

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้อง ของวิธีตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ ยาในกลุ่ม PDE-5 inhibitors ในของกลางยาคดี

ประสิทธิ์ โอภาส และสุภาณี ดวงธีรปรีชา

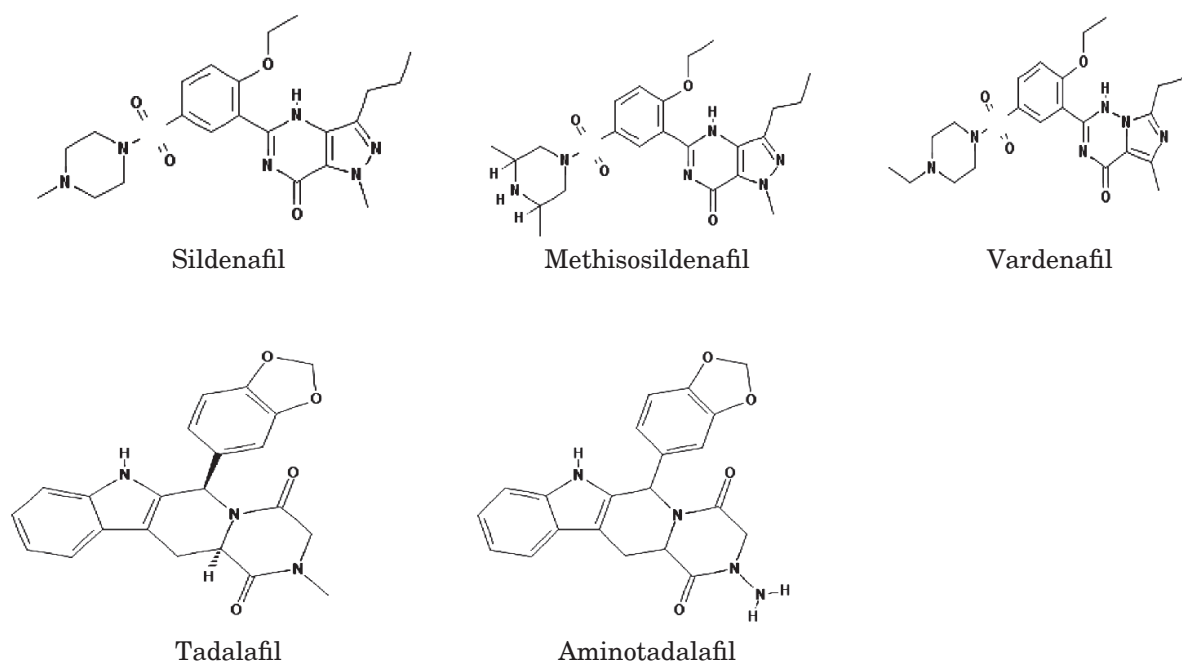
สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ยาในกลุ่ม PDE-5 inhibitors ในของกลางยาคดีด้วยวิธี TLC และ HPLC ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดย วิธี TLC ใช้ silica gel 60 F254 เป็นวัสดุภาคนิ่ง และวัสดุภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 1 ใช้ส่วนผสมระหว่าง ethyl acetate, acetonitrile และ ammonia solution ระบบที่ 2 ใช้ส่วนผสมระหว่าง ethyl acetate, ethanol และ ammonia solution ตรวจวัดด้วย UV254, การสแกนสเปกตรัมและน้ำยา ethanolic-sulfuric acid กับน้ำยา acidified iodoplatinate ตามลำดับ พบว่า sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil และ methisosildenafil มีค่า Rf ในระบบที่ 1 เท่ากับ 0.49, 0.71, 0.50, 0.57 และ 0.56 ตามลำดับ ในขณะที่ระบบที่ 2 มีค่า Rf เท่ากับ 0.31, 0.78, 0.45, 0.72 และ 0.43 ตามลำดับ เมื่อพ่นด้วยน้ำยา ethanolic-sulfuric acid tadalafil และ aminotadalafil จะปรากฏเป็นสีม่วง และเมื่อพ่นทับด้วยน้ำยา acidified iodoplatinate แล้ว sildenafil, tadalafil, vardenafil และ aminotadalafil จะเกิดปฏิกิริยาปรากฏเป็นสีน้ำตาลหรือสีม่วง ขึ้นกับความเข้มข้นของสาร ชัดจำกัดของการตรวจพบของ sildenafil, tadalafil และ vardenafil ด้วยวิธีนี้ มีค่าเท่ากับ 100, 1,000 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ วิธี HPLC ใช้คอลัมน์ชนิด C18 เป็นวัสดุภาคนิ่ง ส่วนผสมระหว่าง 0.01 M ammonium acetate และ methanol เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ ตรวจวัดด้วย PDA detector ที่ความยาวคลื่น 210-350 นาโนเมตร พบ peak ของ sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil และ methisosildenafil แยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ด้วยค่า resolution มากกว่า 1.8 และไม่พบการรบกวนจากองค์ประกอบอื่นในตำรับ ชัดจำกัดของการตรวจพบของ sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil และ methisosildenafil มีค่าเท่ากับ 3.8, 1.0, 2.5, 0.8 และ 2.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 ได้นำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ยาในกลุ่ม PDE-5 inhibitors ในของกลางยาคดีกลุ่มที่แจ้งสรรพคุณการเพิ่มสมรรถภาพทางเพศจำนวน 230 ตัวอย่าง ตรวจพบ sildenafil 213 ตัวอย่าง ตรวจพบ sildenafil, vardenafil, aminotadalafil ผสม tadalafil จำนวน 11 ตัวอย่าง และตรวจพบ sildenafil ผสม vardenafil จำนวน 1 ตัวอย่าง

Accepted for publication, 3 November 2016

บทนำ

ยาในกลุ่ม Phosphodiesterase-5 inhibitors (PDE-5 inhibitors) เป็นยาจับประตอกกลุ่มแรกที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคหย่อนสมรรถภาพทางเพศในเพศชาย ปัจจุบันขึ้นทะเบียนเป็นยาในประเทศไทย 3 ชนิด คือ sildenafil ยาดันแบบมีชื่อการค้า Viagra® tadalafil ยาดันแบบมีชื่อการค้า Cialis® และ vardenafil ยาดันแบบมีชื่อการค้า Levitra® โดยยาดังกล่าวออกสู่ท้องตลาดในปี พ.ศ. 2541, 2545 และ 2548 ตามลำดับ ยาทั้งหมดมี N-heterocyclic เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างและมีโครงสร้างคล้ายกับ purine base ในโครงสร้างของ cyclic guanosine monophosphate (cGMP)⁽¹⁾ (ภาพที่ 1) ทำให้ยาในกลุ่มนี้ยับยั้งเอนไซม์ PDE-5 ในตำแหน่งเดียวกับ cGMP แบบแข่งขัน (reversible competitive antagonist) ซึ่งการยับยั้ง PDE-5 จะทำให้ไม่มีการทำลาย cGMP นำไปสู่การขยายของหลอดเลือดแดงและเลือดไหลเข้าไปใน corpora cavernosum มากขึ้น เกิดการแข็งตัวขององคชาตตามมา



สำหรับวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Hakan Goker และคณะ⁽⁴⁾ และวิธีของ Khaled Al -Tahami⁽⁵⁾ เป็นหลัก และทดสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ตามแนวทาง ICH-Q2 (R1)⁽⁶⁾ เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานของ สำนักยาและวัตถุเสพติดในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ยาเสพติดในกลุ่ม PDE-5 inhibitors ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับการเฝ้าระวังติดตามสถานการณ์ตลอดจนเป็นข้อมูลสนับสนุนผลการวิเคราะห์ที่ใช้เป็นพยานหลักฐานในการดำเนินคดี

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) with UV/PDA Detector: Model Waters 2695-1996-Empower ผลิตภัณฑ์ของ Waters, Millipore Corporation, USA
2. Analytical Balance: Model AT 261 Deltarange, Mettler Toledo, Switzerland
Model MX5, Mettler Toledo, Switzerland
Model MS3002S, Mettler Toledo, Switzerland
3. Column: Hypersil Gold C18, 5 mm, 4.6 × 150 mm, Lot No. 12963
4. Capillaries ปริมาตร 10 µl
5. TLC Silica gel 60 F254, 20 × 20 cm plates, USA
6. TLC Automatic plate spotter, Japan
7. Densitometer, TLC Scanner, Switzerland
8. เครื่องแก้ว class A

สารมาตรฐาน

1. Aminotadalafil, lot no. 1188-024A1, purity 99.9%, TLC Pharmachem., Inc.
2. Methisosildenafil, lot no. 1-YKZ-5-1, purity 98%, Toronto Research Chemimicals Inc.
3. Sildenafil Citrate, lot no. F0K412, purity 98.8%, USP
4. Tadalafil, lot no. F0L003, purity 99.9%, USP
5. Vardenafil HCl.3H₂O, lot no. R-1013-03A, purity 99.7%, Bayer Co., Ltd

สารเคมี

1. Ammonium Acetate: AR grade
2. Methanol: HPLC grade
3. Ethyl acetate: AR grade
4. Ammonia Solution: AR grade
5. Acetonitrile: AR grade
6. Ethanol: AR grade
7. Potassium Iodide: AR grade
8. Sulfuric acid 96% : AR grade
9. Hydrochloric acid 37% : AR grade
10. Water: High Purity

