29.2

พฤษภาคม–สิงหาคม 2566

ISSN 0858-6454

สารตำรายา

Pharmacopoeial Newsletter

กลุ่มจัดทำตำรายาของประเทศไทย

สำนักยาและวัตถุเสพติด

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

สารตำรายา

Pharmacopoeial Newsletter

ที่ปรึกษา สมศักดิ์ สุนทรพาณิชย์, นันทนา สิทธิชัย, นิดาพรรณ เรืองฤทธินนท์

บรรณาธิการอำนวยการ สิริชัย กระบี่ศรี

บรรณาธิการ ศศิวิมล พัฒเสมา

ผู้ช่วยบรรณาธิการ กรวิกา จารุพันธ์, สันติ นิ่มน้อย, ธนิตา ปัทมจินดา, ษษิพิมล บุญทวี

คณะที่ปรึกษาด้านวิชาการ พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์
วรธัช ฐิติกรพงศ์
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เยาวลักษณ์ วรรธนะพิศิษฏ์
สุมนา ศิริสุนทร
สำนักยาและวัตถุเสพติด

เจ้าของ สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

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

วัตถุประสงค์

1. เป็นสื่อเผยแพร่ผลงานของกลุ่มจัดทำตำรายาของประเทศไทย คณะกรรมการจัดทำตำรายาของประเทศไทยและคณะอนุกรรมการที่เกี่ยวข้อง
2. เสนอความก้าวหน้าในการปรับปรุงแก้ไขตำรายาของต่างประเทศและตำรายาของประเทศไทย
3. เผยแพร่ความรู้เรื่องยา วิทยาศาสตร์การแพทย์และวิชาการที่เกี่ยวข้อง
4. เป็นสื่อกลางในการแสดงความคิดเห็นของผู้ใช้และผู้จัดทำตำรายาของประเทศไทย

การส่งเรื่องลงพิมพ์ในสารตำรายา

สารตำรายารับจัดพิมพ์บทความประเภทต่างๆ ดังนี้

1. **นิพนธ์ต้นฉบับ (Original Article)** เป็นรายงานผลการวิจัยด้านเภสัชศาสตร์ แพทยศาสตร์ วิทยาศาสตร์การแพทย์ และวิทยาศาสตร์ทั่วไปที่ยังไม่เคยพิมพ์ที่ใดมาก่อน

2. **บทความปริทัศน์ (Review Article)** เป็นบทความที่เรียบเรียงจากผลงานด้านวิทยาศาสตร์ที่เคยพิมพ์มาแล้ว กล่าวถึงความก้าวหน้าของเรื่องนั้นโดยเฉพาะ

3. **รายงานวิจัยสั้น (Short Communications)** เป็นบทความที่เรียบเรียงจากรายงานผลทางห้องปฏิบัติการด้านเภสัชศาสตร์ แพทยศาสตร์ วิทยาศาสตร์ และวิทยาศาสตร์ทั่วไปที่ยังไม่เคยพิมพ์ที่ใดมาก่อน

4. **ภาคสาระสังเขป (Abstract)** เป็นการแปลเรื่องย่อของบทความด้านวิทยาศาสตร์ที่พิมพ์แล้วและเป็นเรื่องที่มีสาระสำคัญน่าสนใจ

5. **ข่าววิทยาศาสตร์ (Scientific News)** เป็นบทความสั้นๆ เกี่ยวกับวิทยาศาสตร์ทั่วไปที่กำลังอยู่ในความสนใจ

6. **ปกิณกะ (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. การอ้างอิงเอกสารให้ใช้หมายเลขกำกับ 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, 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

สารตำรายาปีที่ 29 ฉบับที่ 2 ขอนำเสนอบทความนิพนธ์ต้นฉบับ 3 เรื่อง เรื่องแรกเป็นเรื่องการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อตรวจเอกลักษณ์ ยาแก้ปวด 14 ชนิด ในเภสัชผลิตภัณฑ์ โดย ภญ.ปฏิมา มณีสถิตย์ และนางสาวอิศรา บุญมี โดยการศึกษานี้ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจเอกลักษณ์ยาแก้ปวดได้พร้อมกันจำนวน 14 ชนิด ได้แก่ Aspirin, Paracetamol, Tramadol HCl, Piroxicam, Orphenadrine citrate, Naproxen sodium, Diclofenac sodium, Indomethacin, Tolperisone HCl, Eperisone HCl, Chlorzoxazone, Methocarbamol, Ibuprofen และ Mefenamic acid ซึ่งสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจเอกลักษณ์ยาแก้ปวดทั้ง 14 ชนิดได้ ทั้งในผลิตภัณฑ์ยาแผนปัจจุบันและยาแผนโบราณ โดยจะช่วยลดเวลาและงบประมาณในการตรวจพิสูจน์ลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนเรื่องที่สองเป็นเรื่องการพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในการหาปริมาณโพลีซอร์เบต 80 ในผลิตภัณฑ์ยานิโมทูซูแมบ โดย ภญ.ชนิดา กานต์ประชา ซึ่งการหาปริมาณของ polysorbate80 มีมากมายหลากหลายเทคนิค การตรวจจับละอองที่มีประจุ หรือ CAD เป็นหนึ่งในเทคนิคที่ได้รับการยอมรับโดยเทคนิคการตรวจวัดนี้จะไม่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างทางเคมีของสารที่ทำการวิเคราะห์ จึงสามารถตรวจวิเคราะห์สารได้หลากหลายชนิดรวมถึง polysorbate80 ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสาร polysorbate โดยใช้ CAD และตรวจสอบความถูกต้อง โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ polysorbate80 ในผลิตภัณฑ์ nimotuzumab และอาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้กับสูตรยาอื่นๆ ได้ ส่วนเรื่องที่สามเป็นเรื่องการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจเอกลักษณ์กลุ่มยาแก้แพ้ 5 ชนิด ในผลิตภัณฑ์ยาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดย ภญ.ปฏิมา มณีสถิตย์ และนางสาวอิศรา บุญมี การศึกษานี้ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจเอกลักษณ์ยาต้านฮีสทามีนได้พร้อมกัน จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ chlorpheniramine, diphenhydramine, promethazine, hydroxyzine และ cetirizine สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจเอกลักษณ์ยาต้านฮีสทามีนทั้ง 5 ชนิดได้ ในผลิตภัณฑ์ยาแผนปัจจุบัน โดยจะช่วยลดเวลาและงบประมาณในการตรวจพิสูจน์ลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนผลการศึกษานิพนธ์ต้นฉบับทั้งสามเรื่องจะเป็นเช่นไรนั้น เชิญติดตามอ่านได้ในวารสาร

สุดท้ายนี้คณะบรรณาธิการวารสารสารตำรายาขอขอบคุณผู้ทบทวน (Reviewer) ที่ได้พิจารณา ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะต้นฉบับบทความก่อนลงตีพิมพ์เผยแพร่ ขอขอบคุณผู้เขียนทุกท่าน ที่เผยแพร่ผลงานเพื่อเป็นวิทยาทาน รวมทั้งผู้อ่านทุกท่านที่สนับสนุนมาโดยตลอด หากพบข้อผิดพลาดประการใดทางคณะบรรณาธิการฯ ต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

สารบาญ

นิพนธ์ต้นฉบับ Original Article

<< การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อตรวจเอกลักษณ์ยาแก้ปวด 14 ชนิด ในเภสัชผลิตภัณฑ์
(Development and Validation of an HPLC Method for Identifying 14 Analgesic Drugs in Pharmaceutical Products)…….…….....…… 1

<< Analytical Method Development and Validation of Polysorbate 80 Concentration in Nimotuzumab Products
(การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในการหาปริมาณโพลีซอร์เบต 80 ในผลิตภัณฑ์ยานิโมทูซูแมบ)……..…….…. 23

<< การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจเอกลักษณ์กลุ่มยาแก้แพ้ 5 ชนิด ในผลิตภัณฑ์ยาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
(Method development and Validation for Identification of 5 Antihistamine Drugs in Pharmaceutical Products by HPLC)….....41

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original Article

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อตรวจเอกลักษณ์ยาแก้ปวด 14 ชนิด ในเภสัชผลิตภัณฑ์

(Development and Validation of an HPLC Method for Identifying 14 analgesic drugs in pharmaceutical products)

*ปฏิมา มณีสถิตย์**

*อิศรา บุญมี**

Abstract Data analysis from the Bureau of Drug and Narcotic, Ministry of Health, Thailand, revealed a significant number of the samples submitted for legal proceedings were adulterated or counterfeit analgesics. Various types of analgesics have been detected in these samples. As each type of analgesic requires a distinct identification method, considerable time and budget are often expended in the analysis. To address this challenge, a new method was developed to simultaneously test for and identify 14 different types of analgesic drugs (aspirin, paracetamol, tramadol HCl, piroxicam, orphenadrine citrate, naproxen sodium, diclofenac sodium, indomethacin, tolperisone HCl, eperisone HCl, chlorzoxazone, methocarbamol, ibuprofen and mefenamic acid) using high performance liquid chromatography (HPLC). Chromatographic conditions were performed on an L7 column (4.6 × 250 mm, 5µm) using acetonitrile and 50mM Monobasic ammonium phosphate (pH 5.0) as a mobile phase in gradient mode with a flow rate of 1.0 ml/min. Detection was done using UV-Vis spectrometry at a wavelength of 254 nm. All of sample solutions were prepared with50% acetonitrile. Validation results indicated that the specificity test found no interference among the peaks of the different analgesic drugs. The resolution was greater than 2.0 for each drug (except one). The limit of detection (LOD) for these analgesics ranged from 0.4 to 36 µg/ml across four matrices: tablets, pills, herbal infusions and traditional mixtures. In conclusion, this developed analytical method is suitable as a standard identification test for wide range of analysis drugs in both modern and traditional formulations.

Keywords: analgesic, high performance liquid chromatography, analytical method development, identification.

*สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ ตามข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ของสำนักยาและวัตถุเสพติด กระทรวงสาธารณสุขประเทศไทย เผยว่าตัวอย่างส่งตรวจเพื่อการดำเนินคดีนั้น มีจำนวนไม่น้อยเป็นหรือปลอมปนยาแก้ปวด ยาแก้ปวดที่ตรวจพบมีหลายชนิด แต่ละชนิดมีวิธีการตรวจเอกลักษณ์ต่างกัน ทำให้ต้องใช้เวลาและงบประมาณมากในการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นจึงพัฒนาวิธีที่สามารถตรวจเอกลักษณ์ยาแก้ปวดได้พร้อมกันจำนวน 14 ชนิด (Aspirin, Paracetamol, Tramadol HCl, Piroxicam, Orphenadrine citrate, Naproxen sodium, Diclofenac sodium, Indomethacin, Tolperisone HCl, Eperisone HCl, Chlorzoxazone, Methocarbamol, Ibuprofenและ Mefenamic acid) โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ซึ่งระบบของ HPLC ประกอบด้วย คอลัมน์ L7 (4.6 × 250 mm, 5µm) สารละลายตัวพาเป็นระบบ Gradient ประกอบด้วย Acetonitrile และ 50mM Monobasic ammonium phosphate, pH 5.0 อัตราการไหล 1.0 ml/min ตรวจวัดด้วยคลื่นแสงที่ 254 nm โดยสารละลายตัวอย่างเตรียมใน 50% Acetonitrile ผลการทดสอบความเฉพาะเจาะจง พบว่าวิธีมีความจำเพาะเจาะจงกับยาแก้ปวดทั้ง 14 ชนิด ค่า Resolution ของตัวยาแต่ละชนิด (ยกเว้น 1 ชนิด) มากกว่า 2.0 และมีความไวในการตรวจพบในตัวอย่าง ยาเม็ด ยาลูกกลอน ยาชงสมุนไพร และยาน้ำแผนโบราณ โดย Limit of detection (LOD) อยู่ในช่วง 0.4-36 µg/ml จากผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจเอกลักษณ์ยาแก้ปวด ในผลิตภัณฑ์ยาแผนปัจจุบัน และยาแผนโบราณได้

กุญแจคำ : ยาแก้ปวด,โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง,การพัฒนาวิธีวิเคราะห์, การตรวจเอกลักษณ์

บทนำ ยาแก้ปวดโดยทั่วไปมีหลายชนิด ตั้งแต่ชนิดที่เป็นยาสามัญประจำบ้านจนถึงแบบที่สั่งจ่ายโดยแพทย์ ยาแก้ปวดแต่ละชนิด มีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันในการระงับอาการปวดผลิตภัณฑ์ยาแก้ปวดที่จำหน่ายในท้องตลาดจึงมี หลายยี่ห้อ หลายรูปแบบ หากผลิตภัณฑ์นั้นได้รับอนุญาตผลิตอย่างถูกต้องพอจะมั่นใจได้ว่ามีคุณภาพและความปลอดภัยตามมาตรฐาน แต่ก็มีไม่น้อยที่พบว่ายาแก้ปวดเกี่ยวข้องกับพฤติการณ์การกระทำความผิดต่อพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 (1) เช่น มีการลักลอบผลิตและการจำหน่ายยาแก้ปวดอย่างผิดกฎหมาย หรือมีการใช้ยาแก้ปวดในทางที่ผิด รวมถึงมีการนำยาแก้ปวดไปปลอมปนในผลิตภัณฑ์อื่น เช่น ยาสมุนไพร ยาลูกกลอนหรือยาแผนโบราณ ซึ่งส่วนใหญ่ผู้สูงอายุมักนิยมบริโภคเพื่อลดอาการปวดเมื่อย ตามข้อมูลของสำนักยาและวัตถุเสพติด (2, 3, 4) พบว่ามีตัวอย่างยาของกลางหรือยาต้องสงสัยที่ส่งมาตรวจพิสูจน์ค้นหาหรือยืนยันตัวยาแก้ปวดในหลักฐาน เพื่อดำเนินคดีหรือพิจารณาดำเนินคดีในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก ทำให้ต้องใช้งบประมาณและเวลาค่อนข้างมากในการตรวจพิสูจน์ เนื่องจากการตรวจพิสูจน์ยาแก้ปวดแต่ละชนิดเป็นวิธีเฉพาะตัวของแต่ละตัวยา ดังนั้นสำนักยาและวัตถุเสพติดจึงดำเนินการพัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พร้อมทั้งทดสอบความใช้ได้ของวิธีตามมาตรฐานสากล (5, 6) ให้ได้วิธีใหม่ที่สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจพิสูจน์ยาแก้ปวดหลายตัวยาพร้อมกันในคราวเดียวขึ้น ซึ่งคาดว่าวิธีดังกล่าวจะสามารถช่วยลดเวลาและประหยัดงบประมาณที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์ได้มากขึ้น

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Shimadzu, Japan, Model LC-20 Series
2. pH Meter: Mettler Toledo, Switzerland, Model SevenExcellent
3. Analytical Balance: Mettler Toledo, Switzerland, Model MS3002S/01
4. Analytical Balance: Mettler Toledo, Switzerland, Model XPR205
5. Ultra Microbalance: Mettler Toledo, Switzerland, Model XP2U
6. Ultrasonic Bath: Crest Powersonic, Malaysia, Model P2600D
7. Water Filtration Apparatus: Millipore, America, Model MILLI-Q
8. Column: VertiSep UPS C8 4.6 mm x 250 mm, 5 µm
9. Column:Inertsil C8 4.6x250, 5 µm
10. Column:Zorbax C8 4.6x250, 5 µm
11. Filter: Vertipure, Nylon Syringe Filter 0.45 µm, Vertical Nylon Filter, 0.45 µm, AgelaTechnologie
12. Glass ware Class A

สารมาตรฐานและสารเคมี

1. Aspirin Reference Standard: DMSc. Reference Standard, Code A0108, Control No. 04D63071
2. Paracetamol Reference Standard: DMSc. Reference Standard, Code P0123, Control No. 08B63001
3. Tramadol HCl Working Standard: DMSc. Working Standard, Code T0160, Control No. WS T160-2/60
4. Methocarbamol Reference Standard: USP Reference Standard, Code M0051, Lot No. I0G112
5. Tolperisone HCl: Mydoclam, Unison LaboratoriesCo.,Ltd, Lot 2IS903, MFG 04/09/19, EXP 04/09/22 ใช้ผลิตภัณฑ์ยาเม็ดเนื่องจากไม่มีสารมาตรฐานจำหน่าย โดยทั่วไปสารปรุงแต่งในสูตรตำรับยาเม็ดไม่มีผลต่อการทดสอบ
6. Piroxicam Working Standard: DMSc. Working Standard, Code P0189, Control No. WS P189-3/61
7. Eperisone HCl: Myonal, Eisai Co.,Ltd., Tokyo Japan, Batch No. 96KØ7P, MFG 26/04/19, EXP 25/04/22 ใช้ผลิตภัณฑ์ยาเม็ดเนื่องจากไม่มีสารมาตรฐานจำหน่าย โดยทั่วไปสารปรุงแต่งในสูตรตำรับยาเม็ดไม่มีผลต่อการทดสอบ
8. Chlozoxazone Reference Standard: USP Reference Standard, Code C0049, Lot No. H
9. Orphenadrine Citrate Working Standard: DMSc. Working Standard, Code O030, Control No. WS O030-3/55
10. Naproxen Sodium Reference Standard: DMSc. Reference Standard, Code N0025, Control No. 05B62055
11. Diclofenac Sodium Reference Standard :DMSc. Reference Standard, Code D0077, Control No. 05B63004

12. Indomethacin Reference Standard :DMSc. Reference Standard, Code I0025, Control No. 05A61011
13. Ibuprofen Reference Standard :DMSc. Reference Standard, Code I0004, Control No. 05B62040
14. Mefenamic acid Reference Standard :DMSc. Reference Standard, Code M0035, Control No. 05C62020
15. Acetonitrile, Anhydrous, HPLC Grade, Source: Macron, CAS No.: 75-05-8
16. Monobasic Ammonium phosphate, Analytical Grade, Source: Carlo Erba, CAS No.: 7722-76-1
17. Ammonium hydroxide, Analytical Grade, Source: Carlo Erba, CAS No.: 1336-21-6
18. Buffer solution pH 2 Source: Merck, Lot No.: HC03981033
19. Buffer solution pH 4 Source: Merck, Lot No.: HC91105435
20. Buffer solution pH 7 Source: Merck, Lot No.: HC02388239
21. Water Type I

ตัวอย่างสำหรับใช้เป็น Placebo

1. ยาเม็ด : บริษัท เภสัชกรรมนครพัฒนา จำกัด
2. ยาชงสมุนไพร : ผงสมุนไพรเถาวัลย์เปรียง ตราธันยพรสมุนไพร ร้านตำรับไทย สมุนไพรไทย
3. ยาลูกกลอน : ตราไผ่เขียว แก้ปวดเมื่อย เบอร์ ๒ ร้านไทยจีนโอสถ
4. ยาน้ำแผนโบราณ : ยาน้ำสตรีเบนโล ห้างหุ้นส่วนจำกัดฮุยแลนด์ฟาร์มาซี

วิธีวิเคราะห์

สภาวะของ HPLC ที่ใช้

- Column: Vertisep UPS C8, 4.6 x 250 mm, 5 µm Serial Number 5717
- Flow rate: 1 ml/min
- Injection volume: 10 µl
- Detector: PDA 254 nm
- Run Time: 70 min
- Gradient Method

