

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแวนโคมัยซินในยาเตรียมเฉพาะคราว รูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

กรรณก สุวรรณราช¹, กุลภัสสร กิตติพินิจนันท์¹, วริษฐา ศิลาอ่อน², อุษณา พัวเพิ่มพูลศิริ³,
สาโรช อ่อนละอ⁴, ชลลิตดา พิษญาจิตติพงษ์^{3*}

¹นักศึกษาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34190 ประเทศไทย

²รองศาสตราจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34190 ประเทศไทย

³ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34190 ประเทศไทย

⁴กลุ่มงานเภสัชกรรม โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ อุบลราชธานี 34000 ประเทศไทย

*ติดต่อผู้พิมพ์: โทร 045-353623 E-mail : chonladda.p@ubu.ac.th

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแวนโคมัยซินในยาเตรียมเฉพาะคราวรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอน
ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

กรรณก สุวรรณราช¹, กุลภัสสร กิตติพินิจนันท์¹, วริษฐา ศิลาอ่อน², อุษณา พัวเพิ่มพูลศิริ³, สาโรช อ่อนละอ⁴, ชลลิตดา พิษญาจิตติพงษ์^{3*}

ว. เภสัชศาสตร์อีสาน 2561; 14(4) : 132-141

รับบทความ : 18 มีนาคม 2561

ตอบรับ : 3 สิงหาคม 2561

แวนโคมัยซินเป็นยาที่ใช้รักษาอาการท้องเสียจากการติดเชื้อ *Clostridium difficile* และการติดเชื้อในลำไส้จาก *Staphylococcus aureus* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแวนโคมัยซินในยาเตรียมเฉพาะคราวแวนโคมัยซินรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนขนาด 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง วิธีการวิจัย: ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในด้านความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity), ความแม่นยำ (precision), ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection; LOD), ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ทดสอบซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ (limit of quantitation; LOQ) และความถูกต้อง (accuracy) ด้วยการใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ที่ประกอบด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่คือ อะซิโตนไตรลอสต์น้าในสัดส่วน 15 : 85 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีด 20 ไมโครลิตร วัฏภาคคงที่คือ คอลัมน์ชนิดคาร์บอน 18 (ขนาดอนุภาค 5.0 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายในและความยาว 4.6 x 250 มิลลิเมตร) ทำการตรวจวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ผลการศึกษาวิจัย: วิธีวิเคราะห์มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานของยาแวนโคมัยซิน มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9999 ในช่วงความเข้มข้น 12.5-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลความแม่นยำมีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่วิเคราะห์ในวันเดียวกันที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 0.88, 1.01 และ 0.71% ตามลำดับ และระหว่างวันเท่ากับ 1.91, 1.46 และ 1.20% ตามลำดับ LOD 1.8878 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ LOQ เท่ากับ 6.0122 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความถูกต้องของวิธีมีร้อยละการคืนกลับเฉลี่ยเท่ากับ 104.12% สรุปผลการวิจัย: วิธีวิเคราะห์นี้มีผลการประเมินผ่านเกณฑ์มาตรฐานของ ICH สามารถใช้เป็นวิธีการวิเคราะห์ในการศึกษาความคงสภาพของยาเตรียมเฉพาะคราวแวนโคมัยซินรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนได้

คำสำคัญ : แวนโคมัยซิน, ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์, ยาเตรียมเฉพาะคราว, ความคงสภาพ, ยาน้ำแขวนตะกอน

Method Validation for Vancomycin Analysis in Extemporaneous Suspensions via HPLC

Kornkanok Suwannarat¹, Kullapas Kittiphinitnunta¹, Warisada Sila-on², Utsana Puapermpoonsiri³,
Sarocho Onlaor⁴, Chonladda Pitchayajittipong^{3*}

¹Pharmacy Students, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

²Associate Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

³Assistant Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

⁴Department of Pharmacy, Sappasitthiprasong Hospital, Ubon Ratchathani 34000, Thailand

*Corresponding author: Tel 045-353623 E-mail : chonladda.p@ubu.ac.th

Abstract

Method Validation for Vancomycin Analysis in Extemporaneous Suspensions via HPLC

Kornkanok Suwannarat¹, Kullapas Kittiphinitnunta¹, Warisada Sila-on², Utsana Puapermpoonsiri³, Saroch Onlaor⁴, Chonladda Pitchayajittipong^{3*}

IJPS, 2018; 14(4) : 132-141

Received : 18 March 2018

Accepted : 3 August 2018

Vancomycin is a drug used for the treatment of diarrhea caused by *Clostridium difficile* and enterocolitis caused by *Staphylococcus aureus*, including Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. This research aims to validate the method for analyzing vancomycin in the extemporaneous suspensions of vancomycin 25 mg/mL by high performance liquid chromatography (HPLC). **Materials and methods:** The study of method validation was included in the topics of linearity, precision, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) and accuracy via HPLC. The HPLC condition was consisted of the mobile phase with the composition of acetonitrile : water in 15 : 85, flow rate 1 mL/min, volume of injection at 20 µL. The stationary phase was the column C18 (particle size 5.0 µm, 4.6 x 250 mm). All of the samples were analyzed by using UV detector with the wavelength of 280 nm. **Results:** The r-square data of linearity was 0.9999 with the range of the concentration 12.5-200 µg/mL. The precision results in the percentage of the relative standard deviation (%RSD) with the concentration 25, 50 and 100 µg/mL were 0.88, 1.01 and 0.71% for intraday, respectively, and 1.91, 1.46, and 1.20% for interday, respectively. From the data of analytical chemistry, the LOD and LOQ can be detected and quantified at 1.8878 µg/mL and 6.0122 µg/mL. Moreover, the accuracy result in the %recovery of vancomycin was 104.12%. **Conclusion:** The method for analyzing vancomycin extemporaneous suspensions met the general requirement of ICH Guideline for validation. It was accurate and reliable for using as a stability-indicating method for the determination of vancomycin extemporaneous suspensions.