ตัวอย่าง

ยาหลอก (placebo) มีส่วนประกอบของยาที่ไม่มีตัวยาสำคัญได้รับจากบริษัทผู้ผลิตยาแผนปัจจุบัน

การทดสอบสถานะของ Thin-Layer Chromatography (TLC)

โดยกำหนดสถานะของระบบ TLC ดังนี้

วัฏภาคเคลื่อนที่

ระบบที่ 1 - Ethyl acetate: Acetonitrile: Ammonia Solution (90 : 10 : 5)

ระบบที่ 2 - Ethyl acetate: Ethanol: Ammonia Solution (100 : 10 : 2)

วัฏภาคนิ่ง - TLC Siliga gel 60 F₂₅₄ 20 × 20 cm plates

ปริมาตรที่หยด - Volume 10 µl

เครื่องตรวจวัด - Densitometer, TLC Scanner 254 nm

- TLC Automatic plate spotter

น้ำยาพ่น

- Ethanolic-sulfuric acid solution

- Acidified iodoplatinate solution⁽⁷⁾

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐาน sildenafil citrate: ชั่งสารมาตรฐาน sildenafil citrate 5 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 5 มิลลิลิตร ละลายด้วย methanol จนครบปริมาตร

สารละลายมาตรฐาน tadalafil: ชั่งสารมาตรฐาน tadalafil 5 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 5 มิลลิลิตร ละลายด้วย methanol จนครบปริมาตร

สารละลายมาตรฐาน vardenafil HCl: ชั่งสารมาตรฐาน vardenafil HCl.3H₂O 6 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 5 มิลลิลิตร ละลายด้วย methanol จนครบปริมาตร

สารละลายมาตรฐาน aminotadalafil: ชั่งสารมาตรฐาน aminotadalafil 2 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 5 มิลลิลิตร ละลายด้วย methanol จนครบปริมาตร

สารละลายมาตรฐาน methisosildenafil: ชั่งสารมาตรฐาน methisosildenafil 1 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 5 มิลลิลิตร ละลายด้วย methanol จนครบปริมาตร

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างยาหลอก ประมาณ 50 ถึง 100 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม methanol ประมาณ 3 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าประมาณ 10 นาที เจือจางด้วย methanol จนครบปริมาตร กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

การเตรียมน้ำยาพ่น

Iodoplatinate solution

ชั่ง platinum chloride 4.5 กรัม และ potassium iodide 90 กรัม ละลายในน้ำปริมาตร 1,800 มิลลิลิตร

Acidified iodoplatinate solution

เติมกรด hydrochloric ปริมาตร 5 มิลลิลิตรในสารละลาย Iodoplatinate solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Ethanolic-sulfuric acid solution

เติมกรด sulfuric ปริมาตร 10 มิลลิลิตรใน ethanol ปริมาตร 90 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์

นำสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิด สารละลายตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC ตรวจวัดโดยส่อง UV ที่ 254 นาโนเมตร และนำไป scan spectrum ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตในช่วงความยาวคลื่น 200 ถึง 400 นาโนเมตร แล้วพ่นด้วยน้ำยา ethanolic-sulfuric acid solution และนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นพ่นทับด้วยน้ำยา acidified iodoplatinate solution

การอ่านและแปลผล

พิจารณาจากค่า Retardation Factor (Rf) ซึ่งหมายถึง อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ภูมิภาคเคลื่อนที่ เคลื่อนที่ Spectrum และการทำปฏิกิริยาให้เกิดสีกับน้ำยาพ่น (Spraying agent) ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด

การทดสอบความถูกต้องของวิธีตรวจเอกลักษณ์ โดยวิธี TLC

1. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมเหมือนกันกับการเตรียมสารละลายมาตรฐานดังกล่าวมาแล้วข้างต้น

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ซึ่งตัวอย่างยาหลอก ประมาณ 50 ถึง 100 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม methanol ประมาณ 3 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าประมาณ 10 นาที เจือจางด้วย methanol จนครบปริมาตร กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

การวิเคราะห์

นำสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิด สารละลายตัวอย่าง ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC

การอ่านและแปลผล

พิจารณาจากค่า Retardation Factor (Rf) ซึ่งหมายถึง อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ภูมิภาคเคลื่อนที่ เคลื่อนที่ Spectrum และการทำปฏิกิริยาการเกิดสีกับน้ำยาพ่น (Spraying agent) ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด

2. การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

นำสารละลายมาตรฐานจากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีมาเจือจางด้วย methanol จนได้ความเข้มข้นของสารมาตรฐานแต่ละชนิดต่ำที่สุดที่ยังสามารถตรวจพบและให้ spectrum ที่ชัดเจน (พิจารณาจากลักษณะของ spectrum จากเส้นเรียบจะเริ่มเปลี่ยนเป็นเส้นหยัก)

การทดสอบสถานะของ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

กำหนดสถานะของระบบโครมาโทกราฟี ดังนี้

คอลัมน์	- Hypersil Gold C18, 5 mm, 4.6 × 150 mm
อุณหภูมิคอลัมน์	- 30 °C
อัตราการไหล	- 1.0 ml/min
วัฏภาคเคลื่อนที่	- Methanol: 0.01 M Ammonium acetate 65 : 35 (v/v)
เครื่องตรวจวัด	- Photodiode array detector (PDA) 210 - 350 nm
ปริมาตรที่ฉีด	- 40 µl

Diluent เตรียมจากเมทานอล ปริมาตร 250 มิลลิลิตรผสมกับน้ำปริมาตร 250 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน sildenafil citrate, tadalafil และ vardenafil HCl ให้มีความเข้มข้นประมาณ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ diluent เป็นตัวปรับปริมาตร

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง ประมาณ 50 ถึง 100 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน diluent ประมาณ 15 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าประมาณ 15 นาที เจือจางด้วย diluent จนครบปริมาตร กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร อาจปรับความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างเพื่อให้ได้ค่า peak area ใกล้เคียง peak area ของสารละลายมาตรฐาน

การวิเคราะห์

นำสารละลายมาตรฐาน สารละลายตัวอย่าง และ diluent ไปฉีดวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตรวจเอกลักษณ์ โดยวิธี HPLC**1. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)****การเตรียมสารละลาย standard stock solution**

สารละลายมาตรฐาน sildenafil citrate: ชั่งสารมาตรฐาน sildenafil citrate 5 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน diluent ประมาณ 7 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายหมด เจือจางด้วย diluent จนครบปริมาตร

สารละลายมาตรฐาน tadalafil: ชั่งสารมาตรฐาน tadalafil 5 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน diluent ประมาณ 7 มิลลิลิตร นำไป sonicate เป็นเวลา 15 นาที เขย่าจนละลายหมด เจือจางด้วย diluent จนครบปริมาตร

สารละลายมาตรฐาน vardenafil HCl: ชั่งสารมาตรฐาน vardenafil HCl.3H₂O 6 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน diluent ประมาณ 7 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายหมด เจือจางด้วย diluent จนครบปริมาตร

สารละลายมาตรฐาน aminotadalafil: ชั่งสารมาตรฐาน aminotadalafil 2 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม diluent ประมาณ 7 มิลลิลิตร นำไป sonicate เป็นเวลา 15 นาที เขย่าจนละลายหมด เจือจางด้วย diluent จนครบปริมาตร

สารละลายมาตรฐาน methisosildenafil: ชั่งสารมาตรฐาน methisosildenafil 1 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม diluent ประมาณ 7 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายหมด เจือจางด้วย diluent จนครบปริมาตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ปิเปตสารละลาย Standard stock solution ชนิดละ 1.0 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เจือจางด้วย diluent จนครบปริมาตร กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชนิดที่ 1 ชั่งตัวอย่างยาหลอก ประมาณ 50 ถึง 100 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม diluent ประมาณ 15 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าประมาณ 15 นาที เจือจางด้วย diluent จนครบปริมาตร กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

ชนิดที่ 2 ชั่งตัวอย่างยาหลอก ประมาณ 50 ถึง 100 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม (ปิเปต) สารละลาย standard stock solution ชนิดละ 1.0 มิลลิลิตร เติม diluent ประมาณ 15 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าประมาณ 15 นาที เจือจางด้วย diluent จนครบปริมาตร กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

การวิเคราะห์

นำสารละลายมาตรฐาน สารละลายตัวอย่างชนิดที่ 1 ชนิดที่ 2 และ diluent ไปฉีดวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

เกณฑ์การตัดสินผล

1. Peak ของ sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil และ methisosildenafil ในสารละลายมาตรฐานแยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์และแต่ละ Peak ไม่ถูกรบกวนโดยประเมนจากค่า peak purity
2. Retention time ของ peak ใด ๆ จากสารละลายตัวอย่างยาหลอก ไม่ตรงกับสารมาตรฐาน sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil และ methisosildenafil ในสารละลายมาตรฐาน
3. Retention time ของ peak ของสารมาตรฐานที่เติมลงในยาหลอก ตรงกับสารมาตรฐาน sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil และ methisosildenafil ในสารละลายมาตรฐานและไม่ถูกรบกวนจากองค์ประกอบอื่นในตำรับ โดยประเมินจากค่า peak purity
4. Spectrum ของ peak ของสารมาตรฐานที่เติมลงในยาหลอกเข้ากันได้กับ spectrum ของสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐาน

2. การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

นำสารละลายมาตรฐานจากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีมาเจือจางด้วย diluent จนได้ความเข้มข้นของสารมาตรฐานแต่ละชนิดต่ำที่สุดที่ยังสามารถให้ peak ที่ชัดเจนโดยค่าอัตราส่วน signal to noise ไม่ต่ำกว่า 3:1 และยังคงให้ spectrum ที่ชัดเจน

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างชนิดที่ 2 มาเจือจางด้วย diluent จนได้ความเข้มข้นของสารมาตรฐานแต่ละชนิดต่ำที่สุดที่ยังสามารถให้ peak ที่ชัดเจนโดยค่าอัตราส่วน signal to noise ไม่ต่ำกว่า 3:1 และให้ spectrum ชัดเจน สามารถเข้ากันกับ spectrum ของสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานได้อย่างถูกต้อง

การวิเคราะห์

นำสารละลายมาตรฐาน สารละลายตัวอย่าง ไปฉีดวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

เกณฑ์การตัดสินผล

ความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารมาตรฐานแต่ละชนิดที่เติมลงในยาหลอกให้ peak ที่ชัดเจนโดยค่าอัตราส่วน signal to noise ไม่ต่ำกว่า 3:1 และให้ spectrum ชัดเจนเมื่อทดสอบความเข้ากันของสารมาตรฐานที่เติมลงในยาหลอกกับ spectrum ของสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานสามารถเข้ากันได้

3. การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมจากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีมาตรวจวิเคราะห์โดยเปลี่ยนแปลงสถานะต่างๆ ของระบบโครมาโทกราฟ เพื่อศึกษาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น การแยกของสาร (resolution), retention time และ tailing factor

การวิเคราะห์

นำสารละลายมาตรฐาน ไปฉีดวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยเปลี่ยนแปลงสถานะต่างๆ ของระบบโครมาโทกราฟ ดังนี้ คอลัมน์จากผู้ผลิตต่างกัน อุณหภูมิของคอลัมน์ อัตราการไหล และอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่

เกณฑ์การตัดสินผล

ศึกษาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น การแยกของสาร (resolution), retention time และ tailing factor

การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ยากกลุ่ม PDE-5 inhibitors ในของกลางยาดี ปีงบประมาณ 2558

ของกลางยาดีเกี่ยวกับการเพิ่มสมรรถภาพทางเพศได้รับจาก สถานีตำรวจ กองกำกับการ 3 และ 4 กรมสอบสวนคดีพิเศษ และกองบังคับการตำรวจปราบปรามยาเสพติด 1 กองบัญชาการตำรวจปราบปรามยาเสพติด จำนวน 230 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นรูปแบบเม็ด 182 ตัวอย่าง แคปซูล 30 ตัวอย่าง เจลชนิดรับประทาน 16 ตัวอย่าง และรูปแบบอื่นๆ จำนวน 2 ตัวอย่าง

ผล

1. วิธี Thin-Layer Chromatography (TLC)

1.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)

ภายใต้สภาวะ TLC ที่พัฒนาขึ้น พบว่าเมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ ethyl acetate: acetonitrile: ammonia solution (90:10:5) ตรวจวัดโดยส่องด้วย UV 254 นาโนเมตรจะปรากฏจุดมืด (dark spots) ของ sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil และ methisosildenafil ที่อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่วัฏภาคเคลื่อนที่ (R_f) เท่ากับ 0.49, 0.71, 0.50, 0.57 และ 0.56 ตามลำดับ (ภาพที่ 2) (A) และตารางที่ 1 เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ ethyl acetate: ethanol: ammonia solution (100:10:2) ตรวจวัดโดยส่องด้วย UV 254 นาโนเมตรจะปรากฏจุดมืด (dark spots) ของ sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil และ methisosildenafil ที่อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่วัฏภาคเคลื่อนที่ (R_f) เท่ากับ 0.31, 0.78, 0.45, 0.72 และ 0.43 ตามลำดับ (ภาพที่ 3) (A) และตารางที่ 1 เมื่อนำไป scan spectrum ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตในช่วงความยาวคลื่น 200 ถึง 400 นาโนเมตรจะปรากฏลักษณะของ spectrum ของสารแต่ละชนิด (ภาพที่ 4) หลังจากนั้นเมื่อนำไปพ่นด้วยน้ำยา ethanolic-sulfuric acid solution แล้วอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที พบว่าเฉพาะ tadalafil และ aminotadalafil เท่านั้นที่ทำปฏิกิริยากับน้ำยา ดังกล่าวปรากฏสีม่วง (ภาพที่ 2) (B) และ (ภาพที่ 3) (B) และ (ตารางที่ 1) เมื่อพ่นทับด้วยน้ำยา acidified iodoplatinate solution พบว่า sildenafil, tadalafil, vardenafil และ aminotadalafil ทำปฏิกิริยากับน้ำยา ดังกล่าวปรากฏสีน้ำตาลหรือสีม่วงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร (ภาพที่ 2) (C) และ (ภาพที่ 3) (C) และ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)

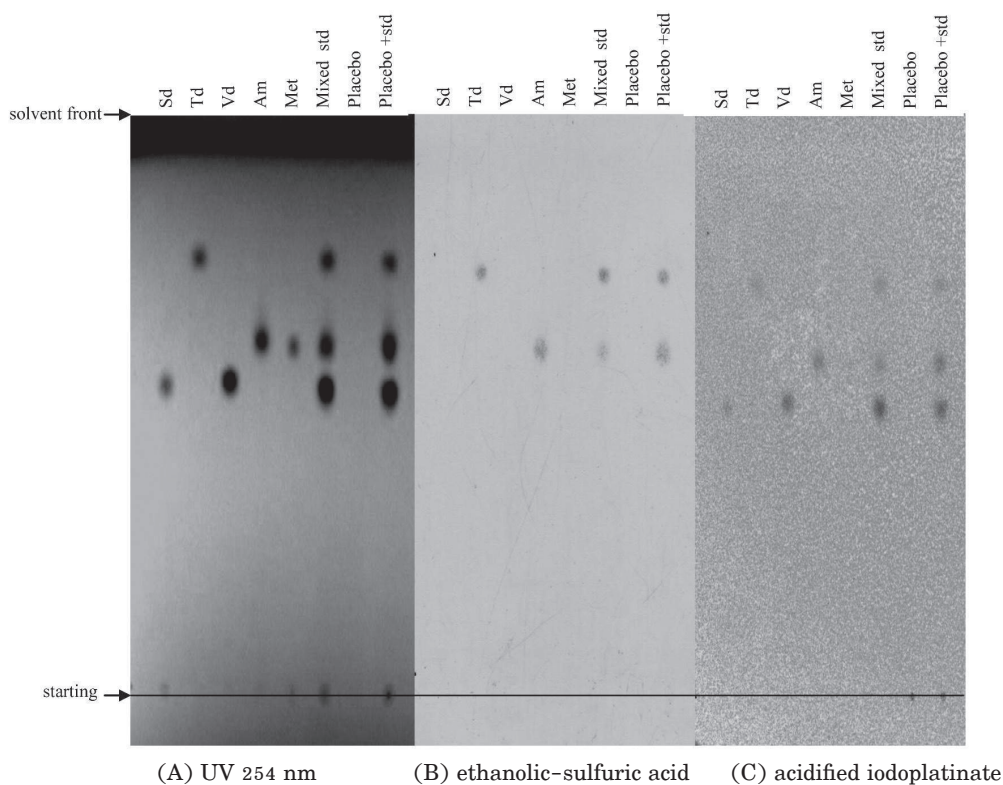
Validation parameter		Standard									
		Sildenafil		Tadalafil		Vardenafil		Aminotadalafil		Methisosildenafil	
		1*	2**	1	2	1	2	1	2	1	2
Rf		0.49	0.31	0.71	0.78	0.50	0.45	0.57	0.72	0.56	0.43
Specificity (UV 254 nm)											
Color	1 [#]	-	-	ม่วง	ม่วง	-	-	ม่วง	ม่วง	-	-
	2 ^{##}	น้ำตาล	ม่วง	น้ำตาล	ม่วง	ม่วง	ม่วง	น้ำตาล	ม่วง	-	-

* TLC System 1, ethyl acetate: acetonitrile: ammonia solution (90:10:5)

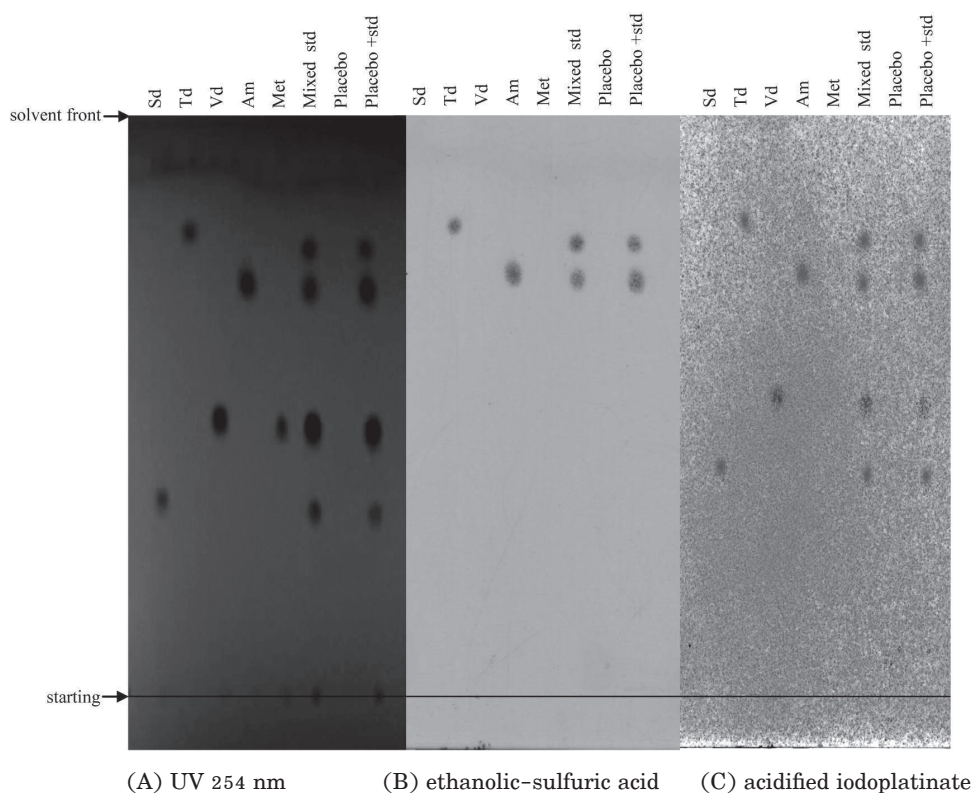
** TLC System 2, ethyl acetate: ethanol: ammonia solution (100:10:2)

