 2.8 ml of water. Running

buffer was composed of 14.42 g of glycine, 3 g of Tris and 1 g of SDS dissolving to the volume of water at 1000 ml. The EPO sample, DSHW standard at 2%, EPO standard or human serum albumin was mixed with 5x sample buffer at ratio of 4:1. The mixture was heated at 100 °C for 6 minutes before loading into gel. The gel was run in a chamber containing the running buffer at 200 Volt until the dye-front was about 5 mm from the bottom.

- Western Blotting

The protein on the polyacrylamide gel was then transferred onto nitrocellulose membrane by using the Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell at 100 Volt for 1 hour. The ratios of primary and secondary antibody and incubation periods in Western Blotting step were performed according to our previous study(11). The blotted nitrocellulose membrane was firstly incubated with primary and secondary antibodies at ratios of 1:400 and 1:1000, respectively. The incubation period for each primary and secondary antibody was 60 minutes. The immunoreactivity of antibody and specific protein was detected using the AP conjugate substrate kit. The density of aggregate bands in EPO samples was measured for the reflective density comparing with that of aggregate band of 2% DSHW standard by using GS-900 Calibrated Densitometer (Bio-Rad Laboratories LTD., California, USA).

Results and discussion

Quantification of EPO Aggregation by Size-exclusion Chromatography

Size-exclusion chromatography (SEC) is a technique for separating protein mixtures depending on their molecular sizes, therefore, SEC was applied to quantify the amount of DSHW standard in term of percentage. The SEC chromatograms showed that the peaks of DSHW standard and monomer appeared at retention time of 17.78 and 19.86 minutes, respectively (Figure 1). The resolutions between these two peaks for all six injections (1.47 ± 0.036) were more than 0.8, which were in line with the acceptance criteria of BP 2016(7). The resolution values proved that the EPO monomer could be well separated from the DSHW peak. The relative standard deviation (RSD) of six injections was 7.09, which was less than the RSD limit of BP 2016 at 10%. The aggregate standard was quantified and diluted with mobile phase to attain DSHW at 2%, which is the limit suggested in BP 2016 for erythropoietin drug product.

Semi-quantification of DSHW in EPO formulation by SDS-PAGE/Western Blotting

When human serum albumin was run on the SDS-PAGE/Western Blotting (Lane 2, Figure 2), it had no band appearing on the membrane. This proved that the antibodies used in the experiment was specific to the protein of interest. Additionally, an EPO sample containing human serum albumin (Lane 4) and 2% DSHW (Lane 3) visually displayed 1 and 2 bands, consecutively (Figure 2). An EPO sample demonstrated a monomer EPO band at molecular weight between 31-38 kDa, which conform to the molecular weight of EPO structure. On the other hand, 2% DSHW lane contained a monomer EPO band and an aggregate band at molecular weight between 52-76 kDa (Figure 2). One aggregate band shown on the SDS-PAGE/Western Blotting in the 2% DSHW lane (Lane 3) conformed to one peak of aggregate occurring in the chromatogram of SEC-HPLC (Figures 1 and 2).

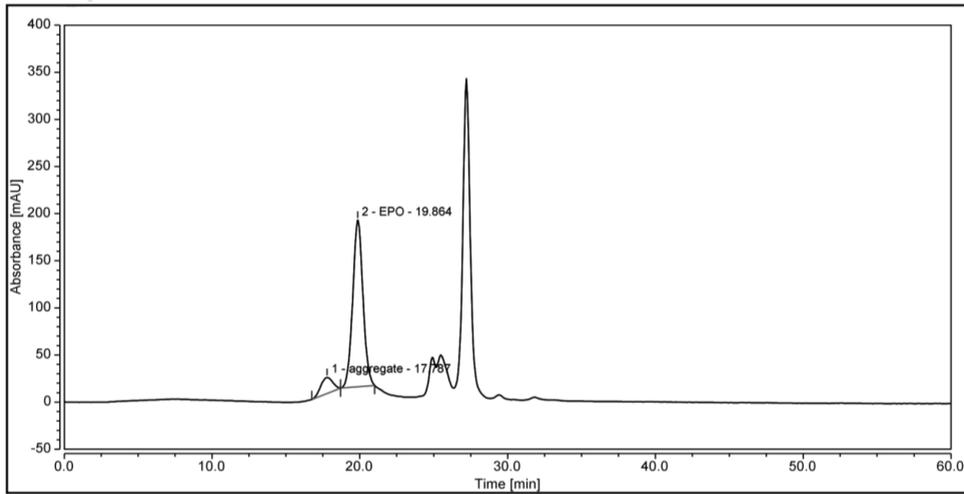


Figure 1 SEC-HPLC Chromatogram of aggregate(1) and monomer EPO(2)

