

วิธีวิเคราะห์ปริมาณโคลเบทาซอลโพรพิโอเนต ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยวิธี ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

นवलพรรณ ไพบูลย์ศรีนครา และนันทนา กลิ่นสุนทร

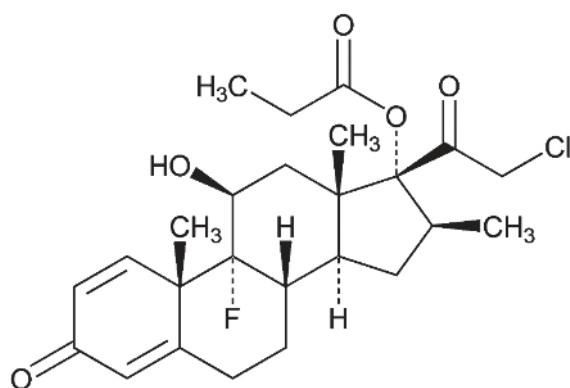
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง สมุทรสงคราม 75000

บทคัดย่อ คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณโคลเบทาซอลโพรพิโอเนต (clobetasol propionate) ในเครื่องสำอาง โดยการสกัดตัวอย่างด้วย methyl alcohol และตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณโดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง (HPLC) ด้วยคอลัมน์ Hypersil BDS C18 (250 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นระบบ gradient เริ่มแรกใช้อะซีโตนไนโตรส : น้ำ อัตราส่วนโดยปริมาตร 33:67 เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปรับอัตราส่วนโดยปริมาตร 50:50 ภายในเวลา 10 นาที และคงที่ที่อัตราส่วนนี้เป็นเวลา 15 นาที ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีด 10 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร จากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ พบว่ามีความจำเพาะเจาะจง โดยสาร clobetasol propionate มีค่า retention time เท่ากับ 30 นาที และไม่ถูกรบกวนจากสารอื่น มีความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับพื้นที่ใต้พีคตลอดช่วงความเข้มข้น 0.8 – 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9996 และมีความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารที่เติมในตัวอย่างกับความเข้มข้นที่ตรวจพบตลอดช่วง 3.2 – 480 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่า r เท่ากับ 0.9995 ขีดจำกัดของการตรวจพบเท่ากับ 0.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 3.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีความแม่นยำแสดงด้วยร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ในช่วง 90 – 94 ความเที่ยงในการวิเคราะห์วันเดียวกัน แสดงด้วย %RSD มีค่า 0.8 – 4.7 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ความเที่ยงของการวิเคราะห์ต่างวัน แสดงด้วย %RSD มีค่า 2.2 – 2.6 และพบว่าวิธีนี้มีค่าความไม่แน่นอนอนสัมพัทธ์ร้อยละ 7.7 ซึ่งได้นำวิธีที่พัฒนาและทดสอบแล้วนี้ไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ clobetasol propionate ในตัวอย่างครีมทาผิวในปี 2556 จำนวน 11 ตัวอย่าง และตรวจพบสาร clobetasol propionate ซึ่งเป็นสารห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอางทั้ง 11 ตัวอย่าง โดยพบในความเข้มข้น 8.0 – 449.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากผลการทดสอบสรุปได้ว่าวิธีนี้มีความเหมาะสมในการนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ clobetasol propionate ในเครื่องสำอางเพื่อประโยชน์ในการคุ้มครองผู้บริโภคให้มีความปลอดภัย

Accepted for publication, 15 June 2016

บทนำ

โคลเบทาซอลโพรพิโอเนต (clobetasol propionate) เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่ม glucocorticoids (corticosteroids) มีลักษณะเป็นผงสีขาว น้ำหนักโมเลกุล 467.0 ไม่ละลายในน้ำแต่สามารถละลายได้ในอะซีโตน (acetone) และไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) และละลายได้บ้างในเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol)⁽¹⁾ มีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 1⁽²⁾



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ clobetasol propionate

clobetasol propionate จัดเป็นยาสเตียรอยด์ที่ภายนอกชนิดรุนแรงสูง ใช้อย่างกว้างขวางในการรักษาอาการทางผิวหนัง ใช้รักษาผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน โรคผื่นผิวหนังที่ต่อยาเตียรอยด์ชนิดรุนแรงปานกลาง หรือใช้ในบริเวณผิวหนังที่หนา เช่น ที่ขาหรือสันเท้า แต่เมื่อใช้ไปนานๆ จะทำให้ผิวหนังบางลง เกิดจ้ำเลือดง่าย หรือมีรอยแตกที่ผิวหนัง เป็นต้น ปริมาณที่ใช้ในยาคือร้อยละ 0.05 สำหรับในเครื่องสำอางได้กำหนดให้สารกลุ่ม Glucocorticoids (Corticosteroids) เป็นสารห้ามใช้ ซึ่งรวมถึง clobetasol propionate ด้วย⁽³⁾ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดวัตถุที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง ในราชกิจจานุเบกษาลงวันที่ 12 พฤษภาคม 2551 ลำดับที่ 300

