
การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณเดกซาเมทาโซน และเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณ โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง

จิราณัฐ แจ่มทวีกุล สุเมธ เทียงธรรม วลัยลักษณ์ เมธากัทร และจิตรา ชัยวัฒน์

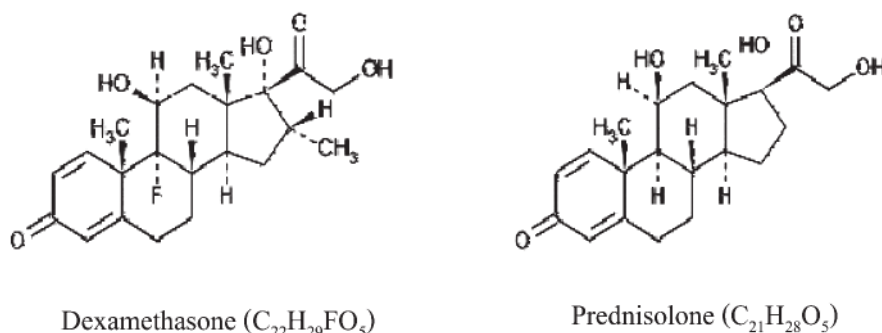
สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ วิธีวิเคราะห์หาปริมาณเดกซาเมทาโซน (Dexamethasone) และเพรดนิโซโลน (Prednisolone) ที่ปนปลอมในยาแผนโบราณถูกพัฒนาขึ้นโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ใช้คอลัมน์ Hypersil BDS RP-8 มีส่วนผสมของ acetonitrile และน้ำเป็นสารละลายตัวพา และเตรียมตัวอย่างโดยเทคนิคการสกัดแยกสารด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid Phase Extraction, SPE) จากการทดสอบความถูกต้องของวิธี พบว่ามีช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงที่ 250-12,500 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน เท่ากับ 0.9987 และ 0.9988 ตามลำดับ ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีโดยการเติมสารละลายเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในตัวอย่างที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 500, 6,000 และ 12,000 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าค่าร้อยละการคืนกลับของสารมาตรฐาน อยู่ในช่วง 100.30-104.53 และ 100.02-102.18 ตามลำดับ และร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเที่ยง อยู่ในช่วง 0.04-2.01 และ 0.15-2.47 ตามลำดับ ปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ปริมาณได้ของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน มีค่าเท่ากับ 250.14 และ 249.30 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จึงกล่าวได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ในการเฝ้าระวังการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทนำ

เดกซาเมทาโซน (Dexamethasone) มีชื่อทางเคมีว่า 9-Fluoro-11 β , 17, 21-trihydroxy-16 α -methylpregna-1, 4-diene-3, 20-dione สูตรโมเลกุล $C_{22}H_{29}FO_5$ น้ำหนักโมเลกุล 392.47 มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น ไม่ละลายน้ำ และเพรดนิโซโลน (Prednisolone) มีชื่อทางเคมีว่า 11 β , 17, 21-Trihydroxypregna-1, 4-diene-3, 20-dione สูตรโมเลกุล $C_{21}H_{28}O_5$ น้ำหนักโมเลกุล 360.45 มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ละลายน้ำได้เล็กน้อย (รูปที่ 1)^(1, 2, 3)

เดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนจัดเป็นยาในกลุ่มคอร์ติโคสเตียรอยด์ (corticosteroid)⁽⁴⁾ ซึ่งเป็นยาควบคุมพิเศษ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ยาควบคุมพิเศษ ฉบับลงวันที่ 26 พฤษภาคม 2521⁽⁵⁾ ในทางการแพทย์ใช้เป็นยาด้านอักเสบและแก้แพ้ ใช้รักษาอาการแพ้ชนิดรุนแรงหรือเรื้อรัง เช่น หอบหืด แพ้ยา โรคภูมิแพ้ทางผิวหนัง หรือกลุ่มโรคอโตอิมมูน เช่น อัมพาตอักเสบจากหางูม โรคไตรั่ว (nephrotic) เอสแอลอี (Systemic Lupus Erythematosus, SLE) เป็นต้น ผู้ที่ใช้ยานี้ต้องอยู่ในความดูแลของแพทย์อย่างใกล้ชิด เพราะหากได้รับติดต่อกันเป็นระยะเวลานานอาจทำให้เกิดอาการบวม น้ำ กระเพาะอาหารทะลุ กระดูกพรุน ภูมิคุ้มกันร่างกายต่ำทำให้ติดเชื้อได้ง่าย อาจเกิดโรคแทรกซ้อนที่เป็นอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ ยากลุ่มคอร์ติโคสเตียรอยด์มีผลต่อร่างกายเกือบทุกระบบ ต้องระมัดระวังในการใช้ยานี้ในผู้ป่วยโรคความดันโลหิต โรคหัวใจ และโรคเบาหวาน⁽⁶⁾ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน

ในปีงบประมาณ 2553 สำนักยาและวัตถุเสพติดได้ทำการตรวจวิเคราะห์การปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในผลิตภัณฑ์ยาแผนโบราณ ด้วยเทคนิคกระดาษกรอง (Thin-layer Chromatography) จำนวน 302 ตัวอย่าง ตัวอย่างส่วนใหญ่ส่งตรวจโดยผู้บริโภครและสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ผลการตรวจพบว่าการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน จำนวน 53 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 17.5⁽⁷⁾ โดยพบการปนปลอมในตัวอย่างทั้งในรูปแบบยาลูกกลอน ยาเม็ดรูปทรงกระบอก ยาผง และยาแคปซูล ตัวอย่างที่พบการปนปลอมของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนมักมีข้อความแสดงสรรพคุณแก้ปวดเมื่อย ปวดตามข้อ แก้อัมพฤกษ์ อัมพาต ฯลฯ ไม่มีเลขทะเบียนตำรับยา ไม่ทราบแหล่งผลิตที่แน่ชัด และพบว่าผู้บริโภคส่วนใหญ่มักเป็นกลุ่มผู้สูงอายุ ผู้มีโรคประจำตัว เช่น หอบหืด หรือผู้ที่ทำงานหนัก ทำให้มีอาการปวดเมื่อย จึงเป็นผู้ที่มีความเสี่ยงสูงที่จะได้รับยาแผนโบราณที่ไม่ปลอดภัย แม้หน่วยงานคุ้มครองผู้บริโภคด้านสาธารณสุขจะได้ดำเนินการณรงค์เพื่อป้องกันและแก้ไขปัญหาดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง แต่ยังคงตรวจพบการปนปลอมในจำนวนใกล้เคียงกับที่เคยตรวจพบในปีที่ผ่านมา ซึ่งอาจเป็นผลมาจากกระแสนิยมการใช้สมุนไพรเพื่อรักษาโรค โดยมีความเชื่อมั่นในสรรพคุณและมั่นใจว่าไม่มีอันตรายหรือมีพิษน้อยกว่ายาแผนปัจจุบัน แต่กลับมีผู้ฉวยโอกาสปนปลอมตัวยาดังกล่าวในผลิตภัณฑ์ยาแผนโบราณเพื่อหวังผลทาง