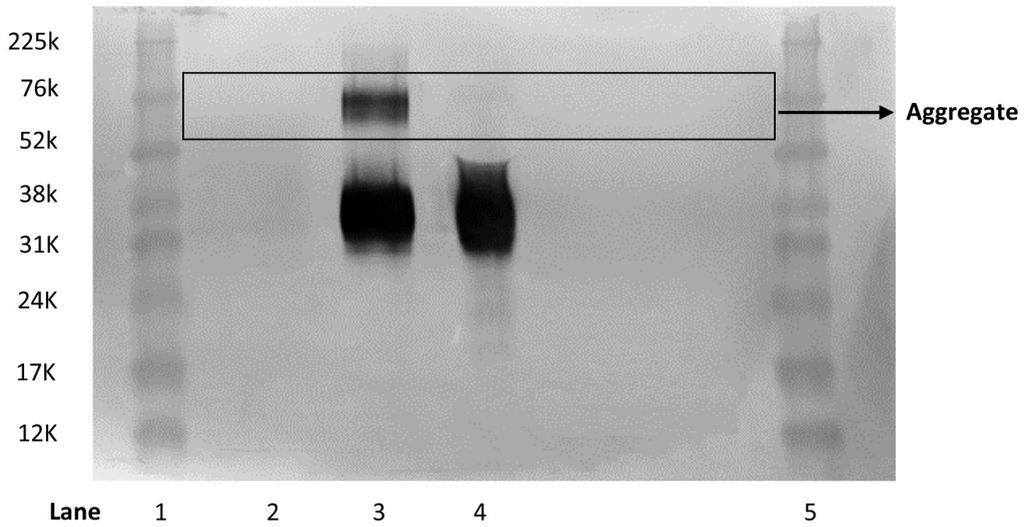


Figure 2 SDS-PAGE/Western Blotting: (Lane 1 and 5) Molecular Weight Marker; (Lane 2) Human Serum Albumin; (Lane 3) 2% DSHW; (Lane 4) EPO Sample containing human serum albumin

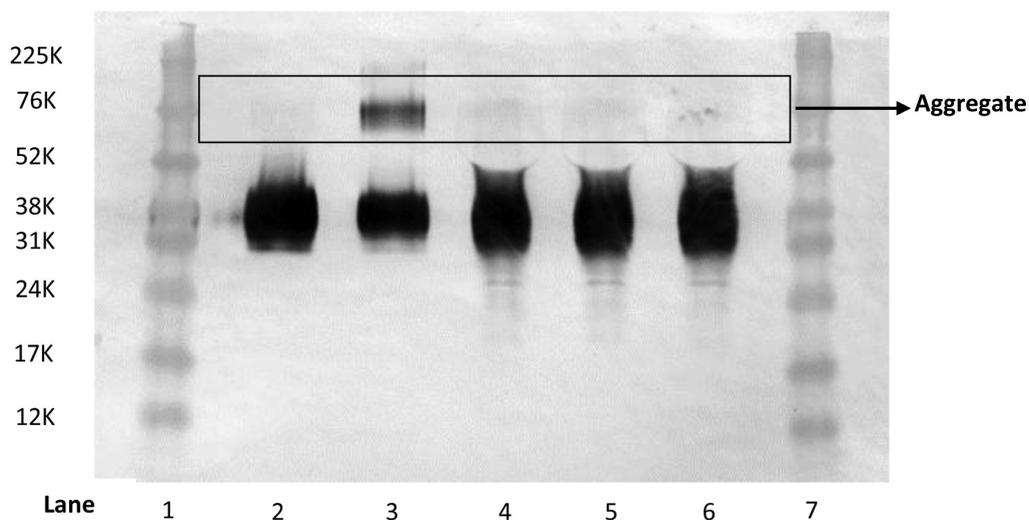


Figure 3 SDS-PAGE/Western Blotting: (Lane 1 and 7) Molecular weight marker; (Lane 2) Unheated EPO Standard; (Lane 3) 2% DSHW; (Lane 4-5) EPO Sample Brand 1-2 (with human serum albumin), (Lane 6) EPO Sample Brand 3 (without human serum albumin)

