

การวิเคราะห์คุณภาพยาเม็ด Norfloxacin และ Ofloxacin

Determination of Quality of Norfloxacin and Ofloxacin in Tablets

สุวรรณา วรรัตน์ (Suwanna Vorarat)^{1*}

ฉันทนา อารมย์ดี (Chantana Aromdee)²

พิมพีใจ วิมุกติพันธ์ (Pimjai Vimuktiphun)³

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์เชิงปริมาณของตัวยาสำคัญ นอร์ฟลอกซาซิน และ โอฟลอกซาซิน ในยาเม็ดที่มีขายในร้านขายยา ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่มีวัฏภาคหนึ่งเป็นคาร์บอน 18 และวัฏภาคเหลว คือ 10 mM เตตราเอทิลแอมโมเนียมโบรไมด์, 10 mM โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ในอะเซทไนไตรล์: 25 mM ซิตริก แอซิด (45:55) pH 3.4 ตัวอย่างยาเม็ดนอร์ฟลอกซาซิน และโอฟลอกซาซิน อย่างละ 6 ตัวอย่าง จากร้านขายยาจากจังหวัดขอนแก่น เชียงราย และสงขลา นำมาหาปริมาณสารสำคัญนอร์ฟลอกซาซิน และ โอฟลอกซาซิน พบว่าปริมาณตัวยาสำคัญทั้ง 2 ตัว อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดตามมาตรฐาน USP ซึ่งกำหนดให้มีตัวยาสำคัญเท่ากับ 90-110 % ตามที่ฉลากระบุ

Abstract

This is quantitative analysis of norfloxacin and ofloxacin in tablets using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with stationary phase of C18 and mobile phase of 10mM tetraethylammonium bromide, 10 mM sodium dodecyl sulphate in acetonitrile: 25 mM citric acid (45 :55), pH 3.4. Six samples each of norfloxacin and ofloxacin were collected from drugstores in Khon Kaen, Chiang Rai and Songkhla. The contents of these drugs were found to comply with USP standard of 90-110 % of the labeled amount.

คำสำคัญ: Norfloxacin, Ofloxacin

Keywords: Norfloxacin, Ofloxacin

¹ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³นักศึกษาระดับปริญญาตรี ชั้นปีที่ 5 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*corresponding author, e-mail: tsuwanna@kku.ac.th

บทนำ

ในปัจจุบันยาในท้องตลาดมีอยู่ด้วยกันหลายรายการโดยยาที่มีตัวยาสำคัญเป็นตัวเดียวกันก็อาจจะมีชื่อทางการค้าแตกต่างกันออกไป ยา Norfloxacin และ Ofloxacin (รูปที่ 1) ก็เป็นยาที่มีบริษัทผู้ผลิตอยู่หลายบริษัทเช่นกัน ซึ่งแต่ละบริษัทก็จะมีสูตรตำรับของผลิตภัณฑ์แตกต่างกันออกไป ทำให้ในแต่ละบริษัทอาจมีปริมาณตัวยาสำคัญไม่เท่ากัน ทั้งนี้ปริมาณตัวยาสำคัญของแต่ละตำรับจะต้องอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด ดังนั้นการทดสอบคุณภาพของยาจึงเป็นสิ่งจำเป็น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบปริมาณเภสัชภัณฑ์ว่ามีปริมาณตัวยาสำคัญตามที่ระบุไว้ในฉลากและถูกต้องตามมาตรฐานหรือไม่ ในแต่ละหน่วยมีความแตกต่างกัน (unit-dose variation) มากน้อยเพียงใด เนื่องจากการที่ผู้ป่วยได้รับยาที่มีขนาดหรือปริมาณเท่ากันในทุกๆ ครั้งจะเป็นปัจจัยสำคัญของการเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรค ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมในการหาปริมาณตัวยาสำคัญ Norfloxacin และ Ofloxacin ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography; HPLC) นอกจากนี้แล้วยังมีการตรวจสอบคุณภาพด้านอื่นๆ ของตัวอย่างตามข้อกำหนดตามเภสัชตำรับ เพื่อเป็นการตรวจสอบคุณภาพของยาที่มีขายอยู่ตามท้องตลาดอีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

