

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ยาเซโฟเพราโซนและซัลแบคแทมในรูปแบบยาฉีด ด้วยโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

ภณิดา รัตนานุกูล และประชากร ผลสิน

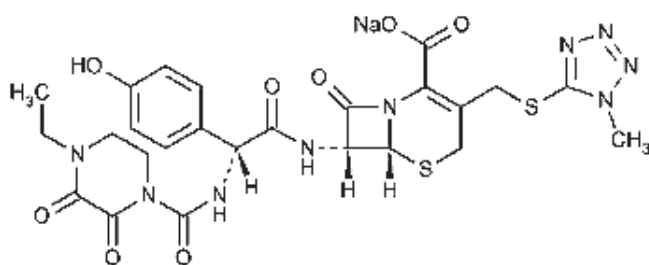
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 10 อุบลราชธานี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง อุบลราชธานี 34000

บทคัดย่อ วิธีวิเคราะห์เซโฟเพราโซนและซัลแบคแทมในรูปแบบยาฉีดพัฒนาขึ้นโดยวิธีรีเวอร์สเฟส โครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์ BDS Hypersil C18 สารละลายตัวพา คือ 0.005 M Tetrabutylammonium hydroxide pH 4.0 และ acetonitrile อัตราส่วน 72 : 28 อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีแสดงถึงความจำเพาะเจาะจง โดยสามารถแยกเซโฟเพราโซนและซัลแบคแทมออกจากสารละลายตัว กราฟมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของเซโฟเพราโซน 0.0720 ถึง 0.2160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และซัลแบคแทม 0.0750 ถึง 0.2250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9999 และ 1.0000 การทดสอบความแม่นยำของวิธีมีค่าร้อยละของการกลับคืนเฉลี่ยเท่ากับ 99.4 และ 100.4 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.9 และ 0.4 การทดสอบความทนซ้ำได้และความเที่ยงของการวิเคราะห์มีค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 0.0 ถึง 1.0 วิธีวิเคราะห์มีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ ของระบบโครมาโทกราฟีที่ทดสอบ ได้แก่ retention time, tailing factor และ theoretical plates ชีตจำกัดของการตรวจพบและชีตจำกัดของการหาเชิงปริมาณของเซโฟเพราโซนมีค่า 0.005 และ 0.014 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และซัลแบคแทม 0.0025 และ 0.0075 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีแสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสม ในการนำไปใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณเซโฟเพราโซนและซัลแบคแทมในรูปแบบยาฉีด

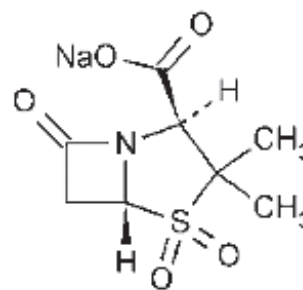
บทนำ

ยาสูตรผสมเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมในรูปแบบยาฉีด (Cefoperazone and Sulbactam for injection) เป็นยาสูตรผสมระหว่าง เซฟเพอราโซน ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่มเซฟาโรสปอริน (cephalosporins) รุ่นที่สาม (third-generation) ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยมีกลไกการออกฤทธิ์คล้ายยา กลุ่มเพนิซิลลิน (penicillins) คือสามารถยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียในขั้นตอน traspeptidation ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายในการสร้างผนังเซลล์ ทำให้เชื้อแบคทีเรียมีผนังเซลล์ที่ผิดปกติ ซึ่งไม่สามารถทนต่อแรงดันออสโมซิส เซลล์จะแตกสลายและแบคทีเรียตายในที่สุด เซฟเพอราโซนใช้สำหรับรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococci* sp. และ *Streptococci* sp. และแกรมลบหลายชนิด เช่น *Pseudomonas aeruginosa*⁽¹⁾ ส่วนซัลแบคแทม เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์บีต้า-แลคแทมเมส (β -lactamase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถทำลายยาปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นสาเหตุให้แบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด

เซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมที่นำมาเตรียมเป็นยาฉีดในรูปแบบผงยาผสมน้ำก่อนใช้นั้นเป็นเกลือโซเดียมที่ละลายน้ำได้ดี มีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังภาพที่ 1 และ 2⁽²⁾



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีเซฟเพอราโซน โซเดียม



ภาพที่ 2 สูตรโครงสร้างทางเคมีซัลแบคแทม โซเดียม

จากคุณสมบัติสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายชนิดทำให้เซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมเป็นยาที่มีข้อบ่งใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อของทางเดินหายใจทั้งส่วนบนและส่วนล่าง โรคติดเชื้อของทางเดินปัสสาวะทั้งส่วนบนและส่วนล่าง อาการเยื่อหุ้มช่องท้องอักเสบ ถุงน้ำดีอักเสบ ท่อทางเดินน้ำดีอักเสบ และโรคติดเชื้ออื่น ๆ ภายในช่องท้อง อาการติดเชื้อในกระแสโลหิต โรคติดเชื้อของผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน โรคติดเชื้อของกระดูกและข้อ อาการอักเสบภายในอุ้งเชิงกราน เยื่อบุมดลูกอักเสบ โรคหนองใน และโรคติดเชื้ออื่น ๆ ของระบบสืบพันธุ์⁽¹⁾ จากคุณสมบัติในการรักษาการติดเชื้อที่ครอบคลุมหลายระบบในร่างกาย ทำให้มีการใช้ยาดังกล่าวอย่างกว้างขวาง เป็นทางเลือกของผู้ที่แพ้ยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่น ๆ และยังจัดเป็นยาในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2556 บัญชี ซึ่งใช้สำหรับการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) จากแบคทีเรียแกรมลบ โดยเฉพาะการติดเชื้อ *Acinetobacter* sp.⁽³⁾

ปัจจุบันมี เซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมในรูปแบบยาฉีด ที่ขึ้นทะเบียนตำรับยาในประเทศไทย 24 ตำรับ จำแนกเป็นผลิตในประเทศ 9 ตำรับ และนำเข้าจากต่างประเทศ 15 ตำรับ เซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมในรูปแบบยาฉีด 1 กรัม ประกอบด้วย เซฟเพอราโซน 500 มิลลิกรัม และซัลแบคแทม 500 มิลลิกรัม และขนาดเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมในรูปแบบยาฉีด 1.5 กรัม ประกอบด้วย เซฟเพอราโซน 1,000 มิลลิกรัม และซัลแบคแทม 500 มิลลิกรัม⁽⁴⁾

การวิเคราะห์หาปริมาณเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมในรูปแบบยาฉีดยังไม่มีวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทั้งในตำรายาของสหรัฐอเมริกา (USP) ตำรายาของยุโรป (Ph. Eur.) และตำรายาของสหราชอาณาจักร (BP) ซึ่งในตำรายาของสหรัฐอเมริกาและตำรายาของสหราชอาณาจักรพบเพียงการตรวจวิเคราะห์วัตถุบของเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม ในการตรวจวิเคราะห์ยาเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมในรูปแบบยาฉีดตามโครงการ