ตารางที่ 1 แสดงสัดส่วนของสารละลายตัวพาในช่วงเวลาที่กำหนด

Time (min)	Buffer	Acetonitrile
0 – 5	70	30
5.1 -50	58	42
50.1 - 70	70	30

วิธีดำเนินการ

1. การเตรียมสารละลาย

    1.1. การเตรียมสารละลาย50mM Monobasic ammonium phosphate of pH 5.0 (Mobile phase)

    ชั่ง Monobasic Ammonium phosphate 5.75 กรัม ละลายในน้ำ Type I 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 5.0 ด้วย 3M Ammonium hydroxide กรองผ่าน Nylon membrane filter ขนาด 0.45 µm

    1.2. การเตรียมสารละลาย 3M Ammonium Hydroxide

    ตวง Ammonium hydroxide 20 มิลลิลิตร ลงในน้ำ ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร

    1.3. การเตรียมสารละลายสำหรับใช้เป็น Diluent

    ตวง Acetonitrile 500 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำ 500 มิลลิลิตร

2. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)

    2.1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานตั้งต้น (Stock Standard Solution)

    2.1.1. ชั่ง Aspirin RS 10 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

    2.1.2. ชั่ง Paracetamol RS 10 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

    2.1.3. ชั่ง Tramadol HCl RS 50 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

    2.1.4. ชั่ง Methocarbamol RS 10 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 5 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

    2.1.5. ชั่งผงยาเม็ด Tolperisone HCl 150 มิลลิกรัม (มีตัวยา Tolperisone HCl 50 มิลลิกรัม) ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent เมื่อกรองด้วย Vertipure, Nylon Syringe Filter 0.45 µmจะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้นประมาณ0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

    2.1.6. ชั่ง Piroxicam RS 10 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.7. ชั่งผงยาเม็ด Eperisone HCl 160 มิลลิกรัม (มีตัวยา Eperisone HCl 50 มิลลิกรัม) ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent เมื่อกรองด้วย Vertipure, Nylon Syringe Filter 0.45 µmจะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้นประมาณ0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.8. ชั่ง Chlorzoxazone RS 10 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 5 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.9. ชั่ง Orphenadrine citrate RS 50 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.10. ชั่ง Naproxen sodium RS 10 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.11. ชั่ง Diclofenac sodium RS 10 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.12. ชั่ง Indomethacin RS 10 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.13. ชั่ง Ibuprofen RS 50 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.14. ชั่ง Mefenamic acid RS 10 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 5 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard Solution)

2.2.1. ปิเปตสารละลาย Aspirin Stock Solution 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จนครบ 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.2. ปิเปตสารละลาย Paracetamol Stock Solution 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จนครบ 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.3. ปิเปตสารละลาย Tramadol Stock Solution 4 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จนครบ 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.4. ปิเปตสารละลาย Methocarbamol Stock Solution 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จนครบ 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.5. ปิเปตสารละลาย Tolperisone Stock Solution 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จนครบ 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.6. ปิเปตสารละลาย Piroxicam Stock Solution 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จนครบ 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.7. ปิเปตสารละลาย Eperisone Stock Solution 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จนครบ 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.8. ปิเปตสารละลาย Chlorzoxazone Stock Solution 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จนครบ 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.9. ปิเปตสารละลาย Orphenadrine Stock Solution 4 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จนครบ 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.10. ปิเปตสารละลาย Naproxen Stock Solution 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จนครบ 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.11. ปิเปตสารละลาย Diclofenac Stock Solution 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จนครบ 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.12. ปิเปตสารละลาย Indomethacin Stock Solution 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จนครบ 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.13. ปิเปตสารละลาย Ibuprofen Stock Solution 5 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จนครบ 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานความที่มีเข้มข้น 480 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.14. ปิเปตสารละลาย Mefenamic acid Stock Solution 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จนครบ 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.3. การเตรียมสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด (Standard Mix Solution, Std.Mix)

2.3.1. ปิเปต Standard Stock Solution ทั้ง 14 ชนิด โดยแต่ละชนิด ปิเปตเป็นจำนวนเดียวกันกับการปิเปตในหัวข้อ 2.2.1 ถึง 2.2.14 แล้วทั้งหมดใส่รวมกันใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent ครบ 25 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

2.4. การเตรียมสารละลาย Placebo

2.4.1. <u>Placebo ยาเม็ด</u>

ชั่ง Placebo ยาเม็ด 25 มิลลิกรัม ใน Volumetric Flask ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม Diluent นำไป Sonicate ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย Diluent จากนั้นกรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

2.4.2. <u>Placebo ยาชงสมุนไพร</u>

ชั่ง Placebo ยาชงสมุนไพร 25 มิลลิกรัม ใน Volumetric Flask ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม Diluent นำไป Sonicate ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย Diluent จากนั้นกรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

2.4.3. <u>Placebo ยาลูกกลอน</u>

ชั่ง Placebo ยาลูกกลอน 25 มิลลิกรัม ใน Volumetric Flask ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม Diluent นำไป Sonicate ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย Diluent จากนั้นกรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

2.4.4. <u>Placebo ยาน้ำแผนโบราณ</u>

ปิเปต Placebo ยาน้ำแผนโบราณ1 มิลลิลิตรใน Volumetric Flask ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม Diluent นำไป Sonicate ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย Diluent จากนั้นกรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

2.5. การเตรียมสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด และผสม Placebo ชนิดละ 3 ซ้ำ (A,B,C)

2.5.1. Placebo ยาเม็ด

ชั่ง Placebo ยาเม็ด 25 มิลลิกรัม ใน Volumetric Flask ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม Std.Mix นำไป Sonicate ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย Std.Mix จากนั้นกรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

2.5.2. Placebo ยาชงสมุนไพร

ชั่ง Placebo ยาชงสมุนไพร 25 มิลลิกรัม ใน Volumetric Flask ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม Std.Mix นำไป Sonicate ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย Std.Mix จากนั้นกรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

2.5.3. Placebo ยาลูกกลอน

ชั่ง Placebo ยาลูกกลอน 25 มิลลิกรัม ใน Volumetric Flask ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม Std.Mix นำไป Sonicate ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย Std.Mix จากนั้นกรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

2.5.4. Placebo ยาน้ำแผนโบราณ

ปีเปต Placebo ยาน้ำแผนโบราณ 1 มิลลิลิตร ใน Volumetric Flask ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม Std.Mix นำไป Sonicate ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย Std.Mix จากนั้นกรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

วิธีดำเนินการ

1. ฉีด Diluent จำนวน 1 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบbase line และ noise
2. ฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด จำนวน 3 ซ้ำ เพื่อทดสอบความนิ่งของระบบ
3. ฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด และผสม Placebo ชนิดละ 1 ซ้ำ
4. ฉีดคั่นสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด และผสม Placebo ในข้อ 3 ด้วยสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด จำนวน 1 ซ้ำ
5. ฉีดปิดท้ายด้วย สารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด จำนวน 1 ซ้ำ
6. บันทึกค่า Retention time, Resolution, Peak Purity และ %Match

เกณฑ์การยอมรับ

1. Peak ยาแต่ละตัวที่ปรากฏใน Chromatogram ที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด ทั้งที่ผสมและไม่ผสม Placebo ต้องมี Retention time แตกต่างกัน
2. Peak ยาแต่ละตัวที่ปรากฏใน Chromatogram ที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด ต้องมีค่า Resolution ระหว่างตัวยาไม่ต่ำกว่า 2.0
3. Peak ยาแต่ละตัวที่ปรากฏใน Chromatogram ที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด และผสม Placeboต้องมีค่า Peak Purity ไม่น้อยกว่า 0.95
4. Peak ยาแต่ละตัวที่ปรากฏใน Chromatogram ที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด และผสม Placebo เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน ต้องมีค่า %Matching ของ Spectrum ไม่น้อยกว่าร้อยละ 95

3. <u>การทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ (System Suitability)</u>

3.1. การทดสอบความเที่ยงของระบบโครมาโทกราฟ

การเตรียมสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด ตามข้อ 2.3

วิธีดำเนินการ

1. ฉีด Diluent จำนวน 1 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบ base line และ noise
2. ฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด จำนวน 3 ซ้ำ เพื่อทดสอบความนิ่งของระบบ
3. บันทึกค่า Retention time และค่า Resolution

การคำนวณ

1. คำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่า %RSD ของค่า Retention time และค่า Resolution ที่ได้จากการฉีด 3 ซ้ำ

เกณฑ์การยอมรับ

1. ค่า %RSD ของตัวยาทุกตัวต้องไม่เกิน 2.0

4. <u>การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection)</u>

ดำเนินการ โดยการค่อยๆลดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน และของสารละลายมาตรฐานผสม Placebo ลงจนได้ความเข้มข้นต่ำสุดของตัวยาแต่ละตัว ที่สามารถตรวจพบและสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด และสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด และผสม Placebo ตามความเข้มข้นดังกล่าวอีกครั้ง โดยเตรียมชนิดละ 3 ซ้ำ เพื่อทดสอบความแม่นยำของขีดจำกัดการตรวจพบ โดยรายละเอียดของการเตรียมสารละลายทดสอบมีดังนี้

4.1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานตั้งต้น (Stock Standard Solution)

4.1.1. ชั่ง Aspirin RS 2 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.2. ชั่ง Paracetamol RS 2 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.3. ชั่ง Tramadol HCl RS 2 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.4. ชั่ง Methocarbamol RS 2 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.5. ชั่งผงยาเม็ด Tolperisone HCl 6 มิลลิกรัม (มีตัวยา Tolperisone HCl 2 มิลลิกรัม) ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.6. ชั่ง Piroxicam RS 2 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.7. ชั่งผงยาเม็ด Eperisone HCl 6 มิลลิกรัม (มีตัวยา Eperisone HCl 2 มิลลิกรัม) ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.8. ชั่ง Chlorzoxazone RS 2 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.9. ชั่ง Orphenadrine citrate RS 5 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.10. ชั่ง Naproxen sodium RS 2 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.11. ชั่ง Diclofenac sodium RS 2 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.12. ชั่ง Indomethacin RS 2 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.13. ชั่ง Ibuprofen RS 10 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.14. ชั่ง Mefenamic acid RS 2 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard Solution)

4.2.1. ปิเปตสารละลาย Aspirin Stock Solution 2 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.2. ปิเปตสารละลาย Paracetamol Stock Solution 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.3. ปิเปตสารละลาย Tramadol Stock Solution 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.4. ปิเปตสารละลาย Methocarbamol Stock Solution 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.5. ปิเปตสารละลาย Tolperisone Stock Solution 2 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานความที่มีเข้มข้น 0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.6. ปิเปตสารละลาย Piroxicam Stock Solution 7 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานความที่มีเข้มข้น 2.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.7. ปิเปตสารละลาย Eperisone Stock Solution 6 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 2.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.8. ปิเปตสารละลาย Chlorzoxazone Stock Solution 5 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.9. ปิเปตสารละลาย Orphenadrine Stock Solution 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.10. ปิเปตสารละลาย Naproxen Stock Solution 4 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.11. ปิเปตสารละลาย Diclofenac Stock Solution 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.12. ปิเปตสารละลาย Indomethacin Stock Solution 2 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.13. ปิเปตสารละลาย Ibuprofen Stock Solution 9 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 36 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.14. ปิเปตสารละลาย Mefenamic acid Stock Solution 2 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.3. การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด (Standard Mix Solution, Std.Mix)

4.3.1. ปิเปต Standard Stock Solution ทั้ง 14 ชนิด โดยแต่ละชนิด ปิเปตเป็นจำนวนเดียวกันกับการปิเปตในหัวข้อ 4.2.1 ถึง 4.2.14 แล้วทั้งหมดใส่รวมกันใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent ครบ 50 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 μm

4.4. การเตรียมสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด และผสม Placebo ชนิดละ 3 ซ้ำ (A,B,C)

4.4.1. Placebo ยาเม็ด

ชั่ง Placebo ยาเม็ด 25 มิลลิกรัม ลงใน Volumetric Flask ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม Std.Mix นำไป Sonicate ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย Std.Mix จากนั้นกรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

4.4.2. Placebo ยาชงสมุนไพร

ชั่งยาชงสมุนไพร 25 มิลลิกรัม ลงใน Volumetric Flask ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม Std.Mix นำไป Sonicate ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย Std.Mix จากนั้นกรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

4.4.3. Placebo ยาลูกกลอน

ชั่ง Placebo ยาลูกกลอน 25 มิลลิกรัม ลงใน Volumetric Flask ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม Std.Mix นำไป Sonicate ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย Std.Mix จากนั้นกรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

4.4.4. Placebo ยาน้ำแผนโบราณ

ปีเปตยาน้ำแผนโบราณ 1 มิลลิลิตร ลงใน Volumetric Flask ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม Std.Mix นำไป Sonicate ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย Std.Mix จากนั้นกรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

วิธีดำเนินการ

1. ฉีด Diluent จำนวน 1 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบ base line และ noise
2. ฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด จำนวน3 ซ้ำ เพื่อทดสอบความนิ่งของระบบ
3. ฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด และผสม Placebo ชนิดละ 1 ซ้ำ
4. ฉีดคั่นสารละลายในข้อ 3 ทุก ๆ 2 ซ้ำ ด้วยสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด จำนวน 1 ซ้ำ
5. ฉีดปิดท้ายด้วย สารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด จำนวน 1 ซ้ำ
6. บันทึกค่า Signal to noise ratio, Retention time, Resolution, Peak Purity และ %Matching

เกณฑ์การยอมรับ

1. Signal to noise ratio ของ Peak ตัวยาแต่ละตัว ที่ปรากฏใน Chromatogram ที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด และสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด และผสม Placebo ต้องไม่น้อยกว่า 3.0

2. Peak ยาแต่ละตัวที่ปรากฏใน Chromatogram ที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด และสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิดและผสม Placeboต้องมีค่า Peak Purity ไม่น้อยกว่า 0.95
3. Peak ยาแต่ละตัวที่ปรากฏใน Chromatogram ที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด และสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด และผสม Placeboเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานต้องมีค่า %Matching ของ Spectrum ไม่น้อยกว่าร้อยละ 95

5. <u>การศึกษาความคงทนของวิธี (Robustness)</u>

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน และสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิดตามข้อ 2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี

การศึกษาความคงทนของวิธี ประกอบด้วย 2 วิธีการ

1. ความยาวคลื่นในการตรวจวัด: จาก 254 นาโนเมตร เปลี่ยนเป็น 252 และ 256 นาโนเมตร
2. คอลัมน์: จาก Vertisep UPS C8, 4.6 × 250 mm, 5 µm เปลี่ยนเป็น Inertsil C8 4.6 × 250 mm, 5 µm และ Zorbax C8 4.6 × 250 mm, 5 µm

วิธีดำเนินการ

1. ฉีด Diluent จำนวน 1 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบ base line และ noise
2. ฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด จำนวน 3 ซ้ำ เพื่อทดสอบความนิ่งของระบบ
3. ฉีดสารละลายมาตรฐาน ชนิดละจำนวน 1 ซ้ำ
4. ฉีดปิดท้ายด้วย สารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด จำนวน 1 ซ้ำ
5. บันทึกค่า Retention time, Resolution, Peak Purity และ %Matching

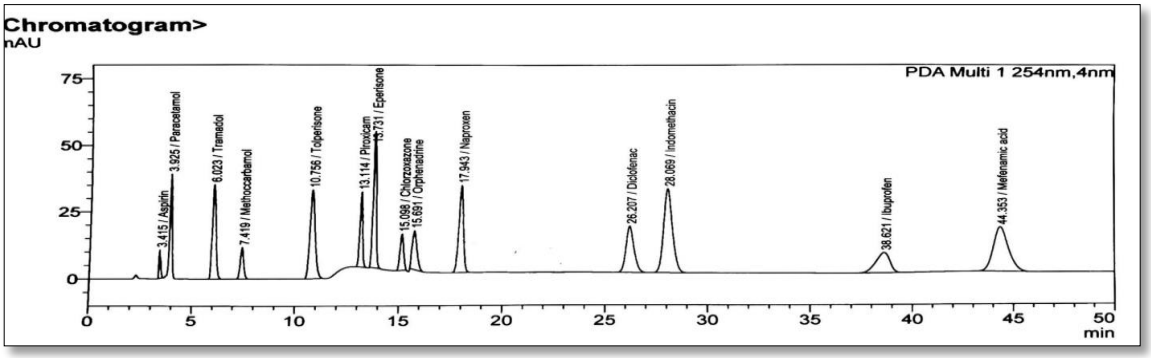
เกณฑ์การพิจารณา

1. ค่า Retention time ของ Peak ของตัวยาแต่ละตัวที่ปรากฏใน Chromatogram เมื่อปรับเปลี่ยน Parameter
2. ค่า Peak Purity ของ Peak ของตัวยาแต่ละตัวที่ปรากฏใน Chromatogram เมื่อปรับเปลี่ยน Parameter
3. ค่า Resolutionระหว่าง Peak ของตัวยาแต่ละตัวที่ปรากฏใน Chromatogram เมื่อปรับเปลี่ยน Parameter
4. ค่า %Matching ของ Spectrum ของตัวยาแต่ละตัวที่ปรากฏใน Chromatogram เมื่อปรับเปลี่ยน Parameter

ผล

1. <u>การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)</u>

วิธีการที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกพีคของยาแก้ปวดทั้ง 14 ชนิด ออกจากกันได้ชัดเจน โดยพิจารณาจากโครมาโทแกรมตามรูปที่ 1 ซึ่งพบว่าแต่ละพีค (ยกเว้น Orphenadrine) ที่อยู่ใกล้กันมีค่า Resolution มากกว่า 2.0 ทั้งนี้ค่า Retention time และ Resolution แสดงดังตารางที่ 2



รูปที่ 1 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด

ตารางที่ 2 แสดงค่า Retention time (RT), ค่า Relative retention time (RRT) และค่า Resolution ของสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด

No.	Standard	RT	RRT	Resolution
1	Aspirin	3.304	0.09	-
2	Paracetamol	3.748	0.10	3.514
3	Tramadol	5.223	0.14	9.535
4	Methocarbamol	6.336	0.17	4.266
5	Tolperisone	8.789	0.24	8.564
6	Piroxicam	11.940	0.32	6.473
7	Eperisone	12.651	0.34	2.221
8	Chlorzoxazone	13.845	0.37	4.332
9	Orphenadrine	14.258	0.39	1.504
10	Naproxen	16.222	0.44	5.207
11	Diclofenac	22.898	0.62	14.611
12	Indomethacin	24.333	0.66	2.486
13	Ibuprofen	32.956	0.89	10.179
14	Mefenamic acid	36.992	1.0	4.319

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิดที่แยกผสมกับ Placebo 4 ประเภท ได้แก่ยาเม็ด ยาชงสมุนไพร ยาลูกกลอน และยาน้ำแผนโบราณ พบว่ายาแต่ละชนิดมีค่า Retention time แตกต่างกัน พีคของยาไม่ถูกรบกวนจากสารอื่นในตำรับยาเม็ด ยาชงสมุนไพร ยาลูกกลอน และยาน้ำแผนโบราณโดยมีค่า Peak Purity ไม่ต่ำกว่า 0.95 รวมถึงมีค่า %Matching ของ Spectrum เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานไม่ต่ำกว่าร้อยละ 95 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงค่า Retention time ค่า Peak Purity และค่า %Matching (%Mat) ของยาแก้ปวดแต่ละชนิดเมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด ที่แยกผสมกับ Placebo 4 ประเภท ได้แก่ยาเม็ด ยาชงสมุนไพร ยาลูกกลอน และยาน้ำแผนโบราณ