วิธีวิเคราะห์ clobetasol propionate ในผลิตภัณฑ์ทางตำยา (pharmaceutical formulations) โดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ด้วยระบบ reversed phase โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 และสารละลายตัวพา (mobile phase) ประกอบด้วยน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทิลแอลกอฮอล์ (methyl alcohol) อะซีโตนไนไตรล์ (acetonitrile) หรือสารละลายอินทรีย์และบัฟเฟอร์ (buffer) ในอัตราส่วนต่างๆ^(4, 5, 6, 7) มีรายงานว่า การตรวจหา clobetasol propionate ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยใช้คอลัมน์ Purospher-Lichracart ขนาด 5 ไมโครเมตร สารละลายตัวพา (mobile phase) ประกอบด้วยส่วนผสมระหว่างอะซีโตนไนไตรล์และน้ำ อัตราส่วน 40:60 โดยปริมาตร และเครื่องตรวจวัดชนิดยูวีที่ความยาวคลื่น 237 นาโนเมตร จะได้ค่าร้อยละของการกลับคืนมากกว่าร้อยละ 94 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกินร้อยละ 3⁽⁸⁾ คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ clobetasol propionate ในเครื่องสำอางชนิดครีมทาผิวโดยเทคนิค HPLC ด้วยระบบสารละลายตัวพาแบบ gradient ที่สามารถวิเคราะห์สารผสมของสเตียรอยด์ได้พร้อมกัน 10 ชนิด และ clobetasol propionate สามารถแยกออกจากสารอื่นได้ โดยที่ไม่ถูกรบกวน รวมถึงการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี โดยศึกษาความจำเพาะเจาะจง ความเป็นเส้นตรง และช่วงของการวิเคราะห์ ความแม่นยำ ความเที่ยง ชัดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณโดยตั้งเป้าหมาย

ให้ค่าร้อยละของการคืนกลับ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์สำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ clobetasol propionate ในเครื่องสำอาง และใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างครีมทาผิวที่ได้รับจากสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเพชรบุรีในปี พ.ศ. 2556 เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังด้านคุ้มครองผู้บริโภค

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐาน : clobetasol propionate ผลิตภัณฑ์ของ Sigma-aldrich ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 98
สารมาตรฐานกลุ่มสเตียรอยด์ ได้แก่ beclomethasone, cortisone acetate และ triamcinolone ผลิตภัณฑ์ของ Sigma-aldrich ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 99, fludrocortisone acetate และ hydrocortisone ผลิตภัณฑ์ของ Sigma-aldrich ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 98, methylprednisolone ผลิตภัณฑ์ของ ASEAN reference substance ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.40, betamethasone ผลิตภัณฑ์ของ ASEAN reference substance ความบริสุทธิ์ร้อยละ 100.69, prednisolone ผลิตภัณฑ์ของ ASEAN reference substance ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.65, dexamethasone ผลิตภัณฑ์ของ DMSc reference standard ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5

สารเคมี : acetonitrile (HPLC grade) ผลิตภัณฑ์ของ RCI Labscan, methyl alcohol (HPLC grade) ผลิตภัณฑ์ของ Merck และน้ำปราศจากไอออน

เครื่องมือและอุปกรณ์

High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) เครื่องชั่งความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม และ 0.01 มิลลิกรัม, เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge), อ่างน้ำความถี่สูง (ultrasonic bath), คอลัมน์ชนิด reversed phase Hypersil BDS C18 (250 มิลลิเมตร × 4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร), หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร, centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร, กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1, nylon syringe filter 0.45 ไมโครเมตร และขวด HPLC vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

ตัวอย่าง

1. ตัวอย่างครีมทาผิวที่ตรวจวิเคราะห์แล้วว่าไม่มี clobetasol propionate ใช้เป็น sample blank สำหรับการทดสอบความถูกต้องของวิธี และในส่วนของ การวิเคราะห์ปริมาณ clobetasol propionate
2. ตัวอย่างครีมทาผิวที่ส่งมาจากสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเพชรบุรีจำนวน 11 ตัวอย่าง แบ่งเป็นครีม 4 ประเภท ได้แก่ ครีมแบ่งขายใส่กระปุกที่มีฉลากระบุสรรพคุณใช้แล้วผิวขาว ลดจุดต่างดำ ครีมแบ่งขายใส่กระปุกที่ไม่มีฉลาก ครีมที่มีฉลากภาษาจีน และครีมที่มีฉลากภาษาจีนที่ข้างกล่องมีตัวย่อ OTC ซึ่งมีข้อมูลว่าใช้เป็นส่วนผสมของครีมที่ผสมใช้กันเองในกลุ่มนักเรียน

