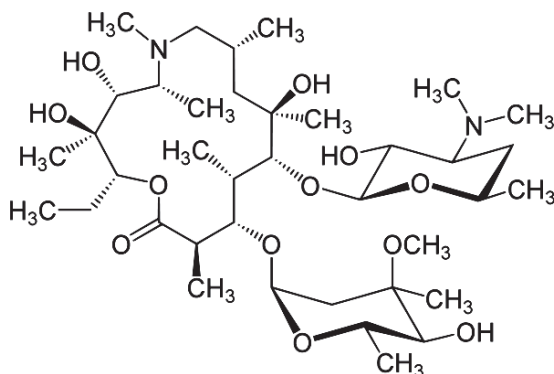

การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ อะซิโทรัมัยซิน ในรูปแบบยาแคปซูลและยาผง สำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน

วิภาพรรณ ไสยสมบัติ สุภาณี ดวงธีรปรีชา สุภาวดี สุรางค์กุล และประสิทธิ์ โอภาส
สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์อะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนด้วยวิธีเรเวอร์สเฟสไฮเพอร์ฟอร์แมนซิลิควิดโครมาโทกราฟี โดยใช้คอลัมน์ชนิด XTerra C18 ขนาด 4.6- × 150- มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สารละลายตัวพาประกอบด้วยส่วนผสมของ acetonitrile, methanol และสารละลายของ dibasic potassium phosphate กับ sodium 1-octanesulfonate pH 8.20 ในอัตราส่วน 21:40:39 โดยปริมาตร อัตราการไหลของตัวพา 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี พบว่าพีคของอะซิโทรัมัยซินสามารถแยกจากสารละลายตัวของอะซิโทรัมัยซินที่เกิดจากการเร่งให้สลายตัวด้วยสภาวะต่างๆ เช่น ความร้อน แสง กรด เบส และออกซิเดชัน การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9979 การทดสอบความแม่นยำของวิธี พบว่าร้อยละของการคืนกลับของอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 99.48, 99.20 ตามลำดับ และมีค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.28, 0.61 ตามลำดับ การทดสอบความทำซ้ำได้ให้ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนเท่ากับ 1.3 และ 1.1 ตามลำดับ ความเที่ยงของการวิเคราะห์ต่างวัน ต่างนักวิเคราะห์และใช้เครื่องมือต่างกัน พบว่าค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนเท่ากับ 1.4 และ 1.1 ตามลำดับ วิธีวิเคราะห์มีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ ที่ทดสอบ คือ คอลัมน์ ความเป็นกรด-เบสของสารละลายตัวพา อุณหภูมิ อัตราส่วนของสารละลายตัวพาและอัตราการไหลของสารละลายตัวพา จากผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมในการนำไปใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน ซึ่งจากการนำวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวไปตรวจวิเคราะห์คุณภาพยาอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลจำนวน 15 ตัวอย่าง และยาอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนจำนวน 8 ตัวอย่าง โดยใช้เกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดตามตำราของประเศสหรัฐอเมริกา (USP 35) พบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีคุณภาพเข้ามาตรฐานตามเกณฑ์ที่กำหนด

บทนำ

อะซิโทรมัยซิน (Azithromycin) เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มของ macrolide ซึ่งมีโครงสร้างหลักทางเคมีแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลักตามจำนวนคาร์บอนอะตอมในวงแหวน macrolides ได้แก่ 14, 15 และ 16 อะตอม อะซิโทรมัยซินเป็น macrolide ที่มีวงแหวน 15 อะตอม หรือ azalide เป็นยาที่เติมอะตอมของไนโตรเจน ทำให้ยามีคุณสมบัติเป็นด่างเพิ่มขึ้น ยานี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *H.influenza* มากกว่าอิริโทรมัยซินซึ่งเป็นยาตัวแรกในกลุ่ม macrolide ที่ออกจำหน่าย 2-8 เท่า ทนกรดได้ดีกว่า มีคุณสมบัติละลายในไขมันได้ดีและแตกตัวน้อยจึงกระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ดี ทำให้ระดับยาในเนื้อเยื่อสูงขึ้น สามารถรับประทานเพียงครั้งเดียวต่อวัน⁽¹⁾ อะซิโทรมัยซินออกฤทธิ์ได้ดีกับเชื้อแบคทีเรียทั้งกรัมบวก กรัมนลบ และ Anaerobes สามารถใช้รักษาการติดเชื้อในทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่าง รวมทั้ง atypical pneumonia โรคติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์และใช้รักษาและป้องกัน Mycobacterium Avium Complex (MAC) ในผู้ป่วยเอดส์⁽²⁾ อะซิโทรมัยซินมีลักษณะเป็นผงสีขาว⁽³⁾ ละลายน้ำได้น้อย แต่ละลายได้ดีในเมทานอล (Methanol) อะเซโตไนไตร (Acetonitrile)⁽⁴⁾ มีชื่อทางเคมีว่า (2R, 3S, 4R, 5R, 8R, 10R, 11R, 12S, 13S, 14R)-13-[(2,6-dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl- α -L-ribo-hexo pyranosyl) oxy]-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-11-[[3,4,6-trideoxy-3-(dimethylamino)- β -D-xyl o-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-one มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$ น้ำหนักโมเลกุล 749.0 และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังนี้ (ภาพที่ 1)⁽⁵⁾



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของอะซิโทรมัยซิน

จากคุณสมบัติในการรักษาการติดเชื้อที่ครอบคลุมหลายระบบในร่างกายและสามารถรับประทานวันละครั้งเป็นเวลา 3 วัน มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการรักษา ทำให้มีการใช้ยาดังกล่าวอย่างกว้างขวาง และยังจัดเป็นยาในบัญชียาหลักแห่งชาติ ปัจจุบันมีอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลที่ขึ้นทะเบียนตำรับในประเทศไทย 11 ตำรับ จำแนกเป็นผลิตในประเทศ 9 ตำรับ และนำเข้าจากต่างประเทศ 2 ตำรับ รูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนที่ขึ้นทะเบียนตำรับในประเทศไทย 6 ตำรับ จำแนกเป็นผลิตในประเทศ 5 ตำรับ และนำเข้าจากต่างประเทศ 1 ตำรับ⁽⁶⁾ วิธีตรวจวิเคราะห์ห่ออะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน มีวิธีมาตรฐานในตำรายาของสหรัฐอเมริกา (USP)⁽⁷⁾ แต่ต้องใช้อุปกรณ์ในการตรวจวัดสัญญาณที่ไม่มีใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ (Amperometric electrochemical detector) ดังนั้นจึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ห่ออะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน โดยใช้เทคนิค RP-HPLC ที่ใช้อุปกรณ์ในการตรวจวัดสัญญาณที่มีใช้กันทั่วไปในห้องปฏิบัติการและมีวิธีการวิเคราะห์ที่เหมือนกัน และตรวจสอบความถูกต้องตามหลักเกณฑ์ของตำรายา USP⁽⁷⁾ และ ICH Guideline⁽⁸⁾ โดยศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธี ความเป็น

เส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ ความแม่นยำ และความคงทนของวิธี เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานของสำนักยาและวัตถุเสพติด ในการวิเคราะห์คุณภาพยาอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน ในโครงการสำรวจคุณภาพยาดังกล่าวที่มีจำหน่ายในประเทศไทย เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคให้ได้ใช้ยาที่มีคุณภาพ และประสิทธิภาพในการรักษาโรค