Keywords: Vancomycin, Method validation, Extemporaneous preparation, Stability, Suspensions

บทนำ

ในปัจจุบันยาแวนโคมัยซินมีการจำหน่ายในรูปแบบยาที่ใช้ในการบริหารทางหลอดเลือดดำ และยาในรูปแบบรับประทาน ซึ่งยาแต่ละรูปแบบมีข้อบ่งใช้ที่แตกต่างกัน โดยรูปแบบยาที่ใช้ในการบริหารทางหลอดเลือดดำมีข้อบ่งใช้สำหรับรักษาโรคติดเชื้อรุนแรงที่เกิดจากเชื้อกลุ่ม *Staphylococcal*

species และ *Streptococcal* species เช่น การป้องกันการติดเชื้อที่เยื่อหุ้มหัวใจหรือเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ การติดเชื้อในกระแสโลหิต โรคติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง และการติดเชื้อที่ผิวหนังและลักษณะโครงสร้างของผิวหนัง (American pharmacists association, 2016) ส่วนในรูปแบบยาสำหรับ

รับประทาน ใช้สำหรับรักษาอาการท้องเสียที่เกิดจากการติดเชื้อ *Clostridium difficile* และการติดเชื้อในลำไส้ที่เกิดจาก *Staphylococcus aureus* รวมถึงการติดเชื้อดื้อยาในกลุ่ม Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Corbett *et al.*, 2016; Diaz *et al.*, 2017) ซึ่งรูปแบบยาสำหรับรับประทานไม่มีระบุอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ (National drug system development committee, 2016) ร่วมกับอุบัติการณ์การเกิดโรคท้องเสียที่เกิดจากการติดเชื้อ *Clostridium difficile* ซึ่งมีอุบัติการณ์ต่ำในเขตพื้นที่ตั้งของโรงพยาบาล โรงพยาบาลจึงไม่ได้พิจารณาจัดซื้อยาในรูปแบบรับประทานเนื่องจากมีความไม่คุ้มค่าและมีราคาสูง ทางโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานีจึงจัดเตรียมยาเฉพาะคราวแวนโคมัยซินในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอน โดยเตรียมจากรูปแบบยาผงละลายน้ำสำหรับบริหารทางหลอดเลือดดำที่มีในโรงพยาบาลทดแทนการใช้ยาแวนโคมัยซินรูปแบบยารับประทานที่มีขายในท้องตลาดเพื่อให้มีขนาดเหมาะสมกับผู้ป่วยเฉพาะราย ซึ่งการเตรียมยาเฉพาะคราวแวนโคมัยซินในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนในโรงพยาบาลยังไม่มี การทดสอบความคงตัวด้านต่าง ๆ ดังนั้น การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยาเตรียมเฉพาะคราวแวนโคมัยซินในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จึงเป็นสิ่งสำคัญเบื้องต้นที่จะนำไปสู่การศึกษาข้อมูลด้านความคงตัวของตำรับที่มีความน่าเชื่อถือในการวิเคราะห์ต่อไป โดยจะส่งผลให้ผู้ป่วยได้รับยาที่มีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยจากการเตรียมเฉพาะคราวที่เตรียมขึ้นจากโรงพยาบาล

USP 36 NF 31 (2013) ระบุวิธีวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญแวนโคมัยซินไฮโดรคลอไรด์ในตำรับ vancomycin hydrochloride for oral solution ด้วยวิธี antibiotics-microbial assay และมีงานวิจัยที่ทดสอบความคงตัวของยาเฉพาะคราวแวนโคมัยซินในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง วิทยาศาสตร์เคลื่อนที่คือ น้ำ : อะซิโตน ไตรล : ไตรเมทิลามีน : เตตระไฮโดรฟิวแรน อัตราส่วน 4500 : 300 : 7 : 50 ที่ค่า pH 3 พบว่ายามีอายุการใช้งาน 90 วัน เมื่อเก็บรักษาในตู้เย็นและเก็บให้พ้นแสง (Whaley *et al.*, 2011) จากงานวิจัยยาเตรียมเฉพาะคราวแวนโคมัยซินความเข้มข้น 25 mg/mL ซึ่งใช้ SyrSpend SF เป็นน้ำกระสายยาสำเร็จรูป มีส่วนที่เป็นวิทยาศาสตร์เคลื่อนที่คือ เมทานอล : แอมโมเนียมอะซิเตต อัตราส่วน 26 : 74 ที่ค่า pH 3 พบว่ามีความคงตัวและสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 30 วัน (Ensom *et al.*,

