

# การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจพิสูจน์ เอกลักษณ์สารช่วยทำให้ผิวขาว 5 ชนิด ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

จิวรรณภรณ์ ขวัญกิจประณีติ และจิราณัฐ แจ่มทวีกุล

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

**บทคัดย่อ** สารช่วยทำให้ผิวขาวบางชนิดที่พบในยาฉีดและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารอาจเป็นสาเหตุให้เกิดผลข้างเคียงที่อันตรายถึงชีวิตต่อผู้ใช้ได้ คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์สารช่วยทำให้ผิวขาว 5 ชนิด ได้แก่ tranexamic acid, glutathione, acetylcysteine, ascorbic acid และ niacin ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ซึ่งใช้เวลาเพียง 10 นาที โดยใช้คอลัมน์ชนิด Mightysil C18 สารละลายตัวพา ประกอบด้วย 0.05% trifluoroacetic acid, acetonitrile และ methanol ในอัตราส่วน 97: 2: 1 โดยปริมาตร ได้ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบของ tranexamic acid, glutathione, acetylcysteine, ascorbic acid และ niacin เป็น 2.0, 0.48, 0.12, 0.10 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และยืนยันตรวจพิสูจน์ด้วย HPLC ระบบที่ 2 กับสารช่วยทำให้ผิวขาว 3 ชนิด ที่เป็นสารที่มีค่าดูดกลืนแสงใกล้เคียงค่า UV cutoff ของ methanol และ acetonitrile ซึ่งเป็นส่วนประกอบในสารละลายตัวพา ได้แก่ tranexamic acid, glutathione และ acetylcysteine โดยใช้คอลัมน์ชนิด Zorbax Eclipse XDB C18 สารละลายตัวพาประกอบด้วย บัฟเฟอร์ pH 2.5 และ methanol ในอัตราส่วน 45: 55 โดยปริมาตร พบค่าขีดจำกัดของการตรวจพบใน HPLC ระบบที่ 2 ของ tranexamic acid, glutathione และ acetylcysteine เท่ากับ 2.0, 0.16 และ 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้ง 2 วิธีผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธี ทั้งนี้ในปีงบประมาณ 2562 ได้นำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใช้ตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์สารช่วยทำให้ผิวขาวทั้งในยาฉีดและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร จำนวน 73 ตัวอย่าง ตรวจพบสารช่วยทำให้ผิวขาว จำนวน 22 ตัวอย่าง (30.1%) วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์สารทั้ง 5 ชนิด ได้ด้วยความรวดเร็ว ช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์

**คำสำคัญ:** สารช่วยทำให้ผิวขาว, การทดสอบความใช้ได้ของวิธี, การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์

Corresponding author E-mail:

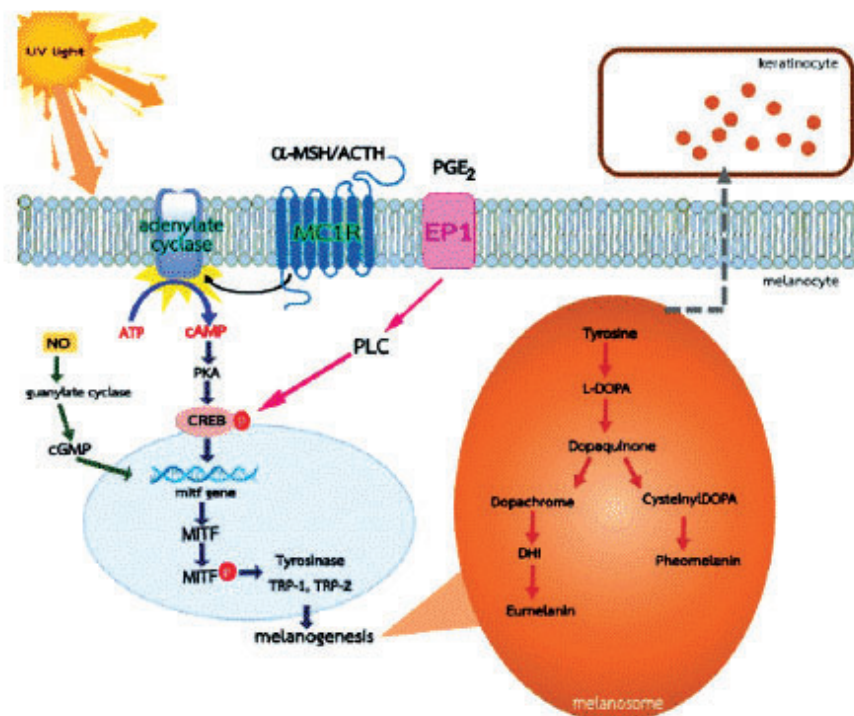
Received: 18 November 2020

Revised: 29 March 2021

Accepted: 17 May 2021

## บทนำ

ปัจจุบันผู้บริโภคหันมาสนใจต่อความงามของผิวพรรณกันมากขึ้น โดยเห็นได้จากจำนวนคลินิกเสริมความงามเพิ่มมากขึ้น และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีสรรพคุณช่วยให้ผิวขาวกระจ่างใส ที่จำหน่ายในท้องตลาดเป็นจำนวนมาก มีการศึกษาหลายงานวิจัยเกี่ยวกับสีผิวของคนเราทำไมจึงแตกต่างกัน และค้นพบว่ากุญแจสำคัญ คือ เม็ดสีเมลานิน กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน เรียกว่า melanogenesis เกิดจากรังสียูวีเป็นตัวกระตุ้นเซลล์ melanocytes ทำให้เอนไซม์ tyrosinase ทำงานมากขึ้น เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน L-tyrosine เป็น L-DOPA และเปลี่ยนต่อไปเป็น DOPA Aquinone จากนั้นจึงสังเคราะห์ต่อเป็นเมลานิน ซึ่งมีด้วยกันสองชนิด ได้แก่ eumelanin และ pheomelanin ดังแสดงในภาพที่ 1 จากนั้นเม็ดสีเมลานินเหล่านี้จะถูกขนส่งไปเก็บไว้ยังเมลานโซม และถูกขนส่งไปตามเดนไดรต์เพื่อส่งเม็ดสีเหล่านี้ไปที่เซลล์ keratinocytes ซึ่งอยู่ใต้ชั้นผิวหนัง นอกจากนี้รังสียูวียังจะไปกระตุ้นการสังเคราะห์ plasmin ในเซลล์ keratinocytes ให้เพิ่มมากขึ้น ซึ่งทำให้หลังสารหลายชนิดออกมา ได้แก่ prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ),  $\alpha$ -melanocyte stimulating ( $\alpha$ -MSH) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่จะไปกระตุ้นการสร้างเมลานินผ่าน cAMP ทำให้มีการสร้างเมลานินมากขึ้น โดยปกติผิวหนังของคนเราจะมีการผลัดเซลล์ผิวประมาณ 28-39 วัน จากนั้นจะสร้างเซลล์ผิวหนังขึ้นมาใหม่เพื่อให้เกิดความกระจ่างใสของผิว ถ้าหากไม่เป็นไปตามรอบนั้นจะทำให้เกิดความหมองคล้ำขึ้น<sup>(1)</sup>



ภาพที่ 1 กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินภายในผิวหนัง

ผู้วิจัยเล็งเห็นว่ากุญแจสำคัญที่เกี่ยวกับการสร้างเม็ดสีเมลานิน คือ เอนไซม์ tyrosinase ซึ่งพบว่ามีสารสำคัญหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน ทั้งนี้กลไกการควบคุมให้ร่างกายมีการสร้างเม็ดสีเมลานินลดลงมิได้หลายกลไก ดังแสดงในตารางที่ 1<sup>(1)</sup> แต่จากตัวอย่างยาฉีดเพื่อช่วยทำให้ผิวขาวที่ใช้ตามคลินิกเสริมความงาม และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารช่วยทำให้ผิวขาวในท้องตลาดที่ได้รับจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และยาอรรคคิต จากสถานตำราจ มักรวบรวมสารช่วยทำให้ผิวขาวต่าง ๆ ดังนี้ tranexamic acid, glutathione, N-acetyl-L-cysteine, ascorbic acid และ niacin โดยมีรายละเอียด ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานิน<sup>(1)</sup>

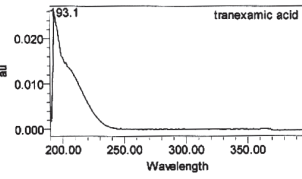
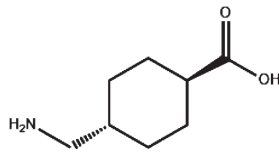
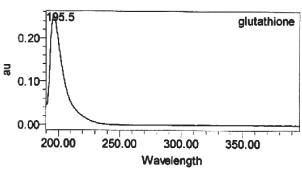
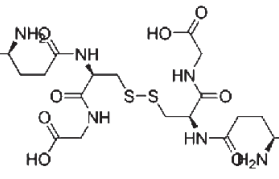
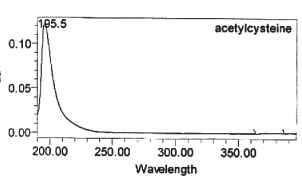
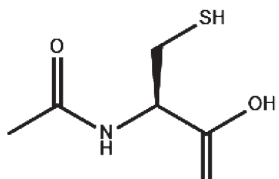
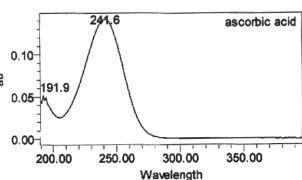
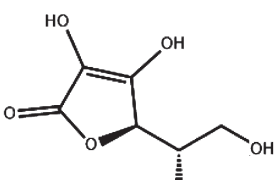
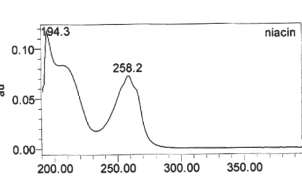
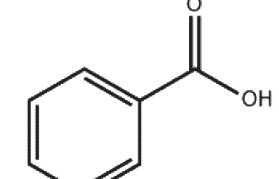
| กลไกการออกฤทธิ์                                                                             | สาร                                                                                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| กระบวนการยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ไทโรซิเนส<br>(Inhibition of tyrosinase transcription)   | Resveratrol, Tretinoin, Retinol, Retinaldehyde, Glucosamine                                                                                   |
| ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส<br>(Tyrosinase inhibition)                               | Glutathione, L-Cysteine, Hydroquinone, Arbutin, Azelaic acid, Kojic acid, Ellagic acid, Resveratrol, Oxyresveratrol, Vitamin C, Mulberoside F |
| ยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน<br>(Inhibit plasmin cause to inhibit melanogenesis)      | Tranexamic acid                                                                                                                               |
| เปลี่ยนการผลิตเมลานินเป็นฟีโอเมลานิน<br>(Switching production of eumelanin to phaeomelanin) | Glutathione, L-Cysteine                                                                                                                       |
| เร่งการผลิตเซลล์ผิวใหม่<br>(Epidermal turnover accelerant)                                  | Thioctic acid, Retinoids, Lactic acid, Glycolic acid, Salicylic acid, Liquiritin                                                              |
| ยับยั้งการขนส่งเมลานินโซม<br>(Suppressing of melanosome transfer)                           | Linoleic acid, N-Nicotinoyl dopamine, Niacinamide, Soy milk                                                                                   |
| ยับยั้งกระบวนการอักเสบ (Anti-inflammatory)                                                  | Niacinamide, Soy milk                                                                                                                         |
| ดักจับอนุมูลอิสระ (Free radical trapping agents)                                            | Glutathione, L-Cysteine, Vitamin C, Vitamin E, Tropical steroids, Glycyrrhetic acid                                                           |

tranexamic acid เป็นผงสีขาว ละลายน้ำได้ดี มีค่า pKa เป็น 4.3 และ 10.6<sup>(2)</sup> เป็น plasmin inhibitor จึงมีฤทธิ์ในการห้ามเลือด เป็นยาใช้ในการรักษาภาวะเลือดออกมาก อาการตกเลือด ในปี ค.ศ. 1979 Nijo Sadako พบว่าสามารถนำมาใช้รักษาฝ้าได้<sup>(3)</sup> จึงมีผู้นำมาใช้ในการรักษาฝ้าและช่วยให้ผิวขาว แต่อาจเกิดอาการข้างเคียงโดยทำให้เกิดลิ้มเลือดอุดตันในร่างกาย หากอุดตันอวัยวะสำคัญ เช่น ที่สมอง ปอด อาจเป็นอัมพาตหรือเป็นอันตรายถึงชีวิตได้<sup>(4, 5)</sup>