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) with UV/PDA Detector : ผลิตภัณฑ์ของ Waters, Millipore Corporation, USA, Model Waters 2695-1996-Empower
2. High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) with UV/PDA Detector : ผลิตภัณฑ์ของ Agilent, Germany, Model Agilent 1100 Series
3. HPLC Column XTerra C18, 5 μm , 4.6 \times 150 mm, Lot No. 0211311851
4. HPLC Column XBridge C18, 5 μm , 4.6 \times 150 mm, Lot No. 0111381701
5. Analytical Balance : Model AT261 Deltarange, Mettler Toledo, Switzerland
6. Analytical Balance : Model MX5, Mettler Toledo, Switzerland
7. เครื่องกรองน้ำ : Model Milli-Q Advantage A10, Millipore, USA
8. Syringe filter: Nylon 0.45 μm
9. เครื่องแก้ว class A

สารมาตรฐานและสารเคมี

1. Azithromycin: USP RS
2. Azaerythromycin A: USP RS
3. Water: High Purity
4. Acetonitrile: HPLC
5. Methanol: HPLC
6. Dibasic potassium phosphate
7. Sodium 1-octanesulfonate
8. Monobasic ammonium phosphate
9. Ammonium hydroxide
10. Phosphoric acid

ตัวอย่าง

ตัวอย่างยาอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลประกอบด้วยปริมาณตัวอย่างอะซิโทรมัยซิน 250 มิลลิกรัมต่อแคปซูล

ตัวอย่างยาอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนประกอบด้วยปริมาณตัวอย่างอะซิโทรมัยซิน 200 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร

Placebo (ส่วนประกอบของยาที่ไม่มีตัวยาสสำคัญ) ของยาอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนได้จากผู้ผลิต

วิธีการทดสอบ

สภาวะของระบบโครมาโทกราฟี (HPLC)

คอลัมน์ :	HPLC Column XTerra C18, 5 μ m, 4.6 \times 150 mm, Lot No. 0211311851
อุณหภูมิของคอลัมน์ :	50 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล :	1.5 ml/min
สารละลายตัวพา :	Acetonitrile, Methanol, Solution A (21:40:39) (Solution A = A solution containing 4.4 mg/ml of dibasic potassium phosphate and 0.5 mg/ml of sodium 1-octanesulfonate, and adjust with phosphoric acid to a pH of 8.20 \pm 0.05)
เครื่องตรวจวัด :	PDA 210 nm
ปริมาตรที่ฉีด :	50 μ l

System suitability

The resolution between azaerythromycin A and azithromycin is not less than 2.5.

The column efficiency is not less than 1000 theoretical plates.

The tailing factor for the analyte peak is 0.9–1.5.

The relative standard deviation for replicate injections is not more than 2.0%.

การเตรียมตัวทำละลาย (Diluent A)

Diluent A :	Acetonitrile, Methanol, Solution B (30:35:35) (Solution B = A solution containing 1.7 mg/ml of monobasic ammonium phosphate, and adjust with ammonium hydroxide to a pH of 10.00 \pm 0.05)
-------------	---

การเตรียมสารละลายมาตรฐานอะซิโทรมัยซิน

ชั่งสารมาตรฐานอะซิโทรมัยซิน ประมาณ 4 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายประมาณ 7 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายหมด เจือจางด้วยตัวทำละลายจนครบปริมาตร กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

การเตรียมสารละลาย Resolution

1. ชั่งสารมาตรฐานอะซิโทรมัยซิน ประมาณ 4 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายประมาณ 7 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายหมด เจือจางด้วยตัวทำละลายจนครบปริมาตร

2. ชั่งสารมาตรฐาน Azaerythromycin A ประมาณ 2 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Acetonitrile ประมาณ 7 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายหมด เจือจางด้วย Acetonitrile จนครบปริมาตร

3. ปิเปตสารละลายข้อ 1 จำนวน 1.0 มิลลิลิตร และสารละลายข้อ 2 จำนวน 2.0 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 20 มิลลิลิตร เจือจางด้วยตัวทำละลายจนครบปริมาตร กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

การเตรียมสารละลายตัวอย่างในการหาปริมาณด้วยวิธี (Content of active ingredient)

ซึ่งตัวอย่างยาให้มีปริมาณตัวยาอะซิโทรัมัยซิน 100 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำทำละลายประมาณ 200 มิลลิลิตร นำไปเขย่า 30 นาที ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย กรองผ่านแผ่นกรอง ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

การเตรียมสารละลายตัวอย่างในการหาการละลายของตัวยา (Dissolution)

ทำการตรวจหาการละลายของตัวยาจากแคปซูล โดยใช้วิธีและมาตรฐานตาม USP 35 ดังนี้ apparatus 2 ความเร็ว 100 รอบต่อนาที มีตัวกลางในการละลายเป็น sodium phosphate buffer pH 6.0 ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ± 0.5 องศาเซลเซียส ในเวลา 45 นาที กรองสารละลายที่ได้ผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธี

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

1. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)

ซึ่งสารมาตรฐานอะซิโทรัมัยซิน ประมาณ 4 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร นำมาทำให้สลายตัวในสภาวะต่าง ๆ หลังจากนั้นเติมน้ำทำละลายประมาณ 7 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายหมด ปรับ pH ของสารละลายเฉพาะสภาวะที่ 1 และ 2 เจือจางด้วยตัวทำละลายจนครบปริมาตร กรองสารละลายผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

สภาวะต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดการสลายตัว

- 1) เติม 10 N Sodium hydroxide จำนวน 1 หยด แล้วนำไปต้มที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง
- 2) เติม 0.5 N Hydrochloric acid จำนวน 1 หยด
- 3) เติม 0.1% Hydrogen peroxide จำนวน 1 หยด
- 4) เติมน้ำจำนวน 1 หยดแล้วนำไปต้มที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง
- 5) นำไปผึ่งแดดนาน 6 ชั่วโมง^(9, 10)

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานที่ทำให้เกิดการสลายตัวที่สภาวะต่าง ๆ ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อศึกษาการรบกวนจากสารสลายตัว คำนวณร้อยละของการสลายตัวโดยเปรียบเทียบกับค่าพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานที่สภาวะปกติ ซึ่งสภาวะต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดการสลายตัวได้จากการทดลองทำการศึกษาเอง สำหรับสภาวะที่ 2 และ 3 ไม่ต้องนำไปต้มต่อ เนื่องจากเมื่อเติมสารที่เร่งให้เกิดการสลายตัวแล้วพบว่าสารที่ทำการศึกษาก็เกิดการสลายตัวแล้ว

2. การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

เตรียมสารละลายมาตรฐานอะซิโทรัมัยซิน ในตัวทำละลายให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายดังกล่าวให้มีความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเตรียมความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ กรองสารละลายผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีค สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ซึ่งต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995

3. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ทดสอบความแม่นยำของวิธีโดยวิเคราะห์ Placebo ที่เติมสารมาตรฐานอะซิโทรัมัยซิน (Spiked placebo) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.12, 0.4 และ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 30, 100 และ 140 ของระดับความเข้มข้นที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณอะซิโทรัมัยซินในตัวอย่าง ตามลำดับ สำหรับยาอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูล เตรียมโดยการชั่งสารมาตรฐานอะซิโทรัมัยซินประมาณ 3, 10 และ 14 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน)

ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร และชั่ง placebo ประมาณ 8 มิลลิกรัม ลงในแต่ละ volumetric flask สำหรับยาอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนเตรียมโดยการชั่งสารมาตรฐานอะซิโทรมัยซิน ประมาณ 3, 10 และ 14 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร และชั่ง placebo ประมาณ 270 มิลลิกรัม ลงในแต่ละ volumetric flask ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณอะซิโทรมัยซินทั้งหมดที่มีในสารละลายเพื่อคำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) ของแต่ละระดับความเข้มข้น หาค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ (% mean recovery) และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%Relative Standard Deviation, %RSD) โดยที่ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับของอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูล ต้องอยู่ในช่วง 98.0-102.0 และค่า %RSD ไม่เกิน 2.0 ส่วนค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับของอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน ต้องอยู่ในช่วง 97.0-103.0 และค่า %RSD ไม่เกิน 2.0

4. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

4.1 ความทำซ้ำได้ (Repeatability)

วิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญในตัวอย่างยาอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน จำนวน 6 ซ้ำ โดยทดสอบในวันและสภาวะเดียวกัน คำนวณปริมาณอะซิโทรมัยซินต่อหน่วย ค่าเฉลี่ย และ %RSD โดย %RSD ต้องไม่เกิน 2.0

4.2 Intermediate Precision

วิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญในตัวอย่างยาอะซิโทรมัยซินชนิดแคปซูลและอะซิโทรมัยซินชนิดผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน จำนวน 6 ซ้ำ โดยเปลี่ยนนักวิเคราะห์ เปลี่ยนวัน และเปลี่ยนเครื่อง HPLC คำนวณปริมาณอะซิโทรมัยซินต่อหน่วย ค่าเฉลี่ย และ %RSD โดย %RSD ต้องไม่เกิน 2.0

5. การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

ศึกษาผลกระทบต่อการวิเคราะห์ยาจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ ของระบบโครมาโทกราฟี คือ คอลัมน์ อัตราส่วนของสารละลายตัวพา ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ของสารละลายบัฟเฟอร์ในสารละลายตัวพา อุณหภูมิของคอลัมน์และอัตราการไหลของสารละลายตัวพา โดยวิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญในตัวอย่างยาอะซิโทรมัยซิน จำนวน 3 ซ้ำ ศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆ ที่อาจมีผลกระทบต่อความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี เช่น resolution ระหว่าง azithromycin และ azaerythromycin A ต้องไม่น้อยกว่า 2.5 ลักษณะรูปร่างของพีค (tailing factor) retention time และ theoretical plates เปรียบเทียบผลวิเคราะห์ที่ได้โดยคำนวณค่า %RSD ต้องไม่เกิน 2.0

6. การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)

เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 ที่กำหนดให้มีการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ โดยคำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนทุกแหล่ง และเป็นไปตามแนวทางการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ด้านยาและวัตถุเสพติด^(11, 12) ซึ่งความไม่แน่นอนของการวัดเป็นค่ารวมของผลกระทบทั้งหมดที่มีต่อผลทดสอบที่เป็นเชิงปริมาณ ดังนั้น แหล่งที่มาของความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ปริมาณอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนพิจารณาได้จากสูตรคำนวณ คือ

$$\text{ปริมาณอะซิโทรมัยซิน (มิลลิกรัมต่อหน่วย)} = \frac{\text{Peak area}_{\text{sample}}}{\text{Peak area}_{\text{std}}} \times \frac{W_{\text{std}}}{D_{\text{std}}} \times \frac{P}{100} \times D_{\text{sam}} \times \frac{\text{Av. Wt./unit}}{W_{\text{sample}}}$$

$\text{peak area}_{\text{sample}}$	=	พื้นที่ใต้พีคอะซิโทรมัยซินในสารละลายตัวอย่าง
$\text{peak area}_{\text{std}}$	=	พื้นที่ใต้พีคอะซิโทรมัยซินในสารละลายมาตรฐาน
W_{std}	=	น้ำหนักของสารมาตรฐานอะซิโทรมัยซิน (มิลลิกรัม)
D_{std}	=	Dilution factor ของสารมาตรฐาน
P	=	ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน (% purity)
D_{sample}	=	Dilution factor ของตัวอย่าง
Av.Wt/unit	=	น้ำหนักผงยาเฉลี่ยต่อแคปซูลหรือน้ำหนักยาเฉลี่ยต่อซองชา (กรัม)
W_{sample}	=	น้ำหนักยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ (กรัม)

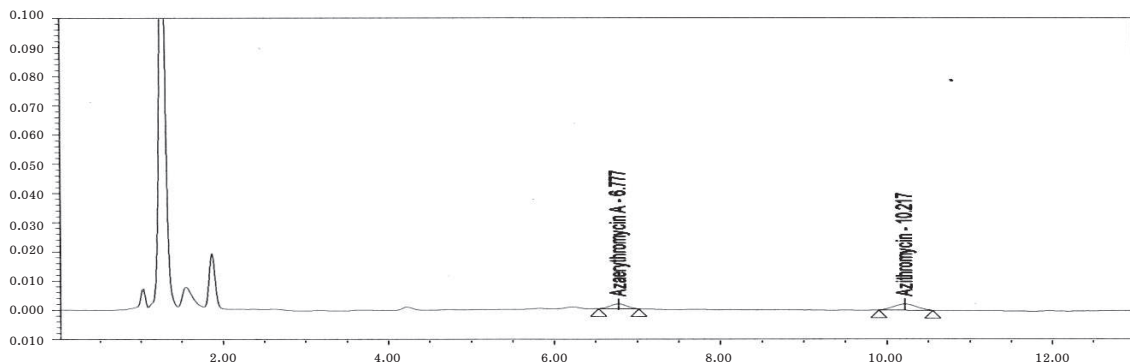
7. การศึกษาคุณภาพยาอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน

วิเคราะห์อะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนในหัวข้อปริมาณตัวยาสำคัญ (Assay) ความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย (Weight Variation) การละลายของตัวยา (Dissolution) ความเป็นกรด-เบส (pH) และปริมาณน้ำ (Water) โดยใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นและผ่านการตรวจสอบความถูกต้อง ในการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญและการละลายของตัวยา

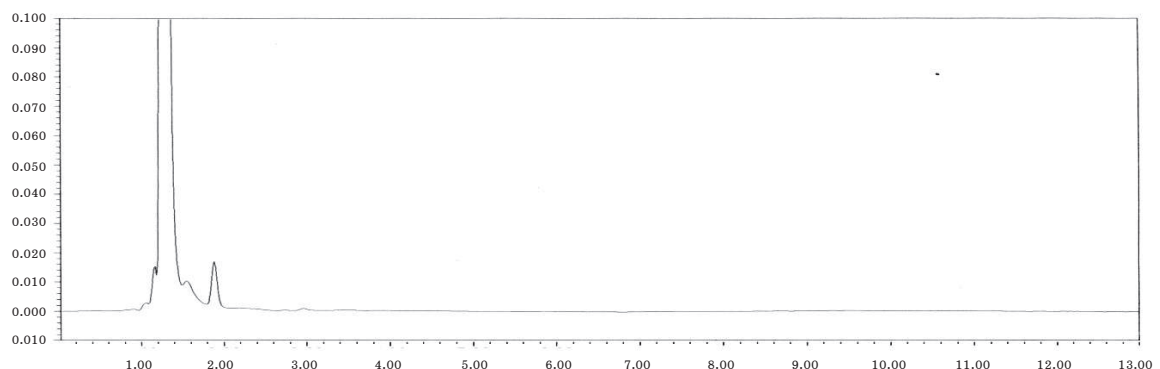
ผล

1. การทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ (Chromatographic system suitability)