สภาวะของเครื่อง HPLC

HPLC column : Hypersil BDS C18 (250 มิลลิเมตร × 4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร)

Mobile phase : Acetonitrile : น้ำ ใช้ระบบ gradient ดังนี้

เวลา (นาที)	Acetonitrile : น้ำ (โดยปริมาตร)
0	33 : 67
10	33 : 67
20	50 : 50
35	50 : 50
35.1	33 : 67
45	33 : 67

Flow rate : 1 มิลลิลิตรต่อนาที
 Column oven : 35 องศาเซลเซียส
 Injection volume : 10 ไมโครลิตร
 Detector : ตั้งค่าการดูดซับคลื่นแสงสูงสุดที่ 240 นาโนเมตร
 Run time : 45 นาที

วิธีวิเคราะห์

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน clobetasol propionate stock solution

ซึ่งสารมาตรฐาน clobetasol propionate 0.025 กรัม ละลายใน methyl alcohol ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐาน clobetasol propionate ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน สำหรับกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน clobetasol propionate ความเข้มข้น 0.8, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางจากสารละลายมาตรฐาน (stock solution)

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ซึ่งตัวอย่าง 2.5 กรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร เติม methyl alcohol 10.00 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำไป sonicate ใน ultrasonic bath 10 นาที หลังจากนั้นถ่ายใส่ centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้ว centrifuge ที่ความเร็ว 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นกรองผ่าน nylon syringe filter 0.45 ไมโครเมตร เก็บใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณ clobetasol propionate ที่พบ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ได้จากกราฟมาตรฐาน} \times \text{ปริมาตรของตัวทำละลาย}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

ดำเนินการตามวิธีของ Tavernier, Loose และ Bockstaele ดังนี้⁽⁹⁾

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity)

เตรียมสารละลายผสมของสารสเตียรอยด์ 10 ชนิด ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้แก่ triamcinolone (TAL), prednisolone (PNL), hydrocortisone (HCS), methylprednisolone (MPS), betamethasone (BTS), dexamethasone (DXS), beclomethasone (BCS), fludrocortisone (FCA), cortisone acetate (CSA) และ clobetasol propionate (CP) ฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อศึกษาความแตกต่างของ retention time ของสารแต่ละชนิด ซึ่งสาร clobetasol propionate จะแยกออกจากสารอื่นโดยไม่ถูกรบกวนจากสารอื่น

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

ฉีดสารละลายมาตรฐานสำหรับกราฟมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.8, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เข้าเครื่อง HPLC สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน clobetasol propionate กับค่าพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) จะต้องไม่น้อยกว่า 0.995

ความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ (Method linearity)

ทดสอบโดยวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน clobetasol propionate (spike sample) ความเข้มข้น 3.2, 8, 15, 30, 60, 120, 240 และ 480 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่พบ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ซึ่งต้องใกล้เคียง 1

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ฉีดสารละลายตัวอย่างเตรียมโดยเติมสารละลายมาตรฐาน clobetasol propionate ใน sample blank ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้ขนาดสัญญาณเป็น 3 เท่าของขนาดสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio) วิเคราะห์ซ้ำ 7 ครั้ง คำนวณค่า LOD เป็นความเข้มข้นของ clobetasol propionate ต่อน้ำหนักตัวอย่าง

ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

วิเคราะห์ตัวอย่างโดยเติมสารละลายมาตรฐาน clobetasol propionate ใน sample blank ที่ระดับความเข้มข้นที่ให้ขนาดสัญญาณเป็น 10 เท่าของขนาดสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio) วิเคราะห์ซ้ำ 10 ครั้ง คำนวณร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) ต้องอยู่ในช่วงร้อยละ 80 - 110 และร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ต้องไม่เกินร้อยละ 8.8 คำนวณค่า LOQ เป็นความเข้มข้นของ clobetasol propionate ต่อน้ำหนักตัวอย่าง

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

การทดสอบความเที่ยงของระบบโครมาโทกราฟ โดยฉีดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายตัวอย่างฉีดซ้ำ 10 ครั้ง คำนวณร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของค่าพื้นที่ใต้พีคไม่ควรเกินร้อยละ 5

ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของการวิเคราะห์ในช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรงโดยวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเติมสารมาตรฐาน clobetasol propionate ใน sample blank ที่ระดับ LOQ, $7.5 \times \text{LOQ}$ และ $30 \times \text{LOQ}$ ได้แก่ที่ความเข้มข้น 3.2, 24 และ 96 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ละความเข้มข้นทดสอบ 10 ซ้ำ คำนวณร้อยละ

ของการคืนกลับ (%Recovery) ต้องอยู่ในช่วงร้อยละ 80 - 110, ร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ต้องไม่เกิน 8.9, 6.5 และ 5.3 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่า predicted %RSD_r ตาม Horwitz's equation

ทดสอบความเที่ยงของการวิเคราะห์ในช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรงต่างวัน (Intermediate precision) โดยเติมสารมาตรฐานใน sample blank ที่ความเข้มข้น 24 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำการวิเคราะห์วันละ 10 ซ้ำ เป็นเวลา 3 วันต่อเนื่องกัน ร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ต้องไม่เกิน 6.5 ซึ่งเป็นค่า predicted %RSD_r ตาม Horwitz's equation

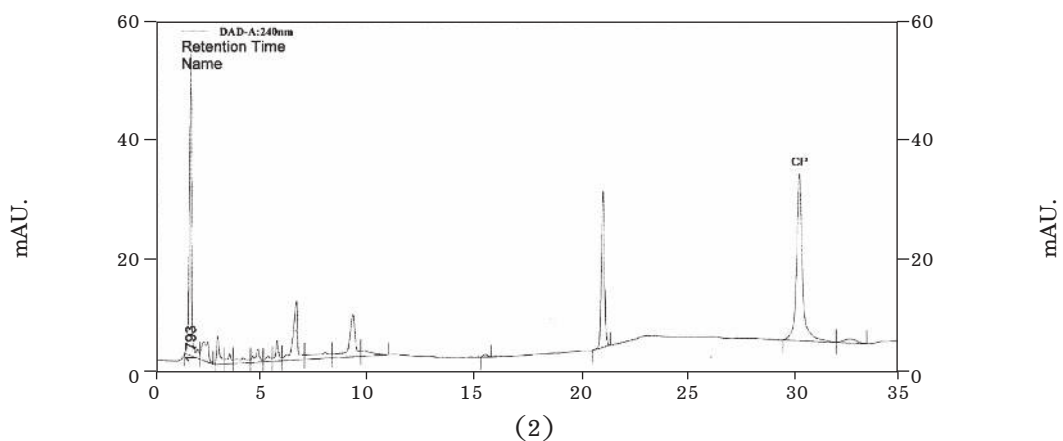
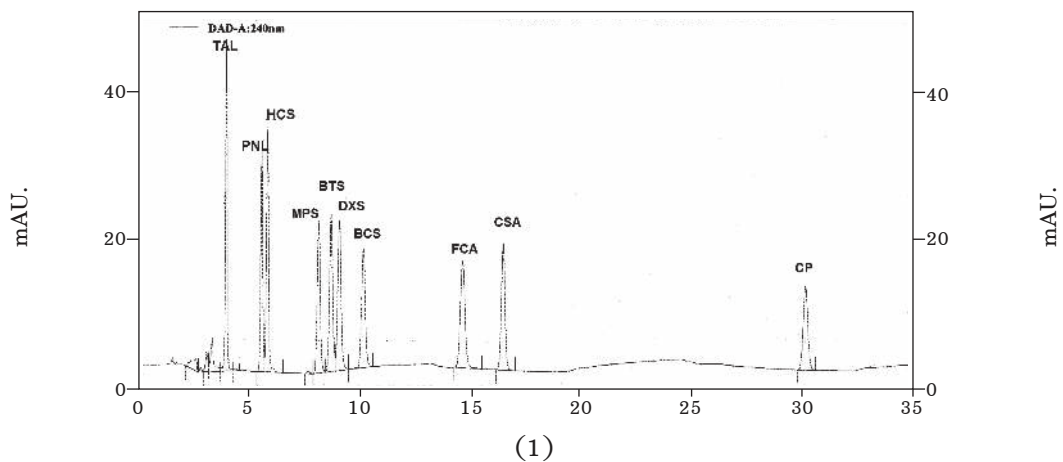
การประเมินค่าความไม่แน่นอน (Measurement uncertainty)

ทำการประเมินค่าความไม่แน่นอนตามวิธีการประเมินค่าความไม่แน่นอน⁽¹⁰⁾ โดยคำนวณค่าความไม่แน่นอนรวม โดยรวมความไม่แน่นอนมาตรฐานจากองค์ประกอบต่างๆ และคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายโดยใช้ $k = 2$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผล

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง

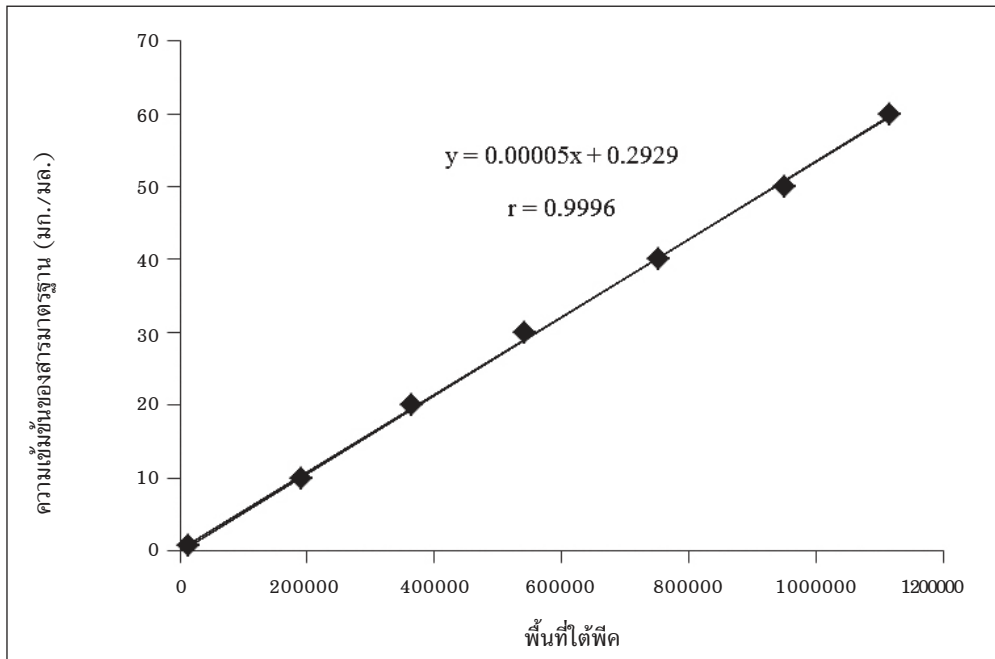
จากการฉีดสารละลายผสมของสารสเตียรอยด์ 10 ชนิด และสารละลายตัวอย่างภายใต้สภาวะของ HPLC ที่พัฒนาพบว่าสาร clobetasol propionate ให้ค่า retention time 30 นาที โดยไม่มีการรบกวนของสารอื่น (ภาพที่ 2)



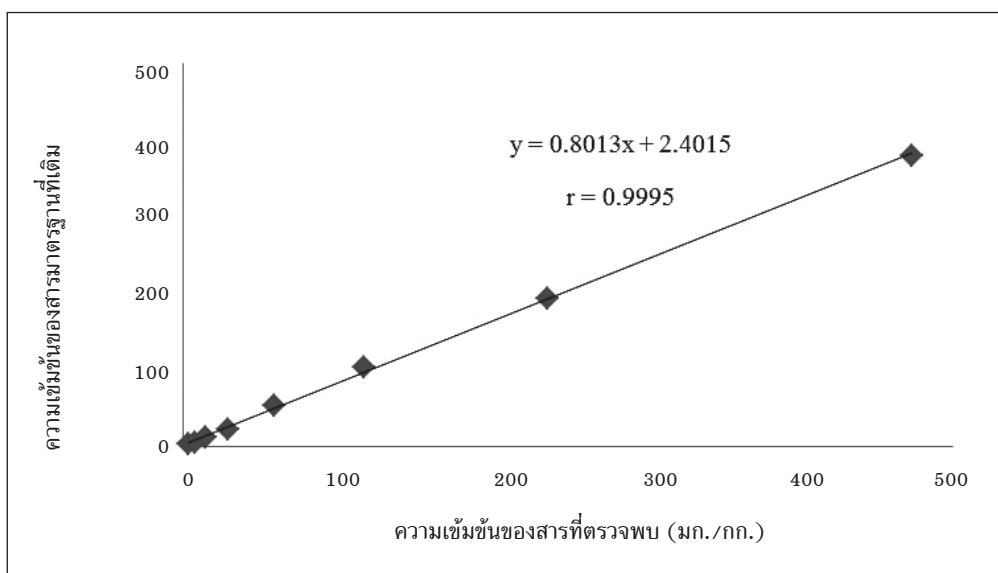
ภาพที่ 2 Chromatogram ของ 1) สารละลายสเตียรอยด์ 10 ชนิด 2) สารละลายตัวอย่าง