Spraying agent, ethanolic-sulfuric acid solution

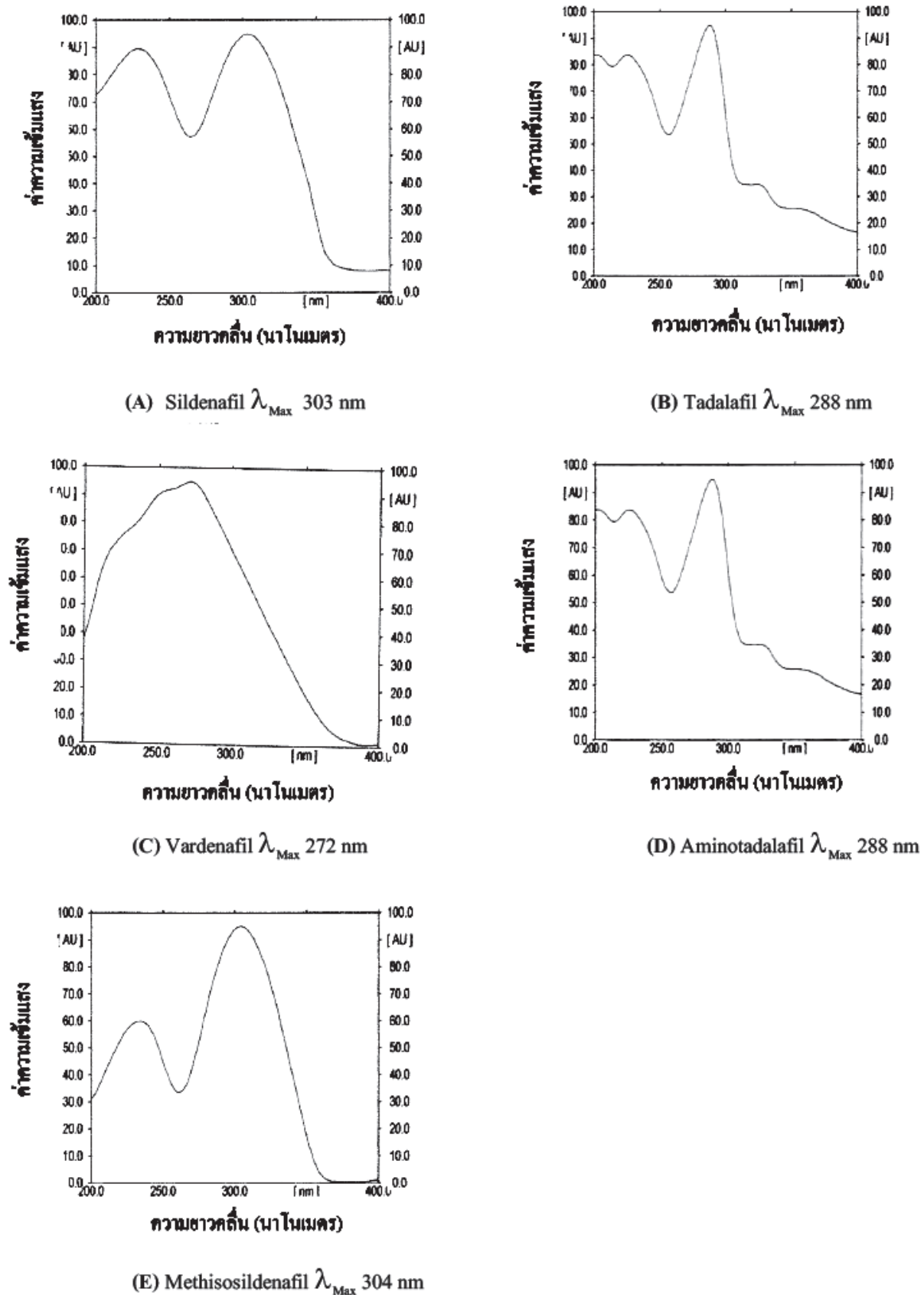
Spraying agent, acidified iodoplatinate solution



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารที่วิฤภาคเคลื่อนที่ ethyl acetate: acetonitrile: ammonia solution (90 : 10 : 5) (Sd = sildenafil, Td = tadalafil, Vd = vardenafil, Am = aminotadalafil, Met = methisosildenafil)



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของสารที่วิฤภาคเคลื่อนที่ ethyl acetate: ethanol: ammonia solution (100 : 10 : 2) (Sd = sildenafil, Td = tadalafil, Vd = vardenafil, Am = aminotadalafil, Met = methisosildenafil)



ภาพที่ 4 ลักษณะ spectrum ของสารในกลุ่ม PDE-5 inhibitors

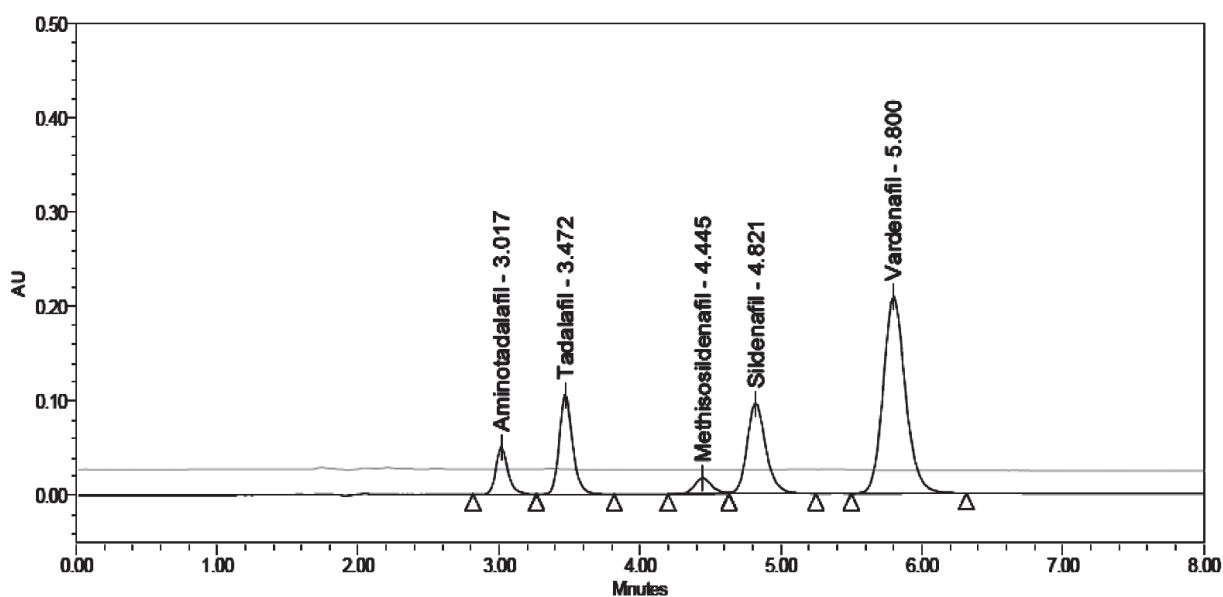
1.2 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (LOD) สำหรับ sildenafil, tadalafil และ vardenafil ที่สามารถตรวจพบได้ และให้ spectrum ชัดเจน เท่ากับ 100, 1,000 และ 250 µg/ml ตามลำดับ