Table 1 Reflective density measurement for aggregate in unheated EPO standard, 2% DSHW and three EPO samples from SDS-PAGE/Western Blotting in Figure 3

Sample	Unheated EPO standard (Lane 2)	2% DSHW (Lane 3)	EPO Sample Brand 1 (Lane 4)	EPO Sample Brand 2 (Lane 5)	EPO Sample Brand 3 (Lane 6)
Reflective density of aggregate band	8.18	1741.74	364.29	286.03	238.04

The aggregate band of unheated EPO standard was not visible, while those of all three EPO samples slightly appeared on the blotting (Figure 3). It was clear that the aggregate band of 2% DSHW visually displayed the highest density band comparing to other aggregate bands of unheated EPO standard and samples (Figure 3). However, when the density values of aggregate bands were measured using Calibrated Densitometer, it demonstrated that the density of unheated EPO standard, 2% DHSW and all three EPO samples (Brands 1-3) was 8.18, 1741.74, 364.29, 286.03 and 238.04, respectively (Table 1). Aggregation of protein naturally occurs under the tropical climate; thus, the stabilizer is commonly added into the formulation to prevent this problem. The density of unheated EPO standard could be recorded by densitometer since the EPO standard was dissolved with mobile phase, which did not contain any stabilizer. Even though the EPO standard was reconstituted with mobile phase for a short period of time before performing the experiment, it was possible that the aggregate was produced with low quantity until it could not be visually noticed. The density of aggregate bands for all three EPO samples was lower than that of 2% DSHW;

consequently, it confirmed that the aggregate in all samples was lower than 2%. Furthermore, the aggregate in all EPO samples (Brands 1-3 or Lanes 4-6), calculated in terms of percentage by comparing with that of 2% DSHW, was 0.42, 0.33 and 0.27%, respectively. The results proved that all EPO samples conformed to the limit by BP 2016.

Conclusion

The SEC/SDS-PAGE/Western Blotting has an advantage as it can solve the interference problem of albumin and aggregate peaks using only SEC method. The combined method is specific and reliable to detect the aggregate of EPO. Therefore, the SEC/SDS-PAGE/Western Blotting can be used as a method for semi-quantitation of aggregate in EPO formulation with and without human serum albumin. It can be concluded that the technique is suitable to determine the aggregate of EPO products in Thai pharmaceutical markets.

Acknowledgement

Bureau of Drug and Narcotic (Department of Medical Sciences, Thailand) for funding.

References

1. Chang, S.H., Kim, H.J. and Kim C.W. 2013. Analysis of the structure and stability of erythropoietin by pH and temperature changes using various LC/MS. *Korean Chemical Society*. 34(9): 2663-2670.
2. Jelkmann, W. 2013. Chapter 10 - Recombinant human erythropoietin and its analogues. *Introduction to biological and small molecule drug research and development* [Online]. [Cited 2017 Apr 25]. Available from: URL: <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-397176-0.00010-8>.
3. Jerome, R., Nicole, C., Kai-Uwe, E. 2004. Anti-erythropoietin antibodies and pure red cell aplasia. *Journal of the American Society of Nephrology*. 15: 398-406.
4. Andreas, S., Otmar, H., Marleen, R., Robert, F., Stephan, B., Britta, D., Martin H., Jorg, W., Nicole, A., Gerad, M.L., and Lain, M. 2012. Tungsten-induced denaturation and aggregation of epoetin alfa during primary packaging as a cause of immunogenicity. *Pharmaceutical Research*. 29(6): 1454-1467.
5. Arakawa, T., Philo, J.S., Ejima, D., Tsumoto, K., and Arisaka, F. 2006. Aggregation analysis of therapeutic proteins, Part 1. *BioProcess International*. 4(10): 42-43.
6. Endo, Y., Nagai, H., Watanabe, Y., Ochi, K., and Takagi, T. 1992. Heat-induced aggregation of recombinant erythropoietin in the intact and deglycosylated states as monitored by gel permeation chromatography combined with a low-angle laser light scattering technique, *The Journal of Biochemistry*. 112(5): 700-706.
7. *British Pharmacopoeia*. 2016. Her Majesty's Stationary Office. London. (Electronic version)
8. Wilczynska, J. D., Roman, I. and Anuszevska, E. 2005. The separation of EPO from other proteins in medical products formulated with different stabilizers, *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 62(3): 177-82.
9. Aitken, A. and Learmonth, M.P. 2002. Protein determination by UV absorption [Online]. [Cited 2017 June 20]. Available from: URL: <https://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-169-8%3A3>