สร้างหลักประกันคุณภาพและมาตรฐานบริการด้านยาปีงบประมาณ 2557 ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 10 อุบลราชธานี ทำการตรวจวิเคราะห์ตามทะเบียนตำรับยา ซึ่งใช้สารเคมี และวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ต่างกัน ทำให้ใช้เวลาและสิ้นเปลืองสารเคมีมาก ผู้วิจัยจึงทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้เทคนิครีเวอร์สเฟสโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (reversed phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC) โดยพัฒนาจากงานวิจัยของ Sreenivasulu และ Rani⁽⁵⁾ เรื่อง Validated RP-HPLC method for simultaneous estimation of sulbactam and cefoperazone in bulk and pharmaceutical dosage form งานวิจัยดังกล่าวใช้สภาวะของโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ดังนี้ คอลัมน์ phenomenex C18 ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร บรรจุนุภาคขนาด 5 ไมโครเมตร สารละลายตัวพาคือบัฟเฟอร์ pH 6.6 กับ acetonitrile ในอัตราส่วน 70 : 30 อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร พบพีคของเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมที่ retention time เท่ากับ 9.32 และ 5.33 ตามลำดับ run time เท่ากับ 20 นาที ซึ่งสภาวะดังกล่าวใช้เวลานาน และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นตามหลักเกณฑ์ของตำรายา USP⁽⁶⁾ และ ICH Guideline⁽⁷⁾ โดยศึกษาความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี ความจำเพาะเจาะจงของวิธีความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ ความแม่นยำ ความเที่ยง ความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ความทนของวิธี ชีตจำกัดของการตรวจพบและชีตจำกัดเชิงปริมาณ เพื่อลดเวลาในการตรวจวิเคราะห์ และใช้เป็นวิธีมาตรฐานของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 10 อุบลราชธานี ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้เทคนิครีเวอร์สเฟสโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (reversed phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC) เลือกใช้คอลัมน์ชนิด BDS Hypersil C18 ขนาด 4.6×100 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 3 ไมโครเมตร สารละลายตัวพาประกอบด้วยส่วนผสมของสารละลาย 0.005 M Tetrabutylammonium hydroxide pH 4.0 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 72 : 28 โดยปริมาตร อัตราการไหลของตัวพา 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร ในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพยาเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมในรูปแบบยาฉีด เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภค ให้ผู้บริโภคได้ใช้ยาที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดรักษาโรค

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ผลิตภัณฑ์ของ Agilent สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
2. เครื่องชั่ง : Sartorius ED224S ผลิตภัณฑ์ของ Sartorius สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
3. Ultrasonic bath : 175DAE ผลิตภัณฑ์ของ Crest Ultrasonics สหรัฐอเมริกา
4. คอลัมน์ : Hypersil BDS C18 ขนาด 4.6×100 มิลลิเมตร บรรจุนุภาคขนาด 3 ไมโครเมตร ผลิตภัณฑ์ของ Thermo Scientific
5. pH meter : Metrohm 702 SM Titrino ผลิตภัณฑ์ของ Metrohm Herisae สวิตเซอร์แลนด์

สารเคมี

Acetonitrile, HPLC grade ผลิตภัณฑ์ของ Merck; Tetrabutylammonium hydroxide 40%, HPLC grade ผลิตภัณฑ์ของ Fluka; Phosphoric acid, AR grade ผลิตภัณฑ์ของ Merck; น้ำ HPLC quality

สารมาตรฐาน

1. USP Cefoperazone Dihydrate Reference Standard CAT. No. 1623670 Lot No. IOK056
2. USP Sulbactam Reference Standard CAT. No. 1097705 Lot No. JOJ117

ตัวอย่าง

ตัวอย่างยาเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมในรูปแบบยาฉีด ประกอบด้วยผงยาเซฟเพอราโซน 500 มิลลิกรัม และซัลแบคแทม 500 มิลลิกรัมต่อ 1 ขวดยาฉีด

การเตรียมสารละลายตัวพา (Mobile phase)

เตรียมสารละลาย 0.005 M tetrabutylammonium hydroxide โดยเจือจางสารละลาย tetrabutylammonium hydroxide (40%) 3.3 ml ด้วยน้ำ 900 ml ปรับ pH เท่ากับ 4.0 ± 0.1 ด้วย phosphoric acid ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 ml จากนั้นผสม 0.005 M tetrabutylammonium hydroxide pH 4.0 กับ acetonitrile ในอัตราส่วน 72 : 28 โดยปริมาตรและกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐานเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม 15 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยสารละลายตัวพา กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ละลายผงตัวอย่างยาในขวดบรรจุยาฉีดด้วยสารละลายตัวพา ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายตัวพา จากนั้นปิเปตสารละลายนี้มา 3 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายตัวพา จะมีความเข้มข้นของ เซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม เท่ากับ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร (ใช้ทันที)

สภาวะของระบบโครมาโทกราฟี (HPLC)

HPLC column	: Hypersil BDS C18 ขนาด 4.6×100 บรรจุนุภาคขนาด 3 ไมโครเมตร
Mobile phase	: 0.005 M Tetrabutylammonium hydroxide pH 4.0 : acetonitrile = 72:28
Flow rate	: 1.0 ml/minute
Detector	: UV 230 nm
Injection volume	: 10 μ l

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

1. การทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี (Chromatographic system suitability)

เตรียมสารละลายมาตรฐานเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมในสารละลายตัวพาให้มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานนี้ 1.5 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำ 3 M hydrochloric acid 0.2 มิลลิลิตร ต้มในน้ำ 80 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรด้วยสารละลายตัวพาแล้วกรองผ่านแผ่นกรอง 0.22 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ตรวจสอบพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น %RSD, retention time, theoretical plate, tailing factor และ resolution ซึ่งคำนวณตามวิธีของ USP⁽⁶⁾ จากโปรแกรมอัตโนมัติของเครื่อง HPLC ฉีดซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อแสดงความเหมาะสมของระบบที่ใช้

2. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)

เตรียมสารละลายตัวอย่างเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมในสารละลายตัวพาให้มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่างนี้ 1.5 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร นำมา

ทำให้สลายตัวในสภาวะต่าง ๆ ปรับปริมาตรด้วยสารละลายตัวพาแล้วกรองผ่านแผ่นกรอง 0.22 ไมโครเมตร สภาวะต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดการสลายตัว

1. ทำให้ร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง
2. เติมสารละลาย 35% hydrogen peroxide จำนวน 1 หยด แล้วนำไปทำให้ร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง
3. เติมสารละลาย 3M hydrochloric acid จำนวน 1 หยด แล้วนำไปทำให้ร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง
4. เติมสารละลาย 3M sodium hydroxide จำนวน 1 หยด แล้วนำไปทำให้ร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง
5. นำไปผึ่งแดด นาน 6 ชั่วโมง

วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่ทำให้เกิดการสลายตัวที่สภาวะต่าง ๆ ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อศึกษาการรบกวนจากสารละลายตัว คำนวณร้อยละของสารละลายตัวโดยเปรียบเทียบค่าพื้นที่ใต้พีคของสารละลายตัวอย่างเซโฟเพราโซนและซัลแบคแทมที่สภาวะปกติ

3. การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

ชั่งสารมาตรฐานเซโฟเพราโซนและซัลแบคแทม 25.5 และ 25.1 มิลลิกรัม (%purity ของสารมาตรฐานเซโฟเพราโซนเท่ากับ 94.7 และของสารมาตรฐานซัลแบคแทมเท่ากับ 99.7) ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยสารละลายตัวพา จะมีความเข้มข้นของเซโฟเพราโซนและซัลแบคแทมเท่ากับ 0.48 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเจือจางสารละลายดังกล่าวให้มีความเข้มข้นเป็นร้อยละ 50, 75, 100, 125 และ 150 ของระดับความเข้มข้นที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ จะมีความเข้มข้นของเซโฟเพราโซนเท่ากับ 0.0720, 0.1075, 0.1449, 0.1787 และ 0.2160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจะมีความเข้มข้นของซัลแบคแทมเท่ากับ 0.0750, 0.1120, 0.1500, 0.1850 และ 0.2250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านแผ่นกรอง 0.22 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยฉีดความเข้มข้นละ 6 ขั้ว ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีคสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ซึ่งต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995⁽⁷⁾

4. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ทดสอบความแม่นยำของวิธีโดยการวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานเซโฟเพราโซนและซัลแบคแทม (spiked sample solution) ที่ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 0.075, 0.1125, 0.150, 0.1875 และ 0.2250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 50, 75, 100, 125 และ 150 ของระดับความเข้มข้นที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณเซโฟเพราโซนและซัลแบคแทมในตัวอย่างตามลำดับ โดยทดสอบความเข้มข้นละ 3 ขั้ว วิเคราะห์ปริมาณเซโฟเพราโซนและซัลแบคแทมทั้งหมดที่มีในสารละลายเพื่อคำนวณค่าร้อยละของการกลับคืน (%recovery) ที่แต่ละระดับความเข้มข้น และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%Relative standard deviation, %RSD) ของการกลับคืนทุกความเข้มข้น โดยที่ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับต้องอยู่ในช่วง 98.0 - 102.0 และค่า %RSD ไม่เกิน 2.0⁽⁷⁾

สร้างกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซโฟเพราโซนและซัลแบคแทมที่เติม และปริมาณที่ตรวจพบ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) กำหนดให้ค่า r ไม่ต่ำกว่า 0.995⁽⁷⁾

5. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

5.1 ความทนซ้ำได้ (Repeatability)

5.1.1 ความเที่ยงของระบบ (System precision)

ฉีดสารละลายมาตรฐานเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม ความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างฉีดซ้ำ 6 ครั้ง คำนวณ %RSD ของพื้นที่ใต้พีคเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม ค่า %RSD ไม่เกิน 2.0⁽⁷⁾

5.1.2 ความเที่ยงของวิธี (Method precision)

ฉีด Spiked sample solution ที่ความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างฉีดซ้ำ 6 ครั้ง คำนวณ %RSD ของพื้นที่ใต้พีคเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม ค่า %RSD ไม่เกิน 2.0⁽⁷⁾

5.2 ความเที่ยงของการเปลี่ยนสภาวะ (Intermediate Precision)

วิเคราะห์ปริมาณตัวอย่างสำคัญในตัวอย่างยาเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมในรูปแบบยาฉีด จำนวน 6 ขั้ว โดยทดสอบต่างวัน เป็นเวลา 2 วัน เปลี่ยนนักวิเคราะห์ จำนวน 2 คน และเปลี่ยนเครื่อง HPLC จำนวน 2 เครื่อง คำนวณปริมาณเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม ค่าเฉลี่ย และ %RSD โดยค่า %RSD ไม่เกิน 2.0⁽⁷⁾

6. ความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง

ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมที่ความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงติดต่อกัน คำนวณปริมาณเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม เปรียบเทียบกับปริมาณที่ 0 ชั่วโมง โดยให้ปริมาณที่ 0 ชั่วโมง เป็น 100% ปริมาณที่พบในเวลาต่างๆ ควรไม่น้อยกว่า 95% เพื่อดูความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างในระหว่างทำการทดสอบ

7. การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

7.1 ความคงสภาพของคอลัมน์

ในระหว่างการศึกษาทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ให้ตรวจสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ โดยทำการบันทึกค่า theoretical plates ในวันที่เริ่มต้น และในระหว่างการศึกษาจนจบการทดลอง นับจำนวนครั้งที่ฉีดสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่างในการทดสอบทั้งหมด ค่า theoretical plates ควรมีค่ามากกว่า 2,000 (ต่อความยาวคอลัมน์)⁽⁸⁾

7.2 ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาวะของระบบ HPLC

ศึกษาผลกระทบต่อการวิเคราะห์ยาจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ ของระบบโครมาโทกราฟี คือ คอลัมน์ สัดส่วนของสารละลายตัวพา ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ของสารละลายบัฟเฟอร์ในสารละลายตัวพา และอัตราการไหลของสารละลายตัวพา (Flow rate) โดยวิเคราะห์ปริมาณตัวอย่างสำคัญในตัวอย่างยาเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม จำนวน 3 ขั้ว ศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆ ที่อาจมีผลกระทบต่อความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี เช่น ลักษณะรูปร่างพีค (ค่า tailing factor ไม่เกิน 2.0) retention time และ theoretical plates พร้อมทั้งคำนวณปริมาณเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม เปรียบเทียบผลวิเคราะห์ที่ได้โดยคำนวณค่า %RSD ต้องไม่เกิน 2.0

8. ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Detection Limit) และขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (Quantitation Limit) ของเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม

คำนวณขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณของเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม โดยคำนวณจาก slope และ intercept ของกราฟมาตรฐาน⁽⁷⁾

ผล

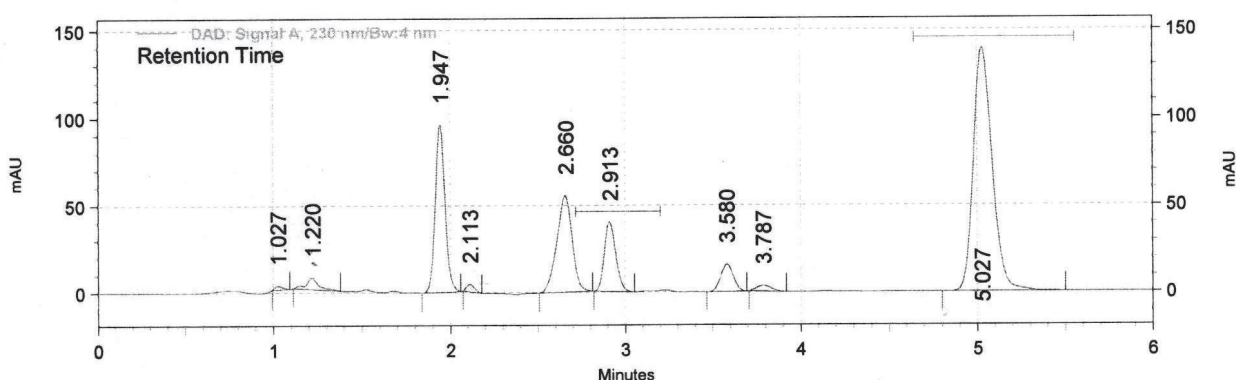
1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้เทคนิครีเวอร์สเฟสโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (reversed phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC) โดยเลือกใช้คอลัมน์ชนิด BDS Hypersil C18 ขนาด 4.6×100 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 3 ไมโครเมตร สารละลายตัวพาประกอบด้วยส่วนผสม

ของสารละลาย 0.005 M Tetrabutylammonium hydroxide pH 4.0 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 72:28 โดยปริมาตร อัตราการไหลของตัวพา 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร พบพีคของเซโฟเพราโซนและซัลแบคแทมที่ retention time เท่ากับ 5.0 และ 2.9 ตามลำดับ run time เท่ากับ 10 นาที

2. การทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี (Chromatographic system suitability)

จากการฉีดสารละลายสำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี ได้ค่า retention time ของสารที่ออกมาเรียงตามลำดับดังนี้ เซโฟเพราโซน เท่ากับ 5.0 ซัลแบคแทม เท่ากับ 2.9 สารละลายตัวพีคที่ 1 เท่ากับ 1.0 สารละลายตัวพีคที่ 2 เท่ากับ 1.2 สารละลายตัวพีคที่ 3 เท่ากับ 1.9 สารละลายตัวพีคที่ 4 เท่ากับ 2.1 สารละลายตัวพีคที่ 5 เท่ากับ 2.6 สารละลายตัวพีคที่ 6 เท่ากับ 3.5 และสารละลายตัวพีคที่ 7 เท่ากับ 3.7 (ภาพที่ 3 และตารางที่ 1)