Standard	ยาเม็ด			ยาชงสมุนไพร			ยาลูกกลอน			ยาน้ำแผนโบราณ		
	Average (%RSD)			Average (%RSD)			Average (%RSD)			Average (%RSD)		
	RT	%Mat	Purity	RT	%Mat	Purity	RT	%Mat	Purity	RT	%Mat	Purity
Aspirin	3.299	99.99	99.39	3.302	99.41	97.57	3.335	99.84	99.66	3.111	96.27	99.08
	(0.23)	(0.00)	(0.53)	(0.16)	(0.05)	(1.31)	(0.69)	(0.03)	(0.06)	(0.24)	(0.00)	(0.49)
Paracetamol	3.742	99.99	99.69	3.754	99.64	99.59	3.971	99.83	99.42	3.793	96.19	96.58
	(0.24)	(0.00)	(0.53)	(0.13)	(0.02)	(0.23)	(0.91)	(0.04)	(0.56)	(0.26)	(0.25)	(0.77)
Tramadol	5.199	99.89	100.00	5.258	99.89	99.79	5.399	99.85	95.40	5.316	99.83	99.87
	(0.57)	(0.03)	(0.00)	(0.18)	(0.02)	(0.36)	(2.80)	(0.03)	(8.33)	(0.60)	(0.02)	(0.11)
Methocarbamol	6.293	99.99	100.00	6.367	99.99	99.99	6.554	99.99	99.99	6.440	99.99	99.99
	(0.55)	(0.00)	(0.00)	(0.19)	(0.00)	(0.00)	(3.15)	(0.01)	(0.01)	(0.66)	(0.00)	(0.00)
Tolperisone	8.707	99.99	99.99	8.847	99.98	99.99	9.212	99.97	99.38	8.978	99.97	99.17
	(0.67)	(0.01)	(0.00)	(0.24)	(0.00)	(0.00)	(4.52)	(0.02)	(1.08)	(0.77)	(0.03)	(0.01)
Piroxicam	11.878	99.98	99.76	11.991	99.96	98.42	12.257	99.95	99.99	12.138	99.93	99.64
	(0.43)	(0.01)	(0.42)	(0.13)	(0.00)	(2.44)	(2.21)	(0.03)	(0.00)	(1.01)	(0.07)	(0.58)
Eperisone	12.610	99.99	99.91	12.693	99.93	96.69	12.930	99.95	95.62	12.839	99.91	99.93
	(0.33)	(0.01)	(0.09)	(0.08)	(0.01)	(5.74)	(1.89)	(0.01)	(7.33)	(1.23)	(0.06)	(0.05)
Chlorzoxazone	13.801	99.99	99.82	13.887	99.99	100.00	14.149	99.99	100.00	14.061	99.99	100.00
	(0.29)	(0.00)	(0.15)	(0.08)	(0.00)	(0.00)	(0.27)	(0.00)	(0.00)	(1.38)	(0.00)	(0.00)
Orphenadrine	14.205	99.99	99.96	14.311	99.99	99.99	14.632	99.99	99.92	14.554	99.98	99.99
	(0.36)	(0.00)	(0.08)	(0.09)	(0.00)	(0.01)	(2.26)	(0.01)	(0.70)	(2.04)	(0.01)	(0.01)
Naproxen	16.159	99.99	100.00	16.276	99.99	100.00	16.648	99.99	96.82	16.560	99.99	100.00
	(0.34)	(0.00)	(0.00)	(0.12)	(0.00)	(0.00)	(2.26)	(0.00)	(2.96)	(2.09)	(0.01)	(0.00)
Diclofenac	22.756	99.99	100.00	22.974	99.99	100.00	23.757	99.99	100.00	23.724	99.99	99.98
	(0.41)	(0.00)	(0.00)	(0.17)	(0.00)	(0.00)	(3.32)	(0.00)	(0.00)	(1.05)	(0.01)	(0.03)
Indomethacin	24.170	99.99	100.00	24.420	99.99	100.00	25.315	99.99	100.00	25.296	99.99	99.99
	(0.44)	(0.00)	(0.00)	(0.19)	(0.00)	(0.00)	(3.58)	(0.00)	(0.00)	(4.91)	(0.00)	(0.00)
Ibuprofen	32.780	99.99	100.00	33.140	99.98	100.00	34.462	99.97	100.00	34.570	99.90	100.00
	(0.48)	(0.00)	(0.00)	(0.21)	(0.01)	(0.00)	(3.80)	(0.02)	(0.00)	(6.31)	(0.07)	(0.00)
Mefenamic	36.719	99.99	100.00	37.165	99.99	100.00	38.750	99.99	100.00	39.119	99.99	100.00
	(0.96)	(0.00)	(0.00)	(0.22)	(0.00)	(0.00)	(3.99)	(0.00)	(0.00)	(7.52)	(0.00)	(0.00)

2. การทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ (System suitability)

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด จำนวน 3 ซ้ำ พบว่ายาแก้ปวดแต่ละชนิดมีค่า %RSD ของ Retention time และส่วนใหญ่ของค่า Resolution ไม่เกิน 2.0 ตามตารางที่ 4 ยกเว้นค่า Resolution ของ Paracetamol และ Tramadol ที่มีค่า %RSD มากกว่า 2 แต่เนื่องจากค่า Resolution ของตัวยาทั้ง 2 มีค่ามากกว่า 2.0 ดังนั้นในกรณีนี้ไม่ส่งผลทางลบต่อความสามารถของวิธีในการแยกตัวยา

ตารางที่ 4 แสดงผลความเที่ยงของระบบโครมาโทกราฟ

No.	Standard	Av. RT	%RSD	Av. Resolution	%RSD
1	Aspirin	3.415	0.117	-	-
2	Paracetamol	3.923	0.120	3.348	4.297
3	Tramadol	6.008	0.214	9.039	4.763
4	Methocarbamol	7.402	0.208	4.264	0.075
5	Tolperisone	10.734	0.192	8.540	0.243
6	Piroxicam	13.111	0.019	6.520	0.699
7	Eperisone	13.721	0.081	2.202	1.352
8	Chlorzoxazone	15.081	0.133	4.321	0.219
9	Orphenadrine	15.658	0.282	1.483	1.912
10	Naproxen	17.906	0.300	5.274	1.765
11	Diclofenac	26.275	0.229	14.750	0.840
12	Indomethacin	28.147	0.242	2.494	0.367
13	Ibuprofen	38.601	0.061	10.129	0.551
14	Mefenamic acid	44.288	0.132	4.316	0.238

3. การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD)

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด และแยกผสม Placebo ยาเม็ด ยาชงสมุนไพร ยาลูกกลอน และยาน้ำแผนโบราณ โดยความเข้มข้นของยาแก่ปวดแต่ละชนิดเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะสามารถตรวจพบและพิสูจน์เอกลักษณ์ได้นั้น พบว่าค่า Signal to noise ratio ของยาแก้ปวดแต่ละชนิดไม่ต่ำกว่า 3.0 ทั้งนี้ส่วนใหญ่มีค่า Peak Purity ไม่น้อยกว่า 0.95 และมีค่า %Matching ของ Spectrum ไม่น้อยกว่าร้อยละ 95 ยกเว้น Paracetamol และ Aspirin ในสารละลายที่ผสม Placebo ยาชงสมุนไพร ยาลูกกลอน และยาน้ำแผนโบราณ และ Tramadol และ Methocarbamol ในสารละลายที่ผสม Placebo ยาลูกกลอน และยาน้ำแผนโบราณ ที่ไม่สามารถหาค่า LOD ได้ (ตารางที่ 5) ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของยาดังกล่าวเริ่มต่ำลง พีคขนาดใหญ่กว่าใน Placebo ยาชง

สมุนไพร ยาลูกกลอน และยาน้ำแผนโบราณ ซึ่งปรากฏอยู่ใกล้กับพีคยาจะส่งอิทธิพลรบกวนพีคยาที่มีขนาดเล็กกว่าเหล่านั้น จนไม่สามารถหาค่าขีดจำกัดการตรวจพบได้

ตารางที่ 5 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบและพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ (LOD) ค่า Peak Purity และค่า %Matching (%Mat) ของสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด และแยกผสม Placebo ทั้ง 4 ชนิด

Standard	Conc µg/ml	ยาเม็ด			ยาชงสมุนไพร			ยาลูกกลอน			ยาน้ำแผนโบราณ		
		Average (%RSD)			Average (%RSD)			Average (%RSD)			Average (%RSD)		
		S/N	%Mat	Purity	S/N	%Mat	Purity	S/N	%Mat	Purity	S/N	%Mat	Purity
Aspirin	0.8	8.9 (17.57)	99.73 (0.11)	98.56 (2.50)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Paracetamol	0.4	54.5 (25.91)	99.77 (0.02)	99.99 (0.01)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Tramadol	4.0	12.7 (24.37)	99.56 (0.45)	99.99 (0.00)	5.8 (14.14)	99.78 (0.16)	99.99 (0.00)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Methocarbamol	2.0	11.7 (25.07)	99.91 (0.03)	99.99 (0.00)	5.3 (4.82)	99.95 (0.02)	99.99 (0.00)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Tolperisone	0.8	43.6 (27.40)	97.57 (1.56)	99.95 (0.01)	19.6 (10.83)	97.09 (2.37)	99.95 (0.01)	10.6 (14.31)	98.08 (2.54)	99.96 (0.01)	13.8 (51.09)	96.20 (0.79)	99.94 (0.03)
Piroxicam	2.8	200.4 (26.27)	97.45 (3.42)	99.99 (0.00)	86.4 (3.95)	99.92 (0.05)	99.99 (0.00)	43.7 (17.95)	99.96 (0.05)	99.99 (0.00)	49.1 (52.64)	99.91 (0.08)	99.93 (0.11)
Eperisone	2.4	222.8 (25.28)	97.24 (3.93)	99.83 (0.29)	101.0 (5.89)	99.64 (0.09)	99.99 (0.00)	50.2 (14.26)	99.49 (0.12)	99.99 (0.00)	55.1 (48.67)	99.68 (0.06)	99.95 (0.09)
Chlorzoxazone	4.0	25.9 (4.83)	98.38 (2.21)	99.99 (0.00)	10.6 (5.95)	99.94 (0.01)	99.99 (0.00)	5.2 (16.09)	99.91 (0.08)	99.99 (0.00)	4.9 (14.09)	99.93 (0.03)	98.68 (2.31)
Orphenadrine	10.0	14.9 (42.03)	99.65 (0.27)	99.99 (0.00)	6.9 (4.77)	99.92 (0.02)	99.99 (0.00)	3.7 (13.22)	99.82 (0.14)	99.99 (0.00)	4.6 (45.43)	99.74 (0.13)	99.61 (0.67)
Naproxen	1.6	33.9 (21.39)	99.81 (0.12)	99.99 (0.00)	16.2 (2.93)	99.15 (0.70)	99.99 (0.00)	8.5 (14.48)	99.73 (0.29)	99.99 (0.00)	8.1 (41.78)	99.86 (0.04)	99.99 (0.00)
Diclofenac	4.0	62.5 (21.62)	99.72 (0.11)	99.99 (0.00)	28.6 (6.10)	99.49 (0.28)	99.99 (0.00)	14.8 (14.19)	99.34 (0.82)	99.99 (0.00)	9.8 (0.77)	99.95 (0.01)	99.57 (0.75)
Indomethacin	4.0	153.2 (20.99)	98.60 (0.21)	99.99 (0.00)	70.2 (7.78)	98.88 (0.13)	99.99 (0.00)	35.7 (12.54)	99.43 (0.75)	99.99 (0.00)	18.6 (1.20)	99.93 (0.02)	99.99 (0.00)
Ibuprofen	36.0	19.8 (27.18)	99.93 (0.06)	99.99 (0.00)	7.1 (22.29)	99.83 (0.16)	99.99 (0.00)	4.6 (20.15)	99.97 (0.01)	99.99 (0.00)	3.6 (10.8)	99.97 (0.00)	99.69 (0.27)
Mefenamic	8.0	57.4 (23.35)	99.72 (0.09)	99.99 (0.00)	27.1 (11.65)	99.73 (0.25)	99.11 (1.55)	14.1 (14.34)	99.75 (0.09)	99.99 (0.00)	11.9 (0.87)	99.90 (0.01)	99.99 (0.00)

4. การศึกษาความคงทนของวิธี (Robustness)

4.1. การเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นในการตรวจวัด (Wavelength)

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด ซึ่งทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 256 และ 256 นาโนเมตร แล้ววัดค่าการตอบสนองเป็นค่าพื้นที่ใต้พีค (Peak Area) ซึ่งแสดงถึงความไวหรือความสามารถในการมองเห็นได้ ของยาแต่ละชนิด พบว่ายาแต่ละชนิดมีค่า ค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีคสูงสุดเมื่อตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 252 และ 256 นาโนเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีค และ %RSD ที่ความยาวคลื่น 254 252 และ 256 นาโนเมตร

No.	Standard	Average Peak Area					
		254 nm	%RSD	252 nm	%RSD	256 nm	%RSD
1	Aspirin	59266	1.09	38186	0.78	24855	0.13
2	Paracetamol	65167	36.97	43143	6.89	28543	10.85
3	Tramadol	436609	0.04	287936	0.22	190502	0.02
4	Methocarbamol	127842	0.08	85877	0.86	56729	0.05
5	Tolperisone	571380	0.12	380861	0.40	253806	0.09
6	Piroxicam	246955	0.32	163509	0.52	106953	0.39
7	Eperisone	569987	0.98	367948	0.34	245054	0.65
8	Chlorzoxazone	160493	1.46	106930	8.54	70707	11.57
9	Orphenadrine	216673	6.48	146012	8.24	97390	1.46
10	Naproxen	443416	0.14	313083	0.30	207890	0.05
11	Diclofenac	431471	0.11	283551	1.17	183863	0.54
12	Indomethacin	962454	0.12	598781	0.46	388524	0.09
13	Ibuprofen	341335	0.38	224018	10.27	146459	0.12
14	Mefenamic acid	768747	0.23	531745	3.49	350551	0.19

4.2. การเปลี่ยนแปลงคอลัมน์

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาแก้ปวด 14 ชนิด โดยมีการปรับเปลี่ยนคอลัมน์พบว่า ค่าเฉลี่ยและ %RSD ของค่า Retention time และค่า Resolution เป็นไปตามตารางที่ 7 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าคอลัมน์ Inertsil มีความสามารถสูงสุดในการแยกพีคยาแก้ปวดทั้ง 14 ชนิด แต่อย่างไรก็ตามก็มีความเสี่ยงที่จะแยกพีคของ Eperisone ออกจากพีคของ Chlorzoxazoneส่วนคอลัมน์ Vertisep UPS ก็สามารถแยกพีคยาแก้ปวดทั้ง 14 ชนิดได้ดี แต่ก็มีความเสี่ยงที่จะแยกพีคของ Chlorzoxazone ออกจากพีคของ Orphenadrine เช่นกัน ส่วน คอลัมน์ Zorbax มีความสามารถ

ต่ำสุดในการแยกพีคยาแก้ปวด เนื่องจากไม่สามารถแยกพีคของ Piroxicam ออกจากพีคของ Eperisone และไม่สามารถแยกพีคของ Chlorzoxazone ออกจากพีคของ Orphenadrine ได้ ดังนั้นหากนำวิธีนี้ไปใช้อาจจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติม ถึงคอลัมน์ที่ใช้ว่ายี่ห้อ หรือรุ่นการผลิตของคอลัมน์มีผลต่อความสามารถของวิธีในการแยกของยาหรือไม่

ตารางที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยของค่า Retention time และค่า Resolution และค่า %RSD เมื่อปรับเปลี่ยน column

No.	Standard	Vertisep UPS column		Inertsil column		Zorbax column	
		Average (%RSD)		Average (%RSD)		Average (%RSD)	
		RT	Resolution	RT	Resolution	RT	Resolution
1	Aspirin	3.415	-	3.590	-	2.673	-
		(0.117)	-	(4.58)	-	(0.15)	-
2	Paracetamol	3.923	3.348	3.960	2.378	2.919	2.131
		(0.120)	(4.297)	(1.85)	(14.39)	(0.27)	(19.32)
3	Tramadol	6.008	9.039	4.764	4.121	3.527	3.488
		(0.214)	(4.763)	(1.91)	(13.87)	(0.78)	(5.20)
4	Methocarbamol	7.402	4.264	7.281	8.863	4.429	4.555
		(0.208)	(0.075)	(4.83)	(11.43)	(1.01)	(1.59)
5	Tolperisone	10.734	8.540	8.273	2.865	5.533	5.416
		(0.192)	(0.243)	(7.94)	(19.51)	(1.16)	(1.43)
6	Piroxicam	13.111	6.520	12.322	15.140	8.339	11.138
		(0.019)	(0.699)	(3.55)	(21.13)	(1.47)	(1.21)
7	Eperisone	13.721	2.202	13.442	6.123	8.757	1.427
		(0.081)	(1.352)	(2.55)	(12.91)	(1.45)	(1.87)
8	Chlorzoxazone	15.081	4.321	13.783	1.749	11.321	10.696
		(0.133)	(0.219)	(3.87)	(43.43)	(0.74)	(3.60)
9	Orphenadrine	15.658	1.483	15.280	6.905	11.509	0.916
		(0.282)	(1.912)	(3.11)	(11.33)	(0.58)	(9.75)
10	Naproxen	17.906	5.274	17.963	9.268	13.061	6.985
		(0.300)	(1.765)	(2.60)	(1.53)	(0.60)	(2.47)
11	Diclofenac	26.275	14.750	27.041	20.477	18.079	18.650
		(0.229)	(0.840)	(3.62)	(6.44)	(0.73)	(0.48)
12	Indomethacin	28.147	2.494	28.408	2.330	18.885	2.335
		(0.242)	(0.367)	(3.69)	(3.99)	(0.75)	(0.48)
13	Ibuprofen	38.601	10.129	36.796	10.596	25.473	12.203
		(0.061)	(0.551)	(4.05)	(3.16)	(0.91)	(0.11)
14	Mefenamic acid	44.288	4.316	43.762	6.878	28.094	3.931
		(0.132)	(0.238)	(5.28)	(5.62)	(1.16)	(1.73)

สรุปและวิจารณ์

เทคนิควิธีของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่พัฒนาขึ้นมีสภาวะของวิธีตามตารางที่ 1 เมื่อทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่าวิธีมีความจำเพาะเจาะจงกับยาแก้ปวดทั้ง 14 ชนิด สามารถแยกพีคยาแก้ปวดทั้ง 14 ชนิดออกจากกันได้ โดยยาแก้ปวดแต่ละชนิดมีค่า Retention time ที่แตกต่างกัน และมีค่า Resolution ส่วนใหญ่ (ยกเว้น Orphenadrine) มีค่ามากกว่า 2.0 (ตารางที่ 2, รูปที่ 1) และไม่ถูกรบกวนจากสารอื่นในตำรับยาเม็ด ยาชงสมุนไพร ยาลูกกลอน และยาน้ำแผนโบราณ โดยมีค่า Peak Purity ไม่ต่ำกว่า 0.95 (ตารางที่ 3) มีความเที่ยงของระบบโครมาโทกราฟ โดยค่า %RSD ของค่า Retention time และส่วนใหญ่ของค่า Resolution ไม่เกิน 2.0 (ตารางที่ 4) มีความไวในการตรวจพบในยาเม็ด ยาลูกกลอน ยาชงสมุนไพร และยาน้ำแผนโบราณ โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบและพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ หรือ Limit of detection (LOD) อยู่ในช่วง 0.4-36 µg/ml (ตารางที่ 5) และมีความทนของวิธี เมื่อปรับเปลี่ยนความยาวคลื่นในการตรวจวัด (ตารางที่ 6)โดยวิธียังมีความไวในการตรวจพบยาแก้ปวดทั้ง 14 ชนิดได้ ส่วนความทนของวิธีเมื่อปรับเปลี่ยนคอลัมน์อาจลดลง คอลัมน์ชนิดเดียวกันแต่ต่างยี่ห้ออาจไม่สามารถแยกพีคยาแก้ปวดบางตัวออกจากกันได้ จึงควรต้องระมัดระวังเลือกใช้คอลัมน์ที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามสรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจเอกลักษณ์ยาแก้ปวดทั้ง 14 ชนิด ดังกล่าว ในผลิตภัณฑ์ยาแผนปัจจุบัน และยาแผนโบราณได้

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานคณะกรรมการกฤษฎีกา. ราชกิจจานุเบกษา พระราชบัญญัติยา พ.ศ.2510
2. สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานประจำปี 2563 สำนักยาและวัตถุเสพติด. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; หน้า 64
3. สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานประจำปี 2564 สำนักยาและวัตถุเสพติด. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; หน้า 65
4. สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานประจำปี 2565 สำนักยาและวัตถุเสพติด. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; หน้า 87
5. The United States Pharmacopeia 41, The National Formulary 36. 2018. The United States Pharmacopeia Convention, Inc. Rockville, USA. 2550.
6. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1) ICH Steering Committee; Nov 2005.