1. สารเคมี

สารเคมีทั้งหมดที่ใช้ตลอดการวิเคราะห์ มีดังนี้

- 1.1 Norfloxacin, Working standard
- 1.2 Ofloxacin, Working standard
- 1.3 Tetraethylammoniumbromide (MW 210.16)
- 1.4 Sodium dodecyl sulphate
- 1.5 Citric acid anhydrous
- 1.6 Water

1.7 Acetonitrile, HPLC grade

1.8 Methanol, AR grade

1.9 2 N Sodium hydroxide

2. อุปกรณ์

เครื่องมือทั้งหมดที่ใช้ตลอดการวิเคราะห์ มีดังนี้

2.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Column : Alltech; Apollo C18 5u; 150 nm. X 4.6 nm.

Pump : Perkin Elmer series 200 lc pump

Detector : 785A UV/vis Detector

Integrator : PE NELSON Model 1022

Injector : Rheodyne 7725i ; 20 µl

2.2 Microsyringe

2.3 Membrane filter 0.45 µm filter

2.4 Ultrasonic bath

2.5 pH meter

3. วิธีการศึกษา

วิธีการศึกษา แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเก็บตัวอย่างยา การเตรียมสารมาตรฐานและการเตรียมตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างโดยซื้อจากร้านขายยาต่างๆ ที่อยู่ทั้งในจังหวัดขอนแก่นและจังหวัด

อื่นๆภายในประเทศไทยโดยมีชื่อทางการค้า ขนาดความแรงเหมือนหรือต่างกัน

การเตรียมสารมาตรฐานในการทำ calibration curve

สารมาตรฐาน Ofloxacin และสารมาตรฐาน Norfloxacin เตรียมเป็น stock solution ที่ความเข้มข้นอย่างละ 150 µg/ml แล้วนำ stock solution ทั้งสองมาเตรียมสารละลายผสมที่ความเข้มข้นอย่างละ 12 - 48 µg/ml ในการทำ calibration curve

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1.1 นำตัวอย่างยาเม็ดมาจำนวน 5 เม็ดของยาแต่ละชนิด ซึ่งน้ำหนักและหาค่าเฉลี่ยต่อเม็ด

1.2 บดยาเม็ดของแต่ละชนิดทั้ง 5 เม็ด รวมกันในโถร่อนละเอียด

1.3 ชั่งยาแต่ละตัวอย่างให้มีปริมาณของตัวยาสำคัญเทียบเท่ากับ 30 มิลลิกรัมใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วย mobile phase

1.4 ปิเปิดตัวอย่างจาก flask ในข้อ 1.3 มาในปริมาตร 2.5 มิลลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วย mobile phase จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 30 µg/ml

นำสารละลายตัวอย่างของยาแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้น 30 µg/ml ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตัวอย่างละ 2 ครั้ง แล้วหาปริมาณ Ofloxacin และ Norfloxacin โดยใช้สมการเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานโดยหาค่าเฉลี่ยของปริมาณที่ได้จากการฉีด 2 ครั้งต่อ 1 ตัวอย่าง

ขั้นตอนที่ 2 การหา HPLC system ที่เหมาะสม

ขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญในตัวอย่างยา

ผลการศึกษา

การหา HPLC system ที่เหมาะสม

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ HPLC system ที่ใช้ในการวิเคราะห์ในการทดลองนี้จะเป็น reverse phase system โดยทำการทดลองหา mobile phase ที่ให้ค่า retention time ที่เหมาะสมและสามารถแยกพีคทั้งสองออกจากกันโดยสมบูรณ์

ทำการศึกษาค้นหา Mobile phase ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณยา Ofloxacin และ Norfloxacin ซึ่งเมื่อทำการทดลองวิเคราะห์โดยใช้ระบบ Mobile phase ดังผลการศึกษาของ Leroy A. Shervington และ