glutathione เป็นผงสีขาว ละลายในน้ำได้ดี มีค่า pKa เป็น 2.12, 3.53, 8.66 และ 9.12<sup>(6)</sup> เป็นสารไทรเปปไทด์ มีข้อบ่งใช้ทางการแพทย์ คือ ใช้ในการรักษาพิษจาก cisplatin chemotherapy พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการฉีด glutathione มีสีผิวที่ขาวขึ้น จึงมีผู้นำผลข้างเคียงของยามาทำให้ผิวขาวขึ้น เนื่องจาก glutathione มีโมเลกุลใหญ่เกินกว่าจะดูดซึมจากทางเดินอาหารได้ และสลายตัวง่ายในทางเดินอาหาร การรับประทาน glutathione จึงไม่มีผลช่วยทำให้ผิวขาว จึงมีผู้นำ glutathione มาใช้โดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ แต่เนื่องจากตัวยามีความเสี่ยง สลายตัวง่ายในกระแสเลือด จึงทำให้ผู้หวังผลในการทำให้ผิวขาวฉีดในความเข้มข้นสูง ซึ่งอาจทำให้เกิดการช็อค ความดันต่ำ หลอดลมตีบ หรือเกิดการแพ้อย่างรุนแรงจนเป็นเหตุทำให้เสียชีวิตได้<sup>(7, 8, 9)</sup>

acetylcysteine (N-acetyl-L-cysteine) เป็นผงสีขาว ละลายในน้ำ และเอทานอลได้ดี มีค่า pKa เป็น 9.52<sup>(10)</sup> นำมาใช้เป็นยาละลายเสมหะและยาต้านพิษที่ตับเนื่องจากรับประทาน paracetamol เกินขนาด<sup>(11)</sup> เป็น N-acetyl derivative ของกรดอะมิโน L-cysteine พบว่าโมเลกุลของ acetylcysteine สามารถดูดซึมเข้าทางเดินอาหารได้ง่ายและรวดเร็ว และไปรวมตัวกับโปรตีน 2 ชนิดในกระแสเลือด คือ glycine และ glutamate ซึ่งเป็น precursor ในการสังเคราะห์ GSH peroxidase ก่อให้เกิดโมเลกุลของ glutathione และ L-cysteine ในกระแสเลือด จึงมีผู้นำ acetylcysteine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ glutathione มาใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ช่วยทำให้ผิวขาว<sup>(12, 13)</sup>

ตารางที่ 2 สเปกตรัม สูตรโครงสร้าง กลไกออกฤทธิ์ ผลข้างเคียง และข้อกฎหมายของสารช่วยให้ผิวขาวทั้ง 5 ชนิด

| ชื่อ/สเปกตรัม                                                                                                  | สูตรโครงสร้าง <sup>(2, 6, 10, 14, 17)</sup>                                         | กลไกออกฤทธิ์ <sup>(1)</sup>                                                                                                                                           | ผลข้างเคียง                                                                                                               | ข้อกำหนดทางกฎหมาย <sup>(19)</sup>                                                                 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1. Tranexamic acid</b><br> |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน</li> </ul>                                                                                | เกิดลิ่มเลือดอุดตัน หากอุดตันอวัยวะสำคัญเช่นที่สมอง ปอดอาจเป็นอัมพาต หรือเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ <sup>(3)</sup>            | ยาแผนปัจจุบัน ประเภทยาอันตราย ข้อ 3 (70) (ยาจำพวกที่มุ่งหมายสำหรับใช้บำบัด บรรเทาหรือรักษาสิวฝ้า) |
| <b>2. Glutathione</b><br>     |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส</li> <li>- เปลี่ยนการผลิตยูเมลานินเป็นฟีโอเมลานิน</li> <li>- ดักจับอนุมูลอิสระ</li> </ul> | กรณีฉีดเข้าหลอดเลือดดำและเกิดการแพ้อย่างรุนแรงจนอาจทำให้เกิดการช็อค ความดันต่ำ หายใจล้มเหลว จนเสียชีวิตได้ <sup>(9)</sup> | ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารให้มีได้ไม่เกิน 250 มิลลิกรัม <sup>(20)</sup>                                |
| <b>3. Acetylcysteine</b><br> |   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส</li> <li>- เปลี่ยนการผลิตยูเมลานินเป็นฟีโอเมลานิน</li> <li>- ดักจับอนุมูลอิสระ</li> </ul> | กรณีฉีดเข้าหลอดเลือดดำอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดความดันโลหิตต่ำและอาการหน้าแดง (flushing) <sup>(21)</sup>                     | ยาแผนปัจจุบัน ประเภทยาอันตราย ข้อ 3(8) (ยาจำพวกแก้ไข้ที่ใช้สำหรับขับเสมหะ)                        |
| <b>4. Ascorbic acid</b><br> |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส</li> <li>- ดักจับอนุมูลอิสระ</li> </ul>                                                   | คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย ปวดท้อง เกิดนิ่วแคลเซียมออกซาเลตในไต <sup>(22)</sup>                                            |                                                                                                   |
| <b>5. Niacin</b><br>        |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ยับยั้งการขนส่งเมลานิน</li> <li>- ดักจับอนุมูลอิสระ</li> </ul>                                                               | คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย และอาการหน้าแดง (flushing) <sup>(23)</sup>                                                      | หากเกิน 20 มิลลิกรัมต่อขนาดรับประทานหนึ่งมื้อจัดเป็นยาอันตราย ข้อ 3                               |

ascorbic acid หรือวิตามินซี เป็นผงสีขาวถึงเหลืองอ่อน ละลายในน้ำได้ดี มีค่า pKa เป็น 4.04 และ 11.7<sup>(14)</sup> จัดเป็นวิตามินละลายในน้ำที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระสูง เป็นโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์คอลลาเจนที่อยู่ใน fibrous tissue, connective tissue กระดูก ฟัน และหลอดเลือด พบว่าวิตามินซีนิยมนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ช่วยให้ผิวขาว<sup>(15, 16)</sup>

niacin หรือวิตามินบี 3 เป็นผงสีขาว ละลายน้ำได้ดี มีค่า pKa เป็น 4.85<sup>(17)</sup> จัดเป็นวิตามินละลายในน้ำที่พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ เป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการสร้างโคเอนไซม์ NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) และ NADP (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมในไกลโคเจน ไชมัน กรดอะมิโน พบว่ามีการนำมาใช้ในการช่วยให้ผิวขาว<sup>(16, 17, 18)</sup>

จากตารางที่ 2 จะเห็นว่าสารช่วยให้ผิวขาวบางชนิดมีผลข้างเคียงที่อันตราย อาจถึงชีวิตได้ จึงควรมีวิธีตรวจวิเคราะห์หาสารเหล่านี้ แต่วิธีในการตรวจหาสารช่วยให้ผิวขาวในปัจจุบันส่วนใหญ่ที่พบมักจะเป็นวิธีที่ตรวจหาสารในกลุ่มเครื่องสำอางร่วมกัน ได้แก่ glycolic acid, ascorbic acid, arbutin, magnesium ascorbyl phosphate<sup>(24)</sup> ในปัจจุบันวิธีตรวจวิเคราะห์สารทั้ง 5 ชนิด เป็นวิธีที่แยกกันวิเคราะห์ในแต่ละชนิด ยังไม่พบการตรวจหาสารช่วยให้ผิวขาวทั้ง 5 ชนิด ข้างต้นในวิธีเดียวกัน จึงเป็นที่มาของการพัฒนาวิธีตรวจเอกลักษณ์สารช่วยให้ผิวขาวทั้ง 5 ชนิดดังกล่าว ด้วยวิธี HPLC ซึ่งทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นตามแนวทาง ICH-Q2 (R1)<sup>(25)</sup> แต่เนื่องจากการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ จึงทดสอบความใช้ได้ของวิธีเฉพาะหัวข้อความจำเพาะเจาะจง การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ และการทดสอบความทนของวิธี โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์สารช่วยให้ผิวขาวทั้ง 5 ชนิด ในทั้งยาฉีดและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารภายในครั้งเดียว ช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในงานยาบรรดคดีและเป็นการเฝ้าระวังภัยสุขภาพแก่ผู้บริโภคได้ แต่เนื่องจากยูวีสเปกตรัมของสาร tranexamic acid, glutathione และ acetylcysteine มีค่าดูดกลืนแสงสูงสุด ( $\lambda_{max}$ ) อยู่ในช่วงของ UV Cutoff ของ methanol และ acetonitrile ซึ่งเป็นส่วนประกอบในสารละลายตัวพา โดยสเปกตรัมนี้เป็นลักษณะสเปกตรัมที่ไม่จำเพาะเจาะจง ดังแสดงในตารางที่ 2 จึงต้องยืนยันผลการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธี HPLC ระบบที่ 2 เพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์ว่าตัวอย่างที่ตรวจพบสารดังกล่าวทั้ง 3 ชนิด มี retention time ของสารละลายตัวอย่างที่ใกล้เคียงกับในสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ระบบ

## วัสดุและวิธีการ

### เครื่องมือและอุปกรณ์

High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Waters Alliance System Model 2695 with Photodiode array detector 2996 Waters, USA; Microbalance: MX5, Mettler Toledo, Switzerland; Analytical Balance: XPE 205, Mettler Toledo, Switzerland; pH meter: Sevencompact, Mettler Toledo, Switzerland; Ultrasonic bath: Elmasonic S100H; HPLC Column: Mightysil C18 ขนาด  $4.6 \times 250$  มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร Lot No. 8027372; HPLC Column: Gemini C18 ขนาด  $4.6 \times 250$  มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร S/N H17-406465; HPLC Column: Zorbax Eclipse XDB C18 ขนาด  $4.6 \times 250$  มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร Lot No. B15125; HPLC Column: CAPCELL PAK C18 ขนาด  $4.6 \times 250$  มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร Cat No. 12533; Membrane filter: Nylon 0.45 ไมโครเมตร; Syringe filter: Polyvinylidene difluoride hydrophilic Type (PVDF HL) 0.45 ไมโครเมตร

### สารมาตรฐาน

tranexamic acid USP, Lot No. R021K0, ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9; glutathione USP, Lot No. F0J340, ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.0; acetylcysteine USP, Lot No. K0K294, ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.4; ascorbic acid USP, Lot No. Q1G135, ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9; niacin USP, Lot No. I0E295, ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.8

### สารเคมี

trifluoroacetic acid (TFA) HPLC grade; sodium lauryl sulfate HPLC grade; methanol (MeOH) HPLC grade; acetonitrile (ACN) HPLC grade; phosphoric acid AR grade; purified water Type I (น้ำบริสุทธิ์)

### ตัวอย่างเมทริกซ์

นำผงเมทริกซ์ของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ไม่มี tranexamic acid, glutathione, acetylcysteine, ascorbic acid และ niacin ผสมอยู่เป็นเมทริกซ์ (matrix) ส่วนในกรณีตัวอย่างยาฉีดใช้เมทริกซ์เป็นน้ำบริสุทธ์

วิธีการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ระบบที่ 1 (สำหรับแยกสาร tranexamic acid, glutathione, acetylcysteine, ascorbic acid และ niacin)

### การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน tranexamic acid, glutathione, acetylcysteine, ascorbic acid และ niacin ในน้ำบริสุทธ์ ให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.4, 0.08, 0.06, 0.025 และ 0.015 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองผ่านหัวกรอง PVDF ชนิด hydrophilic ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

### การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำผงตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารประมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 20.0 มิลลิลิตร เติมน้ำบริสุทธ์ประมาณ 15 มิลลิลิตร นำไป sonicate ประมาณ 10 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธ์ กรณียาฉีดเตรียมตัวอย่างละลายในน้ำบริสุทธ์ให้มีความเข้มข้นเทียบเท่ากับสารละลายมาตรฐาน (ดูจากฉลากยาฉีด) กรองผ่านหัวกรอง PVDF ชนิด hydrophilic ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

### สภาวะเครื่อง HPLC ระบบที่ 1

|                  |                                                                 |
|------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Column           | : Mightysil C18 ขนาด 4.6 × 250 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร |
| Mobile phase     | : 0.05% trifluoroacetic acid: acetonitrile: methanol (97: 2: 1) |
| Flow rate        | : 1 มิลลิลิตรต่อนาที                                            |
| Detector         | : photodiode array 190–400 นาโนเมตร                             |
| Column oven      | : 30 องศาเซลเซียส                                               |
| Injection volume | : 10 ไมโครลิตร                                                  |

วิธีการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ระบบที่ 2 (สำหรับแยกสาร tranexamic acid, glutathione และ acetylcysteine)

### การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน tranexamic acid, glutathione และ acetylcysteine ในน้ำบริสุทธ์ ให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.4, 0.08 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองผ่านหัวกรอง PVDF ชนิด hydrophilic ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

### การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำผงตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารประมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 20.0 มิลลิลิตร เติมน้ำบริสุทธ์ประมาณ 15 มิลลิลิตร นำไป sonicate ประมาณ 10 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธ์ กรณียาฉีดเตรียมตัวอย่างละลายในน้ำบริสุทธ์ให้มีความเข้มข้นเทียบเท่ากับสารละลายมาตรฐาน (ดูจากฉลากยาฉีด) กรองผ่านหัวกรอง PVDF ชนิด hydrophilic ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

## สภาวะเครื่อง HPLC ระบบที่ 2

|                  |                                                                          |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Column           | : Zorbax Eclipse XDB C18 ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร |
| Mobile phase     | : 6.35 mM sodium lauryl sulfate pH 2.5 : methanol (45 : 55)              |
| Flow rate        | : 1 มิลลิลิตรต่อนาที                                                     |
| Detector         | : photodiode array 190–400 นาโนเมตร                                      |
| Column oven      | : 30 องศาเซลเซียส                                                        |
| Injection volume | : 10 ไมโครลิตร                                                           |

## วิธีเตรียม 6.35 mM sodium lauryl sulfate pH 2.5

ซึ่ง sodium lauryl sulfate 1.83 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์ให้ได้ 1000 มิลลิลิตร และปรับ pH ให้ได้ 2.5 ด้วย phosphoric acid

## การทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์

## 1. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีพิสูจน์เอกลักษณ์ระบบที่ 1

## 1.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Specificity)

## การเตรียมสารละลาย standard stock solution 1

สารละลายมาตรฐาน **tranexamic acid** : เตรียมสารละลายมาตรฐาน tranexamic acid ในน้ำบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐาน **glutathione** : เตรียมสารละลายมาตรฐาน glutathione ในน้ำบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐาน **acetylcysteine** : เตรียมสารละลายมาตรฐาน acetylcysteine ในน้ำบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐาน **ascorbic acid** : เตรียมสารละลายมาตรฐาน ascorbic acid ในน้ำบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐาน **niacin** : เตรียมสารละลายมาตรฐาน niacin ในน้ำบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

## การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ปิเปตสารละลาย standard stock solution 1 ของ glutathione, acetylcysteine, ascorbic acid และ niacin อย่างละ 1.0 มิลลิลิตร และสารละลาย standard stock solution 1 ของ tranexamic acid 2.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์ กรองผ่านหัวกรอง PVDF ชนิด hydrophilic ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

## การเตรียมสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์

ซึ่งผงเมทริกซ์ประมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 20.0 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย standard stock solution 1 ของ glutathione, acetylcysteine, ascorbic acid และ niacin อย่างละ 2.0 มิลลิลิตร และสารละลาย standard stock solution 1 ของ tranexamic acid 4.0 มิลลิลิตร เติมน้ำบริสุทธิ์ 3 มิลลิลิตร นำไป sonicate 10 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์ กรองผ่านหัวกรอง PVDF ชนิด hydrophilic ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

### การเตรียมสารละลายเมทริกซ์

ชั่งผงเมทริกซ์ประมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 20.0 มิลลิลิตร เติมน้ำบริสุทธิ์ 10.0 มิลลิลิตร นำไป sonicate 10 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์ กรองผ่านหัวกรอง PVDF ชนิด hydrophilic ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

### การวิเคราะห์

นำสารละลายมาตรฐาน สารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ สารละลายเมทริกซ์และน้ำบริสุทธิ์ ไปฉีดวิเคราะห์ ด้วยสภาวะ HPLC ระบบที่ 1

### เกณฑ์การตัดสินผล

พีคของ tranexamic acid, glutathione, acetylcysteine, ascorbic acid และ niacin ในสารละลายมาตรฐานแยกจากกันอย่างสมบูรณ์ โดยประเมินจากค่า peak purity และ resolution ไม่น้อยกว่า 2

ค่า retention time ของแต่ละพีคของสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ตรงกับสารมาตรฐาน tranexamic acid, glutathione, acetylcysteine, ascorbic acid และ niacin ที่อยู่ในสารละลายมาตรฐานตามลำดับ และพีคของสารดังกล่าวไม่ถูกรบกวน โดยประเมินจากค่า peak purity

สเปกตรัมพีคของสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ สอดคล้องกับสเปกตรัมของสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐาน

ค่า retention time ของพีคใด ๆ ในสารละลายเมทริกซ์ไม่ตรงกับพีคของสารมาตรฐาน tranexamic acid, glutathione, acetylcysteine, ascorbic acid และ niacin

### 1.2 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection: LOD)

#### การเตรียมสารละลายมาตรฐาน standard stock solution 2

ปิเปตสารละลาย standard stock solution 1 ในหัวข้อการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีของสารละลายมาตรฐาน tranexamic acid, glutathione, acetylcysteine, ascorbic acid และ niacin อย่างละ 4.0 มิลลิลิตร แยกใส่ในแต่ละขวดปรับปริมาตรขนาด 20.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์

#### การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ปิเปตสารละลาย standard stock solution 2 ของสารละลายมาตรฐาน tranexamic acid, glutathione, acetylcysteine, ascorbic acid และ niacin จำนวน 5.0, 3.0, 1.0, 2.0, 1.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 20.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์ กรองผ่านหัวกรอง PVDF ชนิด hydrophilic ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

#### การเตรียมสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์

ชั่งผงเมทริกซ์ประมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 20.0 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐาน standard stock solution 2 ของสารละลายมาตรฐาน tranexamic acid, glutathione, acetylcysteine, ascorbic acid และ niacin จำนวน 5.0, 3.0, 1.0, 2.0, 1.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 20.0 มิลลิลิตร นำไป sonicate 10 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์

## การวิเคราะห์

นำสารละลายมาตรฐาน สารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ สารละลายเมทริกซ์และน้ำบริสุทธิ์ ไปฉีดวิเคราะห์ด้วยสภาวะ HPLC ระบบที่ 1

## เกณฑ์การตัดสินผล

ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารมาตรฐานแต่ละชนิดที่เติมลงในสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ให้พีคที่ชัดเจน โดยที่อัตราส่วน signal to noise ไม่ต่ำกว่า 3: 1 และให้สเปกตรัมที่ชัดเจน สอดคล้องกับสเปกตรัมของสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐาน

### 1.3 การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

ศึกษาผลกระทบของพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ resolution, retention time และ tailing factor เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ ของระบบโครมาโทกราฟี คือ คอลัมน์จากผู้ผลิตต่างกัน อุณหภูมิ อัตราการไหลของสารละลายตัวพา และสัดส่วนของสารละลายตัวพา โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างตั้งในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีนำมาตรวจวิเคราะห์

## เกณฑ์การตัดสินผล

ค่าของพารามิเตอร์ต่างๆ ต้องเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดทั่วไปในตำรายามาตรฐาน ได้แก่ resolution ไม่น้อยกว่า 2, tailing factor ไม่มากกว่า 2

## 2. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ระบบที่ 2

### 2.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Specificity)

#### การเตรียมสารละลาย standard stock solution 1

เตรียมสารละลาย standard stock solution 1 ของ tranexamic acid, glutathione และ acetylcysteine ให้ได้ความเข้มข้นตั้งในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ระบบที่ 1

#### การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ปิเปตสารละลาย standard stock solution 1 ของ tranexamic acid, glutathione และ acetylcysteine อย่างละ 2.0, 1.0 และ 1.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 10.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์ กรองผ่านหัวกรอง PVDF ชนิด hydrophilic ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

#### การเตรียมสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์

ชั่งผงเมทริกซ์ประมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 20.0 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย standard stock solution 1 ของ tranexamic acid, glutathione และ acetylcysteine อย่างละ 4.0, 2.0 และ 2.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 20.0 มิลลิลิตร เติมน้ำบริสุทธิ์ 10 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 20.0 มิลลิลิตรนำไป sonicate 10 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์ กรองผ่านหัวกรอง PVDF ชนิด hydrophilic ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

### การเตรียมสารละลายเมทริกซ์

ชั่งผงเมทริกซ์ประมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 20.0 มิลลิลิตร เติมน้ำบริสุทธิ์ 10 มิลลิลิตร นำไป sonicate 10 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์ กรองผ่านหัวกรอง PVDF ชนิด hydrophilic ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

### การวิเคราะห์

นำสารละลายมาตรฐาน สารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ สารละลายเมทริกซ์และน้ำบริสุทธิ์ ไปฉีดวิเคราะห์ด้วยสภาวะ HPLC ระบบที่ 2

### เกณฑ์การตัดสินผล

พีคของ tranexamic acid, glutathione และ acetylcysteine ในสารละลายมาตรฐานแยกจากกันอย่างสมบูรณ์ โดยประเมินจากค่า peak purity และ resolution ไม่น้อยกว่า 2

ค่า retention time ของแต่ละพีคของสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ตรงกับสารมาตรฐาน tranexamic acid, glutathione และ acetylcysteine ที่อยู่ในสารละลายมาตรฐานตามลำดับ และพีคของสารดังกล่าวไม่ถูกรบกวนโดยประเมินจากค่า peak purity

สเปกตรัมพีคของสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ สอดคล้องกับสเปกตรัมของสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐาน

ค่า retention time ของพีคใด ๆ ในสารละลายเมทริกซ์ไม่ตรงกับพีคของสารมาตรฐาน tranexamic acid, glutathione และ acetylcysteine

### 2.2 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection: LOD)

#### การเตรียมสารละลายมาตรฐาน standard stock solution 2

ปิเปตสารละลาย standard stock solution 1 ในหัวข้อการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีของสารละลายมาตรฐาน tranexamic acid, glutathione และ acetylcysteine อย่างละ 4.0 มิลลิลิตร แยกใส่ในแต่ละขวด ปรับปริมาตรขนาด 20.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์

#### การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ปิเปตสารละลาย standard stock solution 2 ของ tranexamic acid, glutathione และ acetylcysteine จำนวน 5.0, 1.0, 1.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 20.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์ กรองผ่านหัวกรอง PVDF ชนิด hydrophilic ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

#### การเตรียมสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์

ชั่งผงเมทริกซ์ประมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 20.0 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐาน standard stock solution 2 ของ tranexamic acid, glutathione และ acetylcysteine จำนวน 5.0, 1.0, 1.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 20.0 มิลลิลิตร นำไป sonicate 10 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์ กรองผ่านหัวกรอง PVDF ชนิด hydrophilic ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

## การวิเคราะห์

นำสารละลายมาตรฐาน สารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ สารละลายเมทริกซ์และน้ำบริสุทธิ์ ไปฉีดวิเคราะห์ด้วยสภาวะ HPLC ระบบที่ 2

## เกณฑ์การตัดสินผล

ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารมาตรฐานแต่ละชนิดที่เติมลงในสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ให้พีคที่ชัดเจน โดยที่อัตราส่วน signal to noise ไม่ต่ำกว่า 3: 1 และให้สเปกตรัมที่ชัดเจน สอดคล้องกับสเปกตรัมของสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐาน

### 2.3 การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

ศึกษาผลกระทบของพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ resolution, retention time และ tailing factor เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ ของระบบโครมาโทกราฟี คือ คอลัมน์จากผู้ผลิตต่างกัน อุณหภูมิ อัตราการไหลของสารละลาย ตัวพา สัดส่วนของสารละลายตัวพา และความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีนำมาตรวจวิเคราะห์

## เกณฑ์การตัดสินผล

ค่าของพารามิเตอร์ต่างๆ ต้องเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดทั่วไปในตำรายามาตรฐาน ได้แก่ resolution ไม่น้อยกว่า 2, tailing factor ไม่มากกว่า 2

## การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์สารช่วยให้ผิวขาวในปีงบประมาณ 2562

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่อ้างว่าช่วยให้ผิวขาว จำนวนทั้งสิ้น 73 ตัวอย่าง ได้รับจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา จำนวน 30 ตัวอย่าง และสถานีตำรวจ จำนวน 43 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นรูปแบบเม็ด จำนวน 3 ตัวอย่าง แคปซูล จำนวน 18 ตัวอย่าง ผง จำนวน 15 ตัวอย่าง และยานีรูรูปแบบของเหลว จำนวน 37 ตัวอย่าง ตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์สารช่วยให้ผิวขาวด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

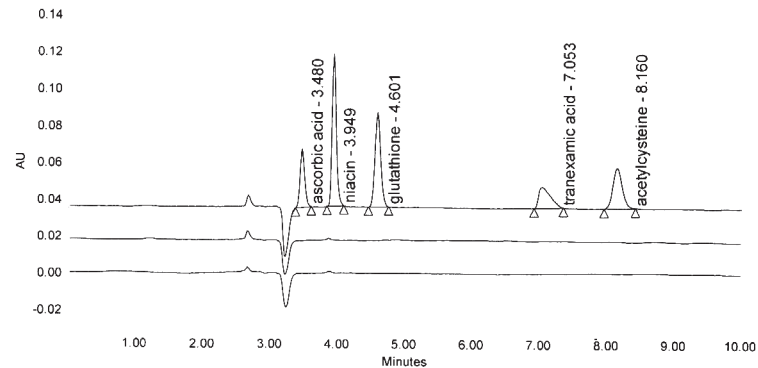
## ผล

### ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของ HPLC ระบบที่ 1

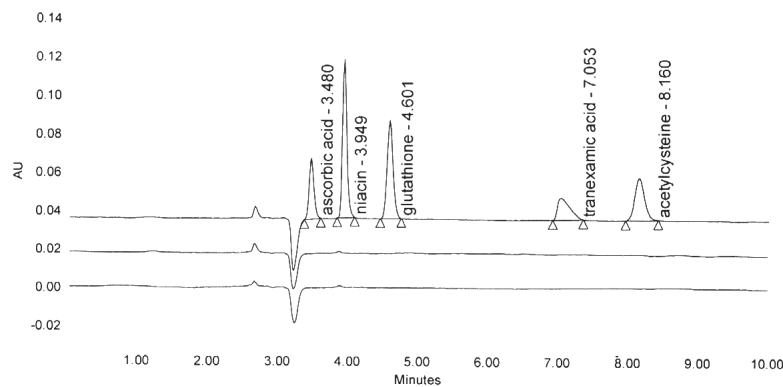
#### การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Specificity)

จากสภาวะ HPLC ระบบที่ 1 พบพีคของ ascorbic acid, niacin, glutathione, tranexamic acid และ acetylcysteine ในสารละลายมาตรฐานมีค่า retention time เป็น 3.469, 3.948, 4.592, 7.042 และ 8.140 นาที ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2 และในสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์มีค่า retention time เป็น 3.471, 3.941, 4.591, 7.039 และ 8.146 นาที ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3 ทั้ง 5 พีคแยกกันอย่างสมบูรณ์ และทั้ง 5 พีค มีค่า resolution มากกว่า 2 แต่ละพีคในสารละลายมาตรฐานและสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ไม่พบการรบกวนจากน้ำบริสุทธิ์และองค์ประกอบอื่นในเมทริกซ์ โดยประเมินจากค่า peak purity พบว่าได้ purity flag เป็น No แสดงว่าแต่ละพีคเป็นสารบริสุทธิ์ (pure) ไม่ถูกรบกวนโดยสารอื่น ในน้ำบริสุทธิ์และสารละลายเมทริกซ์ไม่พบพีคใดๆ ที่มี retention time ตรงกับพีคของสารมาตรฐาน ascorbic acid, niacin, glutathione, tranexamic acid และ acetylcysteine ดังแสดงในภาพที่ 2 และ 3 แสดงว่าน้ำบริสุทธิ์และสารละลายเมทริกซ์ไม่มีสารรบกวนพีคของสารมาตรฐาน และสเปกตรัมของสารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด ในสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ได้ค่า PDA match flag เป็น No แสดงว่าสเปกตรัม

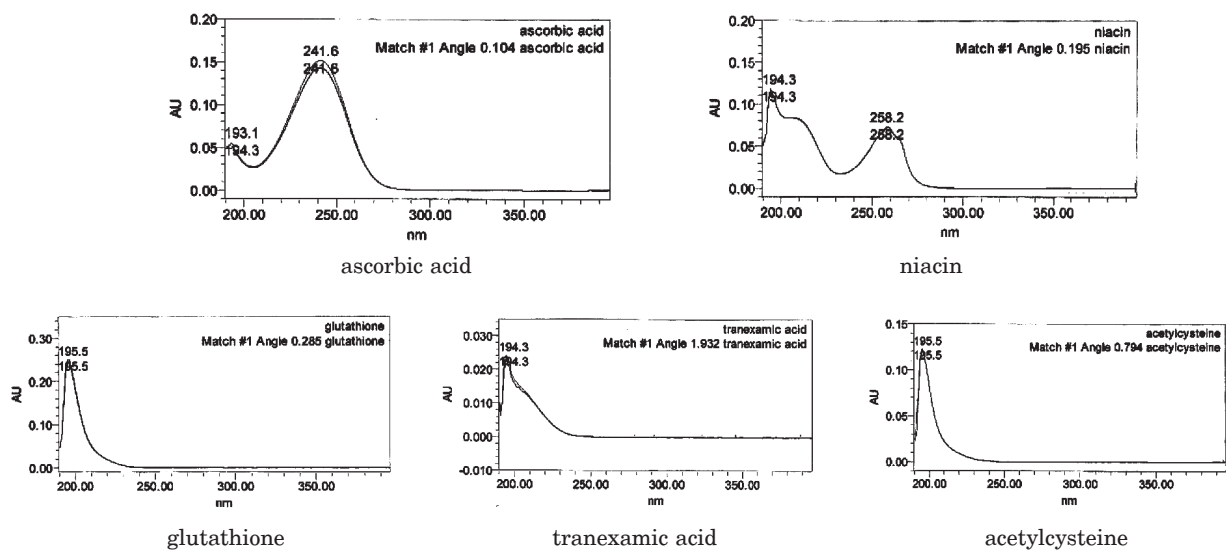
ของสารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด ในสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ สอดคล้องกับในสารละลายมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 4 ตารางที่ 3 และตารางที่ 4



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเทียบกับน้ำบริสุทธิ์และสารละลายเมทริกซ์ในสภาวะ HPLC ระบบที่ 1



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์เทียบกับน้ำบริสุทธิ์และสารละลายเมทริกซ์ในสภาวะ HPLC ระบบที่ 1



ภาพที่ 4 สเปกตรัมของสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานในสภาวะ HPLC ระบบที่ 1

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงในสารละลายมาตรฐานในสภาวะ HPLC ระบบที่ 1

| Standard        | RT    | Rs  | TF  | Peak purity  |                  |             | Match plot      |                     |                |
|-----------------|-------|-----|-----|--------------|------------------|-------------|-----------------|---------------------|----------------|
|                 |       |     |     | Purity angle | Purity threshold | Purity Flag | PDA match angle | PDA match threshold | PDA match Flag |
| Ascorbic acid   | 3.469 | -   | 1.1 | 0.135        | 0.315            | No          | 0.000           | 1.090               | No             |
| Niacin          | 3.948 | 3.8 | 1.3 | 0.290        | 0.448            | No          | 0.000           | 1.165               | No             |
| Glutathione     | 4.592 | 4.7 | 1.1 | 0.338        | 0.628            | No          | 0.000           | 1.298               | No             |
| Tranexamic acid | 7.042 | 9.7 | 1.9 | 2.361        | 2.541            | No          | 0.000           | 2.912               | No             |
| Acetylcysteine  | 8.140 | 3.7 | 1.0 | 0.698        | 1.065            | No          | 0.000           | 1.697               | No             |

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงในสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ในสภาวะ HPLC ระบบที่ 1

| Standard        | RT    | Rs  | TF  | Peak purity  |                  |             | Match plot      |                     |                |
|-----------------|-------|-----|-----|--------------|------------------|-------------|-----------------|---------------------|----------------|
|                 |       |     |     | Purity angle | Purity threshold | Purity Flag | PDA match angle | PDA match threshold | PDA match Flag |
| Ascorbic acid   | 3.471 | -   | 1.1 | 0.111        | 0.335            | No          | 0.102           | 1.099               | No             |
| Niacin          | 3.941 | 3.8 | 1.3 | 0.356        | 0.540            | No          | 0.189           | 1.201               | No             |
| Glutathione     | 4.591 | 4.6 | 1.1 | 0.493        | 0.893            | No          | 0.283           | 1.411               | No             |
| Tranexamic acid | 7.039 | 9.6 | 1.9 | 2.553        | 3.802            | No          | 1.997           | 3.607               | No             |
| Acetylcysteine  | 8.146 | 3.7 | 1.0 | 1.160        | 1.594            | No          | 0.628           | 1.947               | No             |

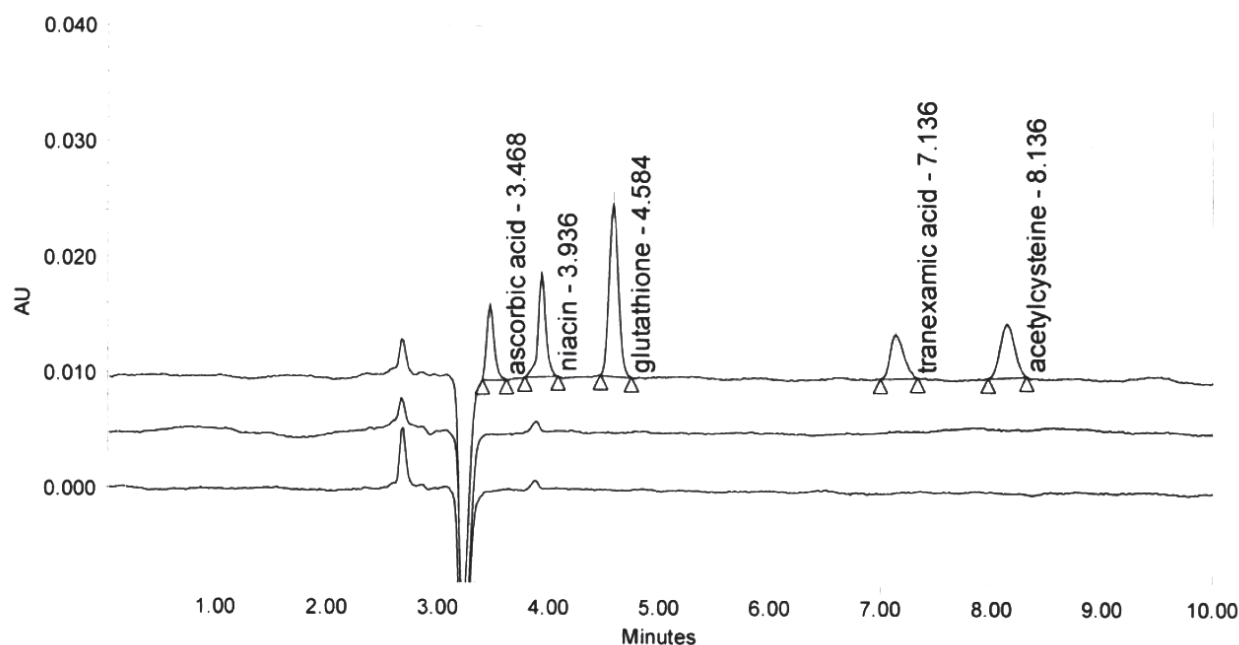
RT = Retention time, Rs = Resolution, TF = Tailing factor

**การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection: LOD)**

พบค่าขีดจำกัดของการตรวจพบของสารมาตรฐาน ascorbic acid, niacin, glutathione, tranexamic acid และ acetylcysteine ในสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ที่ความเข้มข้น 0.10, 0.03, 0.48, 2.0 และ 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ให้พีคที่ชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 5 โดยให้อัตราส่วน signal to noise เป็น 20.75, 25.41, 46.87, 11.47 และ 14.61 ตามลำดับ และให้สเปกตรัมที่ชัดเจน สอดคล้องกับสเปกตรัมของสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐาน

**การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)**

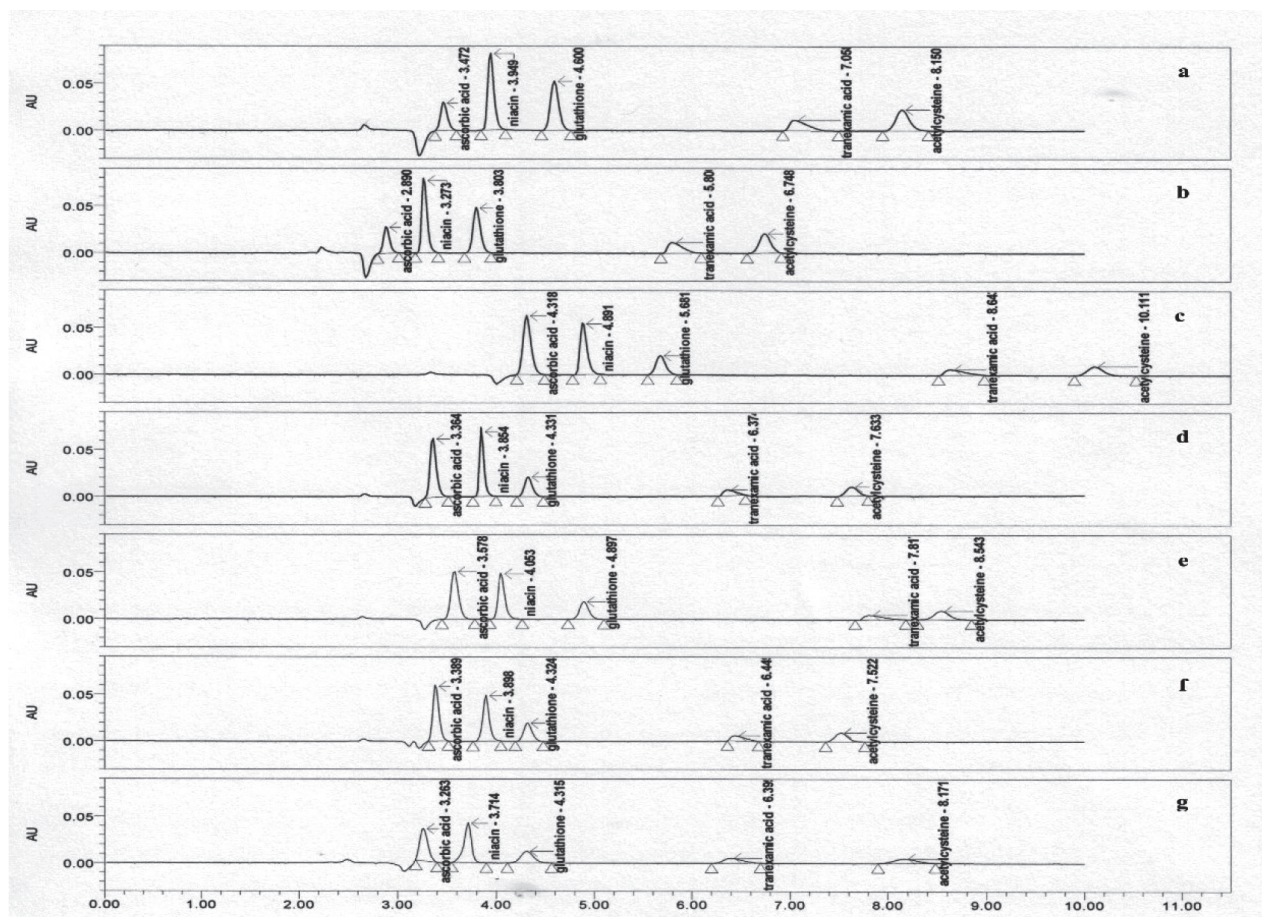
จากการเปลี่ยนสภาวะต่างๆ ทางโครมาโทกราฟี ได้แก่ คอลัมน์จากผู้ผลิตต่างกัน อุณหภูมิ อัตราการไหลของตัวพา และสัดส่วนของสารละลายตัวพา ดังแสดงในภาพที่ 6 ได้พารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ resolution, retention time และ tailing factor ดังแสดงในตารางที่ 5



ภาพที่ 5 โคโรมาโทแกรมของการทดสอบซ้ำจำกัดของการตรวจพบของสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์เทียบกับ น้ำบริสุทธิ์และสารละลายเมทริกซ์ในสภาวะ HPLC ระบบที่ 1

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความทนของวิธีในสภาวะ HPLC ระบบที่ 1

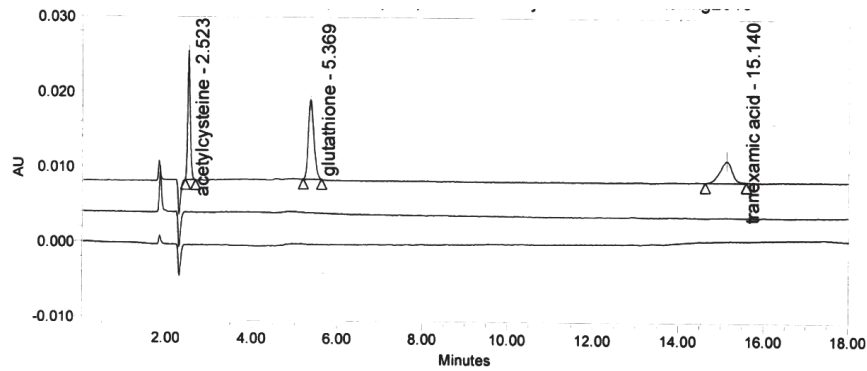
| Chromatographic condition |           | Robustness    |    |     |        |     |     |             |     |     |                 |      |     |                |     |     |
|---------------------------|-----------|---------------|----|-----|--------|-----|-----|-------------|-----|-----|-----------------|------|-----|----------------|-----|-----|
|                           |           | Ascorbic acid |    |     | Niacin |     |     | Glutathione |     |     | Tranexamic acid |      |     | Acetylcysteine |     |     |
|                           |           | RT            | Rs | TF  | RT     | Rs  | TF  | RT          | Rs  | TF  | RT              | Rs   | TF  | RT             | Rs  | TF  |
| Column                    | Mightysil | 3.469         | -  | 1.1 | 3.941  | 3.8 | 1.3 | 4.592       | 4.7 | 1.1 | 7.042           | 9.7  | 1.9 | 8.140          | 3.7 | 1.0 |
|                           | Gemini    | 3.265         | -  | 1.2 | 3.721  | 3.1 | 0.9 | 4.337       | 3.3 | 1.1 | 6.460           | 7.2  | 1.4 | 8.210          | 4.6 | 1.0 |
| Temp. (°C)                | 25        | 3.578         | -  | 1.2 | 4.056  | 3.4 | 1.2 | 4.905       | 5.6 | 1.1 | 7.849           | 10.6 | 2.0 | 8.572          | 2.2 | 1.0 |
|                           | 30        | 3.469         | -  | 1.1 | 3.941  | 3.8 | 1.3 | 4.592       | 4.7 | 1.1 | 7.042           | 9.7  | 1.9 | 8.140          | 3.7 | 1.0 |
|                           | 35        | 3.364         | -  | 1.2 | 3.856  | 4.8 | 1.3 | 4.330       | 4.1 | 1.1 | 6.371           | 10.4 | 1.5 | 7.633          | 5.3 | 1.1 |
| Flow rate (ml/min)        | 0.8       | 4.322         | -  | 1.2 | 4.899  | 4.0 | 1.3 | 5.688       | 4.9 | 1.1 | 8.656           | 10.1 | 2.1 | 10.120         | 4.3 | 1.0 |
|                           | 1.0       | 3.469         | -  | 1.1 | 3.941  | 3.8 | 1.3 | 4.592       | 4.7 | 1.1 | 7.042           | 9.7  | 1.9 | 8.140          | 3.7 | 1.0 |
|                           | 1.2       | 2.886         | -  | 0.8 | 3.268  | 1.4 | 1.3 | 3.798       | 4.3 | 1.1 | 5.796           | 11.1 | 1.4 | 6.741          | 4.3 | 1.1 |
| TFA: ACN:                 | 95:1:4    | 3.387         | -  | 1.2 | 3.896  | 4.2 | 1.1 | 4.325       | 3.1 | 1.1 | 6.453           | 10.9 | 1.4 | 7.522          | 4.6 | 1.1 |
| MeOH                      | 97:2:1    | 3.469         | -  | 1.1 | 3.941  | 3.8 | 1.3 | 4.592       | 4.7 | 1.1 | 7.042           | 9.7  | 1.9 | 8.140          | 3.7 | 1.0 |



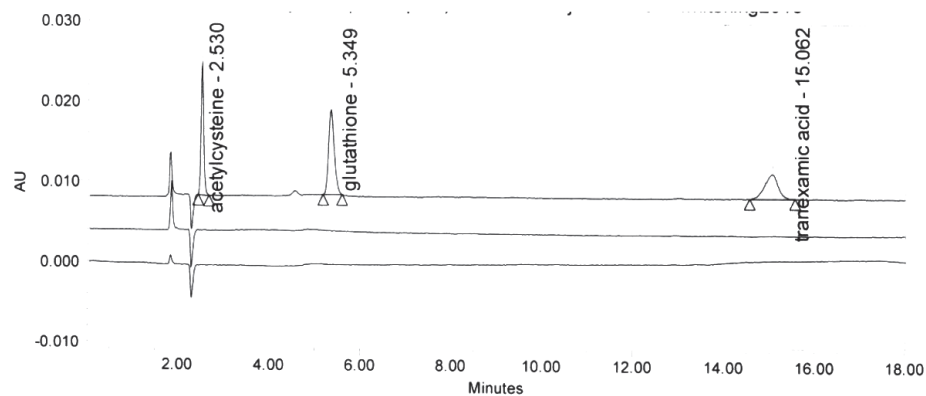
ภาพที่ 6 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานในสภาวะต่างๆ ที่เปลี่ยนไปจากสภาวะ HPLC ระบบที่ 1 [a: สภาวะดั้งเดิม, b: คอลัมน์จากผู้ผลิตต่างกัน, c: อุณหภูมิ 25 °C, d: อุณหภูมิ 35 °C, e: อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที, f: อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที และ g: 0.05% trifluoroacetic acid: acetonitrile: methanol (95:1:4)]

## ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจสอบพิสูจน์เอกลักษณ์ของ HPLC ระบบที่ 2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Specificity)