10. Kurien, B.T. and Scofield, R.H. 2006. Western blotting, *Methods*. 38(4): 283-293.
11. กองแผนงานและวิชาการ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. สรุปการประชุมวิชาการงานคืบม ครองผู้บริโภคด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 เรื่อง “Health Products Regulation Beyond ASEAN Community 2015”. กรุงเทพฯ: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2015.

นักวิทยาศาสตร์การแพทย์เกียรติยศ ประจำปี 2560

มูลนิธิกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ริเริ่มให้มีการจัดตั้งรางวัลนักวิทยาศาสตร์การแพทย์เกียรติยศขึ้นเป็นปีแรกในปี พ.ศ. 2558 และได้มีดำริให้จัดตั้งรางวัลนี้อย่างต่อเนื่อง เพื่อเชิดชูเกียรติบุคลากรในวงการวิทยาศาสตร์การแพทย์ ผู้มีผลงานด้านงานวิเคราะห์ งานวิจัย และงานมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ด้านใดด้านหนึ่งเป็นหลัก และอุทิศตนเป็นประโยชน์ต่อวงการวิทยาศาสตร์การแพทย์อันเป็นที่ประจักษ์ มีการสรรหารายชื่อโดยไม่จำกัดหน่วยงาน ทั้งภาครัฐและเอกชน ซึ่งการคัดเลือกได้ดำเนินงานโดยคณะกรรมการคัดเลือกบุคคลเพื่อรับรางวัลนักวิทยาศาสตร์การแพทย์เกียรติยศ ที่แต่งตั้งโดยมูลนิธิกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ผู้ที่ได้รับรางวัลนักวิทยาศาสตร์การแพทย์เกียรติยศ ประจำปี พ.ศ. 2560 ได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์พลรัตน์ วิไลรัตน์ ในโอกาสนี้วารสารสารตำรายา จึงขอเชิดชูเกียรติโดยการนำประวัติและผลงานด้านวิชาการที่สำคัญของท่านมาเผยแพร่ให้ผู้อ่านได้รับทราบ ในฐานะที่ท่านเป็นผู้อุทิศตนด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในงานวิจัยโรคมะเร็ง โดยเฉพาะผลการวิจัยโรคแทรกซ้อนในมะเร็งชนิดรุนแรง และการพัฒนายาสูตรผสมที่มีผลต่อการรักษาและการป้องกันอันเป็นประโยชน์อย่างกว้างขวางในประเทศไทยและทั่วโลก ควรค่าแก่ผู้อ่านทุกท่านที่จะใช้เป็นแบบอย่างในความมุ่งมั่นทำงานด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ของตนต่อไป

ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์พลรัตน์ วิไลรัตน์

ประวัติส่วนตัว

เกิดวันที่ 24 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2503

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2527 แพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยมหิดล

พ.ศ. 2533 วว. (อายุรศาสตร์) แพทยสภา

พ.ศ. 2543 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (อายุรศาสตร์เขตร้อน) มหาวิทยาลัยมหิดล

ประวัติรับราชการ

พ.ศ. 2534-2536 อาจารย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน

พ.ศ. 2536-2539 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน

พ.ศ. 2539-2541 รองศาสตราจารย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน

พ.ศ. 2541-2547 ศาสตราจารย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน

พ.ศ. 2547-2555 ศาสตราจารย์ ระดับ 11 ภาควิชาอายุรศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน

พ.ศ. 2555-ปัจจุบัน ศาสตราจารย์ได้รับเงินเดือนขั้นสูง (พนักงานมหาวิทยาลัย) ภาควิชาอายุรศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน

ตำแหน่งอื่นๆ

พ.ศ. 2550-ปัจจุบัน หัวหน้าหน่วยโรคเขตร้อนภาวะวิกฤต ภาควิชาอายุรศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

พ.ศ. 2559-ปัจจุบัน ผู้อำนวยการโรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