การค้า และยังพบการปนปลอมสารดังกล่าวในยาแผนโบราณและยาที่มาจากสมุนไพรในต่างประเทศ เช่น สิงคโปร์ มาเลเซีย สหรัฐอเมริกา^(8, 9) การที่จะทำให้ประชาชนตระหนักถึงพิษภัยและมีความรู้ความเข้าใจในการเลือกซื้อผลิตภัณฑ์ ยาแผนโบราณให้มากขึ้น จึงจะต้องรู้ถึงปริมาณการปนปลอมยาแผนปัจจุบันดังกล่าวในผลิตภัณฑ์ยาแผนโบราณ เพื่อประโยชน์ต่อตัวผู้บริโภคและแพทย์ผู้รักษาผู้ป่วยที่ได้รับยาแผนโบราณที่มีการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและ เพรดนิโซโลน โดยก่อนหน้านี้มีการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจเอกลักษณ์และหาปริมาณสารสเตียรอยด์ที่ปนปลอมในยา ที่มาจากสมุนไพร^(10, 11, 12) อาหารสัตว์⁽¹³⁾ ปัสสาวะ⁽¹⁴⁾ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูงที่ใช้ ตัวตรวจวัดเป็นยูวี^(10, 11, 12) หรือแมสสเปกโตรมิเตอร์⁽¹⁴⁾ นอกจากนี้ยังมีวิธีมาตรฐานในการหาปริมาณเดกซาเมทาโซนที่ ระบุในตำราฟาร์มาโคเปียของสหรัฐอเมริกาที่ใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง และใช้สารละลาย ตัวพาแบบ isocratic ที่มีส่วนผสมระหว่าง acetonitrile และน้ำ⁽¹⁾ แต่เนื่องจากในปัจจุบันสำนักยาและวัตถุเสพติด มีวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจเอกลักษณ์เดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณหรือยาที่มาจากสมุนไพร ด้วยเทคนิคแรงขับเคลื่อนบางเท่านั้น อีกทั้งวิธีการดังกล่าวมีขั้นตอนการสกัดที่ยุ่งยาก ต้องใช้คลอโรฟอร์มซึ่งเป็นตัวทำละลาย อินทรีย์ที่มีความเป็นพิษ⁽¹⁵⁾ และยังไม่มียวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน ในยาแผนโบราณหรือยาที่มาจากสมุนไพรซึ่งมีความหลากหลายขององค์ประกอบทางเคมี จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องแยก สิ่งรบกวนการตรวจวัดปริมาณเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนออก ลดขั้นตอนการสกัด เพิ่มประสิทธิภาพการแยก และใช้วิธีที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน ดังนั้นจึงได้ศึกษาและพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณการปนปลอมสเตียรอยด์ดังกล่าวในยา แผนโบราณด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูงที่มีตัวตรวจวัดเป็นยูวี ซึ่งวิธีนี้นิยมใช้ในการตรวจ เเชิงปริมาณ เนื่องจากให้ผลรวดเร็ว ไม่ยุ่งยาก ถูกต้องและแม่นยำ

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐานเดกซาเมทาโซนของสำนักยาและวัตถุเสพติด ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.20 รุ่นผลิต 652008, สารมาตรฐานเพรดนิโซโลนของตำราฟาร์มาโคเปียสหรัฐอเมริกา ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.40 รุ่นผลิต N1J277, Methanol HPLC grade ผลิตภัณฑ์ของ Mallinckrodt ประเทศสหรัฐอเมริกา, Acetonitrile HPLC grade ผลิตภัณฑ์ ของ Mallinckrodt ประเทศสหรัฐอเมริกา, น้ำความบริสุทธิ์สูง (Type I water) ผลิตจากเครื่องของ Millipore ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง ผลิตภัณฑ์ของ Waters Millipore Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา รุ่น 2695-2996, คอลัมน์ Hypersil BDS C8 ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร บรรจุอนุภาค ขนาด 5 ไมโครเมตร ผลิตภัณฑ์ของ Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา, การ์ดคอลัมน์ Phenomenex C8 ขนาด 3.0×4.0 มิลลิเมตร ผลิตภัณฑ์ของ Phenomenex Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา, ตัวดูดซับ Chromobond[®] Cartridge รุ่น HRX เป็น hydrophobic polystyrene-divinylbenzene ขนาดความจุ 200 มิลลิกรัม ผลิตภัณฑ์ ของ MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี, เครื่องผสมสารละลาย ผลิตภัณฑ์ของ Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา รุ่น 232, เครื่องหมุนเหวี่ยง ผลิตภัณฑ์ของ Precision Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา, เครื่องเขย่าความถี่สูง ผลิตภัณฑ์ของ Elma ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี รุ่น Elmasonic S100H, เครื่องชั่ง ผลิตภัณฑ์ของ Mettler Toledo ประเทศสหรัฐอเมริกา รุ่น AT261, แผ่นเมมเบรน สำหรับกรองชนิดไนลอน ผลิตภัณฑ์ของ Vertical Chromatography Co., Ltd. ประเทศไทย ขนาด 0.45 ไมครอน เส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร

ตัวอย่าง

ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่ได้จากผลิตภัณฑ์ยาแผนโบราณรูปแบบลูกกลอนและรูปแบบผงที่ได้จากการส่งตัวอย่างมาทดสอบกับทางสำนักยาและวัตถุเสพติด ซึ่งได้ตรวจสอบด้วยเทคนิคแรงคเลขวางแล้วว่ามีพบการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน โดยบตรวมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำมาอบที่ 55-60 องศาเซลเซียสจนแห้งและบดซ้ำอีกครั้ง บรรจุในภาชนะปิดสนิทป้องกันแสงและความชื้น

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ซึ่งผงตัวอย่าง 14 กรัม ละลายใน 25% v/v methanol จำนวน 200 มิลลิลิตร ปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐาน Dexamethasone Stock Solution (DSS) และ Prednisolone Stock Solution (PSS) แยกเตรียมสารละลายมาตรฐานเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนใน 25% v/v methanol ให้แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐานผสม (Mixed Standard Solution, MSS) ปิเปิดสารละลายมาตรฐาน DSS และ PSS อย่างละ 20.0 มิลลิลิตร ลงในขวดปริมาตรขนาด 50.0 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย 25% v/v methanol

สารละลายมาตรฐานสำหรับกราฟมาตรฐาน เตรียมสารละลายมาตรฐาน MSS ในสารละลายตัวอย่าง โดยปรับปริมาตรด้วย 25% v/v methanol นำมาสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งให้มีระดับความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 250, 1,250, 2,500, 5,000, 7,500, 10,000 และ 12,500 ไมโครกรัมต่อลิตร

การเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid Phase Extraction, SPE)

ซึ่งผงตัวอย่างน้ำหนัก 0.35 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด เติม 25% v/v methanol จำนวน 10.0 มิลลิลิตร นำไปผสมด้วยเครื่องผสมสารละลายอย่างน้อย 1 นาที นำไปเขย่าสารด้วยความถี่สูงต่อเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงประมาณ 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

เตรียมความพร้อมของตัวดูดซับที่บรรจุใน cartridge ด้วย methanol และน้ำ อย่างละ 3 มิลลิลิตร