คณะ (Leroy and Apt, 2005) พบว่าสามารถแยกยา Ofloxacin และ Norfloxacin ได้ดีแต่ใช้เวลาในการ elute สารทั้งสองตัวค่อนข้างนานโดยใช้เวลาประมาณ 30 นาที จึงทำการทดลองต่อโดยการเพิ่มสัดส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ขึ้นเรื่อยๆ จาก 35% acetonitrile จนถึง 50% acetonitrile พบว่าระยะเวลาที่สารถูก elute ออกมาลดลงเรื่อยๆ พบว่าที่ 50% acetonitrile สารจะถูก elute ออกมาได้เร็วเกินไปจนไม่สามารถแยกพีคทั้งสองออกจากกันได้ เปอร์เซ็นต์ของ acetonitrile ที่ 45% เป็นสัดส่วนที่เหมาะสมที่ทำให้สารถูก elute ออกมาได้ในเวลาที่ไม่มากจนเกินไปและให้ค่า resolution ที่ดีสามารถแยกสารออกจากกันอย่างสมบูรณ์ โดยมีค่า resolution เท่ากับ 1.55 (รูปที่ 2)

ดังนั้นจากการศึกษาข้างต้นได้ mobile phase และสภาวะที่ใช้ ในการวิเคราะห์หาปริมาณของยา Ofloxacin และ Norfloxacin คือ

: Mobile phase: 45% aqueous acetonitrile with 10 mM Tetraethylammonium bromide, 10 mM Sodium dodecyl sulphate and 25 mM Citric acid โดยปรับให้มีค่า pH 3.4

: wave length 275 nm

: Flow rate 1 ml/min

การ validate วิธีวิเคราะห์

การ validate วิธีวิเคราะห์เพื่อยืนยันว่า วิธีการวิเคราะห์สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างยา Norfloxacin และ Ofloxacin ได้จริง โดยการทำการ validate ตามหัวข้อต่างๆ ดังนี้

ก. การศึกษาความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Norfloxacin และ Ofloxacin กับ peak area

โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน Norfloxacin และ Ofloxacin 5 ความเข้มข้น นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้ HPLC system ที่จะใช้ในการวิเคราะห์ ใช้ peak area ของ chromatogram ของสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่างๆ มาพล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน และ peak area ของ chromatogram สมการเส้นตรง และค่า r^2 รายงานผลอยู่ในตารางที่ 1

ข. การศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

การศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (within-run precision) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน Norfloxacin และ Ofloxacin 5 ความเข้มข้น แล้วฉีดเข้า HPLC ความเข้มข้นละ 5 ครั้งภายในวันเดียวกัน โดยที่ % RSD เฉลี่ยของ peak area ของสารละลายมาตรฐานไม่เกิน +5 % (ตารางที่ 1)

การศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ระหว่างวัน (between-run precision) โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบผลของการวิเคราะห์ในแต่ละวันเป็นเวลา 5 วัน โดยที่ % RSD เฉลี่ยของ peak area ของสารละลายมาตรฐานไม่เกิน + 5 % (ตารางที่ 1)

ค. การศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง Norfloxacin และ Ofloxacin ให้มีความเข้มข้นครอบคลุมความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานจุดกลางในกราฟมาตรฐาน 2 ความเข้มข้น ฉีดสารละลายผสมความเข้มข้นละ 2 ครั้ง หาค่าเฉลี่ยแล้วนำมาหาค่าความเข้มข้นที่สามารถตรวจพบ เทียบหา % recovery (ตารางที่ 1)

ง. การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถใช้ในการหาปริมาณได้ (LOQ)

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง Norfloxacin และ Ofloxacin ให้มีความเข้มข้น 1 30 และ 51 $\mu\text{g/ml}$ ทำการฉีดสารละลายมาตรฐานผสมในแต่ละความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 7 ครั้ง Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานผสมกับค่า standard deviation ของแต่ละความเข้มข้น หาค่า standard deviation ของ Blank (S_B) ได้จากจุดตัดแกน Y

Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานผสมกับค่าเฉลี่ยของ peak area ในแต่ละความเข้มข้น (mg/ml) จะได้ Y_B จากจุดตัดแกน Y นำไปหาค่า Limit of detection (LOD.) และ Limit of

quantitation (LOQ.) จาก $LOD = 3.3 S_B + Y_B$ และ $LOQ = 10 S_B + Y_B$ จะได้

- ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ (LOD) โดยวิธีนี้ของ Norfloxacin และ Ofloxacin เท่ากับ 0.0970 $\mu\text{g/ml}$ และ 0.1642 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

- ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถใช้ในการหาปริมาณ (LOQ) ได้ของ Norfloxacin และ Ofloxacin เท่ากับ 0.2939 $\mu\text{g/ml}$ และ 0.4975 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

การวิเคราะห์หาปริมาณ Norfloxacin และ Ofloxacin ในสารตัวอย่าง โดยใช้สมการความสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับ Peak area

โดยใช้ปริมาณตัวยาสำคัญที่วิเคราะห์ได้เทียบกับปริมาณตัวยาสำคัญที่ระบุไว้ในฉลากของตัวอย่างยาแต่ละชนิด (% Labelled amount) โดยการเปรียบเทียบกับมาตรฐานของเภสัชตำรับ The United States Pharmacopoeia-The National Formulary (USP27-NF22)⁽²⁾ ซึ่งกำหนดให้ยาเม็ด Norfloxacin และยาเม็ด Ofloxacin ต้องมีปริมาณตัวยาสำคัญอยู่ในช่วงไม่น้อยกว่า 90% และไม่มากกว่า 110% ของ % labeled amount ผลการทดลองแสดงอยู่ในตารางที่ 2

จากผลการทดสอบพบว่าตัวอย่างยาทั้ง 12 ตัวอย่างผ่านมาตรฐานตามกำหนดใน The United States Pharmacopoeia-The National Formulary (USP27-NF22) ซึ่งกำหนดให้ยาเม็ด Ofloxacin และ Norfloxacin มีตัวยาสำคัญอยู่ในช่วง 90-110% labeled amount

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากผลการศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณ Norfloxacin และ Ofloxacin ในตัวอย่างยาสำเร็จรูป โดยใช้วิธีการโครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography; HPLC) นั้นพบว่าระบบการทดลองที่ใช้มีความน่าเชื่อถือในการ

ใช้วิเคราะห์ตัวอย่างยา และจากการวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างยาแต่ละชนิดผ่านมาตรฐานตามเภสัชตำรับ The United Stated Pharmacopoeia-The National Formulary (USP27-NF22, 2004)

วิธีการวิเคราะห์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ Norfloxacin และ Ofloxacin ได้พร้อมกัน นอกจากนี้วิธีวิเคราะห์นี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับยาชนิดอื่นๆในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนได้ อาทิ ciprofloxacin levofloxacin อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ กองยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข สำหรับสารมาตรฐาน Norfloxacin และ Ofloxacin

เอกสารอ้างอิง

Leroy, S.A., Michael, A., Bushra, H., and Jame, D. 2005, The simultaneous separation and determination of five quinolone antibiotics using isocratic reversed-phase HPLC: Application to stability studies on an ofloxacin tablet formulation. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 39, 769-775.

United States Pharmacopoeial Convention, The United States Pharmacopoeia-The National Formulary (USP27-NF22), Madison, 2004.