สิ่งที่ภาคภูมิใจ

ภูมิใจที่ได้มีส่วนในการศึกษาวิจัยโรคมาลาเรีย ทำให้การรักษาผู้ป่วยมาลาเรียทั่วโลกและในประเทศไทยดีขึ้น จำนวนผู้ป่วยที่เป็นมาลาเรียและผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากมาลาเรียทั่วโลกและในประเทศไทยลงมาก เมื่อเทียบกับ 20 ปีที่ผ่านมา

คติในการทำงาน

ทำงานให้ดีที่สุด

เครื่องราชอิสริยาภรณ์

พ.ศ. 2551 มหาวชิรมงกุฏ

พ.ศ. 2554 มหาปรมาภรณ์ช้างเผือก

รางวัลและเกียรติบัตรที่เคยได้รับ

พ.ศ. 2539 รางวัลมหาวิทยาลัยมหิดล ประเภทดีเด่น สาขาการวิจัย

พ.ศ. 2542 รางวัลผลงานวิจัยดีเยี่ยม สภาวิจัยแห่งชาติ (ร่วมรับรางวัล)

พ.ศ. 2548 Award of Medicines for Malaria Venture (MMV) Project of the Year 2005 สำหรับ Outstanding Contribution to Pyronaridine Artesunate Combination Development Program, Switzerland

พ.ศ. 2555 รางวัลอายุรแพทย์ดีเด่นด้านวิชาการ ราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย

ผลงานเด่น

1. ผลงานวิจัยโรคมาลาเรีย

ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์พลรัตน์ วิไลรัตน์ เป็นศาสตราจารย์รุ่นใหม่ที่มีความรู้และความเชี่ยวชาญเป็นอย่างสูงด้านโรคมาลาเรียที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศไทย

มาลาเรียเป็นโรคเขตร้อนที่เกิดจากปรสิตที่มีความสำคัญมากที่สุดในโลก เนื่องจากในแต่ละปีมีผู้ป่วยมาลาเรียปีละประมาณ 200 ล้านคน และเสียชีวิตปีละเกือบ 1 ล้านคน จะเห็นได้ว่าไม่มีโรคจากปรสิตตัวใดที่ทำให้คนเจ็บป่วยและเสียชีวิตได้มากเท่ามาลาเรีย มาลาเรียยังคงเป็น 1 ใน 5 โรคที่ทำให้ประชากรเจ็บป่วยมากเป็นอันดับต้นๆ ของโลก (อันได้แก่ ปอดบวม ท้องร่วง HIV วัณโรค และมาลาเรีย)

ในประเทศไทยมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญของประเทศ ในแต่ละปีมีผู้ป่วยนับหมื่นคน นอกจากนี้บริเวณชายแดนไทย-กัมพูชาก็ถือว่าเป็นบริเวณที่มีเชื้อมาลาเรียค้ำยมากที่สุดในโลก ในประวัติศาสตร์ของเชื้อมาลาเรียที่ค้ำยาก็มักจะเริ่มบริเวณนี้และกระจายไปบริเวณอื่นๆของโลก ดังนั้นการควบคุมการรักษาของมาลาเรียในประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณชายแดนไทย-กัมพูชา จึงมีความสำคัญมากที่องค์กรอนามัยโลกและกระทรวงสาธารณสุขประเทศไทยให้ความเอาใจใส่มาโดยตลอด

ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์พลรัตน์ วิไลรัตน์ ได้ทุ่มเทตลอดระยะเวลาอันยาวนานกว่า 20 ปี ในการศึกษาวิจัยโรคมาลาเรีย ทั้งทางด้านพยาธิกำเนิด พยาธิสภาพ พยาธิสรีรวิทยาของโรคมาลาเรีย ตลอดจนการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียที่ดื้อยา