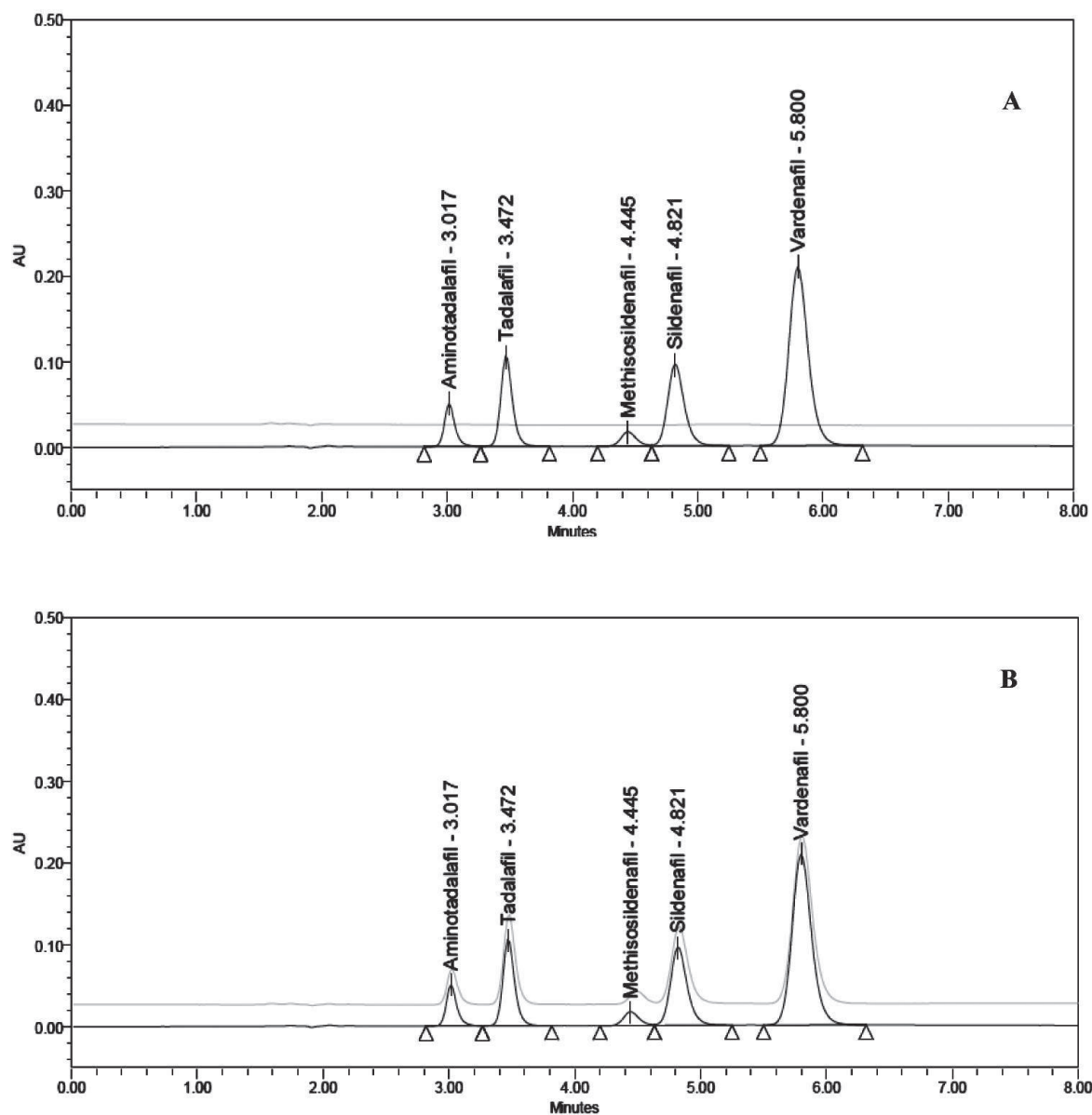
2. วิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

2.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)

ภายใต้สภาวะของ HPLC ที่พัฒนาขึ้นพบว่า peak ของ sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil และ methisosildenafil แยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ด้วยค่า resolution มากกว่า 1.8 ไม่พบการรบกวนจาก diluent (ภาพที่ 5) retention time ของ peak ของสารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิดที่เติมลงในยาหลอก ตรงกับ sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil หรือ methisosildenafil ในสารละลายมาตรฐาน (ภาพที่ 6) และไม่ถูกรบกวนจากองค์ประกอบอื่นในตำรับ โดยประเมินจากค่า peak purity นอกจากนี้ยังพบว่า spectrum ของสารมาตรฐานที่เติมลงในยาหลอกเข้ากันกับ spectrum ของสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐาน (ภาพที่ 7) และ (ตารางที่ 2)



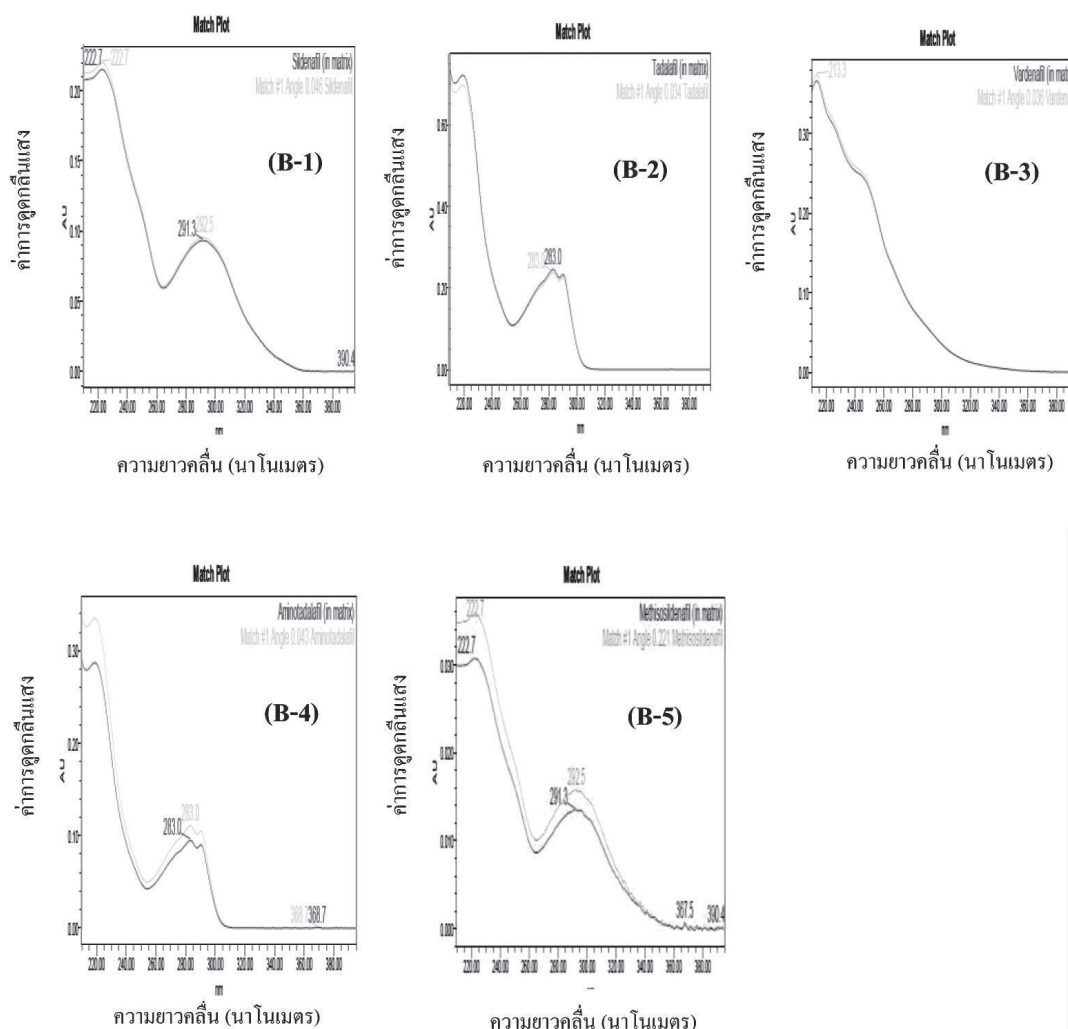
ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานเทียบกับ diluent



ภาพที่ 6 โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างยาหลอกและสารมาตรฐานในสารละลายตัวอย่างยาหลอกเทียบกับสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐาน

A : โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างยาหลอกเทียบกับสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐาน

B : โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานในสารละลายตัวอย่างยาหลอกเทียบกับสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐาน



ภาพที่ 7 สเปกตรัมของสารมาตรฐานในสารละลายตัวอย่างยาหลอกเทียบกับสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐาน (B-1 = สเปกตรัมของ sildenafil, B-2 = สเปกตรัมของ tadalafil, B-3 = สเปกตรัมของ vardenafil, B-4 = สเปกตรัมของ aminotadalafil, B-5 = สเปกตรัมของ methisosildenafil)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)

Standard in placebo	RT (min)	RES	TF	Peak purity			Match plot		
				Purity Angle	Purity Threshold	Purity Flag	PDA match Angle	PDA match Threshold	PDA match Flag
Sildenafil	4.831	1.8	1.2	0.099	0.270	No	0.046	1.045	No
Tadalafil	3.479	3.2	1.2	0.082	0.275	No	0.034	1.017	No
Vardenafil	5.808	4.1	1.2	0.064	0.262	No	0.036	1.028	No
Aminotadalafil	3.023	-	1.3	0.177	0.278	No	0.043	1.039	No
Methisosildenafil	4.495	5.5	1.2	0.339	0.499	No	0.221	1.288	No