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original Article

Analytical method development and validation of polysorbate 80 concentration in nimotuzumab products (การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในการหาปริมาณโพลีซอร์เบต 80 ในผลิตภัณฑ์ยานิโมทูซูแมบ)

*ชนิดา กานต์ประชา**

Abstract Polysorbate 80, otherwise known as Tween 80, is a non-ionic surfactant and emulsifier which is often used in pharmaceutical products for product stabilization, and to reduce protein aggregation and surface adsorption. The decreases in the concentration of polysorbate 80 and in the accumulation of degradant molecules may affect the stability of a protein-containing pharmaceutical products. Nimotuzumab is a therapeutic monoclonal antibody has been used medically in multiple countries. The product itself is specific to an epidermal growth factor receptor (EGFR). The formulation of nimotuzumab product comprises many excipients including polysorbate 80, and control of the content of polysorbate 80 in the formulation is necessary. However, due to insufficient chromophores in its structure, polysorbate 80 cannot be accurately analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC) technique with UV absorbance detection. Direct quantitation of polysorbate 80 by various other methods has been published in literature. Charged Aerosol Detection (CAD) is one of the accepted techniques. The CAD can provide a universal detection— it is independent from the chemical structure of the substance to be analyzed, for many chemicals including polysorbate 80. Nevertheless, the information regarding the use of CAD to analyze the content of polysorbate 80 is still limited, and no information on quantitative analysis of polysorbate 80 in nimotuzumab is available. Hence, in this study, the method for polysorbate 80 content analysis was developed and validated. An Oasis column was selected and 0.02% formic acid in water and in isopropanol was used as a mobile phase. The concentration of polysorbate 80 being analyzed was within 0.1-0.3 mg/mL range. The developed method was validated and passed the validation requirements including specificity, linearity, accuracy, repeatability, and intermediate precision according to the ICH guideline Q2(R1). Moreover, the validated method was used for analysis of polysorbate 80 in nimotuzumab sample. The results from three replications showed that the content of polysorbate 80 in the sample product was 0.15, which passed the in-house specification of 0.1-0.3 mg/mL. %RSD for the system suitability was 1.25. Therefore, the developed method is suitable for analysis of polysorbate 80 content in nimotuzumab products and may be applicable to other drug formulations.

Key words: polysorbate 80, nimotuzumab, CAD

*สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ Polysorbate 80 หรือที่เรียกว่า Tween 80 เป็นสารลดแรงตึงผิวและอิมัลซิไฟเออร์แบบไม่มีไอออน ซึ่งมักใช้ในผลิตภัณฑ์ยาเพื่อทำให้เภสัชภัณฑ์มีความคงตัว ลดการรวมตัวของโมเลกุลยาและการถูกดูดซับที่พื้นผิว ซึ่งการลดลงของความเข้มข้นpolysorbate 80 และการสะสมของสารสลายตัวของ polysorbate 80 อาจส่งผลต่อความคงตัวของของผลิตภัณฑ์ยาโปรตีนได้ nimotuzumab เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ในการรักษาและถูกนำมาใช้ในหลายประเทศ โดยตัวยามีความจำเพาะต่อ epidermal growth factor receptor (EGFR) สูตรตำรับของผลิตภัณฑ์ nimotuzumab ประกอบด้วยส่วนผสมหลายชนิดซึ่งมี polysorbate 80 เป็นหนึ่งในองค์ประกอบ ดังนั้นการควบคุมปริมาณของ polysorbate 80 จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง แต่เนื่องจากโครงสร้างของ polysorbate 80 ไม่มีโครโมฟอร์ที่เพียงพอ ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) ที่มีการตรวจวัดเป็น UV detector ได้ จากข้อมูลพบว่ามีการตีพิมพ์เกี่ยวกับการหาปริมาณของ polysorbate80 มากมายหลากหลายเทคนิค การตรวจจับละอองที่มีประจุ หรือ CAD เป็นหนึ่งในเทคนิคที่ได้รับการยอมรับ โดยเทคนิคการตรวจวัดนี้จะไม่เกี่ยวข้องโครงสร้างทางเคมีของสารที่ทำการวิเคราะห์ สามารถตรวจวิเคราะห์สารได้หลากหลายชนิด รวมถึง polysorbate 80 แต่เนื่องจากข้อมูลที่มีการใช้ CAD เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ polysorbate 80 ยังมีอยู่อย่างจำกัด รวมทั้งไม่มีข้อมูลที่วิเคราะห์หาปริมาณในตำรับยา nimotuzumab ดังนั้นในการศึกษานี้จะพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสาร polysorbate 80 โดยใช้ CAD และตรวจสอบความถูกต้อง คอลัมน์ที่เลือกใช้คือ Oasis ใช้กรดฟอร์มิก ความเข้มข้น 0.02% ในน้ำและใน isopropanol เป็นเฟสเคลื่อนที่ ความเข้มข้นของ polysorbate 80 ที่วิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.1-0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิธีการที่พัฒนาขึ้นได้รับการตรวจสอบความถูกต้องและผ่านข้อกำหนดของการตรวจสอบ ได้แก่ ความจำเพาะ (specificity) ความเป็นเชิงเส้น (linearity) ความแม่นยำ (accuracy) ความเที่ยง (repeatability) และความเที่ยงเมื่อมีการวิเคราะห์ซ้ำ (intermediate precision) ตามแนวทางของ ICH Q2(R1) นอกจากนี้ยังได้นำวิธีที่พัฒนาขึ้นและผ่านการตรวจสอบความถูกต้องแล้วไปวิเคราะห์หาปริมาณ polysorbate 80 ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ nimotuzumab ผลจากการวิเคราะห์โดยการทำซ้ำ 3 ครั้ง พบว่าในตำรับที่วิเคราะห์มีปริมาณ polysorbate 80 เท่ากับ 0.15 ซึ่งผ่านข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์จากผู้ผลิต คือ 0.1-0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร %RSD สำหรับ suitability เท่ากับ 1.25 ดังนั้น จากข้อมูลทั้งหมดในข้างต้นแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนานี้มีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ polysorbate 80 ในผลิตภัณฑ์ nimotuzumab และอาจนำไปใช้กับสูตรยาอื่นๆได้

กุญแจคำ: polysorbate80, nimotuzumab, CAD

Introduction

Polysorbate80, known as tween80, is a viscous, water-soluble yellow liquid. It consists of sorbitol, ethylene oxide, and oleic acid (Fig.1). It is a nonionic surfactant and emulsifier which is often used in pharmaceutical products to stabilize protein pharmaceuticals against aggregation and surface adsorption [1]. Polysorbates are known to be degraded by autooxidation [2] and hydrolysis [2, 3]. These mechanisms will decrease the concentration of polysorbate in the protein formulation over the long shelf life in proportion to the increasing of temperature [3]. Because of the stabilize properties of polysorbate, the decrease in the concentration of polysorbate and the accumulation of degradant molecules in a protein formulation could be of potential concern for protein stability. The degradation process can build up various molecules, some of which are poorly soluble, including fatty acids and polyoxyethylene (POE) esters of fatty acids. The insoluble degradants could potentially impact protein stability [4]. The degradants of polysorbate80 can compromise the stability of

protein [5]. Nimotuzumab is a therapeutic monoclonal antibody that is specific for epidermal growth factor receptor (EGFR) and has been used as a therapy in several countries. Nimotuzumab was approved in many indications such as squamous cell carcinomas of the head and neck, glioma, nasopharyngeal cancer and pancreatic cancer in many countries. The formulation of nimotuzumab product comprise of many excipients including polysorbate80 which its content should be controlled. However, because of the structure of polysorbate80 (Figure1) which lacks a sufficient chromophore, polysorbate 80 could not be accurately analyzed by the conventional method of HPLC with UV absorbance detection. Direct quantitation of polysorbate 80 by various other methods has been published in literature. A simple and fast method for the analysis of polysorbate 80 in pharmaceutical formulations was developed using high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection (ELSD) [6] and charged aerosol detection (CAD) [7]. Charged Aerosol Detection (CAD) can provide a universal detection that is independent of the chemical structure for many chemicals, such as polysorbates [7]. However, there were few information about the use of CAD to analyze the polysobate80 content. In this study, the method was developed by using CAD with a simple and fast process and validated according to the ICH guideline Q2(R1).

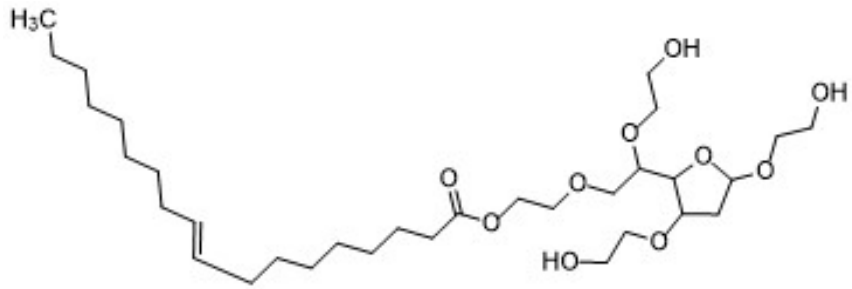


Fig. 1 Structure of polysorbate 80

Equipment, Materials and Reagents

Equipment and materials

1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Dionex, USA, consisting of Pump, Autosampler, Column oven, UV Detector, and program Chromeleon
2. HPLC column: Oasis MAX Online Column, 80Å, 30 µm, 2.1×20 mm and Monomix H2P-SAX, 40 µm, 2.1×20 mm
3. Analytical balance
4. Micropipette
5. Water filter: Model Milli-Q Advantage A10, Millipore, USA
6. Vortex
7. Micropipette
8. Glassware class A

Standard and reagent

1. Polysorbate80 USP reference standard (Lot no. R072G0)
2. Formic acid LC-MS grade (Thermo Fisher Scientific, 64-18-6)
3. Isopropanol HPLC grade (Carlo erba, 67-63-0)
4. Disodium hydrogen phosphate (Carlo erba, 7558-79-4)
5. Sodium dihydrogen phosphate monohydrate (Carlo erba, 10049-21-5)
6. Sodium chloride (Carlo erba, 7647-14-5)

Procedure

1. Reagent preparation

1.1 Matrix solution

Table 1. The component of matrix solution of nimotuzumab product (excluding the polysorbate 80)

Component	Amount per vial	Matrix solution (2X)
Disodium hydrogen phosphate	18.0 mg	360 mg
Sodium dihydrogen phosphate monohydrate	5.2 mg	104 mg
Sodium chloride	86 mg	1720 mg
Water type I	qs. to 10 mL	qs. to 100 mL

1.2 Mobile phase A: 0.02%v/v formic acid in water

Dilute 200 µL of formic acid with water and adjust the volume to 1000 mL.

1.3 Mobile phase B: 0.02%v/v formic acid in isopropanol

Dilute 200 µL of formic acid with isopropanol and adjust the volume to 1000 mL.

2. Standard preparation

2.1 Stock standard solution (5 mg/mL)

Dilute 50 mg of polysorbate80 USPRS with water and adjust to the volume of 10 mL.

2.2 Standard solution (0.2 mg/mL)

Pipette 40 µL of stock standard solution (2.1) and 960 µL of water and mix.

2.3 Standard solution (0.02 mg/mL)

Pipette 100 µL of standard solution (2.2) and 900 µL of water and mix.

3. Sample preparation

Dilute the sample solution with water to contain the final concentration of polysorbate80 of 0.02 mg/mL.

4. Spiked sample preparation

4.1 Stock spiked sample solution (5 mg/mL)

Dilute 50 mg of polysorbate80 USPRS with matrix solution and adjust to the volume of 10 mL.

4.2 Spiked sample solution (0.2 mg/mL)

Pipette 40 µL of stock standard solution and 960 µL of matrix solution and mix.

4.3 Spiked sample solution (0.02 mg/mL)

Pipette 100 µL of stock standard solution and 900 µL of water and mix.

5. HPLC condition

Mobile phase	Mobile phase A: 0.02% formic acid in water Mobile phase B: 0.02% formic acid in isopropanol (Table2)
Flow rate	1 mL/min
Column temperature	30ºC
Sample temperature	5ºC
Injection volume	200 µL
Detector	Charged aerosol detection (CAD) Evaporative temperature: 35ºC, collection frequency 10 Hz, filter 5 seconds, PFV 1.0

Table 2 The gradient of mobile phase

Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	90	10
1	80	20
3.4	80	20
3.5	0	100
4.5	0	100
4.6	90	10
10	90	10

- System suitability

%RSD of the replicated standard solution (5 injections) should not be more than 5.3% [8].

6. Method development

6.1 Column of analysis

A simple reversed phase high-performance liquid chromatography method for polysorbate 80 quantitation was reported. Because of the non-chromophore structure of polysorbate80, the hydrolysis

process with acid or base with heating was performed and oleic acid, a hydrolysis product will be quantitated and detected with UV detection. However, this method was laborious and time consuming [10]. Analysis of polysorbate 80 by high-performance liquid chromatography (HPLC) with charged aerosol detection (CAD) was also reported. Both ion exchange and reverse phase columns were used with CAD. The single peak of polysorbate80 was observed with C18 column but in the sample solution the resolution of polysorbate80 and excipient in the formulation quite not good [7]. For the ion exchange column, the using of Monomix H2P-SAX, 40 µm, 2.1X20 mm and Oasis MAX Online Column, 80Å, 30 µm, 2.1X20 mm were reported and polysorbate80 peak had good resolution and sharp [12-15] but the system were different. Therefore, in this study two chromatographic systems were performed and compared the results of chromatogram such as the intensity of signal and the specificity of polysorbate80 peak from these two columns and using the CAD.

6.2 Concentration of formic acid in the mobile phase

Monomix H2P-SAX and Oasis MAX online were the mix-mode column which contain the ion exchange and reverse phase sorbent. Formic acid is commonly used in the mobile phase in both systems with the concentration at 2%v/v [11-14]. However, the formic acid might increase the signal of background when using the CAD. In this experiment the concentration of formic acid was vary from 0.02, 0.2 and 2% to compare the effect of background from formic acid to the polysorbate80 peak.

6.3 Concentration of polysorbate80 for analysis

The critical micelle concentration (CMC) is an important part of polysorbate80 analysis. If the concentration of polysorbate80 was above the CMC, the hydrophobic functional groups are encapsulated inside of the micelle which might not bind the resin with the same affinity as free tween [12]. Tween 80 form micelle at 0.00157% w/v in water [15]. Therefore, in this study the concentration of polysorbate80 was prepared in 2 levels, lower and about the CMC levels.

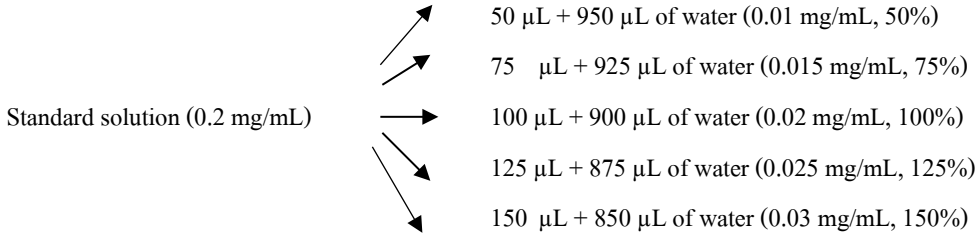
7. Method validation

7.1 Specificity

Inject the solutions as follows: blank, water, mobile phase A, mobile phase B, matrix solution, standard solution, and sample solution and evaluate the interferences from excipients and mobile phase used in the method on the interesting peaks.

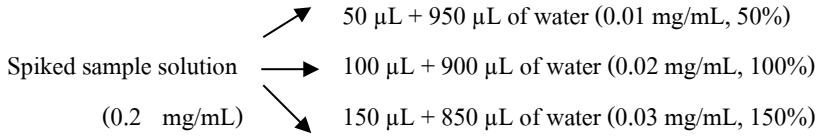
7.2 Linearity and range

Prepare standard solution in 5 concentrations as follows and calculate the coefficient of determination (R^2), y-intercept and slope of the regression line. The coefficient of determination (R^2) should not be less than 0.99 [9].



7.3 Accuracy

Prepared a spiked sample in 3 concentrations (50, 100 and 150%), 3 replicates in each concentration as follows and calculated the %recovery. The %recovery should be within 80-110% [8].



7.4 Repeatability

Prepare the spiked sample as indicated in the part of accuracy (7.3) and calculate the %RSD. The %RSD should not be more than 7.3% [8].

7.5 Intermediate precision (2 operators, 3 different days)

Prepare the spiked sample solution at the concentration of 0.02 mg/mL (100%) in 6 replicates and calculate the %RSD. The %RSD should not be more than 7.3% [8].

7.6 Specification

Parameter	Criteria
Specificity	- The retention time of polysorbate80 peak in standard and sample solution should be the same. - There is no interference from other peaks to the major peak of polysorbate80.
Linearity	- The coefficient of determination (R^2) should not less than 0.99 [9]
Accuracy	- %Recovery: 80-110% [8]
Precision - Repeatability - Intermediate precision	- %RSD: not more than 7.3% [8]

Result

1. Method development

1.1 Column of analysis

The results from Monomix column showed that the signal of polysorbate80 peak was good and peak shape was sharp. However, there was a shoulder in front of the polysorbate80 peak. Moreover, there was a peak of matrix solution which was higher than blank and water. From this result, if the subtraction was performed, there was still the interfered peak from matrix (Fig.2).