ในการศึกษาวิจัยด้านพยาธิกำเนิด พยาธิสภาพ พยาธิสรีรวิทยาของโรคมาลาเรีย ได้ศึกษาพบว่าในผู้ป่วยมาลาเรียรุนแรงบางรายจะมี gram-negative septicemia ร่วมด้วย เชื่อว่าเชื้อบางส่วนมาจากลำไส้ (bacterial translocation) ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์พลรัตน์ วิไลรัตน์ และคณะได้วิจัยพบว่าในผู้ป่วยมาลาเรียรุนแรงมีการเพิ่มขึ้นของการซึมผ่านของลำไส้มากขึ้น (increased intestinal permeability)(1) ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุทำให้เกิด gram-negative bacteremia ในผู้ป่วยมาลาเรียรุนแรงได้ ต่อมองค์การอนามัยโลกได้แนะนำ guidelines (WHO, 2010)(2) การรักษามาลาเรียใหม่โดยแนะนำให้ antibacterial drugs ร่วมด้วยในผู้ป่วยมาลาเรียรุนแรงที่มีช็อคหรืออาการทรุดลง เพื่อป้องกัน/รักษา bacterial sepsis ที่อาจเกิดร่วมได้ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาพบว่าในผู้ป่วยมาลาเรียที่มีดีซ่าน (jaundice) มักพบร่วมกับภาวะแทรกซ้อนของมาลาเรียอื่นๆ(3) เช่น ไตวาย น้ำท่วมปอด ช็อค ดังนั้น ถ้าพบผู้ป่วยมาลาเรียที่มีดีซ่าน จะต้องหาว่ามีภาวะแทรกซ้อนของมาลาเรียอย่างอื่นร่วมด้วยเสมอ ในปัจจุบันองค์การอนามัยโลกถือว่าการพบดีซ่าน (ร่วมกับภาวะแทรกซ้อนมาลาเรียอื่นๆ) เป็น criteria อันหนึ่งของมาลาเรียรุนแรง (WHO 2000, 2006, 2010, 2012, 2014)(2,4-7) และยังพบว่าในผู้ป่วยมาลาเรียรุนแรงจะมี microsomal metabolism ของตับลดลง(8) ดังนั้นการให้ยาที่ผ่าน hepatic microsomal metabolism ในผู้ป่วยมาลาเรียรุนแรงควรต้องปรับยา

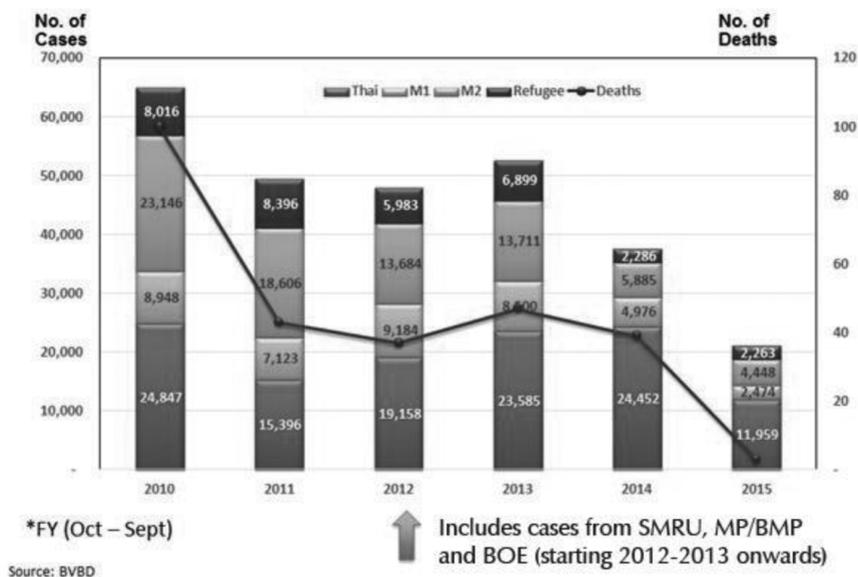
ในการศึกษาวิจัยด้านการรักษา ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์พลรัตน์ วิไลรัตน์ ได้ร่วมกับคณะผู้วิจัยจากหน่วยโรคเขตร้อนในภาวะวิกฤตศึกษาค้นคว้าสูตรรักษามาลาเรียหลายสูตรเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาและลดการดื้อยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มที่ผสมกับ artemisinin (artemisinin combination therapy; ACT) โดยคณะผู้วิจัยที่มีศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์พลรัตน์ วิไลรัตน์ เป็นผู้ร่วมวิจัยร่วมกับ ศาสตราจารย์นายแพทย์ศรัชย์ หล่อริย์สุวรรณ อดีตหัวหน้าคณะวิจัย (เสียชีวิตแล้ว) ได้รายงานประสิทธิภาพที่ดีเยี่ยมของยา artesunate ร่วมกับ mefloquine ในการรักษาผู้ป่วยฟัลซิพาริมมาลาเรียอันเป็นรายงานแรกของโลกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2535 (Lancet 1992;339:821-4)(9) ซึ่งต่อมอค์การอนามัยโลกและกระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทยได้นำไปใช้เป็น guidelines (WHO 2006, 2010)(2,5) ในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียอย่างกว้างขวางทำให้ผู้ป่วยมาลาเรียและผู้ป่วยมาลาเรียที่เสียชีวิตทั่วโลกและในประเทศไทยลดลงมากอย่างเห็นได้ชัด และสามารถป้องกันการดื้อยาได้ดี(10,11)*

นอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2551 (Korean J Parasitol 2008;46:65-70)(12) ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์พลรัตน์ วิไลรัตน์ และคณะผู้วิจัยจากคณะเวชศาสตร์เขตร้อน ได้วิจัยพบว่าการใช้ ACT ในการรักษาฟัลซิพาริมมาลาเรียโดยไม่ให้ single dose of primaquine เมื่อรักษาด้วย ACT ดังที่องค์การอนามัยโลกแนะนำใน guidelines ในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรีย ปี พ.ศ. 2549 (ค.ศ. 2006)(5) อาจไม่สามารถป้องกันการแพร่กระจายของโรคโดย gametocytes ได้ดีพอเนื่องจาก หลังให้ ACT ครบแล้ว 3 วันโดยไม่ให้ single dose of primaquine พบว่ายังมี gametocytes อยู่ในกระแสเลือดหลายวันบางรายพบ gametocytes ในเลือดนานถึง 1 เดือนหลังให้ ACT ซึ่งผู้ป่วยอาจแพร่กระจายเชื้อโรคต่อไปได้จากถูกยุงก้นปล่องกัด ถ้าผู้ป่วยอยู่ในพื้นที่ที่มีมาลาเรียระบาด ต่อมาในปี พ.ศ. 2553 (ค.ศ. 2010)(2) องค์การอนามัยโลกได้เปลี่ยน guidelines ในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียใหม่ โดยให้ single dose of primaquine พร้อมกับให้ ACT และแนะนำให้ใช้ทั่วโลก(2,13)

*ข้อมูลจากองค์การอนามัยโลกระบุว่า ในปี พ.ศ. 2533 (ค.ศ. 1992) ก่อนที่จะมีการศึกษา ACT ครั้งแรกของโลกในปี พ.ศ. 2535 (Lancet 1992;339:821-4) พบผู้ป่วยมาลาเรียทั่วโลกประมาณ 285 ล้านคน และเสียชีวิตประมาณ 1-2 ล้านคน(10); จากนั้นในปี พ.ศ. 2549 (ค.ศ. 2006) องค์การอนามัยโลกแนะนำให้ใช้ ACT ทั่วโลก; ในปีพ.ศ. 2555 (ค.ศ. 2012) พบผู้ป่วยมาลาเรียทั่วโลกลดลงเหลือประมาณ 198 ล้านคน และเสียชีวิตประมาณ 584,000 คน(1)

เป็นที่ประจักษ์ว่า ผลการศึกษาวิจัยของ ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์พลรัตน์ วิไลรัตน์ และคณะ มีผลต่อความเข้าใจโรคมาลาเรียรุนแรงและไม่รุนแรงมากขึ้น ตลอดจนมีผลต่อการรักษาและการควบคุมการระบาดของมาลาเรียทั่วโลกและประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถลดอัตราป่วยและเสียชีวิตจากมาลาเรียลงได้มาก เป็นคุณูปการแก่วงการวิทยาศาสตร์การแพทย์ และสาธารณสุขของโลกและของประเทศไทยอย่างยิ่ง

Confirmed malaria cases and deaths (FY 2010-July 2015)



จำนวนผู้ป่วยมาลาเรียและผู้ป่วยมาลาเรียที่เสียชีวิตในประเทศไทยลดลงมากนับตั้งแต่มีการนำ artemisinin combination therapy (ACT) มาใช้ในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียในประเทศไทย (M1 = ผู้ป่วยมาลาเรียและเป็นต่างชาติที่อยู่ในประเทศไทยตั้งแต่ 6 เดือนขึ้นไป; M2 = ผู้ป่วยมาลาเรียและเป็นต่างชาติที่อยู่ในประเทศไทยน้อยกว่า 6 เดือน)