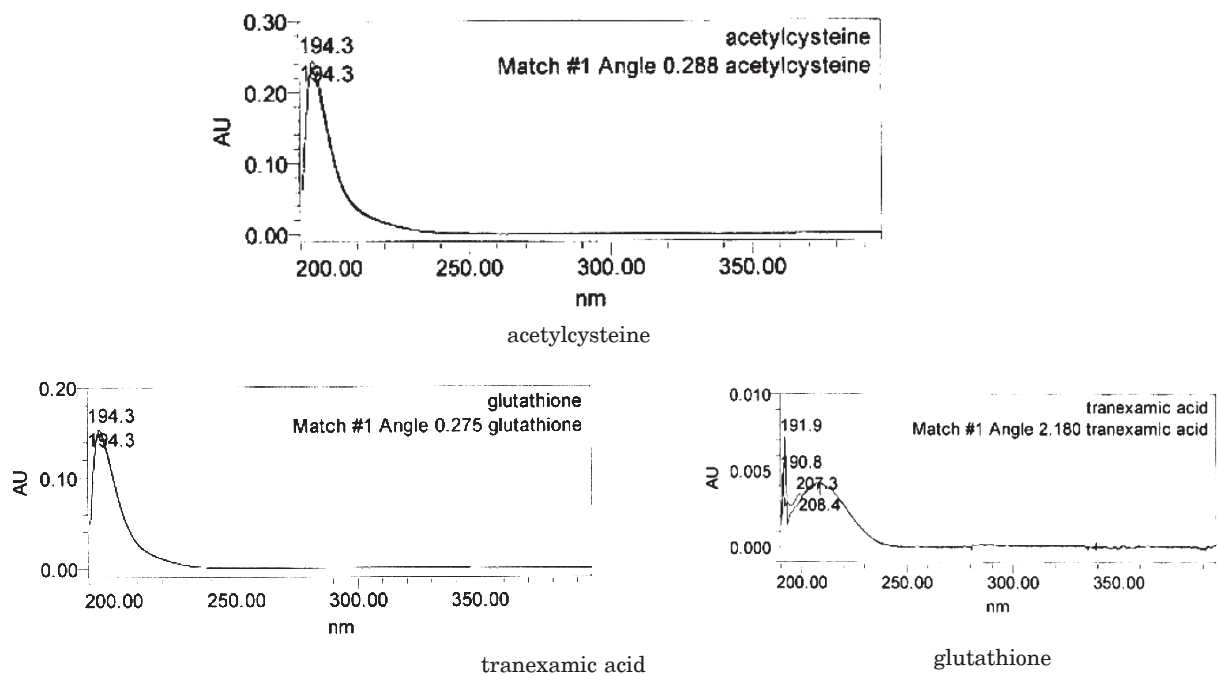
จากสภาวะ HPLC ระบบที่ 2 พบพีคของ acetylcysteine, glutathione และ tranexamic acid ในสารละลายมาตรฐานมี retention time เป็น 2.526, 5.364 และ 15.110 นาที ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 7 และในสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์มี retention time เป็น 2.526, 5.349 และ 15.068 นาที ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 8 โดยจะเห็นว่าพีคของสารมาตรฐานทั้ง 3 ตัว แยกจากกันอย่างสมบูรณ์ และทั้ง 3 พีค มีค่า resolution มากกว่า 2 แต่ละพีคในสารละลายมาตรฐานและสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ไม่พบการรบกวนจากน้ำบริสุทธิ์และองค์ประกอบอื่นในเมทริกซ์ โดยประเมินจากค่า peak purity พบว่าได้ purity flag เป็น No แสดงว่าแต่ละพีคเป็นสารบริสุทธิ์ (pure) ไม่ถูกรบกวนโดยสารอื่น ในน้ำบริสุทธิ์และสารละลายเมทริกซ์ไม่พบพีคใดๆ ที่มี retention time ตรงกับพีคของสารมาตรฐาน acetylcysteine, glutathione และ tranexamic acid ดังแสดงในภาพที่ 7 และ 8 แสดงว่าน้ำบริสุทธิ์และสารละลายเมทริกซ์ไม่มีสารรบกวนพีคของสารมาตรฐาน และสเปกตรัมของสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดในสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ได้ค่า PDA Match flag เป็น No แสดงว่าสเปกตรัมของสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดในสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ สอดคล้องกับในสารละลายมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 9 ตารางที่ 6 และตารางที่ 7



ภาพที่ 7 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเทียบกับน้ำบริสุทธิ์และสารละลายเมทริกซ์ในสภาวะ HPLC ระบบที่ 2



ภาพที่ 8 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์เทียบกับน้ำบริสุทธิ์และสารละลายเมทริกซ์ในสภาวะ HPLC ระบบที่ 2



ภาพที่ 9 สเปกตรัมของสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานในสภาวะ HPLC ระบบ 2

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงในสารละลายมาตรฐานในสภาวะ HPLC ระบบที่ 2

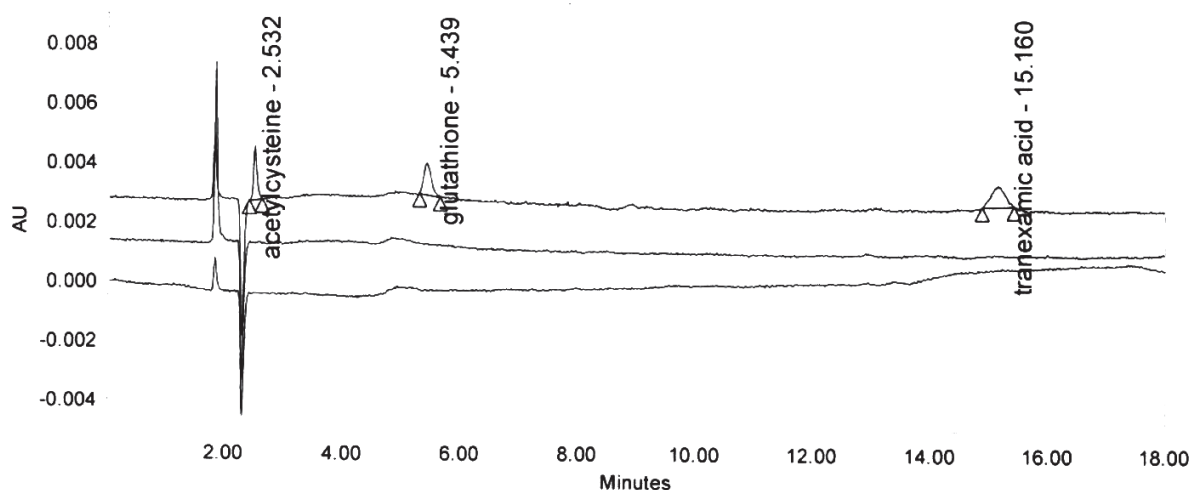
| Standard        | RT    | Rs   | TF  | Peak purity |           |        | Match plot |           |           |
|-----------------|-------|------|-----|-------------|-----------|--------|------------|-----------|-----------|
|                 |       |      |     | Purity      | Purity    | Purity | PDA match  | PDA match | PDA match |
|                 |       |      |     | angle       | threshold | Flag   | angle      | threshold | Flag      |
| Acetylcysteine  | 2.526 | -    | 1.2 | 0.544       | 0.567     | No     | 0.000      | 1.234     | No        |
| Glutathione     | 5.364 | 15.8 | 1.3 | 0.406       | 0.636     | No     | 0.000      | 1.330     | No        |
| Tranexamic acid | 15.10 | 26.6 | 0.9 | 3.958       | 3.999     | No     | 2.457      | 4.661     | No        |

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงในสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ในสภาวะ HPLC ระบบที่ 2

| Standard<br>in matrix | RT     | Rs   | TF  | Peak purity |           |        | Match plot |           |           |
|-----------------------|--------|------|-----|-------------|-----------|--------|------------|-----------|-----------|
|                       |        |      |     | Purity      | Purity    | Purity | PDA match  | PDA match | PDA match |
|                       |        |      |     | angle       | threshold | Flag   | angle      | threshold | Flag      |
| Acetylcysteine        | 2.526  | -    | 1.2 | 0.429       | 0.564     | No     | 0.285      | 1.228     | No        |
| Glutathione           | 5.349  | 15.8 | 1.3 | 0.410       | 0.571     | No     | 0.287      | 1.310     | No        |
| Tranexamic acid       | 15.068 | 30.4 | 0.9 | 3.577       | 3.602     | No     | 4.565      | 4.661     | No        |

#### การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection: LOD)

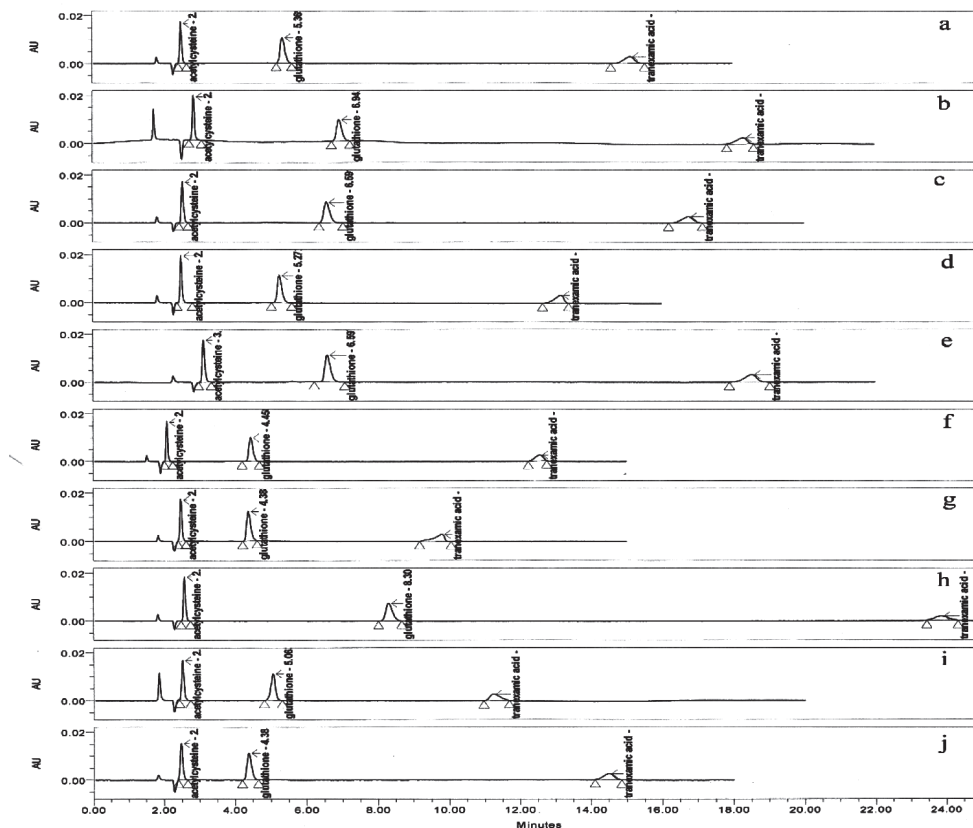
พบค่าขีดจำกัดของการตรวจพบของสารมาตรฐาน acetylcysteine, glutathione และ tranexamic acid ในสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ที่ความเข้มข้น 0.12, 0.16 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ให้พีคที่ชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 10 โดยให้อัตราส่วน signal to noise เป็น 17.58, 11.01 และ 7.13 ตามลำดับ และให้สเปกตรัมที่ชัดเจน สอดคล้องกับสเปกตรัมของสารมาตรฐานในสารละลายมาตรฐาน



ภาพที่ 10 โครมาโทแกรมของการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบของสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์เทียบกับ น้ำบริสุทธิ์และสารละลายเมทริกซ์ในสภาวะ HPLC ระบบที่ 2

## การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

จากการเปลี่ยนสภาวะต่างๆ ทางโครมาโทกราฟี ได้แก่ คอลัมน์จากผู้ผลิตต่างกัน อุณหภูมิ อัตราการไหลของสารละลายตัวพา สัดส่วนของสารละลายตัวพา และความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ ดังแสดงในภาพที่ 11 ได้ค่า resolution, retention time และ tailing factor ดังแสดงในตารางที่ 8



ภาพที่ 11 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานในสภาวะต่างๆ ที่เปลี่ยนไปจาก HPLC ระบบที่ 2 [a: สภาวะดั้งเดิม, b: คอลัมน์จากผู้ผลิตต่างกัน, c: อุณหภูมิ 25°C, d: อุณหภูมิ 35°C, e: อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที, f: อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที, g: buffer pH 2.5: methanol (40 : 60), h: buffer pH 2.5: methanol (50 : 50), i: buffer pH 2.3 และ j: buffer pH 2.7]

## ผลการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์สารช่วยให้ผิวขาวในปิงปประมาณ 2562

ผลการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์สารช่วยให้ผิวขาวในตัวอย่างยาฉีดและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่อ้างว่าช่วยให้ผิวขาวในปิงปประมาณ 2562 ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่าในตัวอย่างยาฉีดรูปแบบของเหลวที่พบในสถานเสริมความงามและในท้องตลาด จำนวน 37 ตัวอย่าง ตรวจพบสารช่วยให้ผิวขาว จำนวน 11 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 29.7 โดยตรวจพบ tranexamic acid จำนวน 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 10.8) glutathione จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.4) ascorbic acid จำนวน 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 10.8) และ niacin จำนวน 1 ตัวอย่าง (ตรวจพบในตัวอย่าง vitamin B complex injection) (ร้อยละ 3.7) และในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารทั้งรูปแบบผง เม็ด และแคปซูล ในท้องตลาด จำนวนทั้งสิ้น 36 ตัวอย่าง ตรวจพบสารช่วยให้ผิวขาว จำนวน 11 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 30.5 โดยตรวจพบ tranexamic acid จำนวน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.8) glutathione จำนวน 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 11.1) ascorbic acid จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.6) ตรวจพบ glutathione ผสม ascorbic acid จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.6) และ glutathione ผสม acetylcysteine จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.6)