2010) สำหรับการศึกษาด้านความคงตัวของยาแวนโคมัยซินในขวดพลาสติกและเข็มฉีดยา วิทยาศาสตร์เคลื่อนที่คือ เมทานอล : แอมโมเนียมอะซิเตต อัตราส่วน 22 : 88 ที่ค่า pH 2.5 (Smith *et al.*, 2017) นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ใช้วิทยาศาสตร์เคลื่อนที่คือ น้ำที่ปรับ pH เป็น 2 ด้วยกรดฟอสฟอริก : อะซิโตน ไตรล อัตราส่วน 50 : 50 (Chauhan and Bhatt, 2015) จากข้อมูลสภาวะทั้งหมดที่ได้จากการสืบค้น นำมาซึ่งการพัฒนาและปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์เพื่อให้ได้วิธีการที่ความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพมากขึ้น ที่เหมาะสมกับการนำไปใช้งานในสภาวะการใช้งานจริงของการวิเคราะห์ยาเฉพาะคราวแวนโคมัยซินในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอน

งานวิจัยเรื่องนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาเตรียมเฉพาะคราวแวนโคมัยซินในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนความเข้มข้น 25 mg/mL ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ในด้านความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) ความแม่นยำ (precision) ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection; LOD) ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ทดสอบ ซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ (limit of quantitation; LOQ) และความถูกต้อง (accuracy) ที่สามารถใช้เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสมในการศึกษาความคงสภาพของยาเตรียมเฉพาะคราวแวนโคมัยซินรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนได้

วิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ แวนโคมัยซินไฮโดรคลอไรด์จาก Edicin® (vancomycin powder for injection 500 mg/vial), เมทานอลและอะซิโตน ไตรลคุณภาพระดับ HPLC จากบริษัท RCI LabScan® (Bangkok, Thailand), น้ำปราศจากไอออนจากเครื่องของบริษัท Labconco® (Kansas, USA) และเครื่องมือที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงจากบริษัท Thermo Scientific® (Germering, Germany) ที่ประกอบด้วย autosampler และใช้ UV-visible detector ที่ความยาวคลื่น 280 nm ประมวลผลการวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ (software) คือ Chromeleon version 6.80, คอลัมน์ขนาด 4.6 x 250 mm. ที่บรรจุด้วยคาร์บอน 18 ขนาดอนุภาค 5.0 µm จากบริษัท Vertical® (Nonthaburi, Thailand), เครื่อง double beam UV-visible spectrophotometer จากบริษัท PerkinElmer® (Singapore)

การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC แบบวัฏภาคย้อนกลับ (reverse phase column) ใช้คอลัมน์ขนาด 4.6 x 250 mm. ที่บรรจุด้วยคาร์บอน 18 ขนาดอนุภาค 5.0 μm . โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่คือ อะซิโตนไตรลต่อน้ำในสัดส่วน 15 : 85 และควบคุมความเป็นกรดต่างในน้ำด้วยกรดฟอร์มิกให้มี pH อยู่ในช่วง 2-3 อัตราการไหล 1 mL/min ปริมาตรการฉีด 20 μL และทำการตรวจวัดโดยใช้ความยาวคลื่น 280 nm. (Chauhan and Bhatt, 2015; Valle *et al.*, 2008; Abu-Shandi, 2009; Hagihara, 2013; Nirmala and Ramesh Raju, 2013)

การเตรียมสารตัวอย่าง

เตรียมสารละลายมาตรฐานของยาแวนโคมัยซิน (standard solution) ความเข้มข้น 25 mg/mL โดยบดลดขนาดด้วยโกร่ง และชั่งผงยาแวนโคมัยซินอย่างละเอียดปริมาณ 500 mg ละลาย และปรับปริมาตรใน volumetric flask ด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 10 mL เตรียมสารละลายมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น คือ 12.5, 25, 50, 100 และ 200 $\mu\text{g/mL}$ เพื่อใช้เป็นข้อมูลของการสร้างกราฟมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายตัวอย่างโดยเขย่าขวดยาที่มีความเข้มข้น 25 mg/mL ให้ยากระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกัน บีบเปิดตัวอย่างยาเตรียม 1 mL ละลาย และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 10 mL ใน volumetric flask เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ กรองผ่านหัวกรองขนาด 0.45 μm จากนั้นบรรจุลงขวดสำหรับบรรจุลงเครื่อง HPLC

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)

ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity) เป็นความสามารถของวิธีการทดสอบที่จะให้ผลการทดสอบเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานในช่วงความเข้มข้นที่กำหนดไว้ ซึ่งทดสอบได้ด้วยการเตรียมสารมาตรฐานอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น (Kanyanuwat and Nakum, 2012) เพื่อดูลักษณะของความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ได้

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (standard solution) ของยาแวนโคมัยซิน โดยการชั่งสารมาตรฐานของยาแวนโคมัยซิน ปริมาณ 500 mg อย่างแม่นยำด้วยเครื่องชั่ง และละลายยาและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ให้เป็นสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นเริ่มต้น 25 mg/mL ปริมาตร 20 mL เจือจางจนได้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานสุดท้าย 12.5, 25, 50, 100 และ 200 $\mu\text{g/mL}$ จากนั้น

กรองสารละลายผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 μm แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง HPLC โดยฉีดความเข้มข้นละ 5 ครั้ง เพื่อนำผลมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยแกน x คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานของยาแวนโคมัยซิน มีหน่วย $\mu\text{g/mL}$ และแกน y คือ พื้นที่ใต้กราฟ จากนั้นคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) ซึ่งค่า r^2 ต้องไม่ต่ำกว่า 0.9950 (ICH guideline, 2005)