ข้อมูลจาก: สำนักควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลง กระทรวงสาธารณสุข (BVBD)

2. หนังสือวิชาการ การรักษาผู้ป่วยมาลาเรียในประเทศไทย

ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์พลรัตน์ วิไลรัตน์ ได้รับเชิญจากราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย ให้ร่วมนิพนธ์แนวทางเวชปฏิบัติในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรีย ในประเทศไทย พ.ศ. 2557(14) โดยนิพนธ์ร่วมกับสำนักโรคติดต่อฯ นำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งหนังสือเล่มนี้สำหรับแพทย์และอายุรแพทย์ใช้ในการดูแลรักษาผู้ป่วยมาลาเรียทั่วประเทศ

3. ร่วมพัฒนาการรักษาโรคมาลาเรียรุนแรง

ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์พลรัตน์ วิไลรัตน์ และนักวิจัยอื่น ๆ จากคณะเวชศาสตร์เขตร้อน ได้รับการขอคุณจากองค์การอนามัยโลก (WHO) ในการวิจัยพัฒนายา rectal artesunate จนกระทั่ง United States Food and Drug Agency (USFDA) ยอมรับจดทะเบียนว่า rectal artesunate เป็นยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียที่ฉุกเฉินได้

4. ผลงานวิจัยและตีพิมพ์

ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์พลรัตน์ วิไลรัตน์ มีผลงานวิจัยและบทความวิชาการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการและหนังสือวิชาการนานาชาติระหว่าง ปี ค.ศ.1991-2017 ในชื่อ Polrat Wilairatana จากฐานข้อมูล Scopus จำนวน 187 เรื่อง มี h-index = 34; มีการอ้างอิง (Time cited) ตั้งแต่ ค.ศ. 1991-2017 = 3,947 ครั้ง (ณ วันที่ 15 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2560)

เรียบเรียงโดย ญญ.ศศิวิมล พัสเสมา

เอกสารอ้างอิง

1. Wilairatana P, Meddings JB, Ho M, Vannaphan S, Looareesuwan S. Increased gastrointestinal permeability in patients with *Plasmodium falciparum* malaria. Clin Inf Dis 1997;24:430-5.
2. WHO. Guidelines for the treatment of malaria, 2nd edition. Geneva: WHO; 2010.
3. Wilairatana P, Looareesuwan S, Charoenlarp P. Liver profile changes and complications in jaundiced patients with falciparum malaria. Trop Med Parasitol 1994; 45: 298-302.
4. WHO. Severe falciparum malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000;94 (suppl 1).
5. WHO. Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: WHO; 2006.
6. WHO. Management of severe malaria: practical handbook. Geneva: WHO; 2012.
7. WHO. Severe malaria. Trop Med Int Health 2014;19 (suppl 1).
8. Wilairatana P, Looareesuwan S, Vanijanonta S, Viravan C, Charoenlarp P, Wittayalertpunya S. Hepatic metabolism in severe falciparum malaria: caffeine clearance study. Ann Trop Med Parasitol 1994;88:13-9.
9. Looareesuwan S, Virvan C, Vanijanonta S, Wilairatana P, Suntharasamai P, Charoenlarp P, Arnold K, Kyle D, Canfield C, Webster K. Randomised trial of artesunate and mefloquine alone and in sequence for acute uncomplicated falciparum malaria. Lancet 1992;339:821-4.
10. Division of Epidemiological Surveillance and trend assessment, WHO. Global health situation and project estimates. Geneva; 1992.
Available at <http://www.ciesin.org/docs/001-010/001-010c.html#fn16>.
11. WHO. World malaria report 2014. Geneva; 2014: p. x.
Available at http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144852/2/9789241564830_eng.pdf
12. Tangpukdee N, Krudsood S, Srivilairit S, Phophak N, Chonsawat P, Yanpanich W, Kano S, Wilairatana P. Gametocyte clearance in uncomplicated and severe Plasmodium falciparum malaria after artesunate-mefloquine treatment in Thailand. Korean J Parasitol 2008;46:65-70.
13. WHO. Emergency response to artemisinin resistance in the greater Mekong Subregion. Geneva; 2013: p.10.
14. ราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย และกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. (2557). แนวทางเวชปฏิบัติในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรีย ในประเทศไทย พ.ศ. 2557. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