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบความทนของวิธีในสภาวะ HPLC ระบบที่ 2

| Chromatographic condition |                | Robustness     |    |     |             |      |     |                 |      |     |
|---------------------------|----------------|----------------|----|-----|-------------|------|-----|-----------------|------|-----|
|                           |                | Acetylcysteine |    |     | Glutathione |      |     | Tranexamic acid |      |     |
|                           |                | RT             | Rs | TF  | RT          | Rs   | TF  | RT              | Rs   | TF  |
| Column                    | Zorbax Eclipse | 2.526          | -  | 1.2 | 5.364       | 15.8 | 1.3 | 15.110          | 26.6 | 0.9 |
|                           | CAPCELL PAK    | 2.873          | -  | 1.2 | 6.926       | 21.0 | 1.3 | 18.257          | 26.5 | 0.8 |
| Temp. (°C)                | 25             | 2.564          | -  | 1.2 | 6.592       | 19.0 | 1.3 | 16.777          | 22.8 | 0.9 |
|                           | 30             | 2.526          | -  | 1.2 | 5.364       | 15.8 | 1.3 | 15.110          | 26.6 | 0.9 |
|                           | 35             | 2.511          | -  | 1.2 | 5.241       | 16.1 | 1.3 | 13.088          | 22.2 | 0.8 |
|                           | 0.8            | 3.140          | -  | 1.3 | 6.605       | 16.1 | 1.3 | 18.543          | 25.9 | 0.8 |
| Flow rate (ml/min)        | 1.0            | 2.526          | -  | 1.2 | 5.364       | 15.8 | 1.3 | 15.110          | 26.6 | 0.9 |
|                           | 1.2            | 2.103          | -  | 1.2 | 4.463       | 15.4 | 1.3 | 12.582          | 25.6 | 0.9 |
|                           | 40 : 60        | 2.491          | -  | 1.2 | 4.388       | 11.5 | 1.3 | 9.809           | 15.9 | 0.7 |
| Buffer pH 2.5 : MeOH      | 45 : 55        | 2.526          | -  | 1.2 | 5.364       | 15.8 | 1.3 | 15.110          | 26.6 | 0.9 |
|                           | 50 : 50        | 2.585          | -  | 1.2 | 8.321       | 24.6 | 1.2 | 23.921          | 27.8 | 1.0 |
|                           | 2.3            | 2.523          | -  | 1.2 | 5.060       | 14.3 | 1.0 | 11.243          | 15.9 | 1.4 |
| pH Buffer                 | 2.5            | 2.526          | -  | 1.2 | 5.364       | 15.8 | 1.3 | 15.110          | 26.6 | 0.9 |
|                           | 2.7            | 2.483          | -  | 1.2 | 4.388       | 9.9  | 1.2 | 14.534          | 25.4 | 0.9 |

## วิจารณ์

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์สารช่วยให้ผิวขาวทั้ง 5 ชนิด ในยาฉีดและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ได้แก่ tranexamic acid, glutathione, acetylcysteine, ascorbic acid และ niacin ด้วยเทคนิค HPLC มี 2 ระบบ โดย HPLC ระบบที่ 1 ใช้ในการแยกสารช่วยให้ผิวขาวทั้ง 5 ชนิด โดยในการพัฒนานิ่วตรวจเอกลักษณ์ระบบที่ 1 ได้ดัดแปลงวิธีมาจาก Kiran R. Patil และคณะ<sup>(26)</sup> ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณด้วยอาศัยของ tranexamic acid capsules โดยดัดแปลงชนิดคอลัมน์เป็น C18 เพื่อให้สามารถแยกสารได้ทั้ง 5 ชนิด เนื่องจากคอลัมน์ C18 สามารถใช้แยกสารได้หลากหลายตั้งแต่สารที่มีคุณสมบัติ polar จนถึง nonpolar โดยคอลัมน์ชนิด C18 มีความยาวของสายโซ่ alkyl ที่มากกว่าคอลัมน์ชนิด C8 ทำให้สาร non polar อยู่ในคอลัมน์ได้นานกว่า ในกรณีที่ต้องการแยกสารที่มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันนั้น เราสามารถเลือกใช้สารละลายตัวพาที่เฉพาะเจาะจงกับสารที่ต้องการแยกได้ ซึ่งคอลัมน์ชนิด C18 สามารถใช้กับสารละลายตัวพาได้หลากหลายกว่า นอกจากนี้จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าวิธีตรวจวิเคราะห์ของสารแต่ละตัวทั้ง 5 ชนิด ส่วนใหญ่ใช้คอลัมน์ชนิด C18 และ C8 จึงเลือกใช้คอลัมน์ชนิด C18 เพื่อใช้ในการแยกสารทั้ง 5 ชนิด จากนั้นจึงทำการปรับเพิ่มสัดส่วนของสารละลายตัวพาในส่วน aqueous phase เพื่อให้ทุกพีคแยกกันอย่างสมบูรณ์ และเพิ่มอัตราการไหลเพื่อลด run time และให้ทุกพีคมีรูปร่างที่สวยงาม ทำให้สามารถแยกสารได้ทั้ง 5 ชนิด ซึ่ง HPLC ระบบที่ 1 ประกอบไปด้วย คอลัมน์ชนิด Mightysil C18 ขนาด  $4.6 \times 250$  มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร สารละลายตัวพา ประกอบด้วย ส่วนผสมของ 0.05% trifluoroacetic acid, acetonitrile และ methanol ในอัตราส่วน 97: 2: 1 โดยปริมาตร อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1 มิลลิลิตร ต่อนาที ตรวจวัดด้วย PDA detector ที่ความยาวคลื่น 190-400 นาโนเมตร พบว่าสามารถใช้แยกสารทั้ง 5 ชนิดได้

อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 10 นาที โดยมีค่า retention time ของ ascorbic acid, niacin, glutathione, tranexamic acid และ acetylcysteine ที่ 3.469, 3.948, 4.592, 7.042 และ 8.140 นาที ตามลำดับ แต่ละสารให้ค่า retention time ใกล้เคียงกันทั้งในสารละลายมาตรฐานและสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ โดยทั้ง 5 พีค แยกกันอย่างสมบูรณ์ มีค่า resolution มากกว่า 2 แต่ละพีคในสารละลายมาตรฐานและสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ไม่พบการรบกวนจากน้ำบริสุทธิ์และองค์ประกอบอื่นในเมทริกซ์ และสเปกตรัมของสารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด ในสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์สอดคล้องกับในสารละลายมาตรฐาน แสดงให้เห็นว่าวิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย HPLC ระบบที่ 1 มีความจำเพาะเจาะจง (Specificity) และเมื่อทดสอบความทนของวิธี (Robustness) ด้วยการเปลี่ยนแปลงสภาวะทางโครมาโทกราฟีต่าง ๆ ได้แก่ คอลัมน์จากผู้ผลิตต่างกัน อุณหภูมิ อัตราการไหลของสารละลายตัวพา และสัดส่วนของสารละลายตัวพา พบว่าการเปลี่ยนแปลงในทุกสภาวะ พีคของสารทั้ง 5 ชนิด ยังคงแยกกันได้อย่างสมบูรณ์ ให้ค่า retention time ที่เปลี่ยนแปลงไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่ลำดับการออกของแต่ละพีคที่แสดงในโครมาโตแกรมยังคงเดิม และสารทั้ง 5 ชนิด แสดงสัญญาณปรากฏในโครมาโตแกรมภายใน 10 นาที

เนื่องจากสเปกตรัมของสาร acetylcysteine, glutathione และ tranexamic acid ดังแสดงในตารางที่ 2 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดใกล้เคียงกับค่า UV cutoff ของ solvent ได้แก่ methanol และ acetonitrile ซึ่งเป็นส่วนประกอบในสารละลายตัวพา เป็นสเปกตรัมที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจง จึงต้องยืนยันผลการตรวจเอกลักษณ์ของสาร 3 ตัวนี้เพิ่มเติม โดยผู้วิจัยเลือกใช้เทคนิค HPLC ระบบที่ 2 ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญของ tranexamic acid ของตำราฟาร์มาโคเปียของประเทศญี่ปุ่น ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 17<sup>(27)</sup> มาปรับใช้เพื่อแยกสาร 3 ชนิดในคราวเดียวกัน เลือกใช้ sodium lauryl sulfate ซึ่งเป็น strong ion-pairing reagent ในการเตรียมบัฟเฟอร์ของสารละลายตัวพา ซึ่งอ้างอิงจากวิธีของตำราฟาร์มาโคเปียของประเทศญี่ปุ่น ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 17<sup>(27)</sup> เนื่องจาก sodium lauryl sulfate เหมาะกับโครงสร้างของสารที่ต้องการแยก เพราะเป็น amphoteric compounds เช่นเดียวกับสารทั้ง 3 ชนิด พบว่าสามารถแยกพีคของสารทั้ง 3 ชนิดได้ และให้รูปร่างพีคที่สวยงาม จากนั้นจึงปรับสัดส่วนสารละลายตัวพาเพื่อให้ทั้ง 3 พีค แยกกันโดยสมบูรณ์ และ run time ไม่มากกว่า 20 นาที นอกจากนี้การทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจเอกลักษณ์ด้วย HPLC ระบบที่ 2 ยังพบว่า sodium lauryl sulfate ไม่กระทบต่อผลการตรวจวิเคราะห์ โดย HPLC ระบบที่ 2 ใช้คอลัมน์ชนิด Zorbax Eclipse XDB C18 ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร สารละลายตัวพา ประกอบด้วย ส่วนผสมของบัฟเฟอร์ pH 2.5 และ methanol ในอัตราส่วน 45 : 55 โดยปริมาตร อัตราการไหลของตัวพา 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย PDA detector ที่ความยาวคลื่น 190–400 นาโนเมตร ค่า retention time ของสาร acetylcysteine, glutathione และ tranexamic acid ปรากฏที่ 2.526, 5.364 และ 15.110 นาที ตามลำดับ โดยในสารละลายมาตรฐานและสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ พบว่าทั้ง 3 พีคสามารถแยกจากกันอย่างสมบูรณ์ และมีค่า resolution มากกว่า 2 แต่ละพีคในสารละลายมาตรฐานและสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์ ไม่พบการรบกวนจากน้ำบริสุทธิ์และองค์ประกอบอื่นในเมทริกซ์ และสเปกตรัมของสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ในสารละลายมาตรฐานในเมทริกซ์สอดคล้องกับในสารละลายมาตรฐาน แสดงให้เห็นว่าวิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย HPLC ระบบที่ 2 มีความจำเพาะเจาะจง (Specificity) เมื่อทดสอบความทนของวิธี (Robustness) ด้วยการเปลี่ยนแปลงสภาวะทางโครมาโทกราฟีต่าง ๆ ได้แก่ คอลัมน์จากผู้ผลิตต่างกัน อุณหภูมิ อัตราการไหลของตัวพา สัดส่วนของสารละลายตัวพาและความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ พบว่าทุกสภาวะไม่ส่งผลต่อความสามารถในการแยกของพีค โดยพบว่าทุกสภาวะสามารถแยกทั้ง 3 พีคได้อย่างสมบูรณ์ โดยมีรูปร่างของพีค หรือค่า tailing factor ใกล้เคียงกับสภาวะตั้งต้น ยกเว้นการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนสารละลายตัวพา พบว่ามีผลต่อการเปลี่ยนแปลง retention time ของสารแต่ละชนิดต่างกัน โดยหากเพิ่มสัดส่วนของ methanol ในสารละลายตัวพามีผลต่อการลด polarity ของสารละลายตัวพา ทำให้สารมี retention time ลดลง อย่างไรก็ตาม HPLC ระบบที่ 2 ยังคงสามารถแยกสาร acetylcysteine, glutathione และ tranexamic acid เพื่อใช้ยืนยันการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของ HPLC ระบบที่ 1 ได้ เนื่องจาก

ข้อสำคัญของการพิสูจน์เอกลักษณ์ คือ การยืนยันเปรียบเทียบค่า retention time ของสัญญาณพีคของสารที่ต้องการจะตรวจพิสูจน์ในสารละลายตัวอย่างและสารมาตรฐานที่ใช้เทียบ นอกเหนือไปจากการเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารในกรณีที่ต้องการตรวจพิสูจน์สารที่มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง UV cutoff ของ methanol และ acetonitrile และไม่สามารถแสดงสัญญาณในรูปสเปกตรัมที่มีลักษณะจำเพาะเจาะจงได้ หากต้องการความสม่ำเสมอของการแสดงสัญญาณของพีค tranexamic acid ในรูปค่า retention time ต้องพึงระวังทั้งในเรื่องสัดส่วนของสารละลายตัวพา เนื่องจากสัดส่วนของสารละลายตัวพาที่เปลี่ยนไปมีผลต่อ retention time ของ tranexamic acid ค่อนข้างมาก

จากผลการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ตัวอย่างที่อ้างว่าช่วยทำให้ผิวขาวที่ได้รับจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาและสถานตำราวจ ในปีงบประมาณ 2562 ทั้งรูปแบบยาฉีดและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร พบว่าผลิตภัณฑ์ยาฉีดที่อ้างว่าช่วยทำให้ผิวขาว ตรวจพบสารช่วยทำให้ผิวขาวจากวิธีที่พัฒนาขึ้นคิดเป็นร้อยละ 29.7 โดยพบ tranexamic acid และ ascorbic acid มากที่สุด (ร้อยละ 10.8) รองลงมาเป็น glutathione (ร้อยละ 5.4) ซึ่งผลิตภัณฑ์ยาฉีดที่อ้างว่าช่วยทำให้ผิวขาวในปัจจุบันนั้นหาซื้อได้ง่ายตามอินเทอร์เน็ต ไม่ว่าจะเป็น tranexamic acid, ascorbic acid หรือ glutathione ทั้งรูปแบบยาเดี่ยวและแบบผสม สารช่วยให้ผิวขาวตัวอื่น เช่น collagen, coenzyme Q10, placenta, hesperidin ซึ่งการที่ผู้บริโภคซื้อเอง หรือฉีดตามคลินิกเถื่อนถือว่าอันตรายมาก หากเกิดอาการแพ้อาจทำให้ช็อค ความดันต่ำ หายใจลำบาก และเสียชีวิตได้ เนื่องจากเป็นการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ หรืออาจเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดจากการใช้เข็มฉีดยาที่ไม่สะอาด ในกรณี tranexamic acid ก็มีโอกาสดูดซึมเลือดอุดตัน เป็นอันตรายต่อชีวิตได้เช่นกัน ส่วนผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่อ้างว่าช่วยทำให้ผิวขาว ตรวจพบสารช่วยทำให้ผิวขาวจากวิธีที่พัฒนาขึ้นคิดเป็นร้อยละ 30.5 โดยตรวจพบ glutathione มากที่สุด (ร้อยละ 11.1) รองลงมาเป็น ascorbic acid, glutathione ผสม ascorbic acid และ glutathione ผสม acetylcysteine (ร้อยละ 5.6) โดย glutathione นั้นสามารถใส่ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้ไม่มากกว่า 250 มิลลิกรัม จึงนิยมใส่ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ซึ่งมักใส่ร่วมกับสารที่อ้างว่าช่วยทำให้ผิวขาวตัวอื่นด้วย ได้แก่ collagen, astaxanthine, grape seed oil, pine bark เป็นต้น หรือแม้แต่ใส่ร่วมกับ ascorbic acid หรือ acetylcysteine ดังในตัวอย่างที่ตรวจพบ นอกจากนี้ยังตรวจพบ tranexamic acid (ร้อยละ 2.8) อีกด้วย ในกรณีตรวจพบ tranexamic acid และ acetylcysteine ถือว่าผิดกฎหมายเนื่องจากเป็นยาอันตราย

## สรุป

การพัฒนาวิธีตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์สารช่วยทำให้ผิวขาว 5 ชนิด ในยาฉีดและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารด้วยเทคนิค HPLC ทั้ง 2 ระบบ ได้ผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธีในหัวข้อความจำเพาะเจาะจง ชัดจำกัดของการตรวจพบ และความทนของวิธี โดย HPLC ระบบที่ 1 พบว่าสามารถตรวจพิสูจน์สารช่วยทำให้ผิวขาว 5 ชนิด ได้แก่ tranexamic acid, glutathione, acetylcysteine, ascorbic acid และ niacin ในระดับขีดจำกัดของการตรวจพบที่ 2.0, 0.48, 0.12, 0.10 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ HPLC ระบบที่ 2 พบว่าสามารถใช้เพื่อยืนยันผลการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารช่วยทำให้ผิวขาว 3 ชนิด ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงในช่วงค่า UV cutoff ของ methanol และ acetonitrile โดยจัดเป็นรูปแบบของสเปกตรัมที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจง ได้แก่ tranexamic acid, glutathione และ acetylcysteine ในระดับขีดจำกัดของการตรวจพบที่ 2.0, 0.16 และ 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในปีงบประมาณ 2562 มีตัวอย่างยาฉีดและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่อ้างว่าช่วยทำให้ผิวขาว จำนวน 73 ตัวอย่าง ตรวจพบสารช่วยทำให้ผิวขาว จำนวน 22 ตัวอย่าง (30.1%) โดยผู้วิจัยได้ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นทำการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ตัวอย่างเหล่านี้ จากเดิมวิธีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์สามารถตรวจได้ครั้งละ 1-2 ชนิด ใช้เวลา 2-3 วัน ยังไม่รวมเวลาในการยืนยันผลอีก 1 ระบบ กรณีตรวจพบ tranexamic acid, glutathione และ acetylcysteine แต่วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์สารทั้ง 5 ชนิด ได้ด้วยความรวดเร็ว ช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ สามารถ

นำมาใช้ประโยชน์ในงานตรวจเอกลักษณ์ในยาบรรดคดี หรือในการตรวจยาฉีดหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ช่วยให้ผิวขาวในท้องตลาดว่ามีสารที่ผิดกฎหมายหรืออันตรายอยู่หรือไม่ เพื่อเป็นการเฝ้าระวังภัยสุขภาพแก่ผู้บริโภค ถือเป็น การพัฒนางานประจำสู่งานวิจัย (Routine to Research) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในงานประจำได้จริง

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักยาและวัตถุเสพติด สำหรับคำแนะนำ ข้อเสนอแนะทางวิชาการ และให้การสนับสนุนให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

### เอกสารอ้างอิง

1. ประไพพิศ อินเสน. การยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินจากพีชกลุ่มเบอร์รี่ไทย. ว วิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2561; 12(2): 69-82.
2. Chemical Book. Tranexamic acid. [online]. 1967; [cited 2021 Mar 20]; [4 screens]. Available from: URL: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB1117189.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB1117189.htm).
3. Sadako N. Treatment of melasma with tranexamic acid. The Clin Rep 1979; 13: 3129-31.
4. Dashore S, Mishra K. Tranexamic acid in melasma: Why and how? Indian J Drugs Dermatol 2017; 3(2): 61-3.
5. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. ทรานซามิน (transamin) กับผิวขาว ...จริงหรือไม่?. [ออนไลน์]. 2554; [สืบค้น 28 พ.ย. 2560]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://pharmacy.mahidol.ac.th/en/knowledge/article/38/ทรานซามิน-transamin-กับผิวขาว-จริงหรือไม่>.
6. Chemical Book. Glutathione. [online]. 2019; [cited 2021 Mar 20]; [7 screens]. Available from: URL: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB6320803.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6320803.htm).
7. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กลูต้าไธโอน (glutathione) ทำให้ขาวจริงหรือไม่?. [ออนไลน์]. 2553; [สืบค้น 28 พ.ย. 2560]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/6/กลูต้าไธโอน-glutathione-ทำให้ขาวจริงหรือไม่>.
8. Villarama CD, Maibach HI. Glutathione as a depigmenting agent: an overview. Int J Cosmet Sci 2005; 27(3): 147-53.
9. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กลูต้าไธโอน ตอนที่ 2 : ยานีต ยากิน และยาทา. [ออนไลน์]. 2556; [สืบค้น 28 พ.ย. 2560]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/139/กลูต้าไธโอน-glutathione-ตอนที่2-ยานีต-ยากิน-และยาทา>.
10. Chemical Book. N-Acetyl-L-cysteine. [online]. 2019; [cited 2021 Mar 20]; [5 screens]. Available from: URL: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB2127503.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB2127503.htm).
11. DRUGBANK Online. Acetylcysteine. [online]. [cited 2020 Oct 8]; [1 screen]. Available from: URL: <http://go.drugbank.com/drugs/DB06151>.
12. Adil M, Amin SS, Mohtashim M. N-acetylcysteine in dermatology. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2018; 84(6): 652-9.
13. Malathi M, Thappa DM. Systemic skin whitening/lightening agents: What is evidence? Indian J Dermatol Venereol Leprol 2013; 79(6): 842-6.

14. Chemical Book. L(+)-Ascorbic acid. [online]. 2019; [cited 2021 Mar 20]; [6 screens]. Available from: URL: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB7853704.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7853704.htm).
15. Pullar JM, Carr AC, Vissers MCM. The role of vitamin C in skin health. *Nutrients* 2017; 9(8): 866. (27 pages).
16. Bandyopadhyay D. Topical treatment of melasma. *Indian J Dermatol* 2009; 54(4): 303-9.
17. Chemical Book. Nicotinic acid. [online]. 2017; [cited 2021 Mar 20]; [5 screens]. Available from: URL: [https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiescb0276607\\_EN.htm](https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiescb0276607_EN.htm).
18. National Library of Medicine. Nicotinic acid. [online]. 2004; [cited 2017 Nov 28]; [1 screen]. Available from: URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nicotinic-acid>.
19. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ยาควบคุมพิเศษ ฉบับที่ 35. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 125 ตอนพิเศษ 173 ง (วันที่ 5 พฤศจิกายน 2551). หน้า 20.
20. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง ข้อกำหนดการใช้ส่วนประกอบที่สำคัญของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดกรดอะมิโน. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 123 ตอนพิเศษ 111 ง (วันที่ 18 ตุลาคม 2549). หน้า 15.
21. ศูนย์พิษวิทยารามาธิบดี คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล. Antidotes (ยาต้านพิษ): N-acetylcysteine (NAC). [ออนไลน์]. [สืบค้น 15 มี.ค. 2564]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://med.mahidol.ac.th/poisoncenter/th/anti-cov/Nac>.
22. MIMS. Ascorbic acid. [online]. [cited 2021 Mar 15]; [1 screen]. Available from: URL: <https://www.mims.com/thailand/drug/info/ascorbic%20acid?mtype=generic>.
23. Drugs.com. Niacin. [online]. 2018; [cited 2021 Mar 15]; [33 screens]. Available from: URL: <https://www.drugs.com/pro/niacin.html#:~:text=The%20most%20commonly%20reported%20adverse,vomiting%2C%20increased%20cough%20and%20pruritus>.
24. Chang ML, Chang CM. Simultaneous HPLC determination of hydrophilic whitening agents in cosmetic products. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 33(4): 617-26.
25. International Conference on Harmonization of Technical Requirement for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Geneva: ICH Steering Committee; 2005.
26. Patil KR, Rane VP, Sangshetti JN, Shinde DB. Assay determination of tranexamic acid in pharmaceutical dosage form (tablet) using HPLC and ELS detector. *Eurasian J Anal Chem* 2010; 5(3): 204-11.
27. Tranexamic acid. In: The Japanese pharmacopeia. 17<sup>th</sup> ed. Tokyo: Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science Society of Japan; 2016. p. 1708-1709.

# Method Validation for Identification of 5 Skin Whitening Agents Using HPLC Technique

**Thiwanporn Kwankitpraniti and Jiranuch Jantaweekul**

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

**ABSTRACT** Some skin whitening agents found in drug injections and dietary supplement products may cause serious life-threatening side effects. The method for identification of 5 skin whitening agents (tranexamic acid, glutathione, acetylcysteine, ascorbic acid and niacin) using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique was, thus, developed and validated. The identification took only 10 minutes, using Mightysil C18 column and a mobile phase of a mixture of 0.05% trifluoroacetic acid, acetonitrile and methanol (97:2:1 v/v). The limits of detection for tranexamic acid, glutathione, acetylcysteine, ascorbic acid and niacin were 2.0, 0.48, 0.12, 0.10 and 0.03 mg/ml, respectively. The results were confirmed by an identification using HPLC system-2 to identify 3 agents: tranexamic acid, glutathione and acetylcysteine with absorbances close to the ultraviolet cutoff of methanol and acetonitrile which contain in mobile phase, using Zorbax Eclipse XDB C18 column and a mobile phase of a mixture of buffer pH 2.5 and methanol (45:55 v/v). The limits of detection of tranexamic acid, glutathione and acetylcysteine were 2.0, 0.16 and 0.12 mg/ml, respectively. Both methods were validated completely. In the fiscal year 2019, they were used for identification of skin whitening agents in drug injections and dietary supplement products for 73 samples and 22 samples (30.1%) were detected for the prohibited skin whitening agents. In conclusion, the developed methods could identify the 5 skin whitening agents with short time of testing and low analysis cost.

**Keywords:** Skin whitening agent, Method validation, Identification