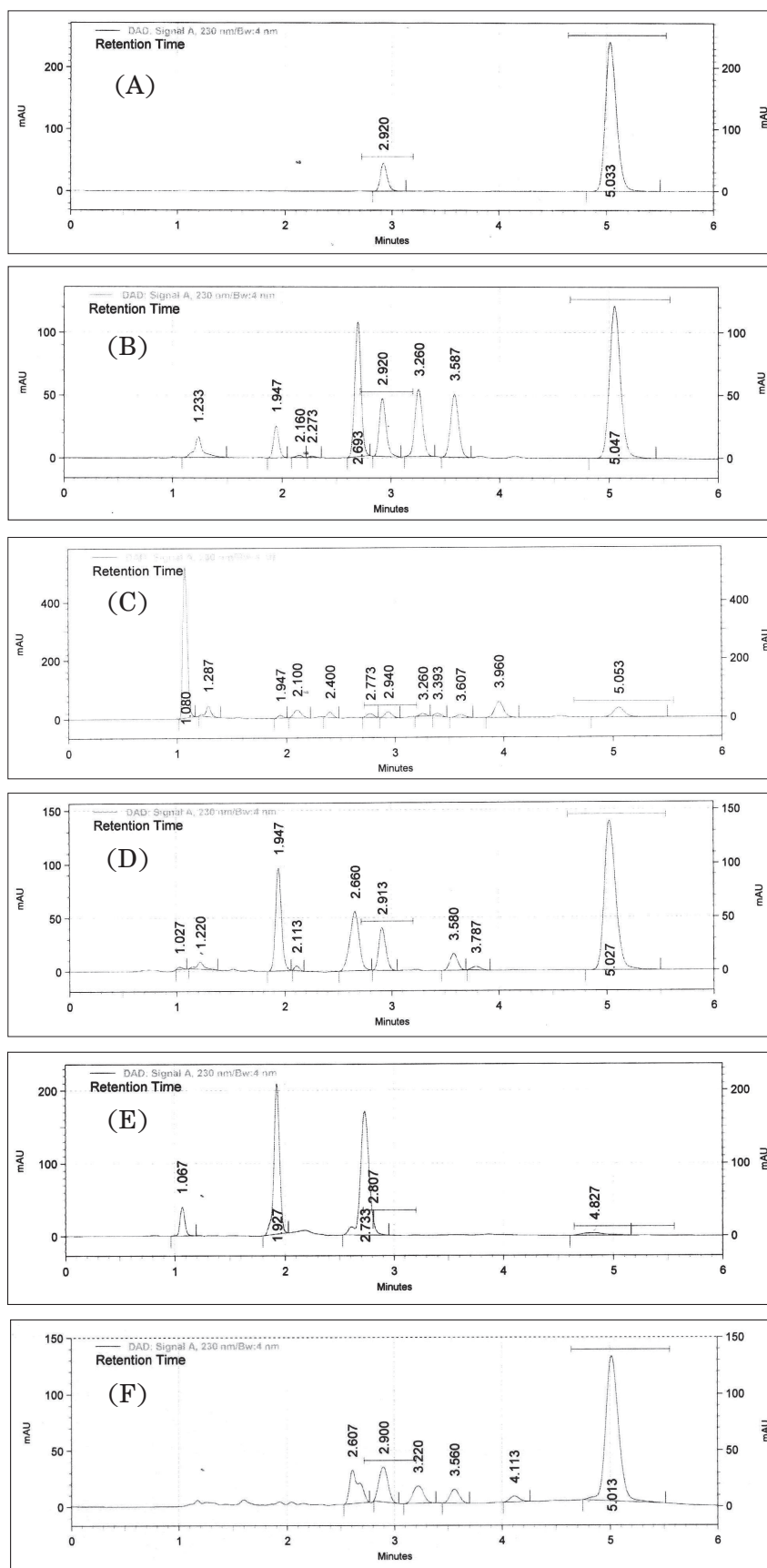
ภาพที่ 3 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานเซโฟเพราโซนและซัลแบคแทมในสภาวะกรด Tailing factor ของทุกพีคประมาณ 0.9 ถึง 1.4 Theoretical plate ของเซโฟเพราโซนและซัลแบคแทมเท่ากับ 10723 และ 9108 ตามลำดับ %RSD ของการฉีดซ้ำ 3 ครั้ง ของเซโฟเพราโซนและซัลแบคแทมเท่ากับ 0.2 และ 0.1 ตามลำดับ สารละลายตัวพีคที่ Relative retention time เท่ากับ 0.51 และ 0.75 มีค่า resolution เท่ากับ 1.8 และ 7.1 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ค่า tailing factor, theoretical plate, resolution ของสารละลายสำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี

	พีค 1	พีค 2	พีค 3	พีค 4	พีค 5	ซัลแบคแทม	พีค 6	พีค 7	เซโฟเพราโซน
Retention time	1.0	1.2	1.9	2.1	2.6	2.9	3.5	3.7	5.0
Tailing factor	1.3	1.1	1.0	1.1	0.9	1.1	1.0	1.1	1.2
Theoretical plate	1,500	2,442	6,058	9,899	4,230	9,108	11,142	9,418	10,723
Resolution					1.8		7.1		

3. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)

จากการฉีดสารละลายตัวอย่างเซโฟเพราโซนและซัลแบคแทมที่ทำให้เกิดการสลายตัวที่สภาวะต่างๆ เปรียบเทียบกับสารละลายตัวอย่างเซโฟเพราโซนและซัลแบคแทมที่สภาวะปกติ พบว่าสามารถแยกสารละลายตัวจากสภาวะต่างๆ ออกจากพีคของเซโฟเพราโซนและซัลแบคแทม (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 โครมาโตแกรมของสารละลายตัวอย่างเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม (A) และสารละลายตัวอย่างเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมที่ทำให้เกิดการสลายตัวที่สภาวะต่างๆ คือ ที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง (B), สภาวะออกซิเดชันที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง (C), สภาวะกรดที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง (D), สภาวะเบสที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง (E) และสภาวะที่ถูกแสงแดดนาน 6 ชั่วโมง (F)

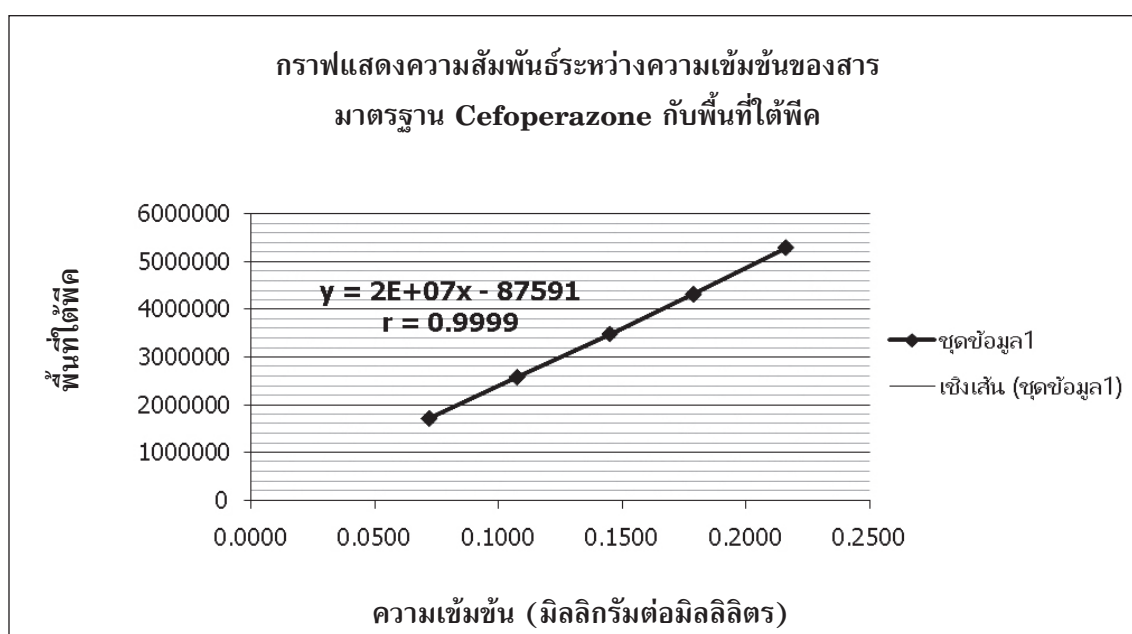
เซฟเพอราโซนเกิดการสลายตัวจากความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส ในสภาวะออกซิเดชัน ในสภาวะกรด ในสภาวะด่างที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง และเร่งด้วยแสงแดด โดยมีการสลายตัวคิดเป็นร้อยละเท่ากับ 51.1, 86.7, 40.7, 97.2 และ 39.7 ตามลำดับ และตรวจพบสารสลายตัวที่เวลาต่างๆ ส่วนซัลแบคแทมมีความทนต่อความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส โดยไม่พบการสลายตัว แต่พบการสลายตัวจากสภาวะออกซิเดชัน ในสภาวะกรด ในสภาวะเบสที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง และเร่งด้วยแสงแดด โดยมีการสลายตัวคิดเป็นร้อยละเท่ากับ 57.5, 9.1, 100.0, และ 8.3 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 สภาวะที่ศึกษาการสลายตัวของเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมและสารสลายตัวที่พบ