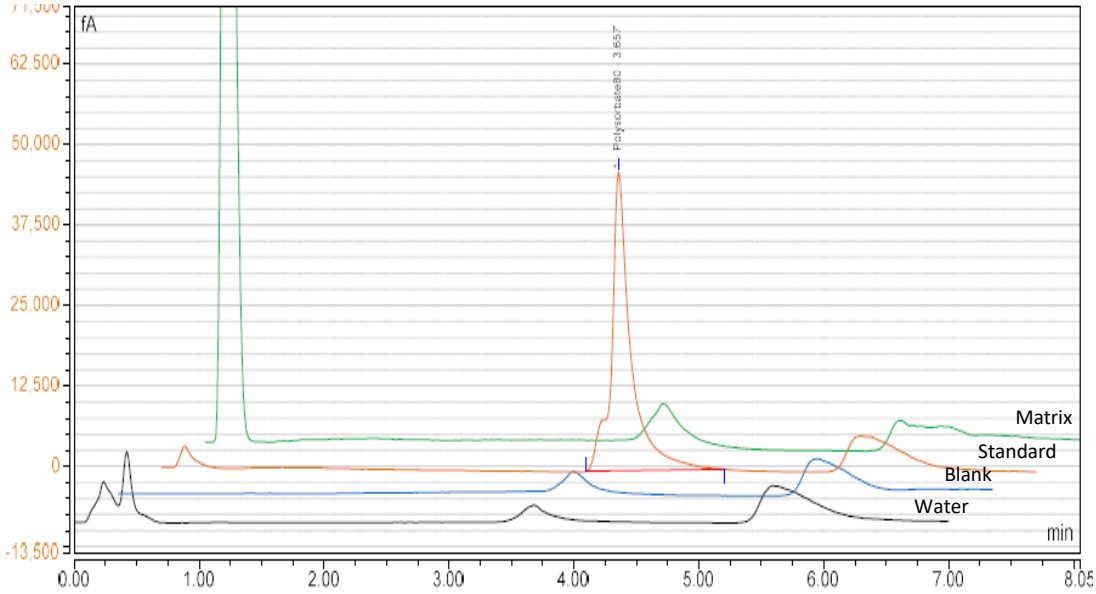


Fig. 2 The chromatogram of blank, water, matrix solution and standard of polysorbate80 (0.02 mg/mL) by using Monomix column.

On the other hand, the results from the Oasis column showed that the peak shape of polysorbate80 was broader than the result from Monomix column. There was a huge peak in front of the polysorbate80 peak, but it decreases to the baseline before the elution of polysorbate80 (Fig.3). Moreover, there was no interference peak from matrix after subtraction of blank because the chromatogram of matrix solution was the same as blank. From this result, the Oasis column was selected to use for polysorbate80 analysis.

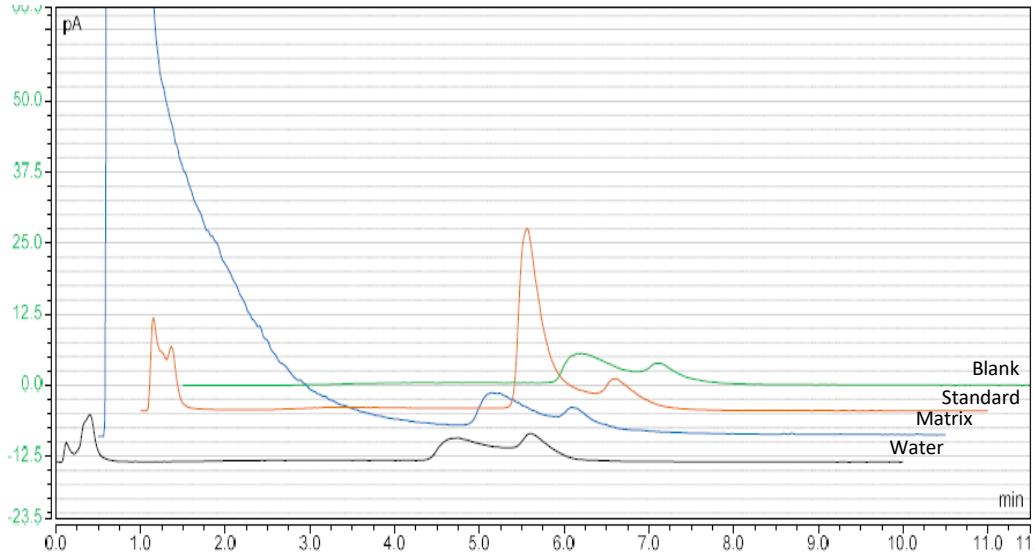


Fig. 3 The chromatogram of blank, water, matrix solution and standard of polysorbate80 (0.015 mg/mL) by using Oasis column.

1.2 Concentration of formic acid in mobile phase

For the first time, the vary of formic acid concentrations was performed with the Monomix column and compared the chromatogram of blank. The result showed that the lower concentration of formic acid can reduce the intensity of noise from the detector (Fig.4). 0.02% formic acid was the lowest concentration commonly used in this kind of detector and it was suitable for this analysis. However, after selecting the analytical column to Oasis, 2% and 0.02% formic acid were tested. The same result as using with the Monomix column was shown. The background of 0.02% formic acid was lower than 2% (Fig.5). Therefore, 0.02% formic acid was used in mobile phase A and B.

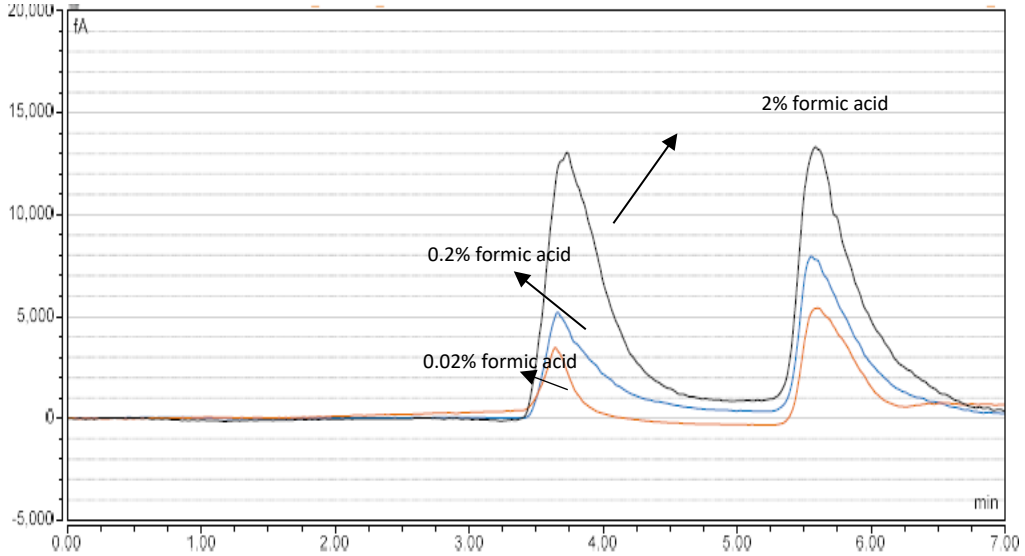


Fig. 4 The chromatogram of blank by using 0.02, 0.2, 2% formic acid in mobile phase A and B with the Monomix column.

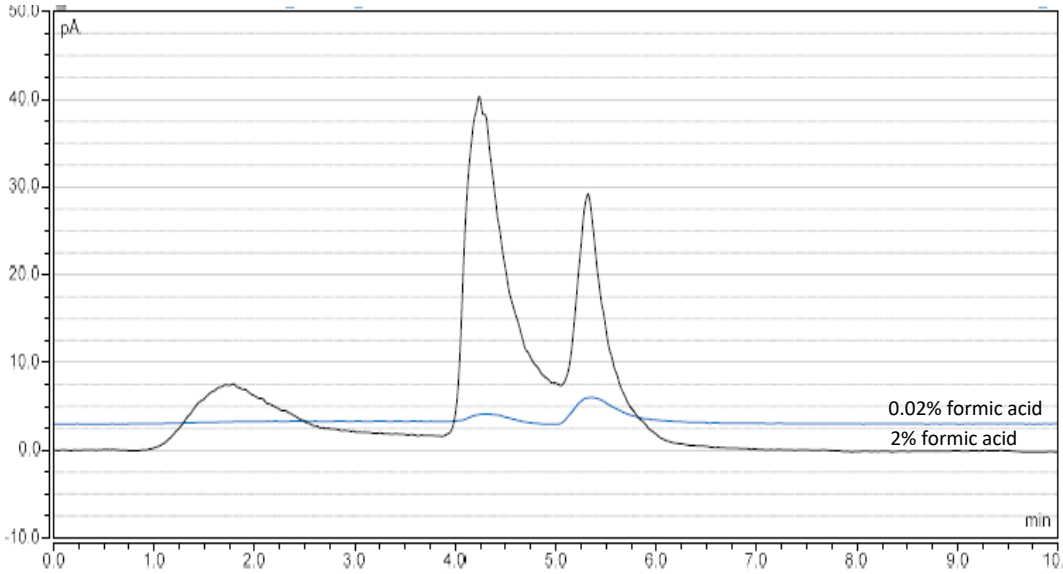


Fig. 5 The chromatogram of water and blank by using 2 and 0.02% formic acid, respectively, in mobile phase A and B with the Oasis column.

1.3 Concentration of polysorbate80 for analysis

As the information of polysorbate80 showed that the critical micelle concentration (CMC) of polysorbate80 was about 0.015 mg/mL [12]. The concentration of polysorbate80 for analysis should be suitable. If the concentration was above the CMC, the binding of the polysorbate is not that well and the %recovery will get lower. However, the too low concentration can also face integration problems after subtraction of blank.

Firstly, 0.1 mg/mL of polysorbate80 was injected and vary the injection volume from 12.5-100 µL to find the suitable concentration. All injection volumes shown that the separation of polysorbate80 peak and the interfering peak was better than the injection volume of 200 µL (Fig.6) and the polysorbate peak was still observed after blank subtraction (Fig.7). Therefore, we can assume that the concentration of polysorbate80 between 0.000625-0.05 mg/mL could be analyzed.

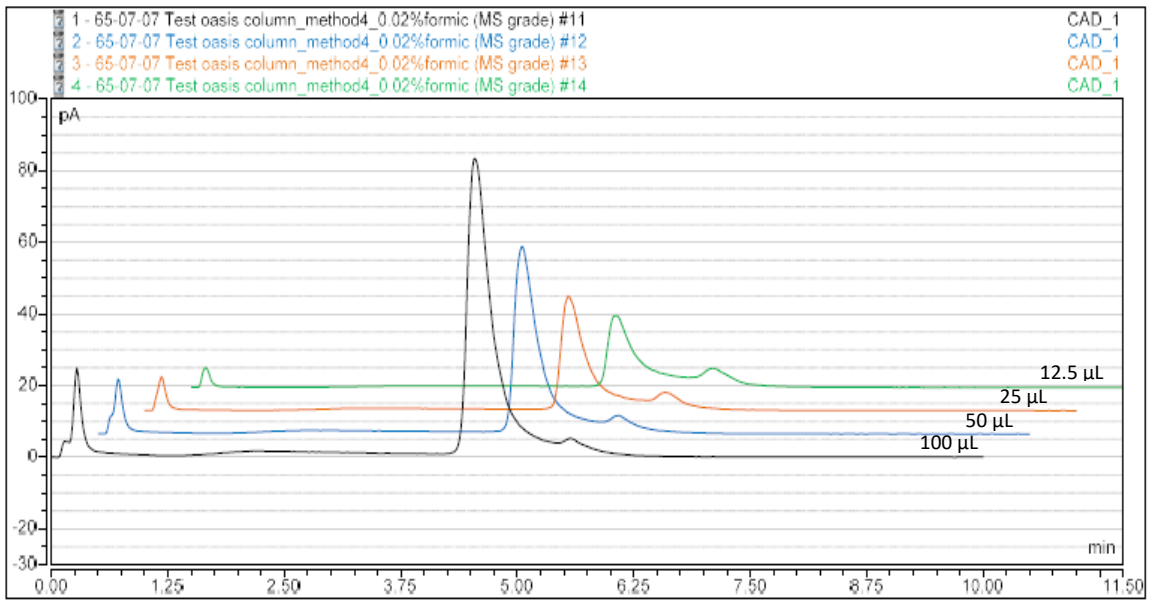


Fig. 6 The chromatogram of 0.1 mg/mL of polysorbate80 with the injection volume of 100, 50, 25 and 12.5 µL.

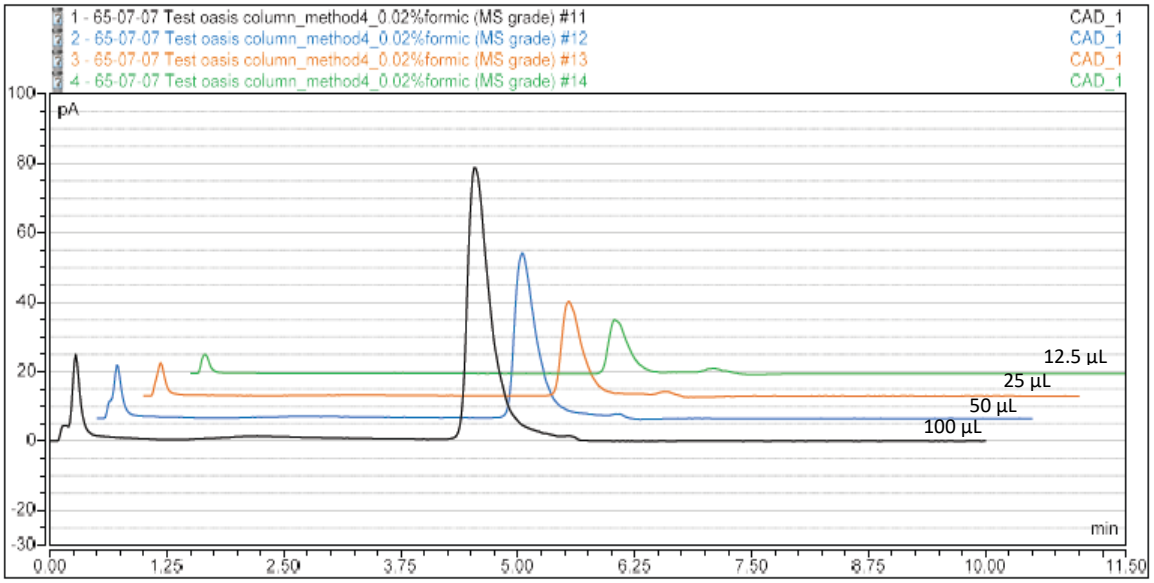


Fig. 7 The chromatogram of 0.1 mg/mL of polysorbate80 with the injection volume of 100, 50, 25 and 12.5 µL after blank subtraction.

The linearity plot of polysorbate80 between 0.005-0.015 mg/mL (lower than CMC) and 0.01-0.03 mg/mL were performed. For 0.005-0.015 mg/mL, the result shown that the R^2 was 0.9909 (Fig.8) and the %recovery were 99.442, 76.511 and 82.604% for the concentration of 0.005, 0.01 and 0.015 mg/mL, respectively (Table3).

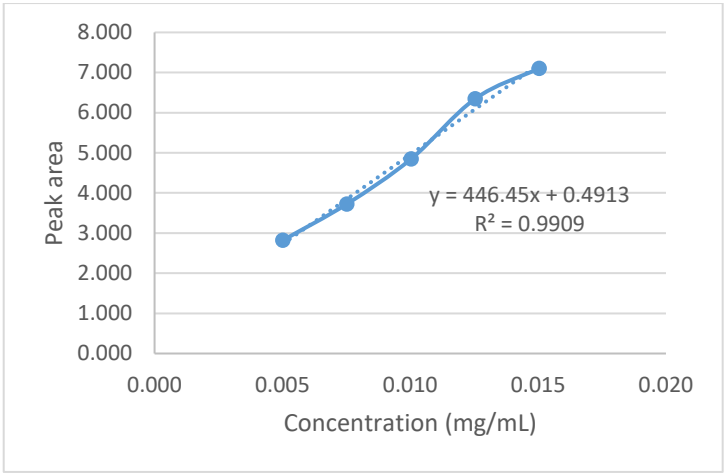


Fig. 8 The linearity curve between the concentration of 0.005-0.015 mg/mL.

Table 3 The %recovery of polysorbate80 between the concentration of 0.005-0.015 mg/mL

Injection no.	Concentration (mg/mL)		
	0.005	0.010	0.015
1	3.850	4.470	6.713
2	2.394	4.390	6.775
Average	3.122	4.430	6.744
Found	0.005	0.008	0.012
Added	0.005	0.010	0.015
%Recovery	99.442	76.511	82.604

For 0.01-0.03 mg/mL, the result shown that the R^2 was 0.9957 (Fig.9) and the %recovery were 83.083, 106.362 and 110.589% for the concentration of 0.01, 0.02 and 0.03 mg/mL, respectively (Table4).

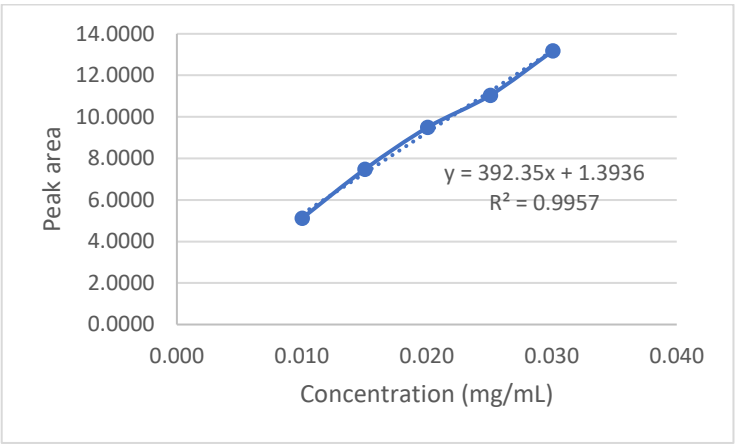


Fig. 9 The linearity curve between the concentration of 0.01-0.03 mg/mL.

Table 4 The %recovery of polysorbate80 between the concentration of 0.01-0.03 mg/mL

Injection no.	Concentration (mg/mL)		
	0.01	0.02	0.03
1	5.022	9.752	14.374
2	4.288	9.736	14.460
Average	4.655	9.744	14.417
Found	0.008	0.021	0.033
Added	0.01	0.02	0.03
%Recovery	83.083	106.362	110.589

From the data of 2 ranges concentrations, the higher concentration was selected, 0.01-0.03 mg/mL because the peak was clearly observed, the better of R^2 value and %recover and the dilution was easier to prepare.

2. Method validation

2.1 Specificity

From the chromatogram of specificity, the retention time of polysorbate80 peak in standard and sample solution was the same and there is no interference from other peaks to the major peak of polysorbate80 which complied with the criteria for specificity (Fig.10). However, there was the background of detector. Blank subtraction should be performed before using the peak area for calculation.