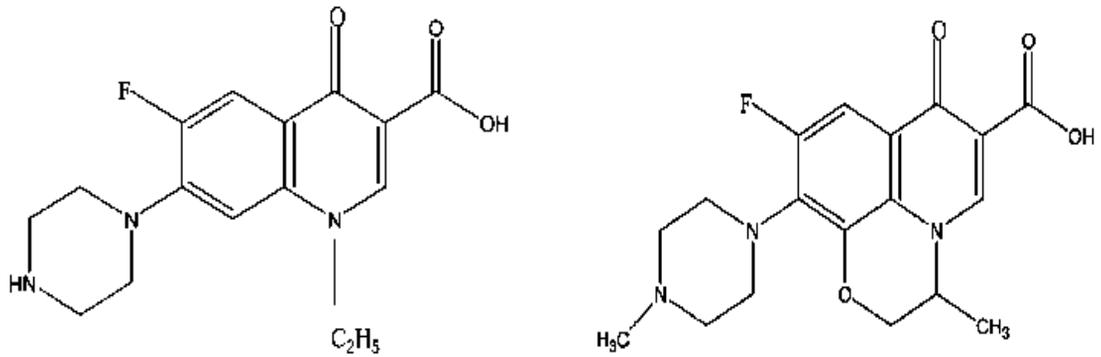
ตารางที่ 1 แสดงผลการ validate ของวิธีการวิเคราะห์

ยา	สมการเส้นตรง	r ²	Within-day Precision %RSD เฉลี่ย	Between-day Precision %RSD เฉลี่ย	% Recovery เฉลี่ย
Norfloxacin	Y = 130342x - 32876	0.9998	0.56	1.66	102.86
Ofloxacin	Y = 35953x + 6320	0.9999	0.47	1.79	100.47

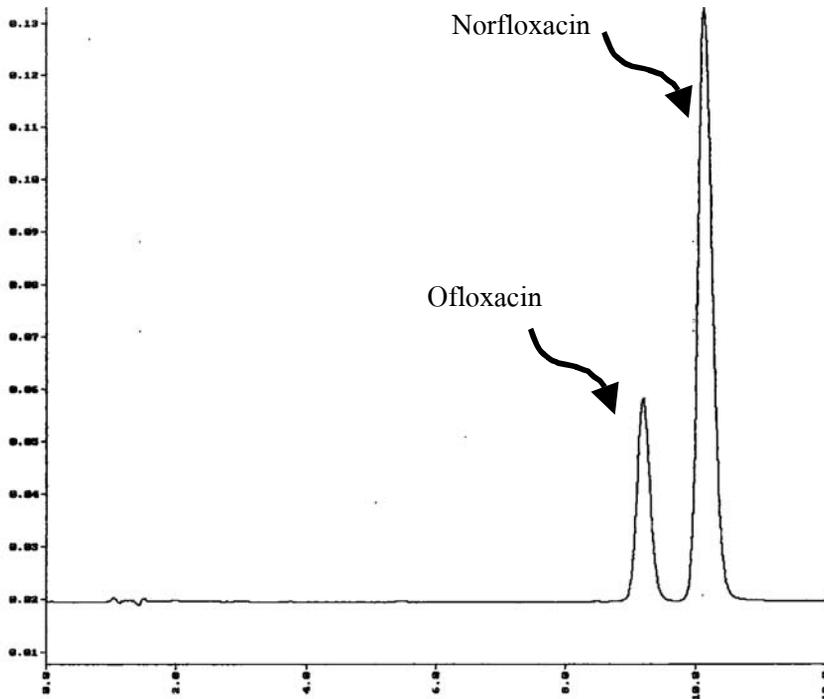
ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์หา % Labelled amount ของยา Norfloxacin และ Ofloxacin ในตัวอย่างยาสำเร็จรูป

ตัวอย่าง	% Labelled amount
A	92.70
B	107.25
C	95.27
D	97.70
E	103.57
F	93.71
G	102.38
H	105.73
I	104.65
J	99.94
K	101.85
L	97.70

หมายเหตุ A-F เป็นตัวอย่าง Norfloxacin G-L เป็นตัวอย่าง Ofloxacin



รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของ Norfloxacin และ Ofloxacin



รูปที่ 2 แสดงโครมาโตแกรมของ Norfloxacin และ Ofloxacin: mobile phase: 45% aqueous acetonitrile with 10 mM Tetraethylammonium bromide, 10 mM Sodium dodecyl sulphate and 25 mM Citric acid โดยปรับให้มีค่า pH 3.4, wavelength 275 nm และ flow rate 1 ml/min