ความแม่นยำ (Precision)

ความแม่นยำ (Precision) เป็นคุณลักษณะที่แสดงความสามารถในการทดสอบสารมาตรฐานความเข้มข้นเดิมซ้ำกันหลายครั้งแล้วให้ผลที่ได้ออกมามีค่าใกล้เคียงกัน (Kanyanuwat and Nakum, 2012)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (standard solution) ของยาแวนโคมัยซิน โดยการชั่งสารมาตรฐานของยาแวนโคมัยซิน ปริมาณ 500 mg อย่างแม่นยำด้วยเครื่องชั่ง ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ให้เป็นสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 25 mg/mL ปริมาตร 20 mL เจือจางจนได้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานสุดท้าย 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ จากนั้นทำการกรองสารละลายมาตรฐานผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 μm จำนวน 3 ความเข้มข้น และทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยฉีดความเข้มข้นละ 6 ครั้ง เพื่อนำผลมาวิเคราะห์หาค่า %RSD ซึ่งค่า %RSD ไม่ควรเกิน 2% (ICH guideline, 2005)

ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of detection; LOD) ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ทดสอบซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ (Limit of quantitation; LOQ)

ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection; LOD) หมายถึง ปริมาณความเข้มข้นสารมาตรฐานต่ำสุดที่สามารถตรวจหรือวัดได้ แต่ไม่สามารถแสดงปริมาณได้อย่างมีความถูกต้องหรือค่าความแม่นยำได้ โดยทั่วไป LOD มีค่าประมาณ 3 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารละลาย blank (Kanyanuwat and Nakum, 2012)

ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ทดสอบซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ (limit of quantitation; LOQ) หรือขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณคือ ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารมาตรฐาน ซึ่งสามารถหาปริมาณได้โดยที่มีความถูกต้องและความแม่นยำเป็นที่ยอมรับ สามารถแสดงค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบได้ ดังนั้นขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณจึงเป็นคุณสมบัติของวิธีที่

แสดงความสามารถในการรายงานผลที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่มีความเชื่อมั่นระดับหนึ่ง โดยทั่วไป LOQ จะมีค่าเป็น 3 เท่าของ LOD หรือประมาณ 10 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารละลาย blank (Panchon, 2016)

ความถูกต้อง (Accuracy)

ความถูกต้อง (Accuracy) เป็นคุณลักษณะที่แสดงว่าผลการทดสอบมีค่าเข้าใกล้ค่าจริงหรือค่าอ้างอิงหรือค่าที่ยอมรับ (Kanyanuwat and Nakum, 2012) การเตรียมสารละลายมาตรฐานยาแวนโคมัยซินความเข้มข้น 25 mg/mL โดยการชั่งสารมาตรฐานยาแวนโคมัยซินอย่างแม่นยำด้วยเครื่องชั่งปริมาณ 250 mg นำมาละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) และปรับปริมาตรใน volumetric flask จนครบ 10 mL

การเตรียมยาเตรียมเฉพาะคราวแวนโคมัยซินในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนความเข้มข้น 25 mg/mL โดยบดลดขนาดผงยาในโกร่งและชั่งผงยาอย่างแม่นยำปริมาณ 500 mg จากนั้นนำผงยาผสมกับน้ำกระสายยา (vehicle) ในโกร่งโดยใส่ปริมาตรครั้งแรกเพียงเล็กน้อยเพื่อให้ผงยาเปียก จากนั้นแบ่งใส่ 2 ครั้งจนครบปริมาตร 15 mL (3/4 ของตำรับ) อีก 5 mL (1/4 ของตำรับ) ใช้กลั้วโกร่งและปรับปริมาตรจนครบ 20 mL ในกระบอกตวงและเทออกมาคนให้เข้ากัน จากนั้นนำบรรจุยาในขวดแก้วสีชา

การทดสอบความถูกต้องโดยใช้วิธี standard addition ซึ่งทำโดยแบ่งชุดทดสอบออกเป็น 2 ชุด

ชุดที่ 1 ยาเตรียมเฉพาะคราวแวนโคมัยซินในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนโดยที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานยาแวนโคมัยซิน เตรียมโดยปิเปตแวนโคมัยซินในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนความเข้มข้น 25 mg/mL ที่เตรียมไว้มา 1 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ใน volumetric flask จนครบ 10 mL จากนั้นทำการผสมให้เข้ากัน จะได้ความเข้มข้น 2.5 mg/mL เจือจางโดยปิเปตสารละลายความเข้มข้น 2.5 mg/mL มา 0.1, 0.2 และ 0.4 mL จำนวน 3 volumetric flask ตามลำดับ ปรับปริมาตรแต่ละ volumetric flask จนครบ 10 mL เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 µg/mL ตามลำดับ ทำการผสมให้เข้ากันและนำมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 µm โดยเตรียมความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