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์

พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน clobetasol propionate กับพื้นที่ใต้พีคมีลักษณะเป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้น 0.8 ถึง 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม โดยมีค่า $r = 0.9996$ และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร clobetasol propionate ที่เติมกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่พบมีความเป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้น 3.2 ถึง 480 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่า $r = 0.9995$ (ภาพที่ 3)



(1)



(2)

ภาพที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง 1) ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน clobetasol propionate กับพื้นที่ใต้พีค 2) ความเข้มข้นของ clobetasol propionate ที่เติมกับความเข้มข้นของ clobetasol propionate ที่ตรวจพบ

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ

ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) มีค่าเท่ากับ 0.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 3.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) เฉลี่ยร้อยละ 90.3 และมีค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 4.7

การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง

จากการฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง 10 ซ้ำ พบว่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของค่าพื้นที่ใต้พีคเท่ากับ 0.48 และ 0.96 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) และพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง

สารละลายมาตรฐาน 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		สารละลายตัวอย่าง	
ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีค	ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีค
1	321702	1	381370
2	322989	2	379324
3	324225	3	382737
4	324419	4	378122
5	323514	5	383753
6	324368	6	388916
7	323986	7	383670
8	326318	8	383609
9	326675	9	379818
10	322550	10	388913
%RSD	0.48	%RSD	0.96

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (spiked sample) ที่ระดับ LOQ, 7.5 × LOQ และ 30 × LOQ ได้แก่ ที่ความเข้มข้น 3.2, 24 และ 96 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ วิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ พบว่าความแม่นยำที่ประเมินจากร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) เฉลี่ยทั้ง 3 ระดับ อยู่ในช่วง 90 – 94 และความเที่ยง (precision) ที่ประเมินด้วยร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) มีค่าร้อยละ 4.7, 3.3 และ 0.8 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ความแม่นยำ และความเที่ยง ของวิธีวิเคราะห์เครื่องสำอาง (ครีมทาผิว) เมื่อเติมสารมาตรฐาน clobetasol propionate ที่ระดับ 3.2 มก./กก. (LOQ), 24 มก./กก. (7.5 × LOQ) และ 96 มก./กก. (30 × LOQ)

Spike level (มก./กก.)	%Recovery (n=10)	%RSD
	Mean ± SD	
3.2	90 ± 4	4.7
24	94 ± 3	3.3
96	90 ± 1	0.8

การทดสอบความเที่ยงของการวิเคราะห์ต่างวัน (Intermediate precision) โดยวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ระดับ $7.5 \times \text{LOQ}$ ได้แก่ ที่ความเข้มข้น 24 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำการวิเคราะห์ 3 วันต่อเนื่องกัน วันละ 10 ซ้ำ พบว่าความเที่ยง (precision) ที่ประเมินด้วยร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) อยู่ในช่วง 2.2 – 2.6 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความเที่ยงของการวิเคราะห์ต่างวัน โดยเติมสาร clobetasol propionate ในตัวอย่างที่ระดับ $7.5 \times \text{LOQ}$ ทำการวิเคราะห์ 3 วันต่อเนื่องกัน วันละ 10 ซ้ำ

การทดสอบ ระหว่างวัน	ปริมาณ clobetasol propionate (มก./กก.)										เฉลี่ย	%RSD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
วันที่ 1	22.0	23.1	22.6	21.8	22.9	22.4	22.6	23.1	23.1	22.0	22.6	2.2
วันที่ 2	22.9	21.9	21.9	22.3	22.1	21.5	21.7	21.8	23.2	22.2	22.2	2.4
วันที่ 3	21.4	22.3	23.5	22.9	22.6	22.2	22.6	22.6	21.8	22.8	22.5	2.6

การสำรวจปริมาณ clobetasol propionate ในตัวอย่างเครื่องสำอาง

ผลวิเคราะห์ปริมาณ clobetasol propionate ในตัวอย่างครีมที่ส่งมาจากสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเพชรบุรี จำนวน 11 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์พบ clobetasol propionate ในตัวอย่างทุกตัวอย่าง โดยมีปริมาณอยู่ในช่วง 8.0 – 449.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ clobetasol propionate ในตัวอย่างครีมที่ส่งมาจากสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเพชรบุรี จำนวน 11 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	C1	C2	D1	D2
ปริมาณที่พบ (มก./กก.)	8.0	20.3	27.7	87.7	124.7	111.7	17.4	71.0	59.1	449.8	345.6