จากการฉีดสารละลาย Resolution เพื่อตรวจสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ พบว่าระบบโครมาโทกราฟสามารถแยก azaerythromycin A และ azithromycin จากกัน (ภาพที่ 2) โดยมี retention time ประมาณ 6.8 และ 10.2 นาที ตามลำดับ และมีค่า resolution เท่ากับ 7.6 โดยไม่มีผลรบกวนจากตัวทำละลาย (Diluent A) (ภาพที่ 3)



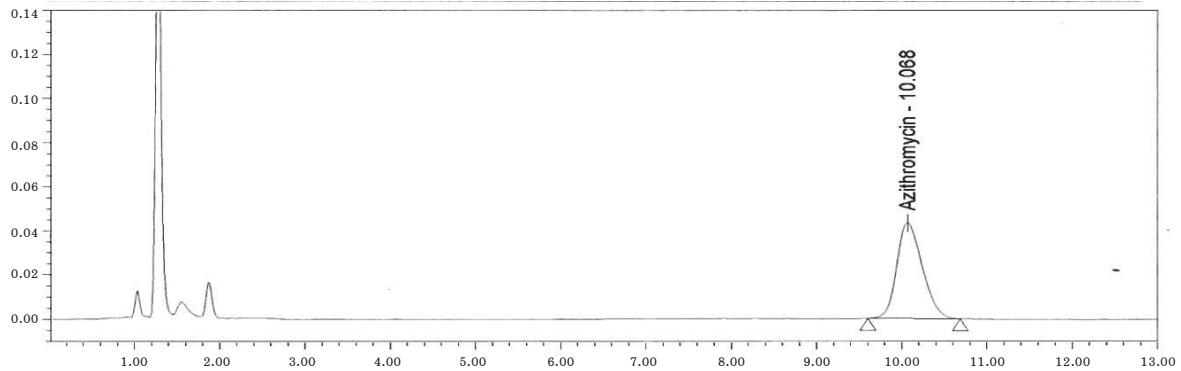
ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารละลาย Resolution



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของตัวทำละลาย (Diluent A)

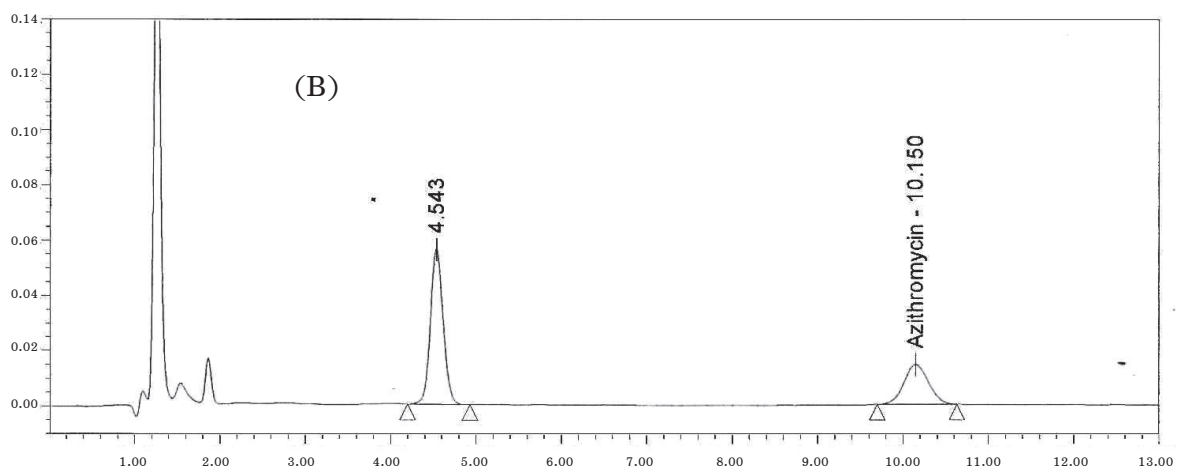
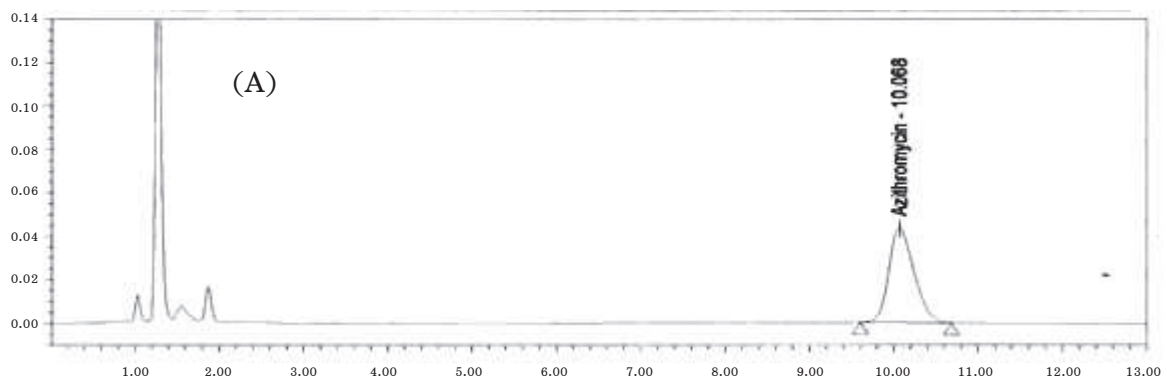
2. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)

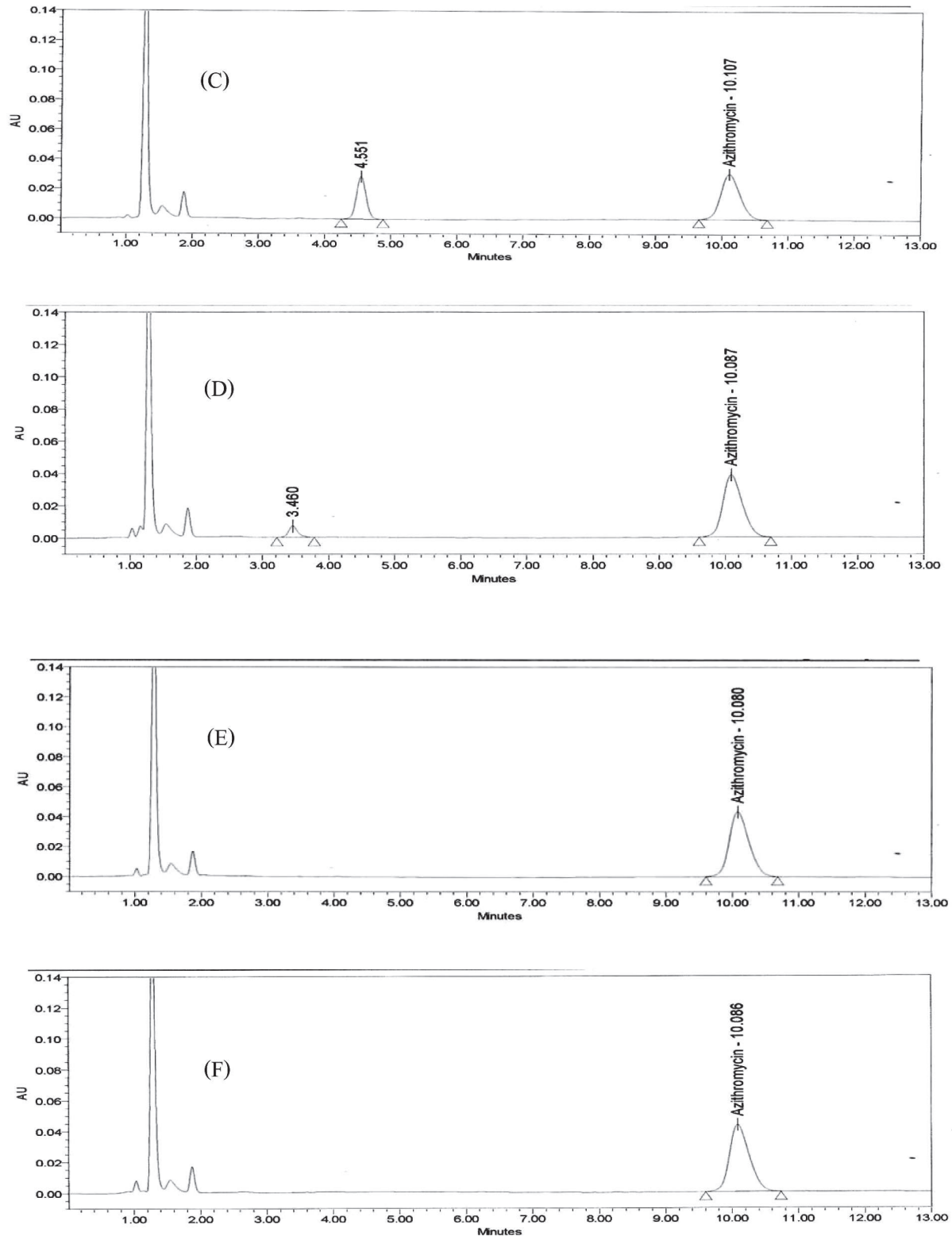
ภายใต้สภาวะของระบบโครมาโทกราฟที่พัฒนาขึ้น ได้พีคของอะซิโทรมัยซินที่เวลาประมาณ 10.1 นาที (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอะซิโทรมัยซิน

จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยการฉีดสารละลายมาตรฐานอะซิโทรมัยซินที่ทำให้เกิดการสลายตัวที่สภาวะต่างๆ เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานอะซิโทรมัยซิน โดยสามารถแยกสารสลายตัวของอะซิโทรมัยซิน ที่เกิดการสลายตัวจากสภาวะต่าง ๆ ออกจากพีคของอะซิโทรมัยซิน (ภาพที่ 5)





ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอะซิโทรมัยซิน (A)
 สารละลายมาตรฐานในสภาวะเบสที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง (B)
 สารละลายมาตรฐานในสภาวะกรด (C)
 สารละลายมาตรฐานในสภาวะออกซิเดชัน (D)
 สารละลายมาตรฐานในสภาวะทำให้ร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง (E)
 สารละลายมาตรฐานในสภาวะที่ถูกแสงแดดนาน 6 ชั่วโมง (F)

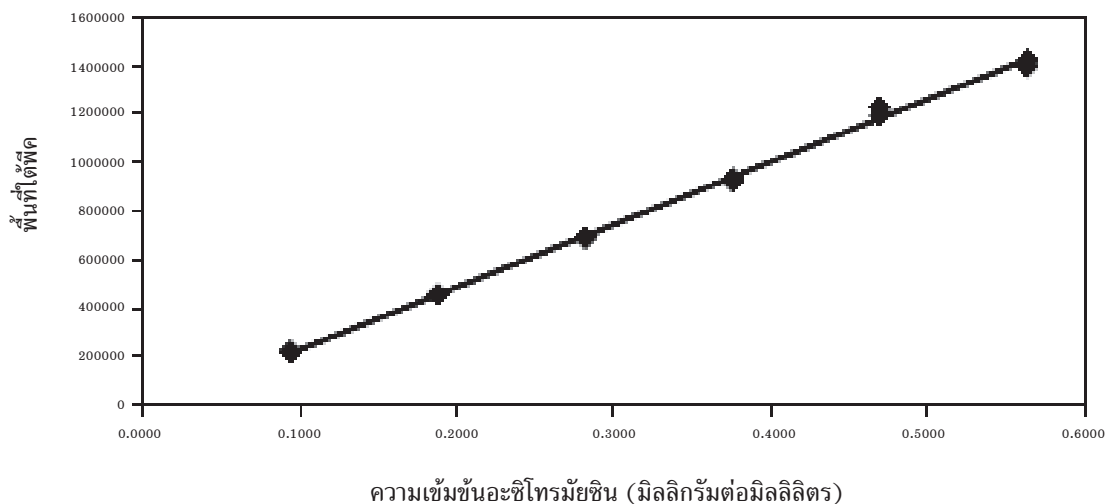
พบว่าอะซิโทรมัยซิน มีความคงทนจากความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง และในสภาวะเร่งด้วยแสง คือ พบการสลายตัวเพียงร้อยละ 1.1 และ 1.3 ตามลำดับ ไม่คงตัวในสภาวะเบสที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง สภาวะกรดและสภาวะออกซิเดชัน โดยมีการสลายตัวและตรวจพบสารสลายตัว โดยแสดงผลการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีจากสภาวะที่ทำให้เกิดการสลายตัว (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงสภาวะที่ศึกษาการสลายตัวของอะซิโทรมัยซิน และสารสลายตัวที่ตรวจพบ

สภาวะที่ทำให้เกิดการสลายตัว	ร้อยละของการสลายตัว	Retention time ของสารสลายตัว (นาที)
เบสที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง	68.35	4.5
กรด	32.00	4.5
ออกซิเดชัน	13.27	3.5
ทำให้ร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง	1.06	ไม่พบสารสลายตัว
แสงแดดนาน 6 ชั่วโมง	1.34	ไม่พบสารสลายตัว

3. การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐาน 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีคมีลักษณะเป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient) เท่ากับ 0.9979 (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีคของอะซิโทรมัยซิน

4. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ผลจากการฉีดสารละลาย placebo ที่เติมสารมาตรฐานอะซิโทรัมัยซินที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ ร้อยละ 30, 100 และ 140 ของความเข้มข้นที่ใช้วิเคราะห์อะซิโทรัมัยซิน เพื่อศึกษาร้อยละของการคืนกลับ พบว่าค่าเฉลี่ยของร้อยละของการคืนกลับของอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูล มีค่าเท่ากับ 99.48 และ %RSD เท่ากับ 0.28 (ตารางที่ 2) ส่วนร้อยละของการคืนกลับของอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน มีค่าเท่ากับ 99.20 และ %RSD เท่ากับ 0.61 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีของอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูล

ระดับความเข้มข้น (ร้อยละของความเข้มข้น ที่ทดสอบ)	ปริมาณสารมาตรฐาน ที่ตรวจพบ (มิลลิกรัม)	ปริมาณสารมาตรฐาน ที่เติม (มิลลิกรัม)	ร้อยละ ของการคืนกลับ	ค่าเฉลี่ย	%RSD
30	2.8008	2.8218	99.26	99.25	0.18
	2.8223	2.8387	99.42		
	2.7733	2.7994	99.07		
100	9.4026	9.4248	99.76	99.79	0.19
	9.3559	9.3921	99.62		
	9.3691	9.3696	99.99		
140	13.1196	13.2490	99.02	99.41	0.35
	13.1246	13.1816	99.57		
	13.1114	13.1573	99.65		
ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ				99.48	0.28

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีของอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน

ระดับความเข้มข้น (ร้อยละของความเข้มข้น ที่ทดสอบ)	ปริมาณสารมาตรฐาน ที่ตรวจพบ (มิลลิกรัม)	ปริมาณสารมาตรฐาน ที่เติม (มิลลิกรัม)	ร้อยละ ของการคืนกลับ	ค่าเฉลี่ย	%RSD
30	2.7360	2.7583	99.19	98.63	0.78
	2.7997	2.8639	97.76		
	2.7452	2.7741	98.95		
100	9.3179	9.3154	100.03	99.13	1.44
	9.2385	9.4772	97.48		
	9.4294	9.4407	99.88		
140	13.2607	13.2620	99.99	99.84	0.13
	13.1771	13.2097	99.75		
	13.2068	13.2340	99.79		
ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ				99.20	0.61

5. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

5.1 ความทำซ้ำได้ (Repeatability)

จากการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญในตัวอย่างยาอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลโดยวิเคราะห์ 6 ซ้ำ ได้ปริมาณตัวยาสำคัญเฉลี่ยเท่ากับ 242.2219 มิลลิกรัมต่อแคปซูล และ %RSD เท่ากับ 1.3 (ตารางที่ 4) ส่วนอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน ได้ปริมาณตัวยาสำคัญเฉลี่ยเท่ากับ 195.7848 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร และ %RSD เท่ากับ 1.1 (ตารางที่ 5)

5.2 Intermediate precision

การศึกษา Intermediate precision ของวิธีที่พัฒนาขึ้นได้ผลการทดสอบ (ตารางที่ 6 และ 7)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความทำซ้ำได้ของอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูล

ตัวอย่างที่	ปริมาณอะซิโทรมัยซิน (มิลลิกรัมต่อแคปซูล)
1	239.9909
2	243.1560
3	240.6924
4	239.6765
5	248.3456
6	241.4700
เฉลี่ย	242.2219
%RSD	1.3

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความทำซ้ำได้ของอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน

ตัวอย่างที่	ปริมาณอะซิโทรมัยซิน (มิลลิกรัมต่อแคปซูล)
1	194.8427
2	197.9665
3	197.8479
4	192.4077
5	195.4342
6	196.2096
เฉลี่ย	195.7848
%RSD	1.1

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบ Intermediate precision ของอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูล

รายการที่ทดสอบ	ปริมาณอะซิโทรมัยซิน (มิลลิกรัมต่อแคปซูล)						เฉลี่ย	%RSD	เฉลี่ย	%RSD
	1	2	3	4	5	6				
นักวิเคราะห์ที่ 1*	239.9909	243.1560	240.6924	239.6765	248.3456	241.4700	242.2219	1.3	244.8319	1.4
นักวิเคราะห์ที่ 2 เปลี่ยนวันและเครื่องมือ**	248.0496	247.8729	247.8406	247.1409	247.2343	246.5128	247.4418	0.2		

* นักวิเคราะห์ที่ 1 ตรวจวิเคราะห์วันที่ 20 มิ.ย. 56 โดยเครื่อง HPLC ผลิตภัณฑ์ของ Waters Model Waters 2695-1996-Empower

** นักวิเคราะห์ที่ 2 ตรวจวิเคราะห์วันที่ 27 มิ.ย. 56 โดยเครื่อง HPLC ผลิตภัณฑ์ของ Agilent Model Agilent 1100 Series

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบ Intermediate precision ของอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน

รายการที่ทดสอบ	ปริมาณอะซิโทรัมัยซิน (มิลลิกรัมต่อแคปซูล)						เฉลี่ย	%RSD	เฉลี่ย	%RSD
	1	2	3	4	5	6				
นักวิเคราะห์ที่ 1*	194.8427	197.9665	197.8479	192.4077	195.4342	196.2096	195.7848	1.1	196.6561	1.1
นักวิเคราะห์ที่ 2 เปลี่ยนวันและเครื่องมือ**	199.4756	197.9835	196.3507	195.1510	196.2579	199.9452	197.5273	1.0		

* นักวิเคราะห์ที่ 1 ตรวจวิเคราะห์วันที่ 20 มิ.ย. 56 โดยเครื่อง HPLC ผลิตภัณฑ์ของ Waters Model Waters 2695-1996-Empower

** นักวิเคราะห์ที่ 2 ตรวจวิเคราะห์วันที่ 27 มิ.ย. 56 โดยเครื่อง HPLC ผลิตภัณฑ์ของ Agilent: Model Agilent 1100 Series

6. การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

จากการทดลองเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ ของระบบโครมาโทกราฟี เพื่อศึกษาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น resolution, retention time, theoretical plates และ tailing factor รวมทั้งวิเคราะห์หาปริมาณอะซิโทรัมัยซินในตัวอย่าง เพื่อเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ จากผลการทดสอบพบว่า สภาวะต่างๆ ของระบบโครมาโทกราฟีที่มีการเบี่ยงเบนไปให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณอะซิโทรัมัยซินในตัวอย่าง มีค่า %RSD ไม่เกิน 1.16 (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบความทนของวิธี

สภาวะของระบบโครมาโทกราฟี	ผลการทดสอบความทนของวิธี								
	Resolution	Retention time	Theoretical plates	Tailing factor	ปริมาณอะซิโทรัมัยซิน (มิลลิกรัม/หน่วย)				
					ค่าเฉลี่ย (n=3)	%RSD	ค่าเฉลี่ย	%RSD	
HPLC column	No.1*	8.8	12.0	7330.5	1.09	245.2151	0.5	247.2346	1.16
	No.2	7.8	13.7	3587.9	0.92	249.2540	1.9		
pH ของ buffer	8.15	8.4	12.5	7397.8	1.02	246.0023	1.6		
	8.20*	8.8	12.0	7330.5	1.09	245.2151	0.5	247.0882	1.05
	8.25	8.2	11.8	5825.1	1.17	250.0471	0.6		
อุณหภูมิของ column	45	10.6	12.7	7981.7	1.05	246.2101	1.5	-	-
	50*	8.8	12.0	7330.5	1.09	245.2151	0.5	246.3080	0.46
	55	8.1	11.2	6695.5	1.05	247.4988	0.6	-	-
Flow rate (ml/minute)	1.4	9.8	12.8	10267.9	1.05	249.4342	0.0	-	-
	1.5*	8.8	12.0	7330.5	1.09	245.2151	0.5	247.8088	0.92
	1.6	9.9	11.3	7556.0	0.99	248.7771	0.2	-	-
ACN/MeOH/Sol.A	19:40:41	10.2	15.6	8590.0	0.94	247.1461	0.7	-	-
	21:40:39*	8.8	12.0	7330.5	1.09	245.2151	0.5	246.3427	0.41
	23:40:37	8.0	10.0	6284.1	1.05	246.6668	0.6	-	-

* หมายถึง สภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่ทำการตรวจสอบความถูกต้อง

7. การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)

เมื่อทราบแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนแล้ว จึงพิจารณาความไม่แน่นอนที่เกิดจากแต่ละแหล่งแล้วคำนวณหา ค่าความไม่แน่นอนรวม (combined relative standard uncertainty) และค่าความไม่แน่นอนขยาย (Expanded uncertainty) เพื่อรายงานเป็นผลการทดสอบ ดังตัวอย่างการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัดในการวิเคราะห์ อะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลที่ได้ผลการวิเคราะห์เท่ากับ 96.9% ของปริมาณที่แจ้ง ผลการคำนวณค่าความไม่แน่นอน พบว่าได้ค่าความไม่แน่นอนขยายเท่ากับ 1.56% ของปริมาณที่แจ้ง จึงรายงานผลการทดสอบเป็น $96.9 \pm 1.6\%$ ของปริมาณที่แจ้ง รายละเอียดของการคำนวณค่าความไม่แน่นอน (ตารางที่ 9) ส่วนอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน ได้ผลการวิเคราะห์เท่ากับ 97.9% ของปริมาณที่แจ้ง ผลการคำนวณค่าความไม่แน่นอน พบว่าได้ค่าความไม่แน่นอนขยายเท่ากับ 1.48% ของปริมาณที่แจ้ง จึงรายงานผลการทดสอบเป็น $97.9 \pm 1.5\%$ ของปริมาณที่แจ้ง รายละเอียดของการคำนวณค่าความไม่แน่นอน (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 9 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์อะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูล

Components	Value, xi	Unit	u(xi)	u(xi)/xi
Standard				
W_{std}	51.98	mg	0.0207	0.000398
Volumetric flask _{std}	25	ml	0.0466	0.001865
Pipet _{std}	5	ml	0.0122	0.002450
Volumetric flask _{std}	25	ml	0.0466	0.001865
Peak area _{std}	1084543.7	-	7050.5548	0.006501
Purity	-	-	-	-
Sample				
Av.Wt/unit	451.8	mg	0.0207	0.000046
W_{sample}	181.08	mg	0.0207	0.000114
Volumetric flask _{std}	250	ml	0.4385	0.001754
Peak area _{sample}	1080656.7	-	2730.5388	0.002527
Repeatability	242.2219	-	0.0053	0.000022
Total relative standard uncertainty: 0.00006486				
Combined relative standard uncertainty: 0.00805				
Test result is 96.9% la.: Combined standard uncertainty: $0.00805 \times 96.9 = 0.78$				
Expanded uncertainty: $k = 2, 2 \times 0.78 = 1.56\%$ la.				
Reported value: $96.9 \pm 1.6\%$ la.				

ตารางที่ 10 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์อะซีโทรมัยซินในรูปแบบยาผง สำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน

Components	Value, xi	Unit	u(xi)	u(xi)/xi
Standard				
W_{std}	50.01	mg	0.0207	0.000414
Volumetric flask _{std}	25	ml	0.0466	0.001865
Pipet _{std}	5	ml	0.0122	0.002450
Volumetric flask _{std}	25	ml	0.0466	0.001865
Peak area _{std}	848359.3	-	2471.9540	0.002914
Purity	-	-	-	-
Sample				
Av.Wt/unit	6327.8	mg	0.0207	0.0000033
W_{sample}	2794.7	mg	0.0207	0.0000074
Volumetric flask _{std}	250	ml	0.4385	0.001754
Peak areasample	867873.3	-	4980.8690	0.005739
Repeatability	195.7848	-	0.0045	0.000023

Total relative standard uncertainty: 0.00005764

Combined relative standard uncertainty: 0.00759

Test result is 97.9% la.: Combined standard uncertainty: $0.00759 \times 97.9 = 0.74$ Expanded uncertainty: $k = 2, 2 \times 0.74 = 1.48\% \text{ la.}$ Reported value: $97.9 \pm 1.5\% \text{ la.}$

8. ผลการศึกษาคุณภาพยาอะซีโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน

ในการเฝ้าระวังคุณภาพยาอะซีโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน ซึ่งเป็นโครงการร่วมระหว่างสำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้วิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 23 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างยาอะซีโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลทั้งหมด 15 ตัวอย่าง จากทะเบียนยา 8 ตำรับ จากผู้ผลิต 7 ราย เป็นผู้ผลิตในประเทศ 5 ราย และผู้นำเข้า 2 ราย ตรวจวิเคราะห์ในหัวข้อปริมาณตัวยาสำคัญ (Assay) ความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย (Weight variation) การละลายของตัวยา (Dissolution) และปริมาณน้ำ (Water) และยาอะซีโทรมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน 8 ตัวอย่าง จากทะเบียนยา 4 ตำรับ จากผู้ผลิต 3 ราย เป็นผู้ผลิตในประเทศ 2 ราย และผู้นำเข้า 1 ราย ตรวจวิเคราะห์ในหัวข้อปริมาณตัวยาสำคัญ (Assay) ความเป็นกรด-เบส (pH) และปริมาณน้ำ (Water) โดยการตรวจวิเคราะห์ในหัวข้อปริมาณตัวยาสำคัญและการละลายของตัวยาใช้วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีแล้ว ส่วนหัวข้อความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย ความเป็นกรด-เบส และปริมาณน้ำ ใช้วิธีและมาตรฐานตามตำราของประเทศไทย (USP 35) ซึ่งจากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 23 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีคุณภาพเข้ามาตรฐานตามเกณฑ์ที่กำหนด

วิจารณ์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนในครั้งนี้มีปัญหาเนื่องจากคุณสมบัติของอะซิโทรมัยซิน คือ อะซิโทรมัยซินมีโครงสร้างขนาดใหญ่ (ดังภาพที่ 1) มวลโมเลกุลมาก ประกอบกับมีค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่เด่นชัด⁽¹³⁾ (very weak ultraviolet chromophore) ทำให้การตรวจวิเคราะห์ที่ใช้การตรวจวัดโดยการดูดกลืนแสงกระทำได้ในช่วงความยาวคลื่นที่จำกัด แต่วิธีที่พัฒนาขึ้นมีขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่ไม่ยุ่งยาก โดยมีเพียงขั้นตอนเดียว ทำให้สามารถลดค่าความผิดพลาด (Error) อันเนื่องมาจากการเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง และวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวิเคราะห์อะซิโทรมัยซินทั้งในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนได้ในคราวเดียวกัน ใช้อุปกรณ์ในการตรวจวัดสัญญาณที่มีใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ คือ UV detector แทนการใช้ Amperometric electrochemical detector ซึ่งเป็นอุปกรณ์ในการตรวจวัดสัญญาณที่เฉพาะเจาะจง ไม่มีใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้วิธีการวิเคราะห์ก็ยังเหมือนกับวิธีการวิเคราะห์อะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาเม็ดตามตำราของสหรัฐอเมริกา (USP 35) แตกต่างกันเฉพาะสัดส่วนของสารละลายตัวพาเท่านั้น

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีพบว่า วิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจงต่ออะซิโทรมัยซิน ไม่พบการรบกวนจากสารละลายตัวที่เกิดขึ้นจากสถานะต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดการสลายตัว

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการทดสอบ โดยศึกษาสารละลายมาตรฐานที่ 6 ระดับความเข้มข้นคิดเป็นช่วงของความเป็นเส้นตรงอยู่ระหว่าง 0.1–0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงตลอดช่วง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.9979

การทดสอบความแม่นยำของวิธี ทดสอบที่ 3 ความเข้มข้น คือ 30, 100 และ 140% ของค่าความเข้มข้นที่ทดสอบ พบว่าร้อยละของการคืนกลับของอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลของทุกความเข้มข้นที่ทดสอบอยู่ระหว่าง 99.02 ถึง 99.99 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 99.48 และ %RSD เท่ากับ 0.28 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ ร้อยละ 98.0–102.0 และค่า %RSD ไม่มากกว่า 2.0 สำหรับร้อยละของการคืนกลับของอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนของทุกความเข้มข้นที่ทดสอบอยู่ระหว่าง 97.48 ถึง 100.03 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 99.20 และ %RSD เท่ากับ 0.61 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ ร้อยละ 97.0–103.0 และค่า %RSD ไม่มากกว่า 2.0 แสดงถึงวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความแม่นยำ

การทดสอบความเที่ยงของวิธี ผลการทดสอบความทำซ้ำได้ ได้ค่า %RSD เท่ากับ 1.3 และ 1.1 สำหรับอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน ตามลำดับ เมื่อทดสอบโดยเปลี่ยนนักวิเคราะห์ เปลี่ยนวันวิเคราะห์ และเปลี่ยนเครื่องมือ ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 6 ซ้ำ ได้ %RSD รวมของผลการวิเคราะห์ เท่ากับ 1.4 และ 1.1 สำหรับอะซิโทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ ไม่มากกว่า 2.0 แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถทำซ้ำได้และมีความเที่ยง