ชุดที่ 2 ยาเตรียมเฉพาะคราวแวนโคมัยซินในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนโดยการเติมสารละลายมาตรฐานยาแวนโคมัยซิน เตรียมโดยปิเปตแวนโคมัยซินในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอน (vancomycin suspensions) ความเข้มข้น 25 mg/mL ที่เตรียมไว้มา 1 mL ปรับปริมาตรจนครบ 10 mL จากนั้นเจือจางครั้งที่ 2 โดยปิเปตสารละลายมา 0.1, 0.2 และ 0.4 mL และ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานยาแวนโคมัยซิน (vancomycin standard solutions) ความเข้มข้น 2.5 mg/mL มาอีก 0.1 mL ใส่ใน volumetric flask ทั้ง 3 ตัวอย่างที่เตรียมไว้ (0.1, 0.2 และ 0.4 mL) ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) จนครบ 10 mL ทำการผสมให้เข้ากันและนำมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 µm โดยเตรียมความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ (Ravisankar *et al.*, 2015)

$$\% \text{Recovery} = [(C1 - C2) / C3] \times 100 \quad \text{สมการที่ 1}$$

C1 = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน

C2 = ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

C3 = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป

จากนั้นคำนวณ %recovery ซึ่งค่า %recovery ที่ผ่านเกณฑ์ควรอยู่ในช่วง 90-115% (The United State Pharmacopeia Convention, 2013)

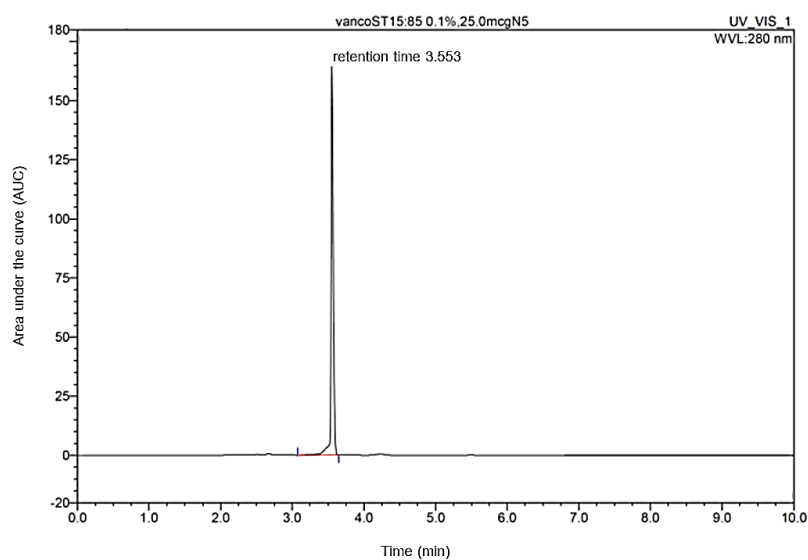
ผลการทดลอง

ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)

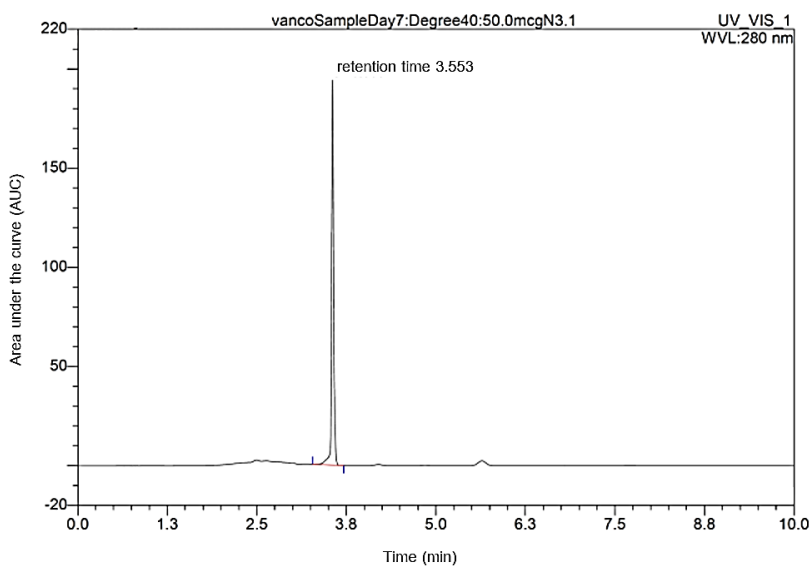
จากโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่างแวนโคมัยซินพบว่า retention time เท่ากับ 3.553 นาที ดังรูปที่ 1(A) และ 1(B) ตามลำดับ แสดงว่าสภาวะที่ใช้ทดสอบมีความเหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณยาแวนโคมัยซินในยาเตรียมเฉพาะคราวรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอน

การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของเครื่องมือเป็นคุณลักษณะในการแสดงความสัมพันธ์ที่เป็นสัดส่วนโดยตรงระหว่างสัญญาณจากเครื่องมือวัด (response) ในการทดสอบคือพื้นที่ใต้กราฟ (area under the curve ; AUC) และความเข้มข้นของสารในช่วงของการศึกษา ได้แก่ 12.5, 25, 50, 100 และ 200 µg/mL เมื่อทำการทดสอบซ้ำ 5 ครั้ง มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) ของค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.9999 โดยมีสมการเส้นตรง คือ $y = 0.0709x + 3.4099$ และดังรูปที่ 1(C)