หมายเหตุ : A คือ ครีมแบ่งขายใส่กระปุกที่มีฉลากระบุสรรพคุณใช้แล้วผิวขาว ลดจุดต่างดำ
B คือ ครีมแบ่งขายใส่กระปุกที่ไม่มีฉลาก
C คือ ครีมที่มีฉลากภาษาจีน
D คือ ครีมที่มีฉลากภาษาจีนที่ข้างกล่องมีตัวย่อ OTC ซึ่งมีข้อมูลว่าใช้เป็นส่วนผสมของครีมที่ผสมใช้กันเองในกลุ่มนักเรียน

การประเมินค่าความไม่แน่นอน

ค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ โดยใช้องค์ประกอบของความไม่แน่นอนจากการชั่งน้ำหนักของตัวอย่างและสารมาตรฐาน การเตรียมสารละลายโดยใช้เครื่องแก้ว การสร้างกราฟมาตรฐาน repeatability และ %recovery คำนวณค่าความไม่แน่นอนรวมและความไม่แน่นอนขยายโดยใช้ $k=2$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ได้ค่าความไม่แน่นอนขยายสัมพัทธ์ร้อยละ 15.51

วิจารณ์

วิธีวิเคราะห์ clobetasol propionate ในเครื่องสำอางครีมทาผิว มีวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ง่ายไม่ซับซ้อน โดยอาศัยการสกัด clobetasol propionate ออกจากเครื่องสำอางทาผิวด้วย methyl alcohol แต่เนื่องจากเครื่องสำอางมีส่วนประกอบของไขมันซึ่งสามารถละลายใน methyl alcohol ได้บางส่วน จึงทำให้พบตะกอนของไขมันในสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมแล้ว ดังนั้นจึงควรตั้งสารละลายทิ้งไว้ให้เกิดการตกตะกอนในตู้เย็นเป็นเวลา 1 คืน ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อป้องกันไม่ให้ column อุดตัน และสาร clobetasol propionate มีความไวต่อแสง จึงต้องใช้เครื่องแก้วสีชาในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

สภาวะของระบบ HPLC ที่พัฒนาใช้ระบบสารละลายตัวพาแบบ gradient โดยใช้ระยะเวลา (run time) เท่ากับ 45 นาที มีความเหมาะสมในการแยกสาร clobetasol propionate ออกจากสารในกลุ่มสเตียรอยด์อื่นอีก 9 ชนิด โดยสาร clobetasol propionate มีค่า retention time เท่ากับ 30 นาที แสดงถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐานสากล ได้แก่ ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ ซึ่งมีค่า r เท่ากับ 0.9996 ตลอดช่วงความเข้มข้น 0.8 – 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 90 – 94 ซึ่งอยู่ในช่วงยอมรับคือร้อยละ 80 – 110 ค่า %RSD ของพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างเท่ากับ 0.48 และ 0.96 ตามลำดับ ค่า %RSD ของการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกันเท่ากับร้อยละ 4.7, 3.3 และ 0.8 ที่ระดับ 3.2, 24 และ 96 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งไม่เกินค่า predicted %RSD_r ตาม Horwitz's equation คือ ไม่เกินร้อยละ 8.8, 6.5 และ 5.3 ตามลำดับ และพบว่าไม่มีความแตกต่างของผลวิเคราะห์ต่างวันเป็นเวลา 3 วัน โดยมีค่า %RSD อยู่ในช่วง 2.2 – 2.6 ซึ่งไม่เกินค่า predicted %RSD_r ตาม Horwitz's equation คือ ไม่เกินร้อยละ 6.5 สำหรับค่า LOD และ LOQ พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.8 และ 3.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จากการประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ได้ค่าความไม่แน่นอนรวมสัมพัทธ์ร้อยละ 7.7 จากการสำรวจปริมาณสาร clobetasol propionate ในเครื่องสำอางครีมทาผิวซึ่งได้รับจากสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเพชรบุรีรวม 11 ตัวอย่าง พบว่าตรวจพบ clobetasol propionate ทุกตัวอย่าง คือ ไม่เข้ามาตรฐานร้อยละ 100 โดยมีปริมาณอยู่ในช่วง 8.0 – 449.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำเมื่อเทียบกับยาสเตียรอยด์ใช้ภายนอก โดยทั่วไปใช้ในปริมาณร้อยละ 0.05 ทั้งนี้สาร clobetasol propionate จัดเป็นสารในกลุ่ม glucocorticoids ซึ่งเป็นสารห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอางลำดับที่ 300 ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดวัตถุห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง

สรุป

วิธีวิเคราะห์ clobetasol propionate ในเครื่องสำอางครีมทาผิวนี้พบว่ามีคุณลักษณะเฉพาะอยู่ในเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐานสากลสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณได้สะดวก มีวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ง่ายไม่ซับซ้อน และยังสามารถวิเคราะห์สารสเตียรอยด์ในเครื่องสำอางครีมทาผิวได้พร้อมกันหลายชนิด เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารกลุ่มสเตียรอยด์ในเครื่องสำอาง เพื่อเฝ้าระวังความปลอดภัยของครีมทาผิวที่มีส่วนผสมของ clobetasol propionate เพื่อการคุ้มครองผู้บริโภคและการตรวจหาปริมาณเพื่อการศึกษาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม ที่ได้ให้คำแนะนำ และสนับสนุนงานวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ดี และขอขอบคุณ สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเพชรบุรีที่ได้ให้ความร่วมมือในการให้ข้อมูลเกี่ยวกับตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างส่งตรวจ

เอกสารอ้างอิง

1. Fontana MC, Bastos MO, Beck RCR. Development and validation of a fast RP-HPLC method for the determination of clobetasol propionate in topical nanocapsule suspensions. *J Chromatogr Sci* 2010; 48: 637-40.
2. Modi P, Vairale A. Cleaning method: a validated HPLC method for determination of clobetasol propionate residues on the surface of manufacturing equipment. *Int J Anal Bioanal Chem* 2012; 2(2):133-8.
3. พระราชบัญญัติเครื่องสำอาง พ.ศ. 2535 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องกำหนดวัตถุที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 125 ตอนพิเศษ 80 ง (ลงวันที่ 12 พฤษภาคม 2551).
4. Dyderski S, Grzeskowiak E, Szalek E, Mrzyglod A. Pharmaceutical availability of clobetasol-17-propionate from cream and ointment. *Acta Pol Pharm* 2001; 58(6): 435-8.
5. Fang JY, Shen KL, Huang YB, Wu PC, Tsai YH. Evaluation of topical application of clobetasol 17-propionate from various cream bases. *Drug Dev Ind Pharm* 1999; 25(1): 7-14.
6. Yateen S, Dighe KS. High performance liquid chromatographic method for clobetasol propionate in dosage forms. *Indian Drugs* 1989; 27(2): 132-3.
7. Badilli U, Amasya G, Özkan S, Tarimci N. Simultaneous determination of clobetasol propionate and calcipotriol in a novel fixed dose emulgel formulation by LC-UV. *Chromatographic* 2013; 76(3): 133-40.
8. Gagliardi L, Orsi DD, Manna F, Tonelli D. HPLC determination of clobetasol propionate in cosmetic products. *J Liq Chromatogr R T* 2000; 23(3): 355-62.
9. Tavernier I, De Loose M, Van Bockstaele E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trac-Trends Anal Chem* 2004; 23(8): 535-52.
10. EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. United Kingdom, Eurachem; 2012.

Determination of Clobetasol Propionate in Cosmetic Products by High Performance Liquid Chromatography

Nuanpan Paiboonsrinakra and Nantana Klinsunthorn

Regional Medical Sciences Center 5th Samut Songkhram, Department of Medical Sciences, Amphor Muang, Samut Songkhram 75000, Thailand.

ABSTRACT The method for determination of clobetasol propionate in cosmetic products was developed. Sample was extracted from cosmetic product by methyl alcohol. Then, the extracted compound was analyzed by HPLC using Hypersil BDS C18 column (250 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm) with a 1.0 ml/min flow rate of a (v/v) gradient elution of acetonitrile; water mobile phase starting from 33:67 for 10 minutes and then using gradient to 50:50 within 10 minutes and maintaining at 50:50 for 15 minutes, a 10 μl sample injection, and PDA detection monitoring at 240 nm. The results of method validation showed that the method was specific to the determination of clobetasol propionate, clobetasol propionate was separated with retention time of 30 minute and was not disturbed by other substances. The method was linear between concentration of standard solution and peak area over the range of 0.8 – 60 μg/ml with correlation coefficient 0.9996 and the correlation between concentration of standard adding to sample and detection concentration over the range 3.2 – 480 mg/kg. with correlation coefficient 0.9995. The limit of detection was 0.8 mg/kg. and limit of quantitation was 3.2 mg/kg. Accuracy was analyzed by the recovery and found in the range of 90 – 94%. The precision was demonstrated by %RSD in acceptable range of 0.8 – 4.7 with the acceptable, intermediate precision was shown by %RSD in acceptable range of 2.2 – 2.6. The relative uncertainty was 7.7%. In 2013, this validated method was used for quantitative analysis of clobetasol propionate in 11 lotion samples. The results showed that clobetasol propionate was detected in every sample in range 8.0 – 449.8 mg/kg. In conclusion, this method was suitable for analysis of clobetasol propionate in cosmetic products for consumer protection.

Key word: clobetasol propionate, High Performance Liquid Chromatography, cosmetic