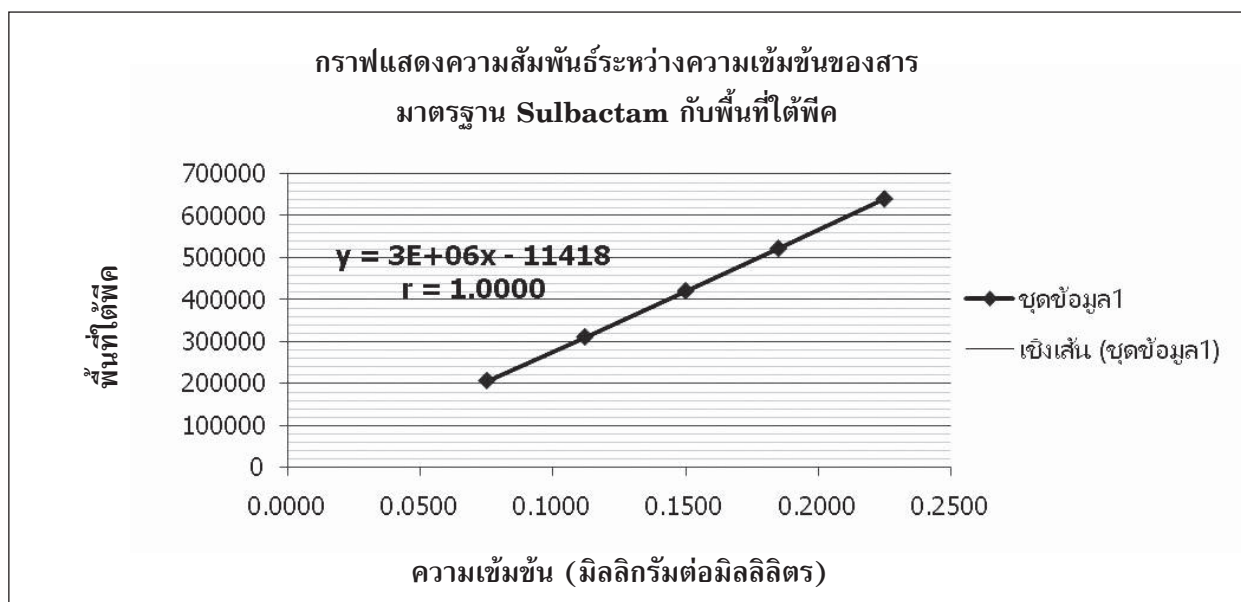
สภาวะที่ทำให้เกิดการสลายตัว	%การสลายตัว		Retention time ของสารสลายตัว (นาที)
	เซฟเพอราโซน	ซัลแบคแทม	
80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง	51.1	0.0	1.2, 1.9, 2.1, 2.2, 2.7, 3.2, 3.5
ออกซิเดชันที่ 80 องศาเซลเซียส	86.7	57.5	1.0, 1.2, 1.9, 2.1, 2.4, 2.7, 3.2, 3.3, 3.6, 3.9
กรดที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง	40.7	9.1	1.0, 1.2, 1.9, 2.1, 2.6, 3.5, 3.7
เบสที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง	97.2	100.0	1.0, 1.9, 2.7
แสงแดด นาน 6 ชั่วโมง	39.7	8.3	2.6, 3.2, 3.5, 4.1

4. การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

จากการนิตสารละลายมาตรฐานเซฟเพอราโซนที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน 5 ระดับ ตั้งแต่ 0.0720 ถึง 0.2160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และซัลแบคแทมที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน 5 ระดับ ตั้งแต่ 0.0750 ถึง 0.2250 พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม กับพื้นที่ใต้พีคมีลักษณะเป็นเส้นตรง ตลอดช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 และ 1.0000 ตามลำดับ ภาพที่ 5, 6