ปิเปิดสารละลายใสที่ได้หลังจากการปั่นแยกตะกอนแล้ว จำนวน 3 มิลลิลิตร ใส่ลงใน cartridge จากนั้นใส่ 5% v/v methanol จำนวน 3 มิลลิลิตร ลงใน cartridge เพื่อขจัดสารที่ไม่จับกับตัวดูดซับออก และชะสารเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนออกมาด้วย methanol จำนวน 6 มิลลิลิตร

การพัฒนาวิธี

การศึกษาการแยกเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง

ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน สารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานโดยใช้สารละลายตัวพาที่มีส่วนผสมของ acetonitrile และน้ำ ในอัตราส่วน 40:60, 30:70 และใช้สารละลายตัวพาแบบ gradient program (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 สารละลายตัวพาแบบ Gradient program

เวลา (นาที)	อัตราการไหล (มิลลิลิตร/นาที)	Acetonitrile (%)	น้ำ (%)
0.0	1.0	28	72
3.0	1.2	22	78
5.0	0.8	25	75
12.0	0.8	30	70
14.0	1.5	28	72
15.0	1.5	28	72
16.0	1.0	28	72

การศึกษาการดูดซับของตัวกรอง

ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมผ่านและไม่ผ่านแผ่นเมมเบรนสำหรับกรองชนิดไนลอน ขนาด 0.45 ไมครอน เส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร และคำนวณร้อยละของการดูดซับสารของตัวกรอง โดยต้องไม่มากกว่าร้อยละ 5⁽¹⁶⁾

การตรวจวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้จาก SPE จำนวน 2.0 มิลลิลิตร และน้ำ จำนวน 2.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปกรองผ่านเมมเบรนชนิดไนลอน ขนาด 0.45 ไมครอนเมตร ใส่ขวดสำหรับวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง HPLC โดยมีสภาวะของเครื่องดังต่อไปนี้

- คอลัมน์ : Hypersil BDS C 8, 5 ไมครอนเมตร ขนาด 4.6 × 150 มิลลิเมตร
- การ์ดคอลัมน์ : C8 ขนาด 4.0 × 3.0 มิลลิเมตร
- อุณหภูมิคอลัมน์ : 30 °C
- สารละลายตัวพา : Gradient program (ตารางที่ 1)
- อัตราการไหล : 0.8–1.5 มิลลิลิตรต่อนาที
- เครื่องตรวจวัด : Diode array detector, ความยาวคลื่นที่ 190–400 นาโนเมตร
- ปริมาตรที่ฉีด : 80 ไมโครลิตร

ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง อย่างละ 80 ไมโครลิตร จำนวน 3 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีคและหาปริมาณของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในหน่วยไมโครกรัมต่อลิตร จากสมการเส้นตรง

$$Y = AX + B \quad \dots\dots\dots(1)$$

Y คือ พื้นที่ใต้พีค

A คือ ความชันของเส้นกราฟ

X คือ ความเข้มข้นของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน (ไมโครกรัมต่อลิตร)

B คือ จุดตัดแกน Y

จากสมการ (1) จะได้ความเข้มข้นของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน (ไมโครกรัมต่อลิตร) ซึ่งเมื่อนำไปแทนค่าในสมการ (2) จะได้ปริมาณเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่อยู่ในตัวอย่างทั้งหมด (m)

$$m = X \times \text{Dilution factor} \times 10^{-3} \quad \dots\dots\dots(2)$$

$$M = m/W \quad \dots\dots\dots(3)$$

Dilution factor เท่ากับ $10 \times 6/3 \times 4/2 = 40$

m คือ ไมโครกรัมของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน ในตัวอย่าง

M คือ ปริมาณเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน ในหน่วยไมโครกรัมต่อกรัม

W คือ ปริมาณตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ (กรัม)

การทดสอบความถูกต้องของวิธี (Method Validation)^(17, 18, 19)

การทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ (Chromatographic system suitability)

ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมที่ระดับความเข้มข้น 6,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ซ้ำ 5 ครั้ง เข้าเครื่อง HPLC คำนวณร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ต้องไม่มากกว่า 2.0, tailing factor ของพีคเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนต้องไม่มากกว่า 2.0 และ resolution ระหว่างพีคเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนต้องไม่น้อยกว่า 2

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

โดยการฉีดตัวทำละลาย สารละลายมาตรฐานผสม สารละลายตัวอย่างที่ไม่มีการปนปลอมของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนจำนวน 5 ตัวอย่าง เข้าเครื่อง HPLC จากโครมาโทแกรมต้องไม่มีการรบกวนของสารอื่นๆ ต่อพีคของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่เติมในสารละลายตัวอย่างและผ่านการสกัดด้วย SPE ที่ระดับความเข้มข้น 250, 1,250, 2,500, 5,000, 7,500, 10,000 และ 12,500 ไมโครกรัมต่อลิตร แต่ละระดับความเข้มข้นฉีดซ้ำ 3 ครั้ง เข้าเครื่อง HPLC นำค่าเฉลี่ยแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐานหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ซึ่งค่าที่ได้ควรมีค่าใกล้เคียง 1

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ชั่งผงตัวอย่างน้ำหนัก 0.35 กรัม เติมสารละลายมาตรฐานผสมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ระดับความเข้มข้น 500, 6,000 และ 12,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC คำนวณร้อยละการคืนกลับ (% Recovery) ที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 6,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ต้องมีร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 80-110 และที่ระดับความเข้มข้น 12,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ต้องมีร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 90-107^(18, 19)

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

ความทำซ้ำได้ (Repeatability)

เตรียมตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานผสมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ระดับความเข้มข้น 500, 6,000 และ 12,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยคำนวณค่าร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ซึ่งจะคิดเป็นช่วงที่ระดับความเข้มข้น 500, 6,000 และ 12,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ต้องมีร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่มากกว่า 10.5, 7.4 และ 5.2 ตามลำดับ^(18, 19)

Intermediate precision

ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานผสมเตตราไฮโดรแคนนาบินอยด์และเพอร์นิโซลินที่ระดับความเข้มข้น 500, 6,000 และ 12,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ 3 วัน นำไปคำนวณทางสถิติโดยวิธี Analysis of variance (ANOVA) เพื่อพิจารณาความแตกต่างของผลวิเคราะห์ระหว่างวัน

การทดสอบความทน (Ruggedness)

ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีการปนปลอมเตตราไฮโดรแคนนาบินอยด์และเพอร์นิโซลิน จำนวน 8 ซ้ำ โดยนักวิเคราะห์ 2 คน แล้วนำไปคำนวณทางสถิติโดยวิธี t-test เพื่อพิจารณาความแตกต่างของผลวิเคราะห์ของนักวิเคราะห์ 2 คน

การตัดสินความแตกต่างของผลวิเคราะห์ให้พิจารณาจากค่า p-value ถ้าค่า p-value มากกว่า 0.05 ถือว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับ 6,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ด้วยคอลัมน์ 2 รุ่นการผลิต แล้วนำไปคำนวณร้อยละความแตกต่างสัมพัทธ์ (Relative Percent Difference, RPD) เพื่อพิจารณาความแตกต่างของผลวิเคราะห์ของคอลัมน์ทั้งสองรุ่นการผลิต

การตัดสินความแตกต่างของผลวิเคราะห์ให้พิจารณาจากร้อยละความแตกต่างสัมพัทธ์ ต้องมีค่าไม่มากกว่า 3.0

การทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit Of Detection, LOD)

ฉีดสารละลายตัวอย่างผสมเตตราไฮโดรแคนนาบินอยด์และเพอร์นิโซลินที่ระดับความเข้มข้นที่ให้ขนาดสัญญาณเป็น 3 เท่าของขนาดสัญญาณรบกวน ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบได้

การทดสอบหาขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (Limit Of Quantitation, LOQ)

ฉีดสารละลายตัวอย่างผสมเตตราไฮโดรแคนนาบินอยด์และเพอร์นิโซลินที่ระดับความเข้มข้นที่ให้ขนาดสัญญาณเป็น 10 เท่าของขนาดสัญญาณรบกวน และนำค่าประมาณการของปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้มาเตรียมสารละลายที่ความเข้มข้นดังกล่าว และฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยคำนวณร้อยละของการคืนกลับ (% Recovery) ต้องอยู่ในช่วงยอมรับได้คือร้อยละ 80-110 และค่าร้อยละการเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ต้องไม่เกินร้อยละ 10.5^(18, 19)

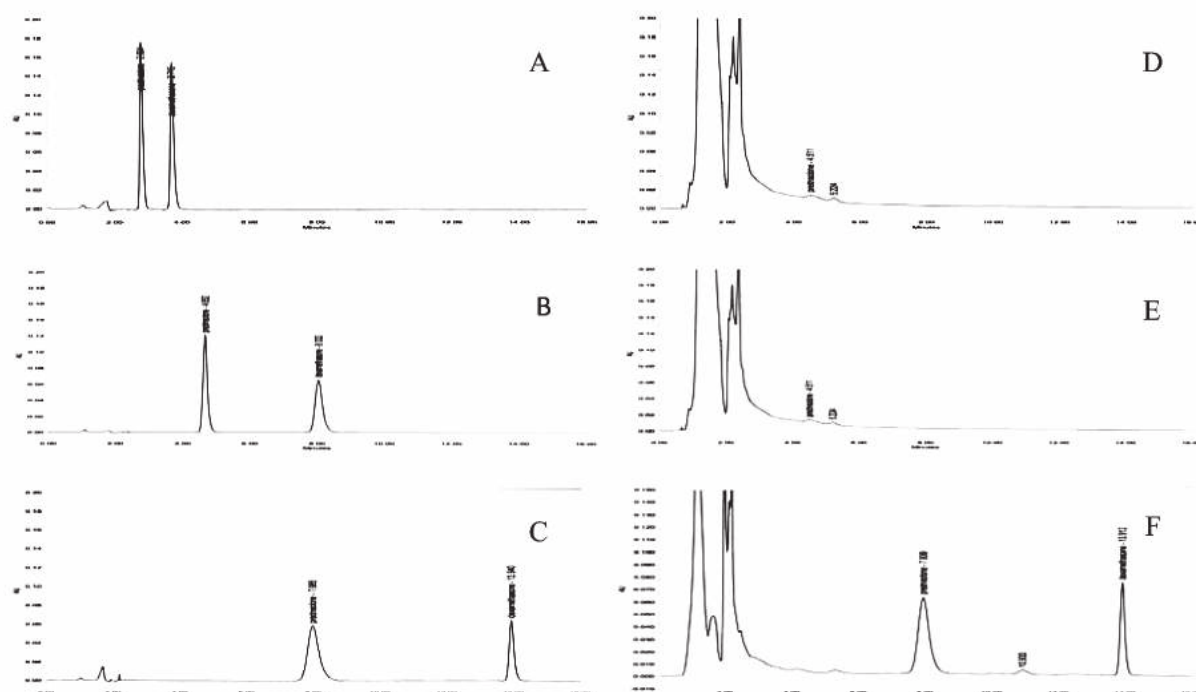
การตรวจปริมาณการปนปลอมเตตราไฮโดรแคนนาบินอยด์และเพอร์นิโซลินในยาแผนโบราณด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

นำตัวอย่างยาแผนโบราณชนิดยาเม็ด ยามผง และยาน้ำ ที่ส่งตรวจที่สำนักงานและวัตถุประสงค์ จำนวน 15 ตัวอย่าง เพื่อหาวิเคราะห์หาปริมาณการปนปลอมเตตราไฮโดรแคนนาบินอยด์และเพอร์นิโซลินในตัวยาดังกล่าวด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

ผล

การศึกษาการแยกเตตราไฮโดรแคนนาบินอยด์และเพอร์นิโซลินด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง

ผลการแยกเตตราไฮโดรแคนนาบินอยด์และเพอร์นิโซลินด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง โดยการใช้สารละลายตัวพาแบบ gradient program ตาม (ตารางที่ 1) สามารถแยกพีคเตตราไฮโดรแคนนาบินอยด์และเพอร์นิโซลินออกจากพีคบริเวณอื่นๆ ได้ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่ไม่พบการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน

(A), (B) และ (C) สารละลายมาตรฐานผสมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในสารละลายตัวพาสสมระหว่าง acetonitrile และน้ำ อัตราส่วน 40:60, 30:70 และแบบ gradient program ตามลำดับ

(D) และ (E) สารละลายตัวอย่างที่ไม่พบการปนปลอมของสารสเดียรอยดในสารละลายตัวพาสสมระหว่าง acetonitrile และน้ำ อัตราส่วน 40:60 และ 30:70 ตามลำดับ

(F) สารละลายตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในสารละลายตัวพาสแบบ gradient

การศึกษาการดูดซับของตัวกรอง

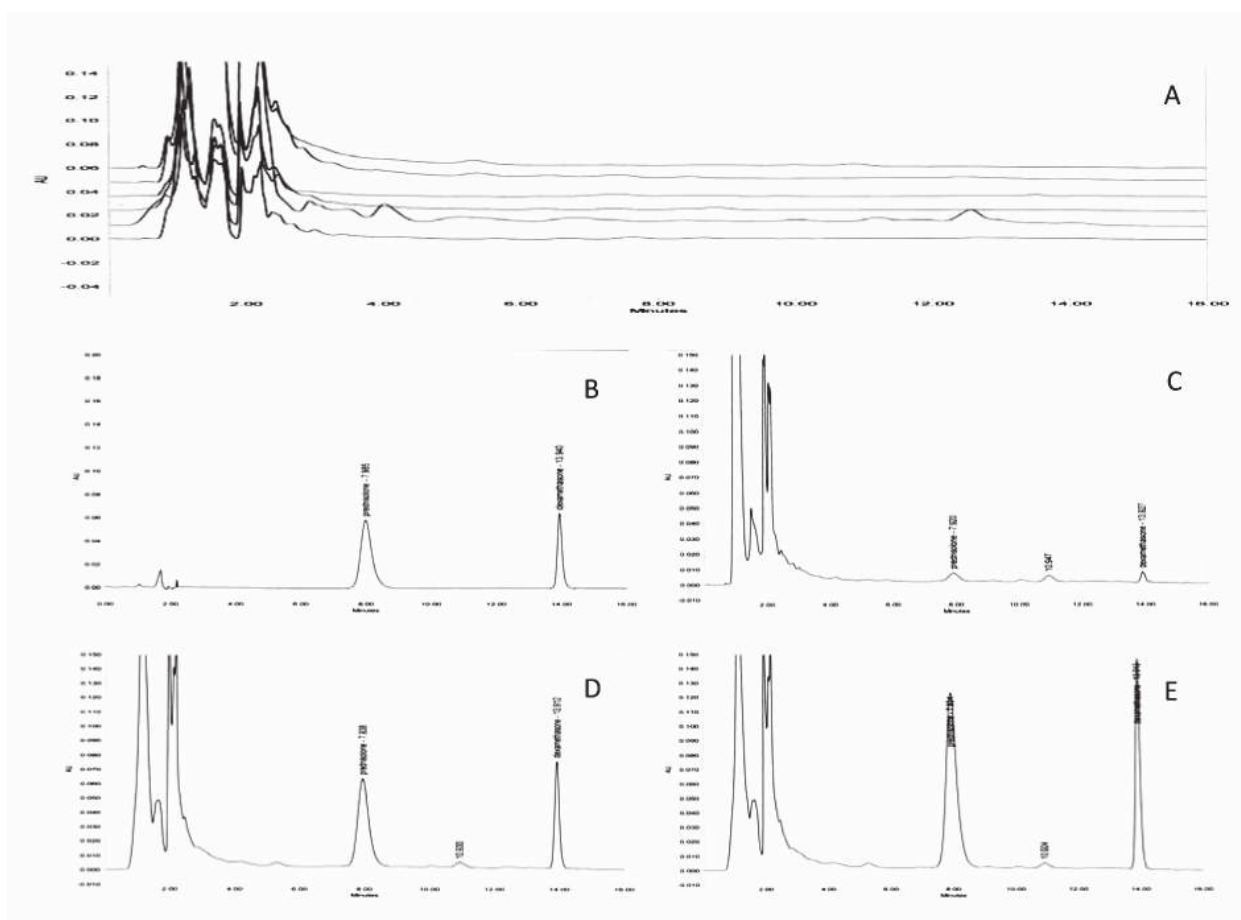
จากการฉีดสารละลายมาตรฐานที่ผ่านเมมเบรน พบว่าพื้นที่ใต้พีคของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนลดลงคิดเป็นร้อยละ 0.39 และ 0.30 ตามลำดับ

การทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟ

จากการฉีดสารละลายมาตรฐานผสมพบพีคของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่เวลาประมาณ 13.8 นาที และ 7.8 นาที ตามลำดับ โดยมีค่า tailing factor ของยาทั้งสองตัวเท่ากับ 1.0 และค่าร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการฉีดสารละลายมาตรฐานผสมที่ระดับความเข้มข้น 6,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ซ้ำ 5 ครั้ง เท่ากับ 0.1 และ 0.3 ตามลำดับ และมีค่า resolution ระหว่างพีคเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน เท่ากับ 13.2 ซึ่งแสดงถึงความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟในการตรวจวิเคราะห์ต่อไปได้

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง

จากการฉีดสารละลายตัวอย่างที่ไม่มีการปนปลอมของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน สารละลายมาตรฐานผสม สารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 500, 6,000 และ 12,000 ไมโครกรัมต่อลิตร เข้าเครื่อง HPLC ซึ่งไม่พบพีคของสารอื่นมารบกวนพีคของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน (ภาพที่ 3)

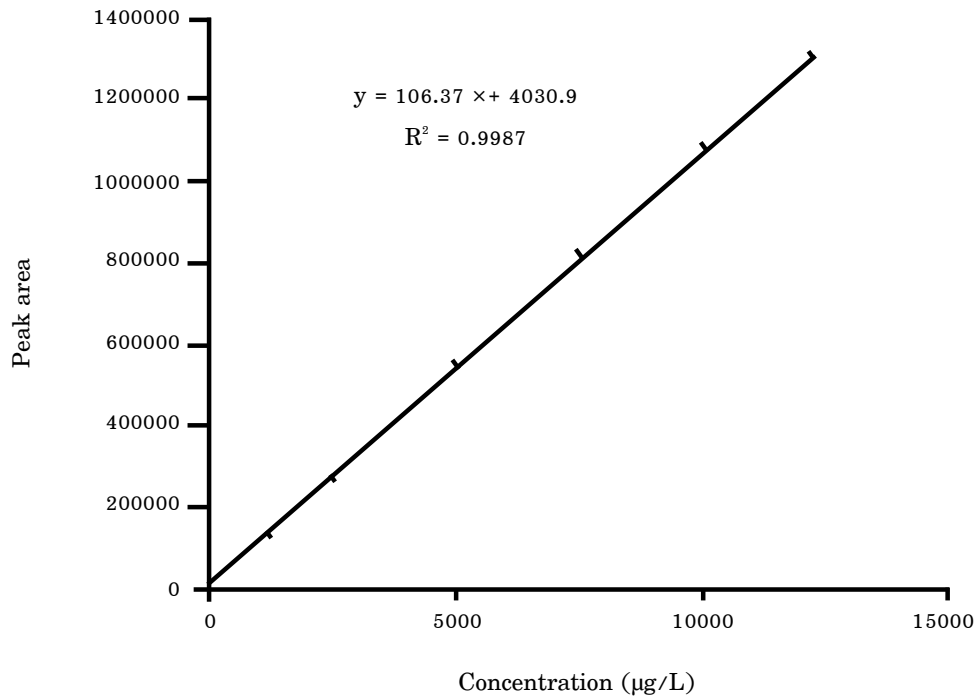


ภาพที่ 3 โครมาโตแกรมการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของสารละลาย

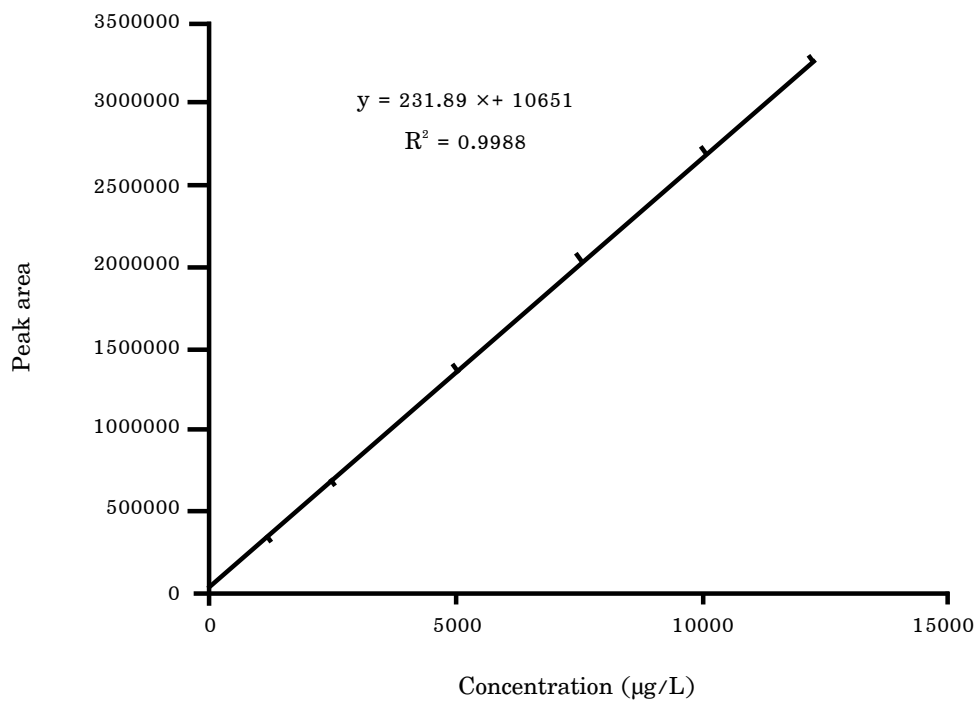
- (A) สารละลายตัวอย่างที่ไม่พบการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน 5 แหล่ง
- (B) สารละลายมาตรฐานเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน
- (C) สารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อลิตร หลังผ่าน SPE
- (D) สารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 6,000 ไมโครกรัมต่อลิตร หลังผ่าน SPE
- (E) สารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ความเข้มข้น 12,000 ไมโครกรัมต่อลิตร หลังผ่าน SPE