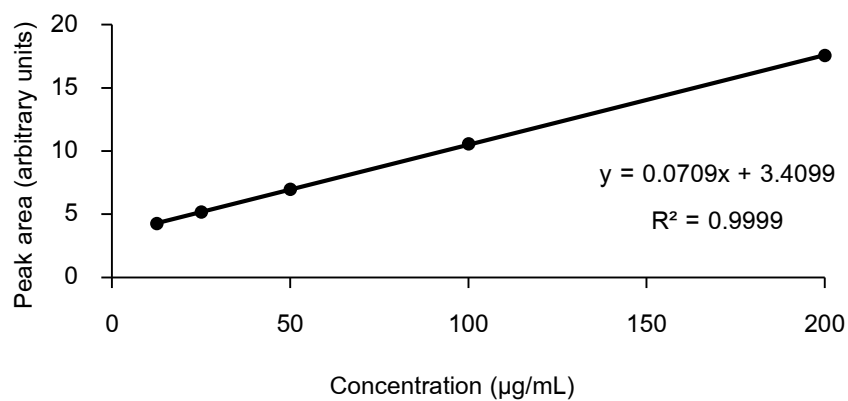
จากผลการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงพบว่าพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.9999 ซึ่งผ่านเกณฑ์การทดสอบโดย ICH guideline 2005 กำหนดให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) ต้องมีค่ามากกว่า 0.9950 จึงผ่านเกณฑ์การทดสอบ และผลการทดสอบสามารถบอกถึงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่เกิดขึ้นระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานและพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งสามารถทำนายได้ด้วยสมการเส้นตรง $y = 0.0709x + 3.4099$ ในช่วงความเข้มข้น 12.5-200 µg/mL



(A)



(B)



(C)

รูปที่ 1 (A) กราฟโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานยาแวนโคมัยซิน 25 $\mu\text{g/mL}$ (B) โครมาโทแกรมของสารตัวอย่างยาแวนโคมัยซิน 50 $\mu\text{g/mL}$ (C) ผลการทดสอบเฉลี่ยของ linearity

ความแม่นยำ (Precision)

ผลการทดสอบความแม่นยำ (precision) เพื่อหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยพิจารณาจากค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation ; RSD) จากผลการทดสอบพบว่าค่า %RSD ของความเข้มข้นในสารละลายมาตรฐาน 25, 50 และ 100 µg/mL ในการทดสอบวันเดียวกัน (intraday) เท่ากับ 0.88, 1.01 และ 0.71% ตามลำดับ และระหว่างวัน (interday) เท่ากับ 1.91, 1.46 และ 1.20% ตามลำดับ จากการทดสอบความแม่นยำ ดังตารางที่ 1 พบว่าเมื่อพิจารณาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) กำหนดให้ค่า %RSD ต้องมีค่าน้อยกว่า 2% จึงผ่านเกณฑ์การทดสอบ ซึ่งผลการทดสอบค่า %RSD ของสารละลายมาตรฐานผ่านเกณฑ์การทดสอบทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ

ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of detection; LOD) ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ทดสอบซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ (Limit of quantitation; LOQ)

ขีดจำกัดในการตรวจพบหรือความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีการทดสอบสามารถวัดได้ (LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณหรือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดสารตัวอย่างโดยที่มีความแม่นยำและความเที่ยงเป็นที่ยอมรับ (LOQ) ในกรณีไม่มี sample blank ให้นำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำมาวิเคราะห์หา

ค่า SD โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 50 µg/mL จำนวน 3 ตัวอย่าง (A, B และ C) ฉีดตัวอย่างละ 7 ครั้ง ด้วยเครื่อง HPLC ผลการทดสอบพบว่า LOD มีค่า 1.8878 µg/mL และ LOQ มีค่า 6.0122 µg/mL ดังตารางที่ 2 จากการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีการทดสอบสามารถวัดได้ (LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณหรือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดสารตัวอย่างโดยที่มีความถูกต้องและความแม่นยำเป็นที่ยอมรับ (LOQ) เป็นค่าที่ได้จากการคำนวณจากสมการที่ 2 และ 3 ตามลำดับ (Sa-ngeumrum *et al.*, 2017)

$$\text{LOD} = 3.14 \text{ SD} \quad \text{สมการที่ 2}$$

$$\text{LOQ} = 10 \text{ SD} \quad \text{สมการที่ 3}$$

ความถูกต้อง (Accuracy)

ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ การศึกษาใช้วิธี standard addition และพิจารณาความถูกต้องโดยการวิเคราะห์ค่า %recovery ซึ่งผลการทดสอบพบว่าค่า %recovery ของสารละลายมาตรฐานเฉลี่ยเท่ากับ 104.12% ดังตารางที่ 3

จากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของสารละลายมาตรฐาน อยู่ระหว่าง 98.84% และ 111.00% และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 104.12% ดังนั้นผลการทดสอบจึงผ่านเกณฑ์โดย ICH guideline 2005 กำหนดให้ค่า %recovery ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 90.00-115.00%

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความแม่นยำใน Intraday และ Interday

ฉีดครั้งที่	ความเข้มข้นแวนโคมัยซิน					
	(25 µg/mL)		(50 µg/mL)		(100 µg/mL)	
	Intraday	Interday	Intraday	Interday	Intraday	Interday
1	24.5621	25.8645	50.7645	49.5458	100.0615	101.0959
2	24.8234	24.4620	50.5839	49.3244	98.9358	100.9972
3	24.4407	24.8797	51.6559	50.8491	98.9617	102.1495
4	24.6088	25.0041	50.2666	50.4288	98.8648	102.4979
5	24.9336	25.7151	50.3540	49.1721	100.2295	100.1862
6	24.3785	25.0073	50.4372	50.2102	100.3279	101.6107
ค่าเฉลี่ย (Mean)	24.6245	24.8900	50.6770	50.2160	99.5635	100.4932
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	0.2161	0.4764	0.5108	0.7334	0.7100	1.2221
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)	0.8777	1.9141	1.0080	1.4606	0.7131	1.2027