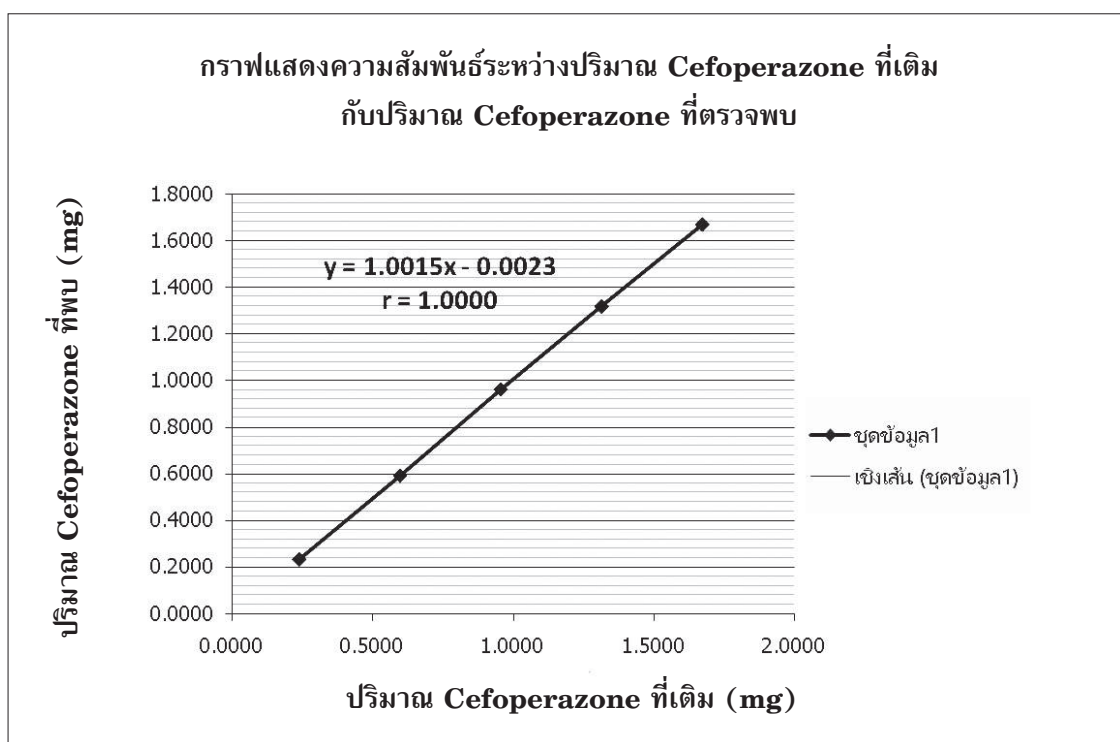


ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเซฟเพอราโซนกับพื้นที่ใต้พีค

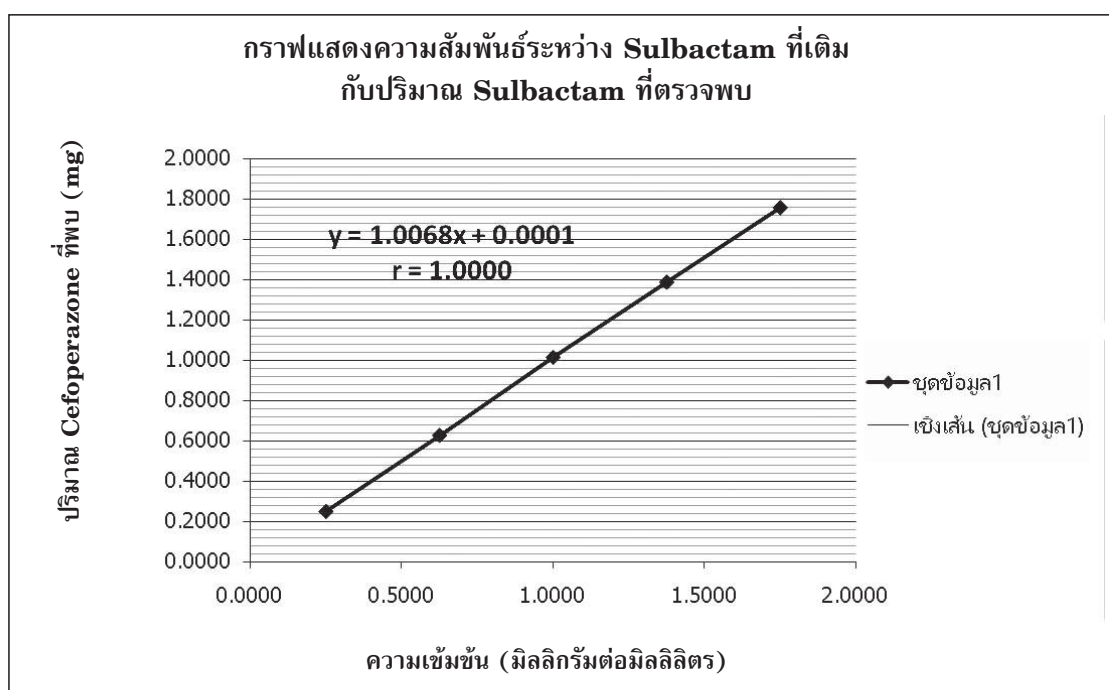


ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานซัลแบคแทมกับพื้นที่ใต้พีค

จากการฉีด Spiked sample solution ที่ความเข้มข้น 0.075, 0.1125, 0.150, 0.1875 และ 0.2250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซฟเพอราโซนที่เติมกับปริมาณที่ตรวจพบมีลักษณะเป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 1.0000 และความสัมพันธ์ระหว่างซัลแบคแทมที่เติมกับปริมาณที่ตรวจพบ มีลักษณะเป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 1.0000 ภาพที่ 7, 8



ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซฟเพอราโซนที่เติมกับปริมาณที่ตรวจพบ



ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณซัลแบคแทมที่เติมกับปริมาณที่ตรวจพบ

5. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

จากการฉีด Spiked sample solution ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของการกลับคืน (percent recovery) ของเซฟเพอราโซนเท่ากับ 98.2, 99.3, 100.7, 100.2 และ 99.7 ตามลำดับและซัลแบคแทมเท่ากับ 99.8, 100.3, 101.4, 100.9 และ 100.4 ตามลำดับ ค่าร้อยละของการกลับคืนในทุกระดับความเข้มข้นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ในช่วงร้อยละ 98.0 – 102.0 และ %RSD ไม่เกิน 2.0 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

สารที่เติม	ปริมาณสาร ที่เติม (มก) (n = 3)	ปริมาณสาร ที่ตรวจพบ (มก) (n = 3)	ร้อยละของ การกลับคืน (n = 3)	%RSD
เซฟเพอราโซน	0.2390	0.2347	98.2	0.9
	0.5975	0.5934	99.3	0.9
	0.9461	0.9627	100.7*	0.5
	1.3146	1.3172	100.2	0.3
	1.6731	1.6681	99.7	0.4
ซัลแบคแทม	0.2500	0.2495	99.8	0.7
	0.6250	0.6269	100.3	1.1
	1.0000	1.0140	101.4*	0.6
	1.3750	1.3874	100.9	0.3
	1.7500	1.7570	100.4	0.5

*ระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์

6. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

6.1 ความทวนซ้ำได้ (Repeatability)

6.1.1 ความเที่ยงของระบบ (System precision)

จากการฉีดสารละลายมาตรฐานเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม ซึ่งมีความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างฉีดซ้ำ 6 ครั้ง คำนวณค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีค และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ได้ %RSD (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความเที่ยงของระบบ (System precision)

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีค					
	เซฟเพอราโซน			ซัลแบคแทม		
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3
1	3560145	3572567	3552636	405334	409373	407873
2	3560379	3573202	3554431	406854	408824	407820
3	3555056	3572290	3551340	406510	408936	406359
4	3554835	3571747	3549946	406250	409221	407431
5	3551937	3572791	3550651	406777	409310	407714
6	3546660	3571554	3547075	405933	409097	407336
Mean	3554835	3572359	3551013	406276	409127	407422
%RSD	0.1	0.02	0.1	0.1	0.1	0.1

6.1.2 ความเที่ยงของวิธี (Method precision)

จากการฉีดสารละลาย Spiked sample solution ที่ระดับความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 3 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างฉีดซ้ำ 6 ครั้ง คำนวณค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีค และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ได้ %RSD (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเที่ยงของวิธี (Method precision)

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีค					
	เซฟเพอราโซน			ซัลแบคแทม		
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3
1	3669233	3672520	3684478	419434	419446	421709
2	3673481	3667040	3693652	419656	418725	423134
3	3668017	3672994	3687643	419342	420459	421989
4	3662478	3666379	3681380	418401	417921	421948
5	3662794	3668423	3682648	418571	419291	421178
6	3664838	3664734	3679548	418829	418939	421283
Mean	3666807	3668682	3684892	419039	419130	421874
%RSD	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2

6.2 ความเที่ยงของการเปลี่ยนสภาวะ (Intermediate Precision)

จากการวิเคราะห์สารละลายตัวอย่าง วันละ 6 ตัวอย่าง ทำการทดสอบ 2 วัน โดยใช้นักวิเคราะห์ 2 คน และเครื่องมือ 2 เครื่อง คำนวณร้อยละของปริมาณเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมเทียบกับสารมาตรฐาน และ %RSD ของแต่ละวัน พบว่า %RSD ของการทดสอบภายในวันเท่ากับ 0.4 และ 0.2 และ %RSD ของการทดสอบระหว่างวัน เท่ากับ 0.3 ซึ่งไม่เกิน 2.0 (ตารางที่ 6 และ 7)

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความเที่ยงของการเปลี่ยนสภาวะ Intermediate Precision ของเซฟเพอราโซน

รายการที่ทดสอบ		ปริมาณของ Cefoperazone (% labeled amount)						Intermediate Precision			
		1	2	3	4	5	6	เฉลี่ย	%RSD	เฉลี่ย	%RSD
ระหว่างวัน	วันที่ 1	95.6	94.8	95.4	95.2	94.6	94.7	95.1	0.4	94.7	0.5
	วันที่ 2	94.3	94.1	94.4	94.6	94.3	94.0	94.3	0.2		
ระหว่างนักวิเคราะห์	คนที่ 1	95.6	94.8	95.4	95.2	94.6	94.7	95.1	0.4	95.9	1.0
	คนที่ 2	96.7	96.8	97.3	96.9	96.4	96.4	96.8	0.4		
ระหว่างเครื่องมือ	HPLC1	95.6	94.8	95.4	95.2	94.6	94.7	95.1	0.4	94.9	0.4
	HPLC2	94.3	94.6	94.8	94.9	94.8	94.7	94.7	0.2		