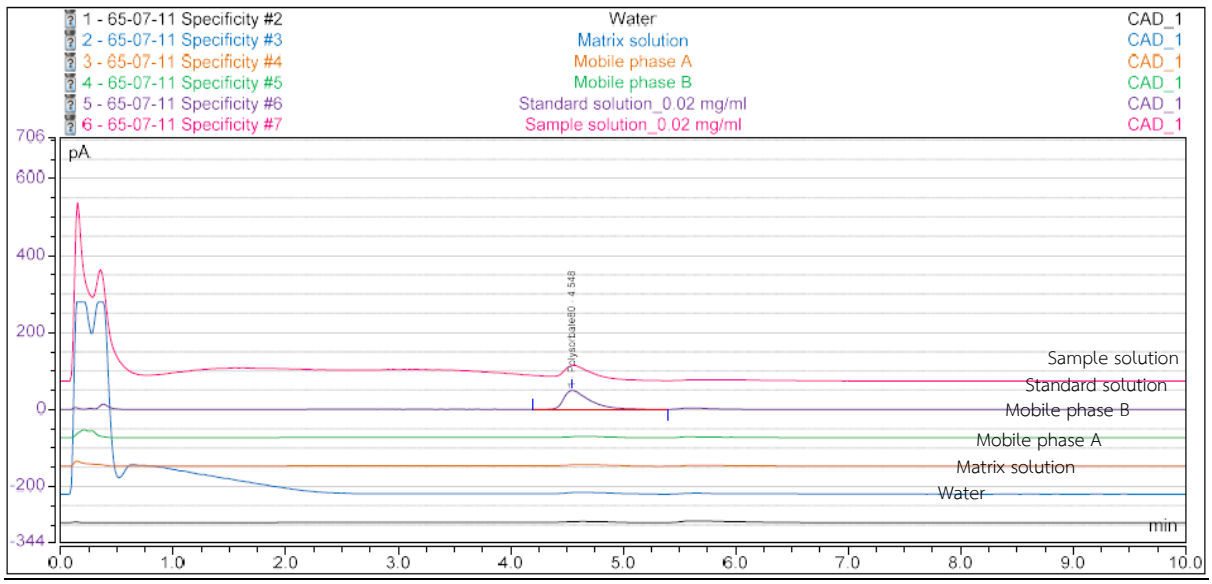


Fig. 10 Chromatogram of specificity

2.2 Linearity

The linearity result showed that the R^2 was 0.9903 (Fig.11) which conformed to the criteria, not less than 0.99 [9].

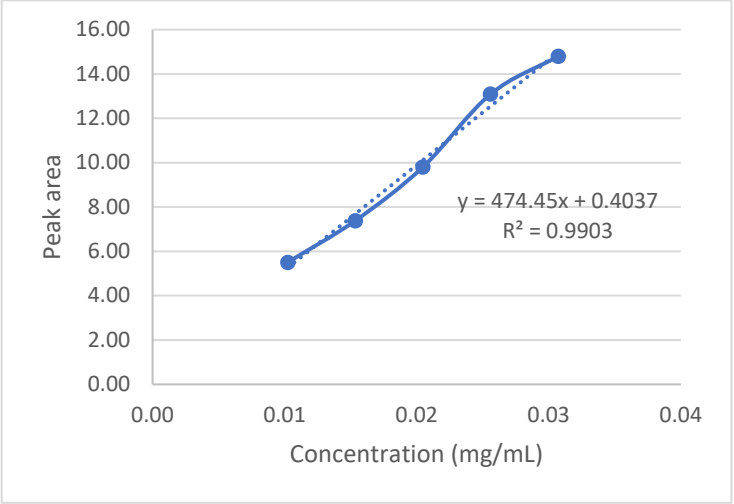


Fig.11 The linearity curve between the concentration of 0.01-0.03 mg/mL.

2.3 Accuracy

The %recovery were 91.135, 94.323 and 101.615% for the concentration of 0.01, 0.02 and 0.03 mg/mL, respectively, which were within the criteria, 80-110% (Table5). Therefore, the accuracy of this method passed the specification.

Table 5 The %recovery of polysorbate80 at the concentration of 0.01, 0.02 and 0.03 mg/mL

Injection no.	Concentration of polysorbate80 (mg/mL)								
	0.01			0.02			0.03		
1	5.061	4.691	4.691	9.774	10.357	9.860	16.018	15.875	15.872
2	4.969	4.770	4.770	9.171	8.904	9.272	13.638	15.952	13.809
Average	5.015	4.731	4.731	9.473	9.631	9.566	14.828	15.914	14.841
Found	0.010	0.009	0.009	0.019	0.019	0.019	0.030	0.033	0.030
Added	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03
%Recovery	95.045	89.181	89.181	93.460	95.088	94.423	99.101	106.559	99.187
Average	91.135			94.323			101.615		

2.4 Repeatability

The data from accuracy testing was also used for the repeatability testing. The %RSD of all 3 concentrations were less than 7.3 which passed the criteria (Table 6).

Table 6 The %RSD of the concentration of polysorbate80 at the level of 80, 100 and 120%

Replicated sample	Concentration of polysorbate80 (mg/mL)		
	80%	100%	120%
1	0.010	0.019	0.030
2	0.009	0.019	0.033
3	0.009	0.019	0.030
Average	0.009	0.019	0.031
%RSD	3.71	0.87	4.21

2.5 Intermediate precision

The six replicates of spiked sample were performed in each day at the concentration of 0.02 mg/mL, 100%. The results showed that the %RSD from 3 days and 2 analysts were 3.90 and 4.30, respectively, which were less than 7.3% (Table7). Therefore, this analytical method also passed the intermediate precision of the validation process.

Table 7 The result of intermediate precision

Sample No.	Concentration of polysorbate80 (mg/mL)			
	Day 1	Day 2	Day 3	2nd analyst
1	0.019	0.018	0.019	0.018
2	0.020	0.020	0.020	0.021
3	0.020	0.019	0.020	0.021
4	0.021	0.019	0.020	0.020
5	0.021	0.020	0.020	0.020
6	0.020	0.020	0.019	0.020
Average	0.020			
%RSD	4.30			
Average (3 days)	0.020			
%RSD (3 days)	3.90			

2.6 Testing pharmaceutical product

After the method was validated, polysorbate80 in nimotuzumab product was analyzed. The result from three replications of sample solution showed that the content of polysorbate80 in the product was 0.15 mg/mL (Table 8) which passed the in-house specification, 0.1-0.3 mg/mL. The %RSD for system suitability was 1.25. The expanded uncertainty was 0.0123 mg/mL which was calculated by multiplying the combined standard uncertainty by coverage factor of 2. The report value will be 0.15 ± 0.0123 mg/mL.

Table 8 The result of pharmaceutical product

Injection no.	Peak area			
	Standard	Sample A	Sample B	Sample C
1	12.149	8.068	9.019	9.088
2	12.184	8.472	8.851	9.136
3	12.050			
4	11.881			
5	11.858			
6	12.816			
Average	12.156	8.270	8.935	9.112
Content of polysorbate80 (mg/mL)		0.137	0.149	0.151
Average (mg/mL)		0.15		
%RSD		5.06		

Discussion

The most strength of the CAD was the detection of some compounds that are practically invisible to UV-absorbance detectors. However, it also detects impurities in the mobile phase which could not be detected by UV-absorbance detectors if they do not contain chromophores. The high level of background could occur if there are some impurities in the component of mobile phase. Therefore, all reagents in mobile phase should be the HPLC or LC-MS grade such as isopropanol and formic acid.

The chromatogram of blank showed the small peaks at the retention time of 4.5 and 5.5 minutes. The gradient of mobile phase was dramatically changed from 100% organic solvent, isopropanol, to 90% water in about 1 minute. The first peak in blank injection should come from the changing of mobile phase. For the peak at the retention time of 5.5 minutes, there might be something in the mobile phase that be detected by CAD. Therefore, chromatogram subtraction should be performed before starting each sequence to improve the baseline and get more accurate data.

Conclusion

The method for polysorbate80 content analysis was developed and validated. The Oasis column was selected by using 0.02% formic acid in water and in isopropanol as a mobile phase and the concentration of polysorbate80 for analysis should be suitable, 0.1-0.3 mg/mL. The developed method was validated and passed the requirement of validation including specificity, accuracy, repeatability, and intermediate precision according to the ICH guideline Q2(R1). Therefore, this method is suitable for analysis of the polysorbate80 content in nimotuzumab product.

References

1. Hillgren A, Lindgren J, Alden M. Protection mechanism of Tween 80 during freeze-thawing of a model protein, LDH. Int J Pharm. 237(2022), pp. 57–69.
2. Ha E, Wang W, Wang YJ. Peroxide formation in polysorbate 80 and protein stability. J Pharm Sci. 91(2002), pp. 2252–64.
3. Kishore RSK, Pappenberger A, Dauphin IB, et al. Degradation of polysorbates 20 and 80: Studies on thermal auto-oxidation in bulk and hydrolysis in formulations. J Pharm Sci. 100(2011), pp. 721–31.
4. R.S.K. Kishore, S. Kiese, S. Fischer, et al. The degradation of polysorbates 20 and 80 and its potential impact on the stability of biotherapeutics. Pharm Res. 28 (5) (2011), pp. 1194-1210.
5. A.D. Grabarek, U. Bozic, J. Rousel, et al. What makes polysorbate functional? Impact of polysorbate 80 grade and quality on IGG stability during mechanical stress. J Pharm Sci. 109 (1) (2020), pp. 871-880.
6. Lakshmy N, Norma S, Sarah V, et al. Determination of polysorbate 80 in parenteral formulations by high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. Journal of Chromatography A. 1012 (2003), pp. 81–86.
7. Lindsay McNalley. Analysis for Polysorbate 80 Using New High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method with Charged Aerosol Detection (CAD). Impact Analytical.
8. AOAC Official Methods of Analysis. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC International 2016.
9. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. Laboratory and Scientific Section United Nations Office on Drugs and Crime. UNITED NATIONS New York, 2009.
10. Michael A, Lawrence WD, Difei Q, et al. A simple reversed phase high-performance liquid chromatography method for polysorbate 80 quantitation in monoclonal antibody drug products. Journal of Chromatography B. 878 (2010), pp. 1865–1870.

11. Vikram N, Zhijun T, Peter I, et al. Evaporative Light Scattering Detection Based HPLC Method for the Determination of Polysorbate 80 in Therapeutic Protein Formulations. Journal of Chromatographic Science. 50(2012), pp. 21–25.
12. Sepax Monomix H2P SAX Tween Quantification Product sheet.
13. Zhen Long et al. A highly sensitive high-performance liquid chromatography charged aerosol detection method for the quantitative analysis of polysorbate 80 in protein solution. Thermo scientific Application Note 72398.
14. Care and use manual for Oasis on-line columns SPE columns for LC/MS/MS. December 2012.
15. Chou DK, Krishnamurthy R, Randolph TW, et al. "Effects of Tween 20 and Tween 80 on the stability of Albutropinduring agitation". J Pharm Sci. 94 (6) (2005), pp. 1368–81.

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original Article

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจเอกลักษณ์กลุ่มยาแก้แพ้ 5 ชนิด ในผลิตภัณฑ์ยา ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

(Method development and Validation for Identification of 5 Antihistamine Drugs in Pharmaceutical Products by HPLC)

*ปฏิมา มณีสถิตย์**

*อิศรา บุญมี**

Abstract Antihistamine is a group of drugs used to reduce or block histamine in order to alleviate allergy symptoms. Antihistamines used for medicinal purpose are available in many types and forms. In the past, quantitative analysis of the drugs is time-consuming as each of the drugs requires specific analytical method. Therefore, the analytical method of diphenhydramine hydrochloride raw material specified in the monograph published in USP 2022 was used to develop a new identification method that can determine 5 antihistamines (chlorpheniramine, diphenhydramine, promethazine, hydroxyzine and cetirizine) once, using a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique. The chromatographic system consists of an L7 column (4.6 × 250 mm, 5µm), a mobile phase, which is phosphate buffer pH 3.0 and acetonitrile. The flow rate is 1.2 ml/min. An ultraviolet at a wavelength of 220 nm was used for detection. The validation result showed that the method was specific to all of the 5 antihistamines. The resolution value of each drug was greater than 2.0. The method showed a sensitivity in detection of the drugs in tablet and syrup forms, with a limit of detection (LOD) within 1.20 – 3.12 µg/ml, except for promethazine. In conclusion, this new method developed can be applied as a standard method for identification of different types of antihistamines in modern drugs of interest.

Keywords: antihistamine, High Performance Liquid Chromatography, analytical method development, identification

*สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ ยาต้านฮีสทามีน (Antihistamine) คือกลุ่มยาที่ใช้ลดและระงับการหลั่งสารฮีสทามีน เพื่อลดอาการแพ้ ยาต้านฮีสทามีนที่นำมาใช้ในทางการแพทย์มีหลายชนิด หลายรูปแบบ ที่ผ่านมาวิธีตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพต้องใช้เวลามากเพราะเป็นวิธีเฉพาะของตัวยาต้านฮีสทามีนแต่ละชนิด ดังนั้นจึงได้นำวิธีตรวจวิเคราะห์วัตถุดิบ diphenhydramine hydrochloride ตาม USP 2022 มาพัฒนาให้เป็นวิธีที่สามารถตรวจเอกลักษณ์ยาต้านฮีสทามีนได้พร้อมกันในคราวเดียว จำนวน 5 ชนิดได้แก่ chlorpheniramine, diphenhydramine, promethazine, hydroxyzine และ cetirizine โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ระบบของโครมาโทกราฟประกอบด้วยคอลัมน์ L7 (4.6 × 250 mm, 5µm) สารละลายตัวพาคือสารละลาย phosphate buffer pH 3.0 และ acetonitrile อัตราการไหล 1.2 ml/min ตรวจวัดด้วยคลื่นแสงที่ 220 nm ผลการทดสอบพบว่าวิธีมีความจำเพาะเจาะจงกับยาต้านฮีสทามีนทั้ง 5 ชนิด ค่า Resolution ของตัวยาแต่ละชนิดมากกว่า 2.0 มีความไวในการตรวจพบในยาเม็ดและยาน้ำเชื่อมโดยมีขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ยกเว้น Promethazine ในยาน้ำเชื่อมอยู่ในช่วง 1.20 ถึง 3.12 µg/ml สรุปว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจเอกลักษณ์ยาต้านฮีสทามีนต่างๆในผลิตภัณฑ์ยาแผนปัจจุบันที่สนใจได้

คำสำคัญ: ยาต้านฮีสทามีน, โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง, การพัฒนาวิธีวิเคราะห์, การตรวจเอกลักษณ์

บทนำ ยาต้านฮีสทามีน (Antihistamine) คือยาที่ใช้ลดและระงับสารฮีสทามีนที่ร่างกายหลั่งออกมา เมื่อสัมผัสหรือเผชิญกับสิ่งที่เป็นอันตราย อย่างเช่น การติดเชื้อ สารนี้ทำให้เกิดการขยายตัวของเส้นเลือด ตามมาด้วยการบวมของผิวหนัง เพื่อเป็นการเตือนให้ร่างกายทราบว่ามีบางสิ่งที่อันตราย สำหรับผู้ที่เป็นโรคภูมิแพ้นั้น ร่างกายจะหลั่งสารฮีสทามีนตอบสนองกับบางสิ่ง เช่น ฝุ่น ละอองเกสร หรือ ขนสัตว์ เป็นต้น ทั้งที่สิ่งเหล่านี้มิได้เป็นอันตราย สารฮีสทามีนที่หลั่งออกมาทำให้เกิดอาการที่ไม่พึงประสงค์ เช่น คัน น้ำตาไหล น้ำมูกไหล คัดจมูก หายใจลำบาก จาม และเป็นผื่นบนผิวหนัง ยาต้านฮีสทามีนสามารถช่วยลดหรือป้องกันอาการดังกล่าวได้ (1) ส่วนโรคหวัด ซึ่งเป็นการติดเชื้อไวรัสในขณะที่ภูมิต้านทานต่ำจากภาวะเครียด หรืออ่อนเพลีย ร่างกายจะตอบสนองต่อการติดเชื้อ ด้วยการทำให้เกิดอาการไข้ ปวดศีรษะ รวมถึงมีน้ำมูกไหล ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้ยาต้านฮีสทามีนร่วมด้วยในการรักษา ยาต้านฮีสทามีนเมื่อแบ่งกลุ่มตามผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจะมี 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ทำให้ง่วง และกลุ่มที่ไม่ทำให้ง่วง กลุ่มที่ทำให้ง่วงนั้นนอกจากตัวยาจะออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งสารฮีสทามีนแล้ว ยาในกลุ่มนี้สามารถผ่านเข้าสู่สมองไปกดระบบประสาท โดยยับยั้งการหลั่งสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนในสมอง ทำให้เกิดผลข้างเคียงที่สำคัญ คือมีอาการง่วงซึม และอาจพบอาการข้างเคียงอื่น ๆ ได้อีก เช่น ปากแห้ง คอแห้ง ตาพร่า ท้องผูก และปัสสาวะคั่ง ซึ่งเป็นผลจากการยับยั้งการทำงานของสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนที่ส่วนอื่นๆของร่างกาย ดังนั้นการใช้ยาที่ไม่ถูกต้องอาจก่อให้เกิดอันตราย (2) ทั้งโรคภูมิแพ้และโรคหวัดเป็นโรคที่พบบ่อยในคนไทย (3) ทำให้ยาต้านฮีสทามีนในประเทศไทยที่จำหน่ายในท้องตลาดหรือที่สั่งจ่ายโดยแพทย์มีมากมายหลายชนิด หลายรูปแบบ อาจสุ่มเสียงต่อการกระทำที่ผิดกฎหมาย เช่นการผลิตจำหน่าย หรือการนำไปใช้อย่างไม่ถูกต้อง จากข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ของสำนักยาและวัตถุเสพติด กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย (4, 5, 6) พบว่าในแต่ละปีมีของกลางยาหรือวัตถุต้องสงสัยจำนวนมากถูกส่งมาตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์การมีหรือปลอมปนยาต้านฮีสทามีนเพื่อดำเนินคดี ตามปกติแล้ววิธีการตรวจพิสูจน์ยาต้านฮีสทามีนเป็นวิธี

เฉพาะตัวของตัวยาแต่ละชนิด หากต้องการตรวจพิสูจน์ยาต้านฮีสทามีนหลายชนิดก็จำเป็นต้องใช้เวลาและงบประมาณมาก ดังนั้นจึงได้นำวิธีตรวจวิเคราะห์วัตถุดิบ Diphenhydramine hydrochloride ตาม USP2022 (7) มาพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธี (8) เพื่อตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ยาต้านฮีสทามีนให้ได้หลายชนิดพร้อมกันในคราวเดียวขึ้น ซึ่งเทคนิคการตรวจพิสูจน์ที่พัฒนาขึ้นนี้จะสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานที่ช่วยประหยัดเวลาและงบประมาณในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ยาต้านฮีสทามีนลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Shimadzu, Japan, Model LC-20 Series
2. pH Meter: Mettler Toledo, Switzerland, Model Seven Excellent
3. Analytical Balance: Mettler Toledo, Switzerland, Model XPR205
4. Ultrasonic Bath: Crest Powersonic, Malaysia, Model P2600D
5. Water Filtration Apparatus: Millipore, America, Model MILLI-Q
6. Column: Inertsil C8 4.6 mm × 250 mm, 5 µm
7. Column: Zorbax C8 4.6 mm × 250 mm, 5 µm
8. Column: VertiSep UPS C8 4.6 mm × 250 mm, 5 µm
9. Fil: Vertipure, Nylon Syringe Filter 0.45 µm, Vertical Nylon Filter, 0.45 µm, Agela Technologie
10. Filter: Vertipure, Nylon Syringe Filter 0.45 µm, Vertical Nylon Filter, 0.45 µm, Agela Technologie
11. Glassware Class A