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบเพื่อหาค่า LOD และ LOQ

ฉีดครั้งที่	ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน		
	A (50 µg/mL)	B (50 µg/mL)	C (50 µg/mL)
1	49.5458	50.7645	50.1044
2	49.3244	50.5839	50.6093
3	50.8491	51.6559	50.4090
4	50.4288	50.2666	50.0240
5	49.1721	50.3540	49.8970
6	50.2102	50.4372	48.4386
7	49.8561	50.3103	50.0254
Mean	49.9124	50.6246	49.9297
SD	0.6143	0.4865	0.7029
Mean SD		0.6012	
LOD		1.8878	
LOQ		6.0122	

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความถูกต้องโดยวิธี standard addition และค่า %recovery

ความเข้มข้น (µg/mL)	C1 µg/mL	C2 µg/mL	C3 µg/mL	%Recovery
25	50.23	24.30	25.00	103.71
	50.02	24.42	25.00	102.39
	51.31	24.30	25.00	108.03
50	76.33	51.48	25.00	99.40
	77.25	50.86	25.00	105.55
	76.25	51.54	25.00	98.84
100	127.48	99.73	25.00	111.00
	129.74	102.80	25.00	107.77
	128.38	103.29	25.00	100.35
เฉลี่ย				104.12

C1 คือความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

C2 คือความเข้มข้นของตัวอย่าง

C3 คือเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป

อภิปรายผลและสรุปผลการวิจัย

ในการศึกษานี้มีการเตรียมสารละลายมาตรฐานจากยาแวนโคมัยซินไฮโดรคลอไรด์ ซึ่งเป็นรูปแบบผลิตภัณฑ์ยาฉีดเข้าหลอดเลือดดำ โดยใช้เป็นสารเทียบเท่าสารมาตรฐานในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแวนโคมัยซินในยาเตรียมเฉพาะคราวรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งควบคุมสภาวะที่ใช้ในการทดสอบเพื่อลดปัจจัยรบกวนในการวิเคราะห์ (Whaley *et al.*, 2011) เช่น สารช่วยในตำรับยาแวนโคมัยซินที่ใช้ในการทดสอบสารช่วยในการเตรียมน้ำกระสายยา และทำการทดสอบด้วยเครื่อง double beam uv-visible spectrophotometer เพื่อหา $\lambda_{\max}$ และพิจารณาว่าไม่มีสารอื่นที่มีค่า $\lambda_{\max}$ ที่ 280 nm. เช่นเดียวกับแวนโคมัยซิน (Chauhan and Bhatt, 2015) จากการทดสอบพบว่าไม่มีสารช่วยอื่นที่มีค่า $\lambda_{\max}$ ที่ 280 nm. ดังนั้นจึงพิจารณาใช้ตัวยาแวนโคมัยซินในรูปแบบยาฉีดเข้าหลอดเลือดดำทดแทนการใช้สารมาตรฐานแวนโคมัยซิน รวมทั้งจากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแวนโคมัยซินในการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาในด้านของสภาวะที่ใช้ในการทดสอบ พบว่าสามารถปรับปรุงให้มีสภาวะที่ง่ายต่อการทดสอบ และการเตรียมสารตัวอย่างเคลื่อนที่ที่มีความซับซ้อนลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาวิเคราะห์ในตัวอย่างที่คล้ายกัน (Smith *et al.*, 2017) การที่สามารถประยุกต์ใช้สารละลายยาแวนโคมัยซินรูปแบบผลิตภัณฑ์ยาฉีดเข้าหลอดเลือดดำ มาทดแทนการใช้สารมาตรฐานของแวนโคมัยซินที่มีราคาแพงนั้น เป็นข้อได้เปรียบที่สามารถสนับสนุนให้หน่วยผลิตยาในโรงพยาบาลสามารถดำเนินงานได้เอง เนื่องจากปริมาณยาฉีดที่ใช้นั้นเป็นไปตามข้อกำหนดใน USP ซึ่งมีปริมาณยาอยู่ในช่วงร้อยละ 90-115 ของปริมาณที่ระบุบนฉลาก และปริมาณโลหะหนักต้องไม่เกินร้อยละ 0.003 ดังนั้นยาฉีดแวนโคมัยซินจึงสามารถใช้เป็น working standard เพื่อหาปริมาณสารในการวิเคราะห์ได้ (USP 36 NF 31, 2013)

สำหรับผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาแวนโคมัยซินพบว่า ข้อมูลที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยที่เคยมีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์มาก่อน (Chauhan and Bhatt, 2015; Smith *et al.*, 2017) โดยที่การวิจัยนี้ใช้สภาวะในการทดสอบที่มีความซับซ้อนลดลง ตัวอย่างเช่นด้านความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) มีข้อมูลการใช้ความเข้มข้นของสารมาตรฐานในช่วง 2-500 $\mu\text{g/mL}$ (Chauhan and Bhatt, 2015) การวิจัยครั้งนี้ใช้ความเข้มข้นของ