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความเที่ยงของการเปลี่ยนสภาวะ Intermediate Precision ของซัลแบคแทม

รายการที่ทดสอบ		ปริมาณของ Cefoperazone (% labeled amount)						Intermediate Precision			
		1	2	3	4	5	6	เฉลี่ย	%RSD	เฉลี่ย	%RSD
ระหว่างวัน	วันที่ 1	101.9	101.4	102.1	101.9	100.9	101.6	101.6	0.4	101.1	0.7
	วันที่ 2	100.5	100.2	100.6	101.0	100.6	100.3	100.5	0.3		
ระหว่างนักวิเคราะห์	คนที่ 1	101.9	101.4	102.1	101.9	100.9	101.6	101.6	0.4	101.7	0.4
	คนที่ 2	101.6	101.8	102.4	102.0	101.4	101.3	101.8	0.4		
ระหว่างเครื่องมือ	HPLC1	101.9	101.4	102.1	101.9	100.9	101.6	101.6	0.4	101.5	0.5
	HPLC2	100.4	101.0	101.8	101.8	101.4	101.3	101.3	0.5		

7. การทดสอบความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง

จากการฉีดสารละลายมาตรฐานสารละลายตัวอย่างเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมที่ความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทุก ๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงติดต่อกัน พบว่าสารละลายมีความคงสภาพในระหว่างทดสอบ ได้ 24 ชั่วโมง โดยสารละลายมาตรฐานมีปริมาณเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม ร้อยละ 97.5 และ 99.7 ตามลำดับ และสารละลายตัวอย่างมีปริมาณเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม ร้อยละ 96.8 และ 100.0 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ ปริมาณที่จุดเริ่มต้น

8. การทดสอบความทนของวิธีวิเคราะห์ (Robustness)

8.1 ความคงสภาพของคอลัมน์

จากการตรวจสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ Hypersil BDS C18 ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้โดย บันทึกค่า theoretical plates ของพีคเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม เมื่อเริ่มต้นใช้เท่ากับ 11644 และ 9936 ตามลำดับ หลังจากจบการทดสอบ พบว่าฉีดสารละลายต่างๆ ประมาณ 500 ครั้ง ค่า theoretical plates เท่ากับ 10810 และ 9138 ตามลำดับ

8.2 ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาวะของระบบ HPLC

จากการทดลองเปลี่ยนสภาวะต่างๆ ของระบบโครมาโทกราฟี เพื่อศึกษาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น retention time, tailing factor และ theoretical plates รวมทั้งวิเคราะห์หาปริมาณเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม ในตัวอย่างยานี้ด เพื่อเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ จากผลการทดสอบพบว่า สภาวะต่างๆ ของระบบโครมาโทกราฟีที่มีการเบี่ยงเบนไป ยังคงให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมที่มีค่า %RSD ไม่เกิน 2.0 และค่า theoretical plates มีค่ามากกว่า 2,000 tailing factor ไม่เกิน 1.3 (ตารางที่ 8 และ 9)

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบความทนของวิธีวิเคราะห์ (Robustness) ของเซฟเพอราโซน

สภาวะของระบบโครมาโทกราฟี		Retention time	Theoretical plates	Tailing factor	ปริมาณของ Cefoperazone (% labeled amount)			เฉลี่ย	%RSD
					1	2	3		
HPLC column	No. 1	5.1	8869	0.9	96.3	96.8	97.1	96.7	0.4
	No. 2*	5.0	11181	1.2	96.2	96.7	96.9	96.6	0.4
	No. 3	4.9	11735	1.2	96.1	96.8	97.0	96.6	0.5
สัดส่วนของตัวพา	70/30	4.0	10774	1.2	97.7	97.2	97.0	97.3	0.4
	72/28*	5.0	11233	1.2	97.6	96.9	96.5	97.0	0.6
	75/25	8.1	11886	1.2	97.7	97.2	97	97.3	0.4
pH ของ buffer	3.9	5.0	11382	1.1	97.4	97.1	96.9	97.1	0.3
	4.0*	5.0	11233	1.2	97.6	96.9	96.5	97.0	0.6
	4.1	5	11288	1.2	97.4	96.9	96.7	97.0	0.4
Flow rate	0.9	5.6	11908	1.2	97.8	97.0	97.1	97.3	0.4
	1.0*	5.0	11233	1.2	97.6	96.9	96.5	97.0	0.6
	1.1	4.6	10815	1.2	97.6	97.3	97.1	97.3	0.3

*สภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่ทำการตรวจสอบความถูกต้อง

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบความทนของวิธีวิเคราะห์ (Robustness) ของซัลแบคแทม

สภาวะของระบบโครมาโทกราฟี		Retention time	Theoretical plates	Tailing factor	ปริมาณของ Cefoperazone (% labeled amount)			เฉลี่ย	%RSD
					1	2	3		
HPLC column	No. 1	2.9	7292	0.9	101.1	101.3	101.3	101.2	0.1
	No. 2*	2.9	9918	1.1	100.6	101.3	101.5	101.1	0.5
	No. 3	2.8	9682	1.2	101.1	102.1	102.2	101.8	0.6
สัดส่วนของตัวพา	70/30	2.6	9579	1.1	98.1	97.8	97.7	97.9	0.2
	72/28*	2.9	9921	1.1	99.3	99.4	99.3	99.3	0.1
	75/25	3.6	10724	1.3	99.5	99.2	99.1	99.3	0.2
pH ของ buffer	3.9	2.9	9893	1.1	99.1	99.0	99.0	99.0	0.1
	4.0*	2.9	9921	1.1	99.3	99.4	99.3	99.3	0.1
	4.1	2.9	9963	1.2	99.8	99.3	99.1	99.4	0.4
Flow rate	0.9	3.2	10620	1.2	100.0	99.1	99.4	99.5	0.5
	1.0*	2.9	9921	1.1	99.3	99.4	99.3	99.3	0.1
	1.1	2.6	9200	1.2	99.9	99.7	99.8	99.8	0.1

*สภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่ทำการตรวจสอบความถูกต้อง

9. ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Detection Limit) และขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (Quantitation Limit) ของเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม

เมื่อคำนวณขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณของเซฟเพอราโซนพบว่ามีความ 0.005 และ 0.014 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณของซัลแบคแทมพบว่ามีความ 0.0025 และ 0.0075 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ คำนวณได้จากค่า slope และ Y-intercept ของสมการเส้นตรงจากผลในข้อ 3