สารมาตรฐานและสารเคมี

1. Cetirizine HCl Reference Standard: DMSc. Reference Standard, Code C235, Control No. 04A61147
2. Diphenhydramine HCl Reference Standard: Asean Reference Standard, Code D097, Lot No. T414021
3. Promethazine HCl Working Standard: DMSc. Working Standard, Code P076, Control No. WS P76-4/61
4. Hydroxyzine HCl Reference Standard: DMSc. Reference Standard, Code H54, Control No. 05A61064
5. Chlorpheniramine maleate Reference Standard: DMSc. Reference Standard, Code C, ControlNo.05A63064
6. Maleic acid Reagent Plus ≥99% (HPLC), Sigma-Aldrich, Lot: SLCC7827
7. Acetonitrile, Anhydrous, HPLC Grade, Source: Macron, CAS No.: 75-05-8
8. Potassium dihydrogen phosphate, AR Grade, Source: CARLO ERBA, CAS No.: 7778-77-0
9. Phosphoric acid, AR Grade, Source: Merck, CAS No.: 7664-38-2
10. Water Type I

ตัวอย่างสำหรับใช้เป็น Placebo

1. ยาเม็ด : บริษัท สยามเภสัช จำกัด
2. ยาน้ำ : A DAGON บริษัท เทพน้ำหวาน จำกัด

วิธีวิเคราะห์

สภาวะของ HPLC ที่ใช้

- Mobile phase: Buffer pH 3.0 : Acetonitrile (65:35)
- Column: Inertsil C8 4.6 mm × 250 mm, 5 µm
- Flow rate: 1.2 ml/min
- Injection volume: 10 µl
- Detector: PDA 220 nm
- Run Time: 15 min

วิธีดำเนินการ

1. การเตรียมสารละลาย

    1.1. การเตรียมสารละลาย (Mobile phase)

    ชั่ง Potassium dihydrogen phosphate 5.4 กรัม ละลายในน้ำ Type I 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 3.0 ด้วย Phosphoric acid ตวงสารละลายมา 650 มิลลิลิตร ผสมกับ Acetonitrile 350 มิลลิลิตรกรองผ่าน Nylon membrane filter ขนาด 0.45 µm

    1.2. การเตรียมสารละลายสำหรับใช้เป็น Diluent

    ตวง Acetonitrile 500 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำ 500 มิลลิลิตร

2. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)

    2.1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

    ตารางที่ 1 แสดงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ใช้ในหัวข้อความจำเพาะเจาะจง

No.	Standard	ความเข้มข้น (mg/ml)	
		Stock Standard Solution	Standard Solution
1	Cetirizine HCl	1.0	0.1
2	Diphenhydramine HCl	1.0	0.1
3	Promethazine HCl	1.0	0.1
4	Hydroxyzine HCl	1.0	0.1
5	Chlorpheniramine maleate	1.0	0.1
6	Maleic acid	0.2	0.02

เตรียมสารละลายมาตรฐานตั้งต้น (Stock Standard Solution)

2.1.1. ชั่ง Cetirizine HCl RS 20 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.2. ชั่ง Diphenhydramine HCl RS 20 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.3. ชั่ง Promethazine HCl RS 20 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.4. ชั่ง Hydroxyzine HCl RS 20 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.5. ชั่ง Chlorpheniramine maleate 20 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.6. ชั่ง Maleic acid 20 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard Solution)

2.2.1. ปิเปตสารละลาย Cetirizine Stock Solution 2 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.2. ปิเปตสารละลาย Diphenhydramine Stock Solution 2 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.3. ปิเปตสารละลาย Promethazine Stock Solution 2 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.4. ปิเปตสารละลาย Hydroxyzine Stock Solution 2 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.5. ปิเปตสารละลาย Chlorpheniramine maleate Stock Solution 2 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.6. ปิเปตสารละลาย Maleic acid Stock Solution 2 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.3. การเตรียมสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และ Maleic acid (Standard Mix Solution, Std.Mix)

2.3.1. ปิเปต Standard Stock Solution (ข้อ 2.1.1 ถึง 2.1.6) ชนิดละ 2 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flaskขนาด 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent กรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

2.4. การเตรียมสารละลาย Placebo 2 ชนิด

2.4.1. <u>Placebo ยาเม็ด</u>

ชั่ง Placebo ยาเม็ด 100 มิลลิกรัม ลงใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร เติม Diluent นำไป Sonicateเป็นเวลา5 นาที ปรับปริมาตรด้วย Diluent กรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

2.4.2. <u>Placebo ยาน้ำ</u>

ตวง Placebo ยาน้ำ 4 มิลลิลิตรใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร เติม Diluent นำไป Sonicate เป็นเวลา5 นาที ปรับปริมาตรด้วย Diluent กรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

2.5. การเตรียมสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และ Maleic acid และผสม Placebo ชนิดละ 3 ซ้ำ (A,B,C)

2.5.1. <u>Placebo ยาเม็ด</u>

ชั่ง Placebo ยาเม็ด 100 มิลลิกรัม ลงใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตรปิเปต Standard Stock Solution (ข้อ 2.1.1 ถึง 2.1.6) ชนิดละ 2 มิลลิลิตร,นำไป Sonicate เป็นเวลา 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย Diluent กรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

2.5.2. Placebo ยาน้ำ

ตวง Placebo ยาน้ำ 4 มิลลิลิตร ลงใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ปิเปต Standard Stock Solution (ข้อ 2.1.1 ถึง 2.1.6) ชนิดละ 2 มิลลิลิตร, นำไปSonicate เป็นเวลา 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย Diluent กรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

วิธีดำเนินการ

1. ฉีด Diluent จำนวน 1 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบ base line และ noise
2. ฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และ Maleic acid (ข้อ 2.3) จำนวน 3 ซ้ำ เพื่อทดสอบความนิ่งของระบบ
3. ฉีดสารละลายมาตรฐานยาต้านฮีสทามีน (ข้อ 2.2.1 ถึง 2.2.6) ชนิดละ 1 ซ้ำ
4. ฉีดคั่นด้วยสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และ Maleic acid (ข้อ 2.3) จำนวน 1 ซ้ำ
5. ฉีดสารละลาย Placebo 2 ชนิด (ข้อ 2.4) ชนิดละ 1 ซ้ำ
6. สารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิดและ Maleic acid ผสมใน Placebo (ข้อ 2.5.1, 2.5.2)
7. ชนิดละ 1 ซ้ำ
8. ฉีดปิดท้ายด้วย สารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน5 ชนิด และ Maleic acid (ข้อ 2.3) จำนวน 1 ซ้ำ
9. บันทึกค่า Retention time, Resolution, Peak Purity และ %Match

เกณฑ์การยอมรับ

1. Peak ยาแต่ละตัวที่ปรากฏใน Chromatogram ที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และ Maleic acid ทั้งที่ผสมและไม่ผสม Placeboต้องมี Retention time แตกต่างกัน โดยมีค่า %RSD ของ Retention time จากการฉีด 3 ซ้ำ ไม่เกิน 2.0 (พิจารณา %RSD จากการฉีดไม่น้อยกว่า 3 ซ้ำ เนื่องจากเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ)
2. Peak ยาแต่ละตัวที่ปรากฏใน Chromatogram ที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และ Maleic acid ต้องมีค่า Resolution ระหว่างตัวยาไม่ต่ำกว่า 2.0
3. Peak ยาแต่ละตัวที่ปรากฏใน Chromatogram ที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และ Maleic acid ที่ผสมใน Placeboต้องมีค่า Peak Purity ไม่น้อยกว่า 0.95
4. Peak ยาแต่ละตัวที่ปรากฏใน Chromatogram ที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และ Maleic acid ที่ผสมใน Placebo เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน ต้องมีค่า%Matching ของ Spectrum ไม่น้อยกว่า ร้อยละ 95

3. <u>การทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ (System Suitability)</u>

3.1. การทดสอบความเที่ยงของระบบโครมาโทกราฟ

การเตรียมสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และ Maleic acid เตรียมเช่นเดียวกับ ข้อ 2.3

วิธีดำเนินการ

1. ฉีด Diluent จำนวน 1 ซ้ำ เพื่อดู base line และ noise
2. ฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิดและ Maleic acid (ข้อ 2.3) จำนวน 3 ซ้ำ เพื่อดูความนิ่งของระบบ
3. บันทึกค่า Retention time และค่า Resolution

การคำนวณ

1. คำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่า %RSD ของค่า Retention time และค่า Resolution ที่ได้จากการฉีด 3 ซ้ำ

เกณฑ์การยอมรับ

1. ค่า %RSD ของการฉีด 3 ซ้ำ ต้องไม่เกิน 2.0 (พิจารณา %RSD จากการฉีดไม่น้อยกว่า 3 ซ้ำ เนื่องจากเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ)

4. <u>การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection)</u>

ดำเนินการโดยการค่อย ๆ ลดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน และของสารละลายมาตรฐานผสม Placebo ลงจนได้ความเข้มข้นต่ำสุดของตัวยาแต่ละตัว ที่สามารถตรวจพบและสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และผสม Placebo ตามความเข้มข้นดังกล่าวอีกครั้ง โดยเตรียมชนิดละ 3 ซ้ำ เพื่อทดสอบความแม่นยำของขีดจำกัดการตรวจพบ โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นอย่างถูกต้องโดยประมาณ ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ใช้ในหัวข้อขีดจำกัดของการตรวจพบ

No.	**Standard**	**ความเข้มข้น (mg/ml)**	
		Stock Standard Solution	**Standard Solution**
1	Cetirizine HCl	0.02	0.003
2	Diphenhydramine HCl	0.02	0.001
3	Promethazine HCl	0.02	0.001
4	Hydroxyzine HCl	0.02	0.003
5	Chlorpheniramine maleate	0.02	0.001

4.1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานตั้งต้น (Stock Standard Solution)

4.1.1. ปิเปตสารละลาย Cetirizine Stock Solution (ข้อ 2.1.1) 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.2. ปิเปตสารละลาย Diphenhydramine Stock Solution (ข้อ 2.1.2) 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.3. ปิเปตสารละลายPromethazine Stock Solution (ข้อ 2.1.3) 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.4. ปิเปตสารละลาย Hydroxyzine Stock Solution (ข้อ 2.1.4) 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.5. ปิเปตสารละลาย Chlorpheniramine maleate Stock Solution (ข้อ 2.1.5) 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard Solution)

4.2.1. ปิเปตสารละลาย Cetirizine Stock Solution 3 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.2. ปิเปตสารละลาย Diphenhydramine Stock Solution 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.3. ปิเปตสารละลายPromethazine Stock Solution 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.4. ปิเปตสารละลาย Hydroxyzine Stock Solution 3 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.5. ปิเปตสารละลาย Chlorpheniramine maleate Stock Solution 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Diluent จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.3. การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด (Standard Mix Solution, Std.Mix)

4.3.1. ปิเปต Standard Stock Solution (ข้อ 4.1.1 ถึง 4.1.5) ปริมาตร 3.0, 1.0, 1.0, 3.0 และ 1.0 มิลลิลิตรตามลำดับใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย กรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

4.4. การเตรียมสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และผสม Placebo ชนิดละ 3 ซ้ำ (A,B,C)

4.4.1. <u>Placebo ยาเม็ด</u>

ชั่ง Placebo ยาเม็ด 100 มิลลิกรัม ลงใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตรปิเปต Standard Stock Solution (ข้อ 4.1.1 ถึง 4.1.5) ปริมาตร 3.0, 1.0, 1.0, 3.0 และ 1.0 มิลลิลิตรตามลำดับ นำไป Sonicate เป็นเวลา 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย Diluent กรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

4.4.2. <u>Placebo ยาน้ำ</u>

ตวง Placebo ยาน้ำ 4 มิลลิลิตร ลงใน Volumetric Flask ขนาด 20 มิลลิลิตร ปิเปต Standard Stock Solution (ข้อ 4.1.1 ถึง 4.1.5) ปริมาตร 3.0, 1.0, 1.0, 3.0 และ 1.0 มิลลิลิตรตามลำดับ นำไป Sonicate เป็นเวลา 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย Diluent กรองด้วย Nylon Syringe Filter 0.45 µm

วิธีดำเนินการ

1. ฉีด Diluent จำนวน 1 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบ base line และ noise
2. ฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด (ข้อ 4.3) จำนวน 3 ซ้ำ เพื่อทดสอบความนิ่งของระบบ
3. ฉีดสารละลายมาตรฐานยาต้านฮีสทามีน (ข้อ 4.2.1 ถึง 4.2.5) ชนิดละ 1 ซ้ำ
4. ฉีดคั่นด้วยสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด (ข้อ 4.3) จำนวน 1 ซ้ำ
5. สารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และผสม Placebo (ข้อ 4.4.1, 4.4.2) ชนิดละ 1 ซ้ำ

6. ฉีดปิดท้ายด้วย สารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด (ข้อ 4.3) จำนวน 1 ซ้ำ
7. บันทึกค่า Signal to noise ratio, Retention time, Resolution, Peak Purity และ %Matching

เกณฑ์การยอมรับ

1. Signal to noise ratio ของ Peak ตัวยาแต่ละตัว ที่ปรากฏใน Chromatogram ที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และผสม Placebo ต้องไม่น้อยกว่า 3.0
2. Peak ยาแต่ละตัวที่ปรากฏใน Chromatogram ที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และผสม Placeboต้องมีค่า Peak Purity ไม่น้อยกว่า 0.95
3. Peak ยาแต่ละตัวที่ปรากฏใน Chromatogram ที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และผสม Placebo เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานต้องมีค่า %Matching ของ Spectrum ไม่น้อยกว่าร้อยละ 95

5. <u>การศึกษาความคงทนของวิธี (Robustness)</u>

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน และสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และ Maleic acid ตามข้อ 2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี

การศึกษาความคงทนของวิธี ประกอบด้วย 4 วิธีการ

1. ความยาวคลื่นในการตรวจวัด: จาก 220 นาโนเมตร เปลี่ยนเป็น 218 และ 222 นาโนเมตร
2. คอลัมน์: จาก Inertsil C8 4.6 × 250 mm, 5 µm ปลี่ยนเป็น Zorbax C8 4.6 × 250 mm, 5 µm และ Vertisep UPS C8 4.6 × 250 mm, 5 µm
3. สัดส่วนของสารละลายตัวพา: จาก Buffer pH 3.0 : ACN (65:35) เปลี่ยนเป็น Buffer pH 3.0 : ACN (60:40) และ Buffer pH 3.0 : ACN (70:30)
4. ความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย Buffer: จาก Buffer pH 3.0 เปลี่ยนเป็น Buffer pH 2.8 และ Buffer pH 3.2

วิธีดำเนินการ

1. ฉีด Diluent จำนวน 1 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบ base line และ noise
2. ฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และ Maleic acid จำนวน 3 ซ้ำ เพื่อทดสอบความนิ่งของระบบ
3. ฉีดสารละลายมาตรฐานยาต้านฮีสทามีน ชนิดละ 1 ซ้ำ
4. ฉีดปิดท้ายด้วย สารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และ Maleic acid จำนวน 1 ซ้ำ

5. บันทึกค่า Retention time, Resolution, Peak Purity และ %Matching

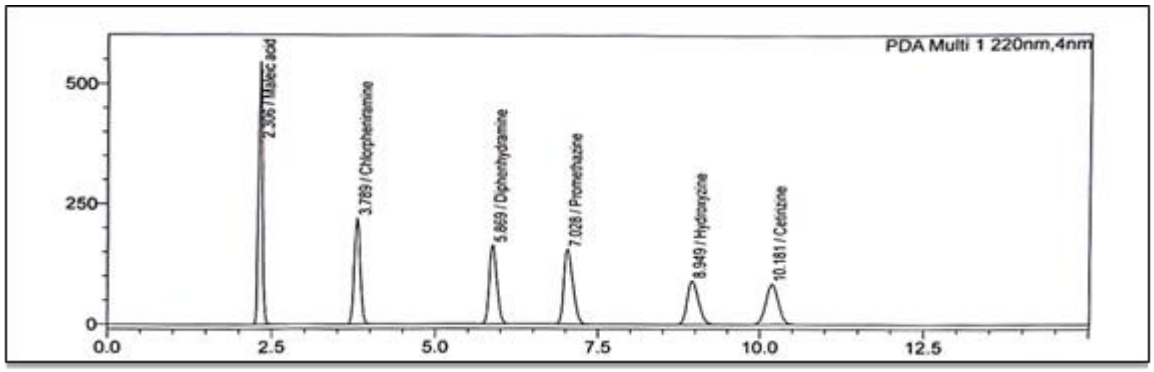
เกณฑ์การพิจารณา

1. ค่า Retention time ของ Peak ของตัวยาแต่ละตัวที่ปรากฏใน Chromatogram เมื่อปรับเปลี่ยน Parameter
2. ค่า Peak Purity ของ Peak ของตัวยาแต่ละตัวที่ปรากฏใน Chromatogram เมื่อปรับเปลี่ยน Parameter
3. ค่า Resolution ระหว่าง Peak ของตัวยาแต่ละตัวที่ปรากฏใน Chromatogram เมื่อปรับเปลี่ยน Parameter
4. ค่า %Matching ของ Spectrum ของตัวยาแต่ละตัวที่ปรากฏใน Chromatogram เมื่อปรับเปลี่ยน Parameter

ผล

1. <u>การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)</u>

วิธีการที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกพีคของยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด ได้แก่ Chlorpheniramine, Diphenhydramine, Promethazine, Hydroxyzine และ Cetirizine ออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยพิจารณาจากโครมาโทแกรมตามรูปที่ 1 ซึ่งพบว่าแต่ละพีคที่อยู่ใกล้กันมีค่า Resolution มากกว่า 2.0 ทั้งนี้ค่า Retention time, Relative retention time และ Resolution แสดงดังตารางที่ 3 โดย Maleic acid ในระบบ ทำหน้าที่เพียงเพื่อให้เป็นตัวแทนตำแหน่ง ใน Chromatograph ของพีคเกลือที่ถูกปล่อยออกมาจากโครงสร้างของ Chlorpheniramine maleate เมื่ออยู่ในสารละลายเท่านั้น



รูปที่ 1 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และ Maleic acid

ตารางที่ 3 แสดงค่า Retention time (RT), ค่า Relative retention time (RRT) และค่า Resolution ของสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิดและ Maleic acid

No.	Standard	RT	RRT	Resolution
1	Maleic acid	2.306	0.23	-
2	Chlorpheniramine	3.789	0.37	9.462
3	Diphenhydramine	5.869	0.58	9.889
4	Promethazine	7.028	0.69	4.599
5	Hydroxyzine	8.949	0.88	6.312
6	Cetirizine	10.181	1.00	3.522