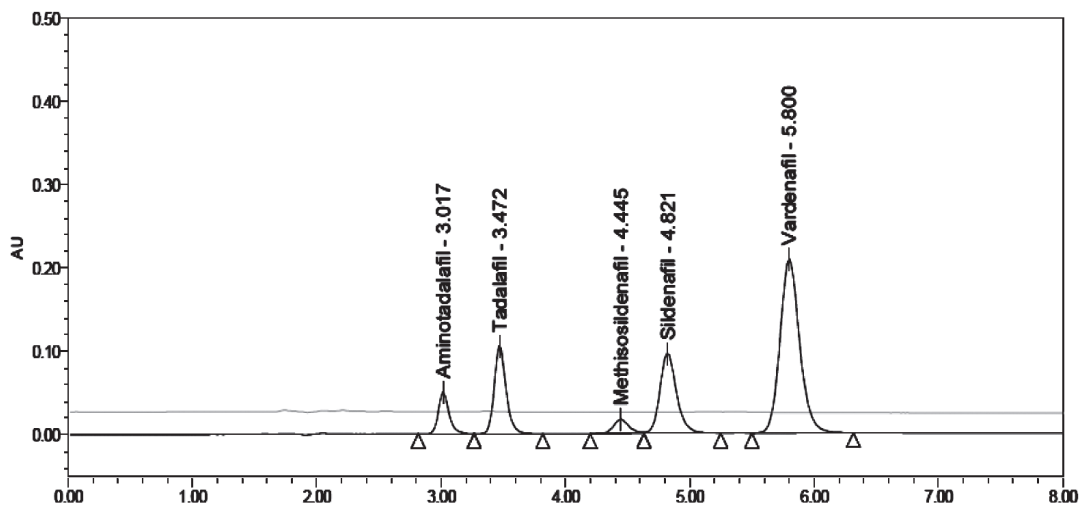
RT = retention time, RES = resolution, TF = tailing factor

2.2 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (LOD) ของสารมาตรฐาน sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil และ methisosildenafil ในสารละลายตัวอย่างยาหลอกที่ให้ peak ชัดเจนโดยค่าอัตราส่วน signal to noise ไม่ต่ำกว่า 3:1 และให้ spectrum ชัดเจนสามารถเข้ากันกับ spectrum ของสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานได้อย่างถูกต้องเท่ากับ 3.8, 1.0, 2.5, 0.8 และ 2.3 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

2.3 การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

จากการทดสอบความทนของวิธี โดยเปลี่ยนคอลัมน์จากผู้ผลิตต่างกัน อุณหภูมิของคอลัมน์ อัตราการไหล และอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ ประเมินผลโดยพิจารณาการแยกของสาร (resolution) retention time และ tailing factor ได้ผลการทดสอบ (ภาพที่ 8) และ (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 8 โครมาโทแกรมแสดงการแยกและ retention time ของสารในสภาวะของระบบโครมาโทกราฟที่ดำเนินการทดสอบความถูกต้องของวิธี

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความทนของวิธี

Chromatographic condition		ผลการทดสอบความทนของวิธี														
		Aminotadalafil			Tadalafil			Methisosildenafil			Sildenafil			Vardenafil		
		RT	RES	TF	RT	RES	TF	RT	RES	TF	RT	RES	TF	RT	RES	TF
HPLC column	No.1 [#]	3.1	-	1.3	3.6	3.2	1.2	4.8	5.5	1.2	5.2	1.8	1.2	6.3	4.1	1.2
	No.2	4.0	-	1.2	5.1	4.8	1.1	7.3	7.0	1.1	8.1	2.2	1.1	10.7	5.7	1.1
	No.3	4.3	-	1.1	5.4	5.0	1.1	8.3	8.7	1.0	9.2	2.1	1.0	12.1	5.7	1.0
Column																
Temp (°C)	25	3.3	-	1.1	3.8	3.0	1.0	5.0	4.9	1.1	5.5	1.8	1.1	6.9	4.0	1.1
	30 [#]	3.1	-	1.3	3.6	3.2	1.2	4.8	5.5	1.2	5.2	1.8	1.2	6.3	4.1	1.2
	40	2.9	-	1.1	3.3	2.4	1.1	4.4	5.2	-	4.7	1.3	1.0	5.5	3.1	1.0
Flow rate (ml/minute)	0.7	4.5	-	1.3	5.2	3.2	1.2	6.8	5.8	1.2	7.5	1.9	1.2	9.1	4.4	1.2
	1.0 [#]	3.1	-	1.3	3.6	3.2	1.2	4.8	5.5	1.2	5.2	1.8	1.2	6.3	4.1	1.2
	1.5	2.1	-	1.2	2.4	2.5	1.1	3.1	4.9	-	3.4	1.6	1.2	4.2	3.7	1.1

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความทนของวิธี (ต่อ)

Chromatographic condition		ผลการทดสอบความทนของวิธี														
		Aminotadalafil			Tadalafil			Methisosildenafil			Sildenafil			Vardenafil		
		RT	RES	TF	RT	RES	TF	RT	RES	TF	RT	RES	TF	RT	RES	TF
MeOH:	55:45	5.1	-	1.2	6.8	6.1	1.1	10.6	9.4	1.1	12.6	3.5	1.1	17.9	7.7	1.2
Buffer	60:40	3.8	-	1.2	4.7	4.4	1.1	6.8	7.3	1.1	7.7	2.5	1.2	10.1	5.8	1.2
	65:35 [#]	3.1	-	1.3	3.6	3.2	1.2	4.8	5.5	1.2	5.2	1.8	1.2	6.3	4.1	1.2
	70:30	2.7	-	1.2	3.0	2.1	1.2	3.6	3.9	-	3.9	1.2	1.2	4.4	2.6	1.2
	75:25	2.5	-	-	2.6	1.4	-	3.1	0	-	3.1	0	-	3.4	1.6	1.2

[#] สภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่ดำเนินการทดสอบความถูกต้องของวิธี

RT = retention time, RES = resolution, TF = tailing factor

3. การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ยาในกลุ่ม PDE-5 inhibitors ในของกลางยาดี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

ผลการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ยาในกลุ่ม PDE-5 inhibitors ในของกลางยาดีที่อวดอ้างสรรพคุณเกี่ยวกับการเพิ่มสมรรถภาพทางเพศ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ยาในกลุ่ม PDE-5 inhibitors ในของกลางยาดี

Dosage Form		Samples	No. of samples	No. of detected samples					
				Sd	Td	Mixed			
						Sd/Td	Sd/Vd	Sd/Td/Am	Td/Am/Vd
Tablets	Known	Sd	100	100	0				
		Td	56	51	5				
		Vd	12	12	0				
	Unknown		14	14	0				
Capsules	Unknown		30	20	0	4	1	1	1
Gels	Known	Sd	16	16	0				
Others	Unknown		2	0	0	0	0	0	0
Total			230	213	5	4	1	1	1

Sd = sildenafil, Td = tadalafil, Vd = vardenafil, Am = aminotadalafil

วิจารณ์

การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของกลุ่ม PDE-5 inhibitors ได้พัฒนาขึ้นสองวิธีคือ วิธี TLC และ HPLC สำหรับวัตถุประสงค์การพัฒนายวิธี TLC เพื่อใช้เป็นวิธีรองสำหรับตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของกลางยาติดกลุ่ม PDE-5 inhibitors ที่มีการแจ้งตัวยาสำคัญ (known samples) ทั้งสองวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีตามหลักเกณฑ์ของ ICH-Q2 (R1) สำหรับวิธี TLC ที่วัฏภาคเคลื่อนที่ ethyl acetate: acetonitrile: ammonia solution (90 : 10 : 5) เมื่อตรวจวัดโดยส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ปรากฏจุดมืด (dark spots) ของ sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil และ methisosildenafil ที่ค่า Rf เท่ากับ 0.49, 0.71, 0.50, 0.57 และ 0.56 ตามลำดับ (ภาพที่ 2) (A) และตารางที่ 1 จากค่า Rf ของสารแต่ละชนิดพบว่าไม่สามารถแยก sildenafil ออกจาก vardenafil แต่เมื่อพิจารณาจากลักษณะของ spectrum ของสารทั้งสองชนิดพบว่า spectrum มีลักษณะแตกต่างกันอย่างชัดเจน (ภาพที่ 4) จึงสามารถจำแนก sildenafil กับ vardenafil โดยอาศัยลักษณะของ spectrum ที่แตกต่างดังกล่าวออกจากกันได้ นอกจากนี้ยังพบว่าที่สภาวะดังกล่าว ยังสามารถแยก methisosildenafil ออกจาก sildenafil และ aminotadalafil ออกจาก tadalafil ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถของวิธีในการแยกสารที่มีโครงสร้างคล้ายกันและลักษณะของ spectrum ใกล้เคียงกัน เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ ethyl acetate: ethanol: ammonia solution (100:10:2) ตรวจวัดโดยส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จะปรากฏจุดมืด (dark spots) ของ sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil และ methisosildenafil ที่ค่า Rf เท่ากับ 0.31, 0.78, 0.45, 0.72 และ 0.43 ตามลำดับ จากค่า Rf ของสารแต่ละชนิดพบว่าสามารถแยก sildenafil, tadalafil, vardenafil และ aminotadalafil ออกจากกันได้ แต่ไม่สามารถแยก vardenafil ออกจาก methisosildenafil (ภาพที่ 3) (A) แต่จากลักษณะของ spectrum ของ vardenafil และ methisosildenafil ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนจึงอาศัยลักษณะดังกล่าวจำแนกสารทั้งสองชนิดได้เช่นเดียวกัน การเกิดจุดมืด (dark spots) ของสารทั้ง 5 ชนิดนี้ เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของสารดังกล่าวมี conjugated double bond ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตได้ เกิดการดับ (quench) การเรืองแสงของสารที่เคลือบ silica ในวัฏภาคหนึ่งเมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จากค่า topological polar surface area⁽²⁾ ของ sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil และ methisosildenafil เท่ากับ 250, 74, 118, 101 และ 126 Å² ตามลำดับ แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของค่าพื้นที่ผิวของสารทั้ง 5 ชนิด และเมื่อพิจารณาส่วนประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ทั้ง 2 ระบบ ที่มีความแตกต่างกันชัดเจนคือวัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 1 มี acetonitrile เป็นส่วนประกอบ ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2 มี ethanol เป็นส่วนประกอบและจากค่าคงที่ไดอิเล็กตริก⁽⁸⁾ ของ acetonitrile และ ethanol เท่ากับ 38.8 และ 25.0 ตามลำดับ แสดงว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ ระบบที่ 1 มีขั้วสูงกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับค่า Rf (ระบบที่ 1 = 0.49, ระบบที่ 2 = 0.31) ของ sildenafil ซึ่งเป็นสารที่มีขั้วสูงที่สุดจากสารทั้ง 5 ชนิด ประสิทธิภาพการแยกสารของวัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 1 ดีกว่าระบบที่ 2 อาจเนื่องมาจากวัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 1 มีขั้วมากเกินไปจึงไม่เหมาะสมเท่ากับวัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2 ในการแยกสารกลุ่มดังกล่าว เมื่อนำไป scan spectrum ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตในช่วงความยาวคลื่น 200 ถึง 400 นาโนเมตร จะปรากฏลักษณะของ spectrum ของสารแต่ละชนิด (ภาพที่ 4) หลังจากนั้นเมื่อนำไปพ่นด้วยน้ำยา ethanolic-sulfuric acid solution แล้วอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที พบว่าเฉพาะ tadalafil และ aminotadalafil เท่านั้นที่ทำปฏิกิริยากับน้ำยาดังกล่าวปรากฏสีม่วง (ภาพที่ 2) (B) และ (ภาพที่ 3) (B) เมื่อพ่นทับด้วยน้ำยา acidified iodoplatinate solution พบว่า sildenafil, tadalafil, vardenafil และ aminotadalafil ทำปฏิกิริยากับน้ำยาดังกล่าวปรากฏสีน้ำตาลหรือสีม่วงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร (ภาพที่ 2) (C) และ (ภาพที่ 3) (C) แต่ไม่พบการเกิดสีกับ methisosildenafil อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของ methisosildenafil ต่ำเกินไป การเลือก sulfuric acid เป็นน้ำยาพ่นสำหรับตรวจวัดยาในกลุ่ม PDE-5 inhibitors เนื่องจากเป็นน้ำยาที่ใช้กันแพร่หลาย (universal detection reagent)