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

จากการฉีดสารละลายมาตรฐานผสม เดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่เติมลงในสารละลายตัวอย่าง ในช่วงความเข้มข้น 250.14–12,507.18 และ 249.30–12,464.76 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ได้กราฟเป็นเส้นตรง ตลอดช่วงความเข้มข้น โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.9987 และ 0.9988 ตามลำดับ (ภาพที่ 4 และ 5)



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเดกซาเมทาโซนและพื้นที่ใต้พีค



ภาพที่ 5 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเพรดนิโซโลนและพื้นที่ใต้พีค

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

โดยการเติมสารละลายมาตรฐานเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ 3 ระดับความเข้มข้น ได้ร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) ของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนอยู่ในช่วงร้อยละ 100.30-104.53 และ 100.02-102.18 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

ชนิดของ สารละลายมาตรฐาน ที่เติม	ปริมาณที่เติม (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ปริมาณที่พบ (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ยของปริมาณที่พบ (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ยของ ร้อยละ การคืนกลับ	ร้อยละ การเบี่ยงเบน มาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)
เดกซาเมทาโซน	500.29	512.54	522.97	104.53	2.01
	500.29	533.59			
	500.29	522.79			
	6,003.45	6,193.98	6,187.99	103.07	0.12
	6,003.45	6,179.54			
	6,003.45	6,190.45			
	12,006.90	12,044.35	12,042.60	100.30	0.04
	12,006.90	12,037.76			
	12,006.90	12,045.69			
เพรดนิโซโลน	498.59	511.52	498.70	100.02	2.47
	498.59	497.68			
	498.59	486.90			
	5,983.08	6,105.15	6,113.58	102.18	0.25
	5,983.08	6,104.71			
	5,983.08	6,130.88			
	11966.17	11,993.03	11,993.29	100.23	0.15
	11966.17	11,975.14			
	11966.17	12,011.71			

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

จากการฉีดสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่าวิธีนี้มีความสามารถทำซ้ำได้ โดยมีค่าร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) อยู่ในช่วง 0.04-2.01 และ 0.15-2.47 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

จากการทดสอบ Intermediate precision โดยการวิเคราะห์ซ้ำ 3 วัน วันละ 3 ซ้ำ ที่ 3 ระดับความเข้มข้น และนำไปทดสอบสถิติ Analysis of variance (ANOVA)⁽²⁰⁾ พบว่าผลการวิเคราะห์ทั้ง 3 วัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า p-value ของการวิเคราะห์เดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนอยู่ที่ 0.50 และ 0.10 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำในแต่ละวัน

วันที่	ระดับความเข้มข้นที่ศึกษา (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ปริมาณเฉลี่ยที่ตรวจพบ เดกซาเมทาโซน	(ไมโครกรัมต่อลิตร $\pm$ %RSD) เพรดนิโซโลน
1	500	522.97 $\pm$ 2.01	498.70 $\pm$ 2.47
	6,000	6187.99 $\pm$ 0.12	6113.58 $\pm$ 0.25
	12,000	12042.60 $\pm$ 0.04	11,993.29 $\pm$ 0.15
2	500	483.62 $\pm$ 1.77	538.52 $\pm$ 0.48
	6,000	6149.25 $\pm$ 0.04	6145.09 $\pm$ 0.08
	12,000	12007.12 $\pm$ 0.04	11983.14 $\pm$ 0.14
3	500	508.96 $\pm$ 0.43	532.29 $\pm$ 0.39
	6,000	6155.33 $\pm$ 0.26	6101.75 $\pm$ 0.23
	12,000	12099.32 $\pm$ 0.97	12016.24 $\pm$ 0.94
p-value (between day)		0.500.10	

การทดสอบความทน (Ruggedness)

นักวิเคราะห์ 2 คน วิเคราะห์ 8 ซ้ำ นำไปทดสอบสถิติ t-test พบว่าผลการวิเคราะห์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า p-value ของการวิเคราะห์เดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนอยู่ที่ 0.48 และ 0.94 ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

จากการเปลี่ยนคอลัมน์รุ่นผลิตภัณฑ์ 8447 และ 12341 พบว่าผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกัน โดยค่าร้อยละความแตกต่างสัมพัทธ์ (Relative Percent Difference, RPD) ของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนอยู่ที่ 0.32 และ 0.95 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความเที่ยงในการวิเคราะห์ซ้ำโดยการเปลี่ยนนักวิเคราะห์

นักวิเคราะห์ที่	ค่าเฉลี่ยของปริมาณเดกซาเมทาโซน (ไมโครกรัมต่อลิตร $\pm$ %RSD)	ค่าเฉลี่ยของปริมาณเพรดนิโซโลน (ไมโครกรัมต่อลิตร $\pm$ %RSD)
1	1847.72 $\pm$ 1.25	1,472.71 $\pm$ 4.92
2	1814.19 $\pm$ 7.05	1,475.48 $\pm$ 5.45
p-value (between analyst)		0.48
		0.94

การทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit Of Detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (Limit Of Quantitation, LOQ)

ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน มีค่าเท่ากับ 128.34 และ 124.95 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ปริมาณได้ของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน มีค่าเท่ากับ 250.14 และ 249.30 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ปริมาณได้ของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน มีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 90.66–95.60 และ 89.44–96.86 ตามลำดับ และค่าร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 2.21 และ 2.63 ตามลำดับ

การตรวจปริมาณการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

ผลการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในตัวอย่าง จำนวน 15 ตัวอย่าง พบการปนปลอมทั้งเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน จำนวน 2 ตัวอย่าง พบการปนปลอมเดกซาเมทาโซนอย่างเดียว จำนวน 7 ตัวอย่าง และไม่พบการปนปลอมสารดังกล่าว จำนวน 6 ตัวอย่าง โดยตรวจพบปริมาณการปนปลอมเดกซาเมทาโซนในช่วง 57.67–246.65 ส่วนในล้านส่วน และพบปริมาณการปนปลอมเพรดนิโซโลน 1967.78 ส่วนในล้านส่วน ส่วนอีก 1 ตัวอย่างตรวจพบเพรดนิโซโลน 22.04 ส่วนในล้านส่วน แต่มีปริมาณต่ำกว่าขีดจำกัดของการวัดปริมาณ