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิดและ Maleic acid ที่แยกผสมกับ Placebo ยาเม็ดและยาน้ำ พบว่าพีคของยาแต่ละชนิด ไม่ถูกรบกวนจากสารอื่นในตำรับ โดยมีค่า Peak Purity ไม่ต่ำกว่า 0.95 และมีค่า %Matching ของ Spectrum เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานไม่ต่ำกว่าร้อยละ 95 (ตารางที่ 4) ยกเว้น Promethazine ในสารละลายที่ผสม Placebo ยาน้ำ แสดงผลเป็น NA ทั้งนี้เนื่องจากใน Placebo ยาน้ำนั้น มีพีคปรากฏในโครมาโทแกรม ในช่วงเวลาเดียวกันกับพีคของ Promethazine

ตารางที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยและ% RSD ของค่า Retention time (RT) ค่า%Matching และค่า Peak Purity ของยาต้านฮีสทามีนแต่ละชนิดเมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิดและ Maleic acid ที่ผสมใน Placebo ยาเม็ด และยาน้ำ

No.	Standard	Placebo	RT	%RSD	%Matching	%RSD	Purity	%RSD
1	Maleic acid	ยาเม็ด	2.315	0.19	99.99	0.00	99.99	0.01
		ยาน้ำ	2.295	0.04	99.87	0.01	99.99	0.00
2	Chlorpheniramine	ยาเม็ด	3.792	0.13	99.99	0.01	99.99	0.02
		ยาน้ำ	3.812	0.03	99.97	0.00	99.99	0.00
3	Diphenhydramine	ยาเม็ด	5.870	0.09	99.99	0.00	99.71	0.51
		ยาน้ำ	5.917	0.03	99.93	0.00	99.99	0.00
4	Promethazine	ยาเม็ด	7.041	0.07	99.99	0.00	99.99	0.02
		ยาน้ำ	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5	Hydroxyzine	ยาเม็ด	8.959	0.05	99.99	0.00	98.44	2.51
		ยาน้ำ	9.014	0.02	99.98	0.00	99.98	0.01
6	Cetirizine	ยาเม็ด	10.188	0.05	99.99	0.00	99.07	1.62
		ยาน้ำ	10.197	0.02	99.99	0.00	99.99	0.00

2. การทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ (System suitability)

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิดและ Maleic acid จำนวน 3 ซ้ำ พบว่ายาต้านฮีสทามีนแต่ละชนิดมีค่า %RSD ของ Retention time และค่า %RSD ของ Resolution ไม่เกิน 2.0 ตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลความเที่ยงของระบบโครมาโทกราฟี

No.	Standard	Av. RT	%RSD	Av. Resolution	%RSD
1	Maleic acid	2.307	0.04	-	-
2	Chlorpheniramine	3.788	0.04	9.499	0.41
3	Diphenhydramine	5.870	0.02	9.930	0.37
4	Promethazine	7.030	0.02	4.620	0.63
5	Hydroxyzine	8.949	0.01	6.332	0.36
6	Cetirizine	10.182	0.01	3.529	0.34

3. การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD)

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และผสม Placebo ยาเม็ด และยาน้ำ โดยความเข้มข้นของยาต้านฮีสทามีนแต่ละชนิดเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะสามารถตรวจพบและพิสูจน์เอกลักษณ์ได้นั้น พบว่าค่า Signal to noise ratio ของยาต้านฮีสทามีนแต่ละชนิดไม่ต่ำกว่า 3.0 และมีค่า Peak Purity ไม่น้อยกว่า 0.95 และมีค่า %Matching ของ Spectrum ไม่น้อยกว่าร้อยละ 95 ยกเว้น Promethazine ในสารละลายที่ผสม Placebo ยาน้ำ ไม่สามารถหาค่า LOD ได้ แสดงผลเป็น NA (ตารางที่ 6) ทั้งนี้เนื่องจากใน Placebo ยาน้ำนั้น มีพีคปรากฏในโครมาโทแกรม ในช่วงเวลาเดียวกันกับพีคของ Promethazine

ตารางที่ 6 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบและพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ (LOD), ค่า Signal to noise ratio ค่า%Matching และค่า Peak Purity ของสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด ผสมใน Placebo ยาเม็ดและยาน้ำ

No.	Standard	Placebo	LOD (µg/ml)	S/N	%RSD	%Matching	%RSD	Purity	%RSD
1	Chlorpheniramine	ยาเม็ด	1.40	23.82	6.31	99.93	0.05	99.99	0.00
		ยาน้ำ	1.40	183.91	6.42	99.99	0.00	99.59	0.38
2	Diphenhydramine	ยาเม็ด	1.30	23.78	8.59	99.94	0.07	99.99	0.00
		ยาน้ำ	1.30	408.14	1.23	99.99	0.00	100.00	0.00

3	Promethazine	ยาเม็ด	1.20	14.57	6.86	99.71	0.34	99.99	0.00
		ยาน้ำ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4	Hydroxyzine	ยาเม็ด	3.12	31.26	5.32	99.97	0.04	99.99	0.00
		ยาน้ำ	3.12	31.25	3.85	99.50	0.35	99.94	0.01
5	Cetirizine	ยาเม็ด	3.10	21.67	5.51	99.93	0.04	99.99	0.01
		ยาน้ำ	3.10	75.49	4.18	99.88	0.06	99.99	0.00

4. การศึกษาความคงทนของวิธี (Robustness)

4.1. การเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นในการตรวจวัด (Wavelength)

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิดและ Maleic acid ซึ่งทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 220 218 และ 222 นาโนเมตร แล้ววัดค่าการตอบสนองเป็นค่าพื้นที่ใต้พีค (Peak Area) เป็นการแสดงถึงความไวหรือความสามารถในการมองเห็นได้ ของยาแต่ละชนิด พบว่ายาแต่ละชนิดมีค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีคสูงสุดเมื่อตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 220 218 และ 222 นาโนเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

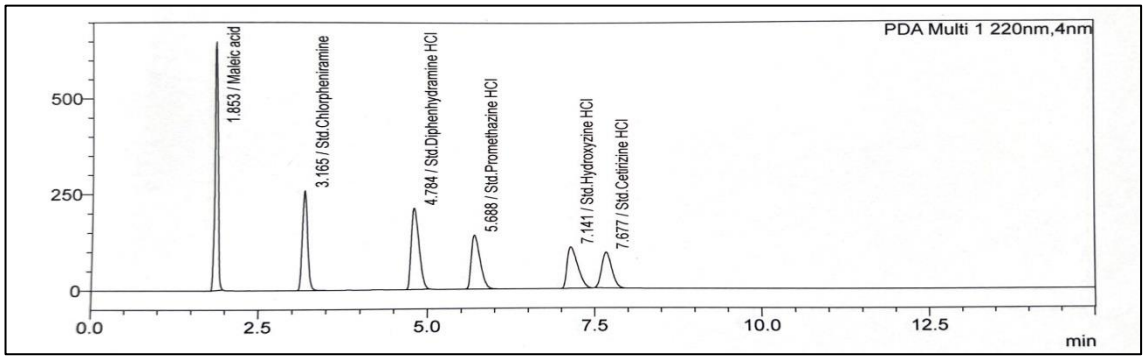
ตารางที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีค และ %RSD ที่ความยาวคลื่น 220 218 และ 222 นาโนเมตร

No.	**Standard**	**Average Peak Area**					
		220 nm	**%RSD**	**218 nm**	**%RSD**	**222 nm**	**%RSD**
1	Maleic acid	2142760	1.47	2502106	0.17	1827999	0.16
2	Chlorpheniramine	1400741	0.17	1356034	0.06	1445132	0.06
3	Diphenhydramine	1321692	0.76	1371511	0.24	1230431	0.24
4	Promethazine	1482800	2.64	1414873	0.33	1398844	0.33
5	Hydroxyzine	1092209	0.58	999316	1.77	1074477	1.78
6	Cetirizine	1101589	2.13	1136480	0.09	1221288	0.08

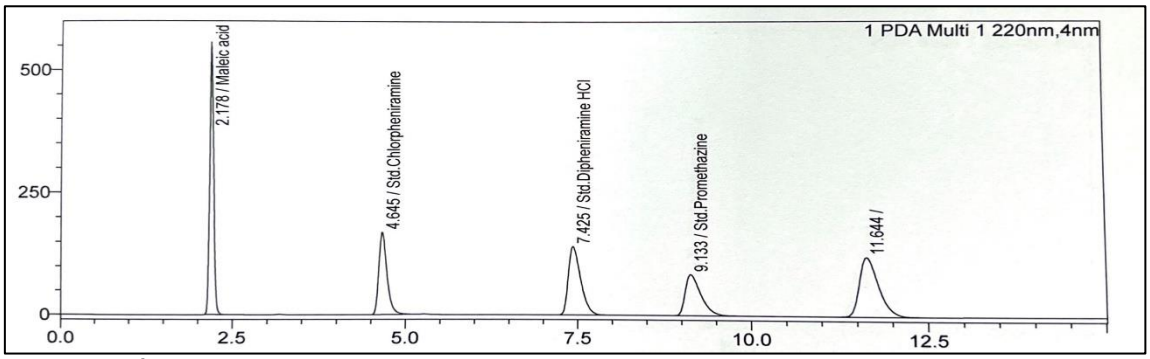
4.2. การเปลี่ยนแปลงคอลัมน์

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิดและ Maleic acid โดยมีการปรับเปลี่ยนคอลัมน์พบว่า พีคของยาต้านฮีสทามีนทั้ง 5 มีค่าเฉลี่ยและ %RSD ของค่า Retention time และค่า Resolution เป็นไปตามตารางที่ 8 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าคอลัมน์ Inertsil มีความสามารถสูงสุดในการแยกพีคยาต้านฮีสทามีนทั้ง 5 ชนิดนี้ ส่วนคอลัมน์ Zorbax สามารถแยกพีคยาต้านฮีสทามีนดังกล่าวได้เช่นเดียวกันแต่อาจมีความเสี่ยงในการแยกพีค Hydroxyzine และ Cetirizine ออกจากกัน เนื่องจากค่า Resolution ระหว่างตัวยาทั้งสองต่ำกว่า 2.0 (รูปที่ 2) และส่วนคอลัมน์ Vertisep UPS นั้น มีความสามารถต่ำสุดในการแยก เนื่องจากไม่สามารถแยกพีคของยา Hydroxyzine และ

Cetirizine ออกจากกันได้ (รูปที่ 3) ดังนั้นหากนำวิธีนี้ไปใช้อาจจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติม ถึงคอลัมน์ที่ใช้ว่ายี่ห้อ หรือรุ่นการผลิตของคอลัมน์มีผลต่อความสามารถของวิธีในการแยกของยาหรือไม่



รูปที่ 2 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และ Maleic acid ในคอลัมน์ Zorbax



รูปที่ 3 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด และ Maleic acid ในคอลัมน์ Vertisep UPS

ตารางที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยของค่า Retention time และค่า Resolution และค่า %RSD เมื่อปรับเปลี่ยนคอลัมน์

No.	Standard	Av. RT (%RSD)			Av. Resolution (%RSD)		
		Inertsil*	Zorbax	Vertisep	Inertsil*	Zorbax	Vertisep
1	Maleic acid	2.307	1.857	2.177	-	-	-
		(0.04)	(0.17)	(0.05)	-	-	-
2	Chlorpheniramine	3.788	3.169	4.656	9.499	10.147	14.312
		(0.04)	(0.13)	(0.32)	(0.41)	(0.57)	(0.48)
3	Diphenhydramine	5.870	4.788	7.454	9.930	8.267	9.841

		(0.02)	(0.07)	(0.45)	(0.37)	(0.66)	(0.45)
4	Promethazine	7.030	5.691	9.173	4.620	3.670	4.523
		(0.02)	(0.07)	(0.53)	(0.63)	(0.50)	(0.50)
5	Hydroxyzine	8.949	7.145	11.684	6.332	5.075	5.502
		(0.01)	(0.09)	(0.44)	(0.36)	(0.18)	(0.55)
6	Cetirizine	10.182	7.680	11.684	3.529	1.722	5.502
		(0.01)	(0.06)	(0.44)	(0.34)	(0.60)	(0.55)

4.3 การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของสารละลายตัวพา (Mobile phase)

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิดและ Maleic acid โดยมีการปรับเปลี่ยนสัดส่วนของสารละลายตัวพาพบว่า พีคของยาต้านฮีสทามีนทั้ง 5 มีค่าเฉลี่ยและ %RSD ของค่า Retention time และค่า Resolution เป็นไปตามตารางที่ 9 ซึ่งเมื่อสัดส่วนของ Acetonitrile ในสารละลายตัวพาเพิ่มขึ้น พบว่าค่า Retention time และ ค่า Resolution ของยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิดและ Maleic acid นั้น ลดลง ทำให้มีความเสี่ยงในการแยกพีค Promethazine ออกจาก พีคของ Diphenhydramine และแยกพีค Hydroxyzine ออกจากพีคของ Promethazine และเมื่อสัดส่วนของ Acetonitrile ในสารละลายตัวพาลดลง พบว่าค่า Retention time และ Resolution ของทุกตัวยาเพิ่มมากขึ้น พีคของยาต้านฮีสทามีนทั้ง 5 ชนิด สามารถแยกออกจากกันได้มากขึ้น แต่อาจส่งผลให้ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ที่ยาวนานมากเกินไป

ตารางที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ยของค่า Retention time และค่า Resolution และค่า %RSD เมื่อปรับเปลี่ยนสัดส่วนสารละลายตัวพา

No.	**Standard**	**Av. RT (%RSD)**			**Av. Resolution (%RSD)**		
		Buffer : Acetonitrile			**Buffer : Acetonitrile**		
		65 : 35	**60 : 40**	**70 : 30**	**65 : 35**	**60 : 40**	**70 : 30**
1	Maleic acid	2.307	2.289	2.388	-	-	-
		(0.04)	(0.09)	(0.15)	-	-	-
2	Chlorpheniramine	3.788	2.566	5.243	9.499	2.197	16.779
		(0.04)	(0.22)	(0.08)	(0.41)	(1.81)	(1.12)
3	Diphenhydramine	5.870	3.193	9.902	9.930	4.334	15.030
		(0.02)	(0.29)	(0.05)	(0.37)	(0.92)	(0.04)

4	Promethazine	7.030	3.485	13.015	4.620	1.940	7.673
		(0.02)	(0.34)	(0.05)	(0.63)	(2.12)	(0.06)
5	Hydroxyzine	8.949	3.758	19.054	6.332	1.786	10.913
		(0.01)	(0.41)	(0.04)	(0.36)	(6.58)	(0.10)
6	Cetirizine	10.182	4.401	22.005	3.529	3.649	4.358
		(0.01)	(0.38)	(0.01)	(0.34)	(4.28)	(0.22)

4.4 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลาย Buffer

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานแบบผสมยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิดและ Maleic acid โดยมีการปรับเปลี่ยนความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย Buffer ของสารละลายตัวพา พบว่า พีคของยาต้านฮีสทามีนทั้ง 5 มีค่าเฉลี่ยและ %RSD ของค่า Retention time และค่า Resolution เป็นไปตามตารางที่ 10 ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าความสามารถของวิธีในการแยกยาต้านฮีสทามีนทั้ง 5 ชนิด นั้นไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ยของค่า Retention time และค่า Resolution และค่า %RSD เมื่อปรับเปลี่ยน pH ของ Buffer

No.	**Standard**	**Av. RT (%RSD)**			**Av. Resolution (%RSD)**		
		pH 3.0	**pH 2.8**	**pH 3.2**	**pH 3.0**	**pH 2.8**	**pH 3.2**
1	Maleic acid	2.307	2.327	2.317	-	-	-
		(0.04)	(0.20)	(0.05)	-	-	-
2	Chlorpheniramine	3.788	3.582	3.786	9.499	8.027	9.516
		(0.04)	(0.20)	(1.85)	(0.41)	(0.14)	(2.96)
3	Diphenhydramine	5.870	5.777	5.503	9.930	10.567	8.441
		(0.02)	(0.10)	(3.17)	(0.37)	(0.20)	(3.68)
4	Promethazine	7.030	6.931	6.576	4.620	4.619	4.420
		(0.02)	(0.09)	(3.21)	(0.63)	(0.15)	(3.42)
5	Hydroxyzine	8.949	8.793	8.305	6.332	6.206	5.938
		(0.01)	(0.10)	(3.04)	(0.36)	(0.04)	(3.61)
6	Cetirizine	10.182	10.226	9.533	3.529	4.116	3.662
		(0.01)	(0.06)	(2.50)	(0.34)	(0.19)	(0.42)

สรุปและวิจารณ์

เทคนิควิธีของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่พัฒนาขึ้น เมื่อทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่าวิธีมีความจำเพาะเจาะจงกับยาต้านฮีสทามีนทั้ง 5 ชนิด สามารถแยกพีคยาต้านฮีสทามีนทั้ง 5 ชนิด และ Maleic acid ออกจากกันได้ โดยยาต้านฮีสทามีนแต่ละชนิดมีค่า Retention time ที่แตกต่างกัน และมีค่า Resolution มากกว่า 2.0 (รูปที่ 1, ตารางที่ 3) พีคของยาไม่ถูกรบกวนจากสารอื่นในตำรับยาเม็ด และยาน้ำ โดยมีค่า Peak Purity ไม่ต่ำกว่า 0.95 (ตารางที่ 4) ระบบโครมาโทกราฟ มีความเที่ยงโดยค่า Retention time และค่า Resolution ให้ค่า %RSD ไม่เกิน 2.0 (ตารางที่ 5) มีความไวในการตรวจพบในยาเม็ด และยาน้ำ โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบและพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ หรือ Limit of detection (LOD) อยู่ในช่วง 1.20-3.12 µg/ml (ตารางที่ 6) และมีความทนของวิธี เมื่อปรับเปลี่ยนความยาวคลื่นในการตรวจวัด (ตารางที่ 7) ปรับเปลี่ยนสัดส่วนของสารละลายตัวพา (ตารางที่ 9) ปรับเปลี่ยนความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลายตัวพา (ตารางที่ 10) และเมื่อมีการเลือกใช้คอลัมน์ที่เหมาะสม (ตารางที่ 8) สรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานที่สามารถช่วยลดเวลาและงบประมาณในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ยาต้านฮีสทามีน 5 ชนิด ดังกล่าว ในเภสัชภัณฑ์แผนปัจจุบันได้

เอกสารอ้างอิง

1. Antihistamines. [online]. Available from: URL: https://www.nhs.uk/conditions/antihistamines
2. นศภ. อนุชิต ตุงธนบดี. น้ำมูกไหล ทำไมเภสัชจ่ายยาแก้แพ้. คลังข้อมูลยา. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: URL: https://pharmacy.mahidol.ac.th/DIC/knowledge_full.php?id=35
3. รศ. นพ.ปารยะ อาศนะเสน. โรคภูมิแพ้ และยาต้านฮิสทามีน. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: URL: https://www.si.mahidol.ac.th/sidoctor/sirirajonline2021/Article files/1175_1.pdf
4. สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานประจำปี 2563 สำนักยาและวัตถุเสพติด. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; หน้า 64.
5. สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานประจำปี 2564 สำนักยาและวัตถุเสพติด. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; หน้า 65.
6. สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานประจำปี 2565 สำนักยาและวัตถุเสพติด. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; หน้า 87.
7. The United States Pharmacopeia: Diphenhydramine HCl [online]. 2021 [cited 2022 June]. Available from: https://online.uspnf.com/uspnf

8. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1) ICH Steering Committee; Nov 2005.