เหมาะสำหรับตรวจวัดสารที่มีขั้วแม้ว่าจะไม่มีความจำเพาะเจาะจงแต่เนื่องจากวิธีตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้นอกจากจะพิจารณาจากการเกิดสียังพิจารณาจากค่า Rf และลักษณะของ spectrum เทียบกับสารมาตรฐานประกอบกัน ในส่วนของน้ำยา acidified iodoplatinate solution เป็นน้ำยาชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายสำหรับตรวจวัดสารประเภท organic nitrogen compounds⁽⁹⁾ เมื่อทดลองทางห้องปฏิบัติการกับยาในกลุ่ม PDE-5 inhibitors ปรากฏว่าสามารถทำปฏิกิริยาให้เกิดสีกับยาในกลุ่มดังกล่าวได้ จึงเลือกน้ำยาดังกล่าวมาเป็นส่วนหนึ่งของวิธีที่พัฒนาขึ้นในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของกลางยาดีในกลุ่ม PDE-5 inhibitors

วิธี HPLC ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Hakan Goker และคณะ และวิธีของ Khaled Al-Tahami โดยวิธีของ Hakan Goker และคณะ ใช้วิธี HPLC-DAD-MS ใช้คอลัมน์ชนิด C18 (5 μ m) และวัฏภาคเคลื่อนที่มีส่วนผสมระหว่าง acetonitrile, methanol และ 0.05 M ammonium acetate ในส่วนวิธีของ Khaled Al-Tahami ใช้วิธี HPLC-DAD ใช้คอลัมน์ชนิด C18 (3.5 μ m) และวัฏภาคเคลื่อนที่มีส่วนผสมระหว่าง acetonitrile, 0.3 M ammonium acetate และ 0.2% formic acid แต่เนื่องจากสำนักยาและวัตถุเสพติดไม่มีเครื่องมือตามวิธีของ Hakan Goker และคณะ และคอลัมน์ที่ใช้ตามวิธีของ Khaled Al-Tahami มีจำกัด ดังนั้นเพื่อความสะดวกและเหมาะสมสำหรับการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของกลางยาดีในกลุ่ม PDE-5 inhibitors ของสำนักยาและวัตถุเสพติดจึงได้พัฒนาวิธีขึ้น สำหรับวิธีตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ยาในกลุ่ม PDE-5 inhibitors ที่พัฒนาขึ้นพบว่า peak ของ sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil และ methisosildenafil แยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ด้วยค่า resolution มากกว่า 1.8 แต่ละ peak ไม่ถูกรบกวนจากยาหลอกโดยประเมินจากค่า peak purity (ตารางที่ 2) retention time ของ peak ของสารมาตรฐานทั้งห้าชนิดที่เติมลงในยาหลอก ตรงกับ sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil หรือ methisosildenafil ในสารละลายมาตรฐาน (ภาพที่ 6) นอกจากนี้ยังพบว่า spectrum ของสารมาตรฐานที่เติมลงในยาหลอกเข้ากันกับ spectrum ของสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐาน (ภาพที่ 7)

จากข้อมูลของสำนักยาและวัตถุเสพติดในปี พ.ศ. 2554 และในปี พ.ศ. 2557 พบว่าเคยตรวจพบการปลอมปน aminosildenafil ซึ่งเป็นสารอะนาล็อกของยา tadalafil และ methisosildenafil (Aildenafil) ซึ่งเป็นสารอะนาล็อกของยา sildenafil ในยาแผนโบราณ ตามลำดับ ดังนั้น การพัฒนาวิธีตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ครั้งนี้นอกจากจะมุ่งเน้นแยก sildenafil, tadalafil และ vardenafil แล้ว ยังมุ่งเน้นการแยก methisosildenafil ออกจาก sildenafil และ aminosildenafil ออกจาก tadalafil ด้วยเช่นเดียวกัน เนื่องจาก sildenafil และ methisosildenafil หรือ tadalafil และ aminosildenafil มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีและ spectrum ที่ใกล้เคียงกันมากอาจก่อให้เกิดผลบวกлож (false positive) ได้จากทั้งวิธี TLC และ HPLC ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้สามารถแยกสารดังกล่าวออกจากกันได้ แสดงให้เห็นถึงความสามารถของวิธีในการแยกสารในกลุ่มดังกล่าวซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญที่แสดงถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น

ขีดจำกัดของการตรวจพบของวิธี TLC แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ sildenafil, tadalafil และ vardenafil ที่สามารถตรวจพบได้ และให้ spectrum ชัดเจน เท่ากับ 100, 1,000 และ 250 μ g/ml ตามลำดับ สำหรับขีดจำกัดของการตรวจพบของวิธี HPLC แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil และ methisosildenafil ที่เติมลงในยาหลอก ที่ให้ peak ชัดเจนโดยค่าอัตราส่วน signal to noise ไม่ต่ำกว่า 3:1 และให้ spectrum ชัดเจนสามารถเข้ากันกับ spectrum ของสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานได้อย่างถูกต้อง เท่ากับ 3.8, 1.0, 2.5, 0.8 และ 2.3 μ g/ml ตามลำดับ

สำหรับวิธี HPLC ได้มีการทดสอบความทนของวิธี โดยเปลี่ยนคอลัมน์จากผู้ผลิตต่างกัน โดยใช้คอลัมน์ hypersil gold C18, 5 mm, 4.6 $\times$ 150 mm เป็นสภาวะเปรียบเทียบ พบว่าคอลัมน์จากผู้ผลิตสองแห่งต่างกันสามารถแยกสาร (resolution) ทั้ง 5 ชนิดออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ รูปร่างของแต่ละ peak (tailing factor) ไม่ต่าง

จากสภาวะเปรียบเทียบ แต่ retention time เพิ่มขึ้น ซึ่งทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนคอลัมน์จากผู้ผลิตสามแห่งต่างกันไม่มีผลกระทบต่อผลการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ดังกล่าว เมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์ โดยใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะเปรียบเทียบ พบว่าการแยกสารทั้ง 5 ชนิดออกจากกันและรูปร่างของแต่ละ peak ไม่ต่างจากสภาวะเปรียบเทียบแต่ retention time ต่างกันโดยที่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิพบว่า retention time ลดลง เมื่อเปลี่ยนอัตราการไหล (flow rate) โดยใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นสภาวะเปรียบเทียบ ผลการแยกสารและรูปร่างของ peak ไม่ต่างจากสภาวะเปรียบเทียบ แต่การเพิ่มอัตราการไหลมีผลให้ retention time ลดลง เมื่อเปลี่ยนอัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่โดยใช้อัตราส่วน methanol: 0.01 M ammonium acetate (65:35, v/v) เป็นสภาวะเปรียบเทียบ พบว่าการลดอัตราส่วน methanol มีแนวโน้มที่จะแยกสารได้ดีขึ้น แต่ในขณะเดียวกันก็ส่งผลให้ค่า retention time เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน เมื่อเพิ่มอัตราส่วน methanol พบว่าแนวโน้มในการแยกสารลดลงและที่อัตราส่วน methanol: 0.01 M ammonium acetate (75:25, v/v) ไม่สามารถแยก methisosildenafil ออกจาก sildenafil (ตารางที่ 3) จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นนี้มีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่าง ๆ ส่งผลให้เกิดความสะดวกในการนำวิธีไปใช้ตรวจพิสูจน์ยาในกลุ่ม PDE-5 inhibitor ในของกลางยาเสพติดต่อไป

การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ยาในกลุ่ม PDE-5 inhibitors ในของกลางยาเสพติดเกี่ยวกับการเพิ่มสมรรถภาพทางเพศ ที่ได้รับจากสถานตำรวจ กองกำกับการ 3 และ 4 กรมสอบสวนคดีพิเศษ และกองบังคับการตำรวจปราบปรามยาเสพติด 1 กองบัญชาการตำรวจปราบปรามยาเสพติด ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 พบว่าตัวอย่างรูปแบบเม็ดที่ระบุด้วยยาสำคัญเป็น sildenafil จำนวน 100 ตัวอย่าง ตรวจพบด้วยยาสำคัญตามที่ระบุไว้ทั้งหมด ที่ระบุด้วยยาสำคัญเป็น tadalafil จำนวน 56 ตัวอย่าง แต่ตรวจพบ sildenafil ซึ่งไม่ตรงกับที่ระบุไว้ จำนวน 51 ตัวอย่าง และตรวจพบ tadalafil ตามที่ระบุไว้ จำนวน 5 ตัวอย่าง ที่ระบุด้วยยาสำคัญเป็น vardenafil มีจำนวน 12 ตัวอย่าง แต่ตรวจพบ sildenafil ทั้งหมด ส่วนตัวอย่างรูปแบบเม็ดที่ไม่ระบุด้วยยาสำคัญแต่อาจสรรพคุณเกี่ยวกับการเพิ่มสมรรถภาพทางเพศ มีจำนวน 14 ตัวอย่าง ตรวจพบ sildenafil ทั้งหมด ตัวอย่างรูปแบบแคปซูล จำนวน 30 ตัวอย่างทั้งหมดนี้ไม่ระบุด้วยยาสำคัญและส่วนใหญ่เป็นยาแผนโบราณและอาจสรรพคุณที่ทำให้เข้าใจได้ว่าเกี่ยวข้องกับการเพิ่มสมรรถภาพทางเพศ หรือบำรุงร่างกาย ซึ่งจาก 30 ตัวอย่าง ตรวจพบ sildenafil จำนวน 20 ตัวอย่าง ตรวจพบ sildenafil ผสม tadalafil จำนวน 4 ตัวอย่าง ตรวจพบ sildenafil ผสม vardenafil จำนวน 1 ตัวอย่าง ตรวจพบ sildenafil ผสม tadalafil และ aminotadalafil จำนวน 1 ตัวอย่าง ตรวจพบ vardenafil ผสม tadalafil และ aminotadalafil จำนวน 1 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบด้วยยาทั้ง 5 ชนิด จำนวน 3 ตัวอย่าง ในส่วนตัวอย่างรูปแบบเจลซึ่งเป็นชนิดรับประทาน (oral jelly) จำนวน 16 ตัวอย่าง ทั้งหมดระบุด้วยยาสำคัญเป็น sildenafil และตรวจพบ sildenafil ทั้งหมดตามที่ระบุ ส่วนตัวอย่างรูปแบบอื่นๆ เช่น รูปแบบสารละลาย ครีม เป็นต้น ไม่ระบุด้วยยาสำคัญแต่อาจสรรพคุณที่ทำให้เข้าใจได้ว่าเกี่ยวข้องกับการเพิ่มสมรรถภาพทางเพศ จำนวน 2 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบด้วยยาทั้ง 5 ชนิดทั้ง 2 ตัวอย่าง

สรุป

การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ยาในกลุ่ม PDE-5 inhibitors ในของกลางยาเสพติดโดยวิธี TLC และ HPLC ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ มีความจำเพาะเจาะจง ชัดจำกัดของการตรวจพบของวิธี TLC สำหรับ sildenafil, tadalafil และ vardenafil เท่ากับ 100, 1,000 และ 250 µg/ml ตามลำดับ วิธี HPLC สำหรับ sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil และ methisosildenafil เท่ากับ 3.8, 1.0, 2.5, 0.8 และ 2.3 µg/ml ตามลำดับ วิธี HPLC มีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะระบบโครมาโทกราฟีง่าย และสะดวกในการนำไปใช้เพื่อตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ยาในกลุ่ม PDE-5 inhibitors ในของกลางยาเสพติดต่อไป การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ยาในกลุ่ม PDE-5 inhibitors ในของกลางยาเสพติดเกี่ยวกับการเพิ่มสมรรถภาพทางเพศ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 จำนวน 230 ตัวอย่าง ตรวจพบ sildenafil จำนวน 213 ตัวอย่าง tadalafil จำนวน 5 ตัวอย่าง sildenafil ผสม tadalafil จำนวน 4 ตัวอย่าง sildenafil

ผสม vardenafil จำนวน 1 ตัวอย่าง sildenafil ผสม tadalafil และ aminotadalafil จำนวน 1 ตัวอย่าง และ vardenafil ผสม tadalafil และ aminotadalafil จำนวน 1 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบตัวยาทั้ง 5 ชนิด จำนวน 5 ตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

1. สุรศักดิ์ วิชัยโย, สุวิญญ์ เจียมโฆสิต. การสำรวจการใช้ยาในโรคหย่อนสมรรถภาพทางเพศ [ออนไลน์]. 2549; [สืบค้น 5 ส.ค. 2557]: [42 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/service-research-special-abstract.php?num=41&year=2549>
2. Chemical structure of PDE-5 inhibitors [online]. [cited 2015 Apr 27]; [10 screens]. Available from: URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sildenafil/tadalafil/vardenafil/aminotadalafil/aildenafil>
3. พระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 และฉบับแก้ไขเพิ่มเติม ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ยาควบคุมพิเศษ ฉบับที่ 35 (พ.ศ. 2551) ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 125 ตอนพิเศษ 173 ง (วันที่ 5 พฤศจิกายน 2551).
4. Hakan Goker, Maksut Coskun and Gulgun Ayhan-K1lc1gil. Chromatographic Separation and Identification of Sildenafil and Yohimbine Analogues Illegally Added in Herbal Supplement. [online]. 2012; [cited 2015 Jan 12]; [19 screens]. Available from: URL: <http://www.intechopen.com>.
5. Khaled Al-Tahami. Determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil in dietary supplements sold in the Yemeni market. J Scientific Research 2014; 3(4):403-5.
6. International Conference on Harmonization of Technical Requirement for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Geneva: ICH Steering Committee; 2005.
7. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, editors. Clarke's analysis of drugs and poisons. 3rd ed. London, UK: Pharmaceutical Press; 2004.
8. ลิควิดโครมาโทกราฟี (Liquid Chromatography) [ออนไลน์]. [สืบค้น 18 มี.ค. 2558]; [68 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <http://e-book.ram.edu/e-book/c/CM334/CM334-4.pdf>
9. TLC visualization reagents [online]. [cited 2015 Jan 18]; [14 screens]. Available from: URL: http://lcso.epfl.ch/files/content/sites/lcso/files/load/TLC_Stains.pdf.

Development and Validation Method for Identification of PDE-5 inhibitors In Seized Materials

Prasit Opas and Supanee Duangteraprecha

Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT Identification of PDE-5 inhibitors in Seized Materials using TLC and HPLC methods was developed and validated. TLC method, the stationary phase was silica gel 60 F 254, the mobile phase comprised two systems. System 1 was the mixture of ethyl acetate, acetonitrile and ammonia solution and system 2 was the mixture of ethyl acetate, ethanol and ammonia solution. TLC of isolated sample was firstly detected by UV radiation at 254 nm, spectrum scanning and then confirmed by color reaction with ethanolic-sulfuric acid and acidified iodoplatinate reagent. In system 1, R_f were found to be 0.49, 0.71, 0.50, 0.57, and 0.56 for sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil, methisosildenafil, respectively. In system 2, the R_f were found to be 0.31, 0.78, 0.45, 0.72, and 0.43 for sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil, methisosildenafil, respectively. A purple color after spraying with ethanolic-sulfuric acid reagent indicated the presence of tadalafil and aminotadalafil. When acidified iodoplatinate solution was used, a brown to purple color developed indicated the presence of sildenafil, tadalafil, vardenafil and aminotadalafil. With TLC techniques, limit of detections of sildenafil, tadalafil and vardenafil were 100, 1000 and 250 $\mu\text{g/ml}$ respectively. HPLC method, the separation was performed on a C18 column by isocratic elution with a mobile phase of 0.01 M ammonium acetate buffer and methanol and PDA detection at 210–350 nm. All sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil and methisosildenafil peaks were completely resolved as shown by resolution values greater than 1.8, with no interference from matrix components. With HPLC techniques, limit of detections of sildenafil, tadalafil, vardenafil, aminotadalafil and methisosildenafil were 3.8, 1.0, 2.5, 0.8 and 2.3 $\mu\text{g/ml}$ respectively. The validated method was applied to the identification of illicit drugs containing PDE-5 inhibitors in seized materials in fiscal year 2015. It was found that among 230 samples tested, 213 samples contained sildenafil, 11 samples contained a mixture of sildenafil, vardenafil, aminotadalafil, tadalafil and one sample contained a mixture of sildenafil and vardenafil.

Key words: PDE-5 inhibitors, seized materials, identification, method validation