วิจารณ์

วิธีการตรวจเอกลักษณ์การปนปลอมของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณด้วยเทคนิครังคเลขฉิวบาง ซึ่งพัฒนาโดยสำนักยาและวัตถุเสพติด ไม่สามารถหาปริมาณการปนปลอมของตัวยาดังกล่าวได้ จึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณการปนปลอมของตัวยาดังกล่าวในยาแผนโบราณ ซึ่งดัดแปลงมาจากการหาปริมาณเดกซาเมทาโซนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูงในตำราฟาร์มาโคเปียของสหรัฐอเมริกา⁽¹⁾ โดยใช้สารละลายตัวพาแบบ isocratic ที่มีส่วนผสมของ acetonitrile และน้ำ โดยมีอัตราส่วน 1:2 และพบว่ามีการศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณของสเตียรอยด์ในยาแผนโบราณ^(10, 11) โดยใช้สารละลายตัวพาแบบ isocratic เช่นเดียวกับตำราฟาร์มาโคเปียของสหรัฐอเมริกา แต่มีส่วนผสมของ acetonitrile และน้ำ ในอัตราส่วน 30:70 โดยในวิธีการดังกล่าวสามารถแยกพีคสารละลายมาตรฐานผสมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนออกจากกันได้ แต่ไม่สามารถแยกสารรบกวนในสารละลายตัวอย่างออกจากพีคของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งจะมีผลต่อความถูกต้องของการวิเคราะห์หาปริมาณสารดังกล่าว (ภาพที่ 2) เนื่องจากยาแผนโบราณและยาที่มาจากสมุนไพรมีความหลากหลายขององค์ประกอบทางเคมี ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องใช้สารละลายตัวพาที่มีส่วนผสมของ acetonitrile และน้ำ แบบมีการเปลี่ยนองค์ประกอบของสารละลายตัวพาแบบ gradient program ตามตารางที่ 1 สามารถแยกพีคเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนได้อย่างมีประสิทธิภาพและไม่พบการรบกวนจากองค์ประกอบที่หลากหลายของสมุนไพรต่างๆ ในสูตรตำรับ

การเตรียมตัวอย่างโดยใช้เทคนิคการสกัดแยกด้วยตัวดูดซับของแข็งสามารถกำจัดสารรบกวนการตรวจวิเคราะห์บางส่วนออกไปได้ โดยตัวดูดซับของแข็งที่เลือกใช้เป็น hydrophobic polystyrene-divinylbenzene adsorbent resin มีคุณสมบัติเหมาะสมในการสกัดแยกด้วยยาสำคัญในตัวอย่างได้หลายรูปแบบ ทั้งจากยาเม็ด ยาครีม จากปัสสาวะ หรือเลือดได้^(21, 22) โดยในการสกัดแยกต้องเตรียมความพร้อมของตัวดูดซับที่บรรจุใน cartridge ด้วย methanol และน้ำก่อนเสมอ เพื่อให้ตัวดูดซับมีความเหมาะสมกับสารละลายที่นำมาสกัด และช่วยให้อนุภาคของสารที่สนใจสัมผัสกับตัวดูดซับให้ได้มากที่สุด โดยหลังจากผ่านสารละลายตัวอย่างลงในตัวดูดซับของแข็งและชะสารที่ไม่ต้องการออกด้วย 5%v/v methanol เนื่องจากเป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ต้องรอให้ตัวดูดซับแห้งก่อนแล้วจึงชะเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนออกด้วย methanol จำนวน 6 มิลลิลิตร ในส่วนของคอลัมน์ เลือกใช้คอลัมน์ชนิด reverse phase C8 พร้อมการ์ดคอลัมน์ reverse phase C8 เนื่องจากหาง่าย ราคาไม่แพง และมีสภาพไม่มีขั้ว เช่นเดียวกับ C18 แต่จำนวนคาร์บอนน้อยกว่า จึงทำให้พีคของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนถูกชะออกมาได้เร็วกว่าคอลัมน์ชนิด reverse phase C18

ในการศึกษานี้ได้เลือกตัวอย่างยาแผนโบราณสองรูปแบบ คือ ยาลูกกลอน และยาผง เป็นตัวแทนของยาแผนโบราณที่นำมาศึกษา เนื่องจากเป็นรูปแบบของยาแผนโบราณที่มีองค์ประกอบของสมุนไพรหลายชนิด อีกทั้งในขั้นตอนการทำให้เป็นเม็ดยาลูกกลอนต้องมีสารยึดเกาะ เช่น น้ำผึ้ง น้ำแป้ง สำหรับยาผงซึ่งส่วนใหญ่ คือยาหอม เป็นยาผงที่มีองค์ประกอบของสมุนไพรมากกว่า 40 ชนิด จึงครอบคลุมองค์ประกอบของสมุนไพรที่อาจมีผลต่อการตรวจวิเคราะห์ได้

ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นจึงมีความเป็นไปได้ในการที่จะนำไปประยุกต์ใช้ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณการปนปลอมของ เดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณรูปแบบอื่นๆ ได้ เช่น ยาแคปซูล ยาเม็ด ยาน้ำ และยาทวน

วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถหาปริมาณเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนที่ปนปลอมในยาแผนโบราณได้ อ้างอิง หลักการประเมินความถูกต้องตาม ICH Guideline⁽¹⁷⁾ โดยไม่พบว่ามี การรบกวนจากสารอื่นซึ่งแสดงถึงความจำเพาะของ วิธี เมื่อทดสอบความเป็นเส้นตรงด้วย standard addition ในช่วง 250–12,500 ไมโครกรัมต่อลิตร ได้ค่าสัมประสิทธิ์ ความสัมพันธ์ ใกล้เคียง 1 แสดงว่าวิธีนี้มีความเป็นเส้นตรงตลอดช่วงที่ทำการศึกษา ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี วิเคราะห์หาปริมาณเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 500, 6,000 และ 12,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่าเฉลี่ยร้อยละการคืนกลับของเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนอยู่ในช่วง 100.30–104.53 และ 100.02–102.18 ตามลำดับ และวิธีนี้มีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงทั้งนักวิเคราะห์ และรุ่นของคอลัมน์ได้

ทั้งนี้ เมื่อนำวิธีวิเคราะห์หาปริมาณที่พัฒนาขึ้นไปใช้ตรวจหาการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลน ในตัวอย่างยาแผนโบราณที่ส่งตรวจกับสำนักงานและวัตถุเสพติด จำนวน 15 ตัวอย่าง ให้ผลสอดคล้องกับวิธีการตรวจ เอกลักษณะด้วยเทคนิคครุฑเลขผิวบางที่ทางสำนักงานและวัตถุเสพติดใช้อยู่ โดยพบการปนปลอมทั้งเดกซาเมทาโซนและ เพรดนิโซโลน จำนวน 2 ตัวอย่าง ปนปลอมเดกซาเมทาโซนเพียงอย่างเดียว จำนวน 7 ตัวอย่าง และเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณ การปนปลอมสารดังกล่าวด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่าปริมาณการปนปลอมเดกซาเมทาโซนอยู่ในช่วง 57.67–246.65 ส่วน ในล้านส่วน และพบตัวอย่างยาแผนโบราณ 1 ตัวอย่าง ที่มีการปนปลอมเพรดนิโซโลนในปริมาณ 1967.78 ส่วนในล้าน ส่วน ส่วนอีกหนึ่งตัวอย่างพบการปนปลอมเพรดนิโซโลนแต่มีปริมาณต่ำกว่าขีดจำกัดของการวัดปริมาณ ดังนั้นวิธีการ ดังกล่าวที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจเอกลักษณ์และหาปริมาณการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนได้ในคราว เดียวกัน จึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการตรวจวิเคราะห์การปนปลอมสารดังกล่าวในยาแผนโบราณ และการ ศึกษาจะเป็นประโยชน์มากยิ่งขึ้นเมื่อศึกษาร่วมกับการสำรวจพฤติกรรมกรรมการบริโภคยาแผนโบราณของประชาชนเพื่อ สื่อสารความเสี่ยงและแจ้งเตือนภัยในการบริโภคยาแผนโบราณที่มีการปนปลอมเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนต่อไป