การทดสอบความทนของวิธีทดสอบโดยเปลี่ยนแปลง HPLC column อัตราส่วนของสารละลายตัวพาความเป็นกรด-เบส (pH) ของสารละลายบัฟเฟอร์ในสารละลายตัวพา อุณหภูมิของคอลัมน์และอัตราการไหลของสารละลายตัวพา พบว่าการเปลี่ยนแปลงที่ได้ทำการทดสอบดังกล่าวไม่มีผลกระทบต่อระบบ ซึ่งพิจารณาจากประสิทธิภาพของการแยก (theoretical plates) Resolution ระหว่าง azithromycin และ azaerythromycin A และรูปร่างของพีค (tailing factor) และจากผลการวิเคราะห์อะซิโทรมัยซินในตัวอย่างในสถานะที่มีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ได้ผลการทดสอบที่มีค่า %RSD ไม่เกิน 2.0 เป็นการยืนยันว่าเมื่อสถานะของระบบโครมาโทกราฟีมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยจะไม่กระทบต่อผลวิเคราะห์ แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความทนต่อสถานะที่เปลี่ยนแปลง

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดเป็นเครื่องวัดระดับคุณภาพของผลการทดสอบ การแสดงค่าความไม่แน่นอนทำให้ค่าที่รายงานนั้นมีความครบถ้วนสมบูรณ์และน่าเชื่อถือ นอกจากนี้ยังเป็นการแสดงถึงความสามารถในการสอบกลับได้ของระบบการวัด สำนักยาและวัตถุเสพติดเป็นห้องปฏิบัติการที่ให้บริการการทดสอบ ต้องสามารถรายงานค่าความไม่แน่นอนของผลการทดสอบได้หากเป็นความต้องการของลูกค้า จากตัวอย่างการประเมินค่าความไม่แน่นอนของผลการทดสอบหาปริมาณอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน พบว่าได้ค่าความไม่แน่นอนขยาย 1.6% และ 1.5% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ปกติของการตรวจวิเคราะห์ยา

สรุป

วิธีวิเคราะห์อะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนได้อย่างถูกต้องแม่นยำและมีความจำเพาะเจาะจงต่อตัวยาสสำคัญ เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และสามารถวิเคราะห์ยาทั้งสองรูปแบบได้ในเวลาเดียวกัน วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ป็นวิธีมาตรฐานของสำนักยาและวัตถุเสพติดในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพยาตั้งกล่าวในโครงการสำรวจคุณภาพยาอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนที่มีจำหน่ายในประเทศไทย โดยการตรวจวิเคราะห์ในหัวข้อปริมาณตัวยาสสำคัญและการละลายของตัวยาสใช้วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีแล้ว ส่วนหัวข้อความแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ย ความเป็นกรด-เบส และปริมาณน้ำ ใช้วิธีและมาตรฐานตามตำรายาของประเทศสหรัฐอเมริกา (USP 35) ซึ่งจากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 23 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีคุณภาพเข้ามาตรฐานตามเกณฑ์ที่กำหนด

เอกสารอ้างอิง

1. คนวรรณ พจนาคม, จันคณา บุระโอสถ. เกสซ์เคมีของยาปฏิชีวนะกลุ่ม Macrolides. ว ไทยโภชนาการ [วารสารออนไลน์] 2547; [สืบค้น 9 พ.ย. 2556] 1(4): [8 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://oldweb.pharm.su.ac.th/thai/CE/datafiles/1-000-SPU-000-0410-01.pdf>.
2. อโนชา อุทัยพัฒน์. Macrolides. ใน : อโนชา อุทัยพัฒน์, นงลักษณ์ สุขวานิชย์ศิลป์, บรรณาธิการ. เกสซ์วิทยา เล่ม 2. กรุงเทพฯ : นิวไทยมิตรการพิมพ์; 2541. หน้า 114-128.
3. Guidechem. Azithromycin chemical properties. [online]. 2013; [cited 2013 Jan 14]; [1 screen]. Available from: URL: <http://www.guidechem.com/products/83905-01-5.html>.
4. Answers corporation. Solubility of azithromycin. [online]. 2013; [cited 2013 Jan 14]; [1 screen]. Available from: URL: http://www.wiki.answers.com/Q/solubility_of_azithromycin.
5. Azithromycin. In: Moffat AC, Oaaelton MD, Widdop B. Clarke's analysis of drugs and poisons. 3rd ed. London: Pharmaceutical Press; 2004. p. 663.
6. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ผลิตภัณฑ์ยา. [ออนไลน์]. [สืบค้น 22 ม.ค.2557] เข้าถึงได้จาก : URL: <http://fdaolap.fda.moph.go.th/logistics/drgdrug/DSerch.asp>.
7. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 35-NF 30). Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2012. p. 2283-2284, 2286-2287.
8. International Conference on Harmanization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Geneva: ICH Steering Committee; 2005.

9. จุไรรัตน์ รัควาทิน. แนวทางการทดสอบความคงสภาพของยาต่อแสง. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2539. หน้า 47.
 10. Sudheer M, Rao ABNN, Theja DHH, Prakash M, Ramalingam P, MohN AM. Development of stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of azithromycin and ambroxol HCl (SR) in the tablet formulation. *Der Pharmacia Lettre* 2012; 4(3): 803-10.
 11. สุวรรณ จารุสุข และคณะ. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2550. หน้า 22-31.
 12. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549. หน้า 77-86.
 13. Kanfer I, Skinner MF, Walker RB. Analysis of macrolide antibiotics. *J Chromatogr A* 1998; 812 (1-2): 255-86.
-

Development and Validation Method for Determination of Azithromycin Capsules and Azithromycin for Oral Suspension

**Wipapan Saiyasombat Supanee Duangteraprecha Supawadee Surangkul
and Prasit Opas**

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

ABSTRACT The development and validation of reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method for the determination of azithromycin capsules and azithromycin for oral suspension was established. The separation was achieved on a XTerra C18, 5- μ m, 4.6- \times 150-mm column, at 50 degree Celsius. The mobile phase was the mixture of acetonitrile, methanol and dibasic potassium phosphate with sodium 1-octanesulfonate pH 8.20 (21:40:39, v/v) at the flow rate of 1.5 ml per minute, setting the detection at 210 nm. Specificity test indicated that azithromycin peak was not interfered by its degradation product peaks from any stress conditions : heat, light, acid/base hydrolysis and oxidation. The described method was linear over the range of 0.1-0.6 mg per ml for azithromycin with correlation coefficient, r, 0.9979. The percentage mean recovery of azithromycin capsules and azithromycin for oral suspension were 99.48 (%RSD = 0.28) and 99.20 (%RSD = 0.61), respectively. The repeatability of azithromycin capsules and azithromycin for oral suspension were performed with %RSD 1.3 and 1.1, respectively. The intermediate precision data (%RSD) obtained among different days, analysts and HPLC instruments of azithromycin capsules and azithromycin for oral suspension were 1.4 and 1.1 respectively. The results showed that this method was robust when HPLC conditions such as the HPLC column, the pH of buffer solution, the ratio of mobile phase, the column temperature and even the flow rate, were changed. The proposed analytical method presented here revealed that it was suitable for the determination of azithromycin capsules and azithromycin for oral suspension. This validated method was further used to analyze azithromycin capsules and azithromycin for oral suspension; it was found that all of the samples complied with the specifications.

Key words : azithromycin capsules, azithromycin for oral suspension, HPLC, method validation