สารมาตรฐานอยู่ในช่วง 12.5-200 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งเป็นช่วงที่แคบกว่า แต่มีค่าสูงสุดและต่ำสุดของความเข้มข้นครอบคลุมในการวิเคราะห์ปริมาณยาแวนโคมัยซิน ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) มากกว่า 0.995 ความแม่นยำ (precision) มีค่า %RSD น้อยกว่า 2 และความถูกต้อง (accuracy) มีค่า %recovery อยู่ในช่วง 90-115%

ผลการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณยาเตรียมเฉพาะคราวแวนโคมัยซินในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนขนาด 25 mg/mL ซึ่งปรับปรุงวิธีวิเคราะห์จากวิธีมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณแวนโคมัยซินในยาเตรียมเฉพาะคราวรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนจาก ICH guideline 2005 พบว่ามีผลการทดลองในด้านความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) ของค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.9999 ความแม่นยำ (precision) มีค่า %RSD เท่ากับ 0.9610 ในการทดสอบ intraday และมีค่า %RSD ของความเข้มข้นในสารละลายมาตรฐาน 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ เท่ากับ 0.88, 1.01 และ 0.71% ตามลำดับ และ 1.91, 1.46 และ 1.20% ในการทดสอบ interday ตามลำดับ ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection; LOD) มีค่า 1.8878 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ทดสอบซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ (limit of quantitation; LOQ) มีค่า 6.0122 $\mu\text{g/mL}$ และความถูกต้อง (accuracy) มีค่า %recovery เฉลี่ยเท่ากับ 104.12% มีผลการทดสอบผ่านเกณฑ์ตามข้อกำหนด ICH guideline 2005 ซึ่งผลการทดสอบนี้จะเป็นตัวบ่งชี้ถึงความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ที่จะทำการทดสอบต่อไปในอนาคต จากการที่มีวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาเตรียมเฉพาะคราวแวนโคมัยซินในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนความเข้มข้น 25 mg/mL ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่เหมาะสม สามารถนำมาใช้เป็นวิธีการวิเคราะห์ในการศึกษาความคงสภาพของยาเตรียมเฉพาะคราวแวนโคมัยซินในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ ที่อนุเคราะห์เภสัชภัณฑ์ยาฉีด vancomycin และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่เครื่องมืออุปกรณ์ และสารเคมีในการทำงานวิจัยครั้งนี้

References

- Abu-Shandi KH. Determination of vancomycin in human plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem* 2009; 395(2): 527-532.
- Chauhan MK, Bhatt N. A simple and modified method development of vancomycin using high performance liquid chromatography. *J Chromatogr Sep Tech* 2015; 6: 296.
- Corbett AH, Dana WJ, Fuller MA, et al. Drug information handbook with international trade names index. 25th ed. Wolters Kluwer Inc.: Lexicomp; 2016. 1353-56.
- Diaz R, Ramalheira E, Afreixo V, Gago B. Evaluation of vancomycin MIC creep in *Staphylococcus aureus*. *J Glob Antimicrob Re* 2017; 10: 281-284.
- Ensom MH, Decarie D, Lakhani A. Stability of vancomycin 25 mg/mL in Ora-Sweet and water in unit-dose cups and plastic bottles at 4°C and 25°C. *Can J Hosp Pharm* 2010; 63(5): 366-72.
- Hagihara M, Sutherland C, Nicolau DP. Development of HPLC methods for the determination of vancomycin in human plasma, mouse serum and bronchoalveolar lavage fluid. *J Chromatogr Sci* 2013; 51(3): 201-207.
- ICH harmonized tripartite guideline validation of analytical procedures text and methodology: Q2(R1); 2005.
- Kanyanuwat N, Nakum N. The validation of the test method. Department of primary industries and mines; 2012. 22-24.
- National drug system development committee. National of essential medicines; 2016: Government gazette no. 133:255.
- Nirmala K, Ramesh Raju R. Determination of vancomycin by using RP-HPLC method in pharmaceutical preparations. *Int J Res Ayurveda Pharm* 2013; 4(1): 116-119.
- Panchon N. Validation and verification of analytical procedure for impurity. *R&D Newsletter* 2016; 22(2): 19-22.
- Ravisankar P, Navya CN, Pravalika D, Sri DN. A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation. *IOSR J Pharm* 2015; 5(10): 7-19.
- Sa-ngeumrum K, Bungthong S, Sila-on W, Puapermpoonsiri U, Onlaor S, Pitchayajittipong C. Method validation for metronidazole analysis by HPLC in extemporaneous suspensions. *IJPS* 2017; 13(1):219-27.
- Smith AD, Rempel G, Szeitz A, Klassen TL, Ensom MHH. Vancomycin 50 mg/mL suspension in oral syrup: stability in plastic bottles and syringes at 2 temperatures. *Can J Hosp Pharm* 2017; 70(3): 247-9.
- The United State Pharmacopoeia Convention. United States Pharmacopoeia 36, National Formulary 31. Rockville; 2013. 5542-47.
- Valle MJ, Lopez FG, Navarro AS. Development and validation of an HPLC method for vancomycin and its application to a pharmacokinetic study. *J Pharmaceut Biomed* 2008; 48: 835-839.
- Whaley PA. Stability of vancomycin in SyrSpend SF. *Int J Pharm Compd* 2012; 16(2): 167-9.