สรุป

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยาแผนโบราณที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่มีความ จำเพาะ ความเที่ยง และความแม่นยำสูง สามารถที่จะนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณเดกซาเมทาโซนและเพรดนิโซโลนในยา แผนโบราณในห้องปฏิบัติการได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการสื่อสารความเสี่ยงและแจ้งเตือนภัยจากการใช้ยาแผนโบราณ ที่มีการปนปลอมตัวยาแผนปัจจุบันดังกล่าวเพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มตรวจคุณภาพเภสัชภัณฑ์ทางเคมี-ฟิสิกส์ สำนักงานและวัตถุเสพติด ที่ช่วยจัดเตรียม อุปกรณ์ และตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักงานและวัตถุเสพติดที่ให้การสนับสนุน ทางด้านงบประมาณและข้อเสนอแนะ ทำให้การศึกษาครั้งนี้ลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. The United States Pharmacopeia–The National Formulary. 32nd ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention; 2009. p. 2083–7, 3368–70.
2. Dexamethasone. [online]. [cited 2012 Oct 6]; [8 screens]. Available from: URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Dexamethasone>

3. Prednisolone. [online]. [cited 2012 Oct 6]: [4 screens]. Available from: URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Prednisolone>
4. คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา. บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2551. พิมพ์ครั้งที่ 2. นนทบุรี: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข; 2552. หน้า 40.
5. กองควบคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. รวมกฎหมายด้านยา ออกตามความในพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 และฉบับแก้ไขเพิ่มเติม. นนทบุรี: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข; 2546. หน้า 223.
6. Reynolds JEF, editor. Martindale: the extra pharmacopoeia. 30th ed. London: The Pharmaceutical Press; 1993. p. 712-22.
7. สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานประจำปี 2553. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ; 2554.
8. Siri DNBC, Lai CS, Haris MRHM. Screening of adulterants in unregistered herbal products in Malaysia. *Der Pharma Chemica* 2013; 5(2): 278-85.
9. คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. อย่าให้สเตรอยด์ลายนวล (อีกต่อไป). ยาวีพากซ์. [วารสารออนไลน์]. 2555; [สืบค้น 2 ธ.ค. 2556]; 5(15): [32 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <http://www.thaidrugwatch.org/download/series/series15.pdf>
10. Ku YR, Wen KC, Ho LK, Chang YS. Solid-phase extraction and high performance liquid chromatographic determination of steroids adulterated in traditional Chinese medicines. *J Food Drug Anal* 1999; 7(2): 123-30.
11. Ku YR, Liu YC, Lin JH. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic analysis of prednisone adulterated in a foreign herbal medicine. *J Food Drug Anal* 2001; 9(3): 150-2.
12. Klinsunthorn N, Petsom A, Nhujak T. Determination of steroids adulterated in liquid herbal medicines using QuEChERS sample preparation and high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 2011; 55(5): 1175-8.
13. Gonzalo-Lumbreras R, Muñiz-Valencia R, Santos-Montes A, Izquierdo-Hornillos R. Liquid chromatographic method development for steroids determination (corticoids and anabolics): application to animal feed samples. *J Chromatogr A* 2007; 1156(1-2): 321-30.
14. Thevis M, Schänzer W, Geyer H, Thieme D, Grosse J, Rautenberg C, et al. Traditional Chinese medicine and sports drug testing: identification of natural steroid administration in doping control urine samples resulting from musk (pod) extracts. *Br J Sports Med* 2013; 47(2): 109-14.
15. ศูนย์ข้อมูลพิษวิทยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. คลอโรฟอร์ม. [ออนไลน์]. 2543; [สืบค้น 2 ธ.ค. 2556]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: http://webdb.dmso.moph.go.th/ifc_toxic/a_tx_1_001c.asp?info_id=78
16. Kiehm K, Dressman JB. Evaluation of drug adsorption to membrane filters under biowaiver test conditions. *Dissolution Technology* 2008 [cited 2011 Dec 11]; [5 screens]. Available from: URL: http://www.dissolutiontech.com/DTresour/200811Articles/DT200811_A02.pdf
17. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedure: text and methodology Q2(R1). Geneva, Switzerland: ICH Steering Committee; 2005.
18. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
19. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. 2002; [cited 2010 Feb 12]; [38 screens]. Available at: URL: http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf

20. ชูศรี วงศ์ตันะ. เทคนิคการใช้สถิติเพื่อการวิจัย. พิมพ์ครั้งที่ 8. กรุงเทพฯ: เทพเนรมิตการพิมพ์; 2544.
 21. New chromobond HR-X from macherey-nagel. 2008. [cited 2010 Jan 9]: [1 screen]. Available from: URL: http://www.labmate-online.com/news/chromatography/1/macherey-nagel_gmbh/new_chromabond_hr-x_from_macherey-nagel/1303/
 22. Thurman EM, Mills MS. Solid-phase extraction: principles and practice. New York: John Wiley & Sons; 1998. p. 45-81.
-

Method Development for Determination of Dexamethasone and Prednisolone in Traditional Drug by High-Performance Liquid Chromatography

**Jiranuch Jamtaweekul Sumate Thiangthum Waliluk Matapatara
and Chitra Chaiyawat**

Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, Thiwanond Road, Nonthaburi 11000

ABSTRACT The quantitative determination of the adulterated dexamethasone and prednisolone in traditional drug was developed by using high performance liquid chromatography (HPLC) with reversed phase C8 column (Hypersil BDS) and a mixture of acetonitrile and purified water as a mobile phase. The sample solution was cleaned up by solid phase extraction (SPE). The method validation data showed good linearity at the concentration range of 250–12,500 µg/L with the correlation coefficient of 0.9987 and 0.9988 for dexamethasone and prednisolone, respectively. Accuracy and precision were performed by adding 500, 6,000 and 12,000 µg/L of each of dexamethasone and prednisolone to sample matrix. The percentages of recovery were 100.30–104.53 and 100.02–102.18 for dexamethasone and prednisolone, respectively. The relative standard deviations of dexamethasone and prednisolone were 0.04–2.01 and 0.15–2.47, respectively. The limit of quantitation of dexamethasone and prednisolone are 250.14 and 249.30 µg/L, respectively. Therefore, the developed HPLC method is suitable for surveillance of the dexamethasone and prednisolone adulterants in traditional herbal medicines.

Key words: dexamethasone, prednisolone, traditional drug, solid phase extraction, high performance liquid chromatography