วิจารณ์

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมในรูปแบบยาฉีด (Cefoperazone and Sulbactam for injection) เป็นยาที่ยังไม่มีวิธีมาตรฐานในตำรายาเล่มใด ในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพยาต้องการตรวจวิเคราะห์ตามทะเบียนตำรับยา ซึ่งแต่ละทะเบียนมีการใช้คอลัมน์ สารเคมี และวิธีในการตรวจวิเคราะห์ที่ต่างกันทำให้ต้องเตรียมอุปกรณ์และสารเคมีหลากหลายชนิด และต้องใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน จากงานวิจัยของ Sreenivasulu E and Rani GT เรื่อง Validated RP-HPLC method for simultaneous estimation of sulbactam and cefoperazone in bulk and pharmaceutical dosage form งานวิจัยดังกล่าวใช้สภาวะของโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ดังนี้ คอลัมน์ phenomenex C18 ขนาด 4.6×150 mm บรรจุอนุภาค ขนาด 5 ไมโครเมตร สารละลายตัวพา คือ บัฟเฟอร์ pH 6.6 กับ acetonitrile ในอัตราส่วน 70 : 30 อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร พบพีคของเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมที่ retention time เท่ากับ 9.32 และ 5.33 ตามลำดับ run time เท่ากับ 20 นาที (10) ซึ่งสภาวะดังกล่าวใช้เวลานาน วิธีที่พัฒนาขึ้นโดยใช้วิธีรีเวอร์สเฟสไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์ชนิด BDS Hypersil C18 ขนาด 4.6×100 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 3 ไมโครเมตร สารละลายตัวพาประกอบด้วยส่วนผสมของสารละลาย 0.005 M Tetrabutylammonium hydroxide pH 4.0 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 72 : 28 โดยปริมาตร อัตราการไหลของตัวพา 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร พบพีคของเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมที่ retention time เท่ากับ 5.0 และ 2.9 ตามลำดับ run time เท่ากับ 10 นาที ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่า

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี พบว่าวิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทม ไม่พบการรบกวนของสารละลายตัวที่เกิดขึ้นจากสภาวะต่างๆ ที่ทำให้เกิดการสลายตัว

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการทดสอบ โดยศึกษาสารละลายมาตรฐานที่ 5 ระดับความเข้มข้น พบว่าช่วงของความเป็นเส้นตรงของเซฟเพอราโซนอยู่ระหว่างความเข้มข้นในช่วง 0.0720 ถึง 0.2160 และช่วงของความเป็นเส้นตรงของซัลแบคแทมอยู่ระหว่างความเข้มข้นในช่วง 0.0750 ถึง 0.2250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 และ 1.0000 ตามลำดับ

การทดสอบความแม่นยำของวิธี ทำการทดสอบที่ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 0.075, 0.1125, 0.150, 0.1875 และ 0.2250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าร้อยละของการกลับคืนของเซฟเพอราโซนอยู่ในช่วง 98.2 – 100.7 และค่าร้อยละของการกลับคืนของซัลแบคแทมอยู่ในช่วง 99.8 – 101.4 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ ร้อยละ 98.0 – 102.0 และค่า %RSD ไม่มากกว่า 2.0 แสดงถึงวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความแม่นยำ

การทดสอบความเที่ยง พบว่ามีการทวนซ้ำได้ มีความเที่ยงจากการเปลี่ยนวันวิเคราะห์ เครื่องมือและนักวิเคราะห์ ผลการทดสอบได้ค่า %RSD อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือไม่มากกว่า 2.0 แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถทวนซ้ำได้และมีความเที่ยง

การทดสอบความคงสภาพของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง พบว่ามีความคงสภาพนาน 24 ชั่วโมง การทดสอบความคงทนของวิธีพบว่าการเปลี่ยนคอลัมน์ สัดส่วน ความเป็นกรด-ด่างและอัตราการไหลของสารละลายตัวพา ไม่มีผลกระทบต่อระบบ ซึ่งพิจารณาจากประสิทธิภาพของการแยก (theoretical plates) และรูปร่าง

ของพีค (tailing factor มีค่าไม่เกิน 2.0) และจากผลการวิเคราะห์ปริมาณเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมในรูปแบบยาฉีดในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ได้ผลการทดสอบที่มีค่า %RSD ไม่เกิน 2.0 เป็นการยืนยันว่าเมื่อสภาวะของระบบโครมาโทกราฟีมีการเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อยจะไม่กระทบต่อผลวิเคราะห์ แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความทนต่อสภาวะที่เปลี่ยนแปลง

การตรวจสอบขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณของเซฟเพอราโซน มีค่าเท่ากับ 0.005 และ 0.014 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และซัลแบคแทม พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.0025 และ 0.0075 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สรุป

วิธีวิเคราะห์เซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมในรูปแบบยาฉีด ด้วย HPLC ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณเซฟเพอราโซนและซัลแบคแทมในรูปแบบยาฉีดได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ มีความจำเพาะเจาะจงต่อตัวยาสำคัญ และใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์น้อย สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 10 อุบลราชธานี ในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพยาเพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคให้ได้รับโรคยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาและปลอดภัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางศุภวรรณ เกตุอินทร์ และนางสาวจริยา สุขผล ที่กรุณาให้คำปรึกษา และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 10 อุบลราชธานี ทุกคน ที่ให้การดำเนินงานสำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. ยุพิน สังวรินทะ, สุภีนันท์ อัญเชิญ, พยงค์ วณิกเกียรติ, นพมาศ วงศ์วิทย์เดชา, บรรณาธิการ. เกสร์วิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2543. หน้า 459-469.
2. Trivedi HK, Kshetri N, Patel MC. A Rapid, validated RP-HPLC method for the simultaneous determination of cleaning validation and cross-contamination of 12 beta-lactam compounds. *Sci Pharm* 2013; 81: 151-65.
3. ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2556. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 130 ตอนพิเศษ 126 ง (ลงวันที่ 30 กันยายน 2556).
4. งานบริการข้อมูลผลิตภัณฑ์สุขภาพผ่านอินเทอร์เน็ต. ผลิตภัณฑ์ยา. [ออนไลน์]. 2557 [สืบค้น 29 ธ.ค. 2557]; [5 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://fdaolap.fda.moph.go.th/logistics/drgdrug/Dserch.asp>.
5. Sreenivasulu E, Rani GT. Validated RP-HPLC method for simultaneous estimation of sulbactam and cefoperazone in bulk and pharmaceutical dosage form. *Int J Curr Res Chem Pharma Sci* 2014; 1(10): 60-7.
6. United States Pharmacopeia National Formulary (USP/NF). 36th ed. Validation of compendial procedures <1225>. Rockville, MD: The United States Pharmacopeia Convention; 2013. p. 983.
7. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). ICH Steering Committee; Nov 2005.
8. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Reviewer guidance: validation of chromatographic methods. Rockville, MD: FDA; Nov 1994.

Development and Validation of Analytical Method for the Assay of Cefoperazone and Sulbactam for Injection by High Performance Liquid Chromatography

Panida Rattananukul and Prachaporn Polsin

Regional Medical Science Center 10th, Department of Medical Sciences, Amphoe Mueang, Ubon Ratchathani 34000, Thailand

ABSTRACT The analytical method for Cefoperazone and Sulbactam for injection was developed using a reversed-phase high performance liquid chromatography. The stationary phase was Hypersil BDS C18 Column while the optimum mobile phase was 0.005 M Tetrabutylammonium hydroxide pH4.0 and acetonitrile (72:28), with a flow rate of 1.0 ml/min. and the detector wavelength at 230 nm. Method validation data showed a good specificity by separation of Cefoperazone and Sulbactam from the unknown degradation products. The linearity was found at the range of Cefoperazone concentrations between 0.0720 to 0.2160 mg/ml and 0.0750 to 0.2250 mg/ml of Sulbactam concentrations, with the correlation coefficient of 0.9999 and 1.0000 respectively. Mean percentage recoveries of Cefoperazone and Sulbactam were 99.4 (%RSD = 0.9) and 100.4 (%RSD = 0.4) respectively. The repeatability and precision varied from 0.0 to 1.0 %RSD. The method was rugged and robust to the variations of HPLC system tested including retention time, tailing factor and theoretical plates. The detection limit and the quantitation limit for Cefoperazone were 0.005 and 0.014 mg/ml and for Sulbactam were 0.0025 and 0.0075 mg/ml. The developed method is therefore suitable for assay of Cefoperazone and Sulbactam for injection.

Keywords: Cefoperazone and sulbactam for injection, method validation, reversed-phase high performance liquid chromatography