

การตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ปริมาณเมโทรนิดาโซลในตำรับยาน้ำแขวนตะกอน สำหรับผู้ป่วยเฉพาะคราว ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

กษิตติ สัมรัมย์¹, ศุภชัย บุ่งทอง¹, วริษฐา ศิลาล่อน¹, อุษณา พัวเพิ่มพูลศิริ¹, สาโรช อ่อนละออง², ชลลิตดา พิษญาจิตตพงษ์^{1*}

Received: 31 January 2017

Accepted: 29 March 2017

บทคัดย่อ

บทนำ: ยาเตรียมเฉพาะคราวรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนเมโทรนิดาโซล เตรียมขึ้นที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี เพื่อให้การวิเคราะห์ปริมาณตัวยามีความถูกต้องจึงต้องมีวิธีการตรวจสอบขั้นตอน การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการวิเคราะห์ยาเตรียมเฉพาะคราวในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนเมโทรนิดาโซลขนาด 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเครื่องมือวิเคราะห์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง **วิธีดำเนินการวิจัย:** ศึกษาความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ในด้านความเป็นเชิงเส้น ความแม่นยำ ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีการทดสอบสามารถวัดได้ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดสารตัวอย่างโดยมีความเชื่อมั่นระดับหนึ่งได้ และความถูกต้อง ซึ่งปรับปรุงวิธีวิเคราะห์จากวิธีมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณยาเมโทรนิดาโซลในรูปแบบยาเม็ด ใน USP 36 NF 31 ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่คือน้ำและเมทานอลในสัดส่วน 80 ต่อ 20 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรการฉีด 10 ไมโครลิตรและใช้คอลัมน์ขนาด 150 x 4.6 มิลลิเมตร ที่บรรจุด้วยคาร์บอน 18 ขนาดอนุภาค 5.0 ไมโครเมตรและทำการตรวจวัดโดยใช้ความยาวคลื่นแสง 254 นาโนเมตร **ผลการวิจัย:** จากการทดสอบกระบวนการตรวจสอบความถูกต้องพบว่าความเป็นเชิงเส้นมีค่าสัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรงมากกว่า 0.9990 ในช่วงความเข้มข้น 5-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลความแม่นยำมีค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 2.0 ทั้งในการวิเคราะห์วันเดียวกันและระหว่างวัน ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีการทดสอบสามารถวัดได้มีค่า 0.0081 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและพบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดสารตัวอย่างโดยมีความเชื่อมั่นระดับหนึ่งได้มีค่า 0.2460 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลของความถูกต้องมีร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วงกำหนดคือร้อยละ 80-120 **สรุปผลการวิจัย:** วิธีวิเคราะห์ที่ปรับปรุงมีผลการตรวจสอบความน่าเชื่อถือผ่านเกณฑ์ของข้อกำหนดทั่วไป ซึ่งมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ สามารถนำมาใช้เป็นวิธีการวิเคราะห์ในการศึกษาความคงสภาพของยาเมโทรนิดาโซลในรูปแบบยาเตรียมเฉพาะคราวชนิดยาน้ำแขวนตะกอนได้

คำสำคัญ: ความถูกต้องของกระบวนการวิเคราะห์, ยาเมโทรนิดาโซล, ยาเตรียมเฉพาะคราว, ยาน้ำแขวนตะกอน, ความคงสภาพ

วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2560; 13 (ฉบับพิเศษ): 219-227

^{1,2} นักศึกษาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จ.อุบลราชธานี 34190

^{3,4,6} Ph.D. (Pharmaceutical Sciences) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ กลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี 34190

⁵ กลุ่มงานเภสัชกรรม โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จ.อุบลราชธานี 34000

* **ติดต่อผู้พิมพ์:** ชลลิตดา พิษญาจิตตพงษ์ กลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จ.อุบลราชธานี 34190 e-mail: chonladda_pitch@hotmail.com

Method validation for metronidazole analysis by HPLC in extemporaneous suspensions

Kasidit Sa-ngeumrum¹, Supachai Bungthong², Warisada Sila-on³, Utsana Puapermpoonsiri⁴, Saroch Onlaor⁵,
Chonladda Pitchayajittipong^{6*}

Abstract

Introduction: Extemporaneous metronidazole suspensions are consistently prepared at Sapphasitthiprasong hospital in Ubon Ratchathani province. In order to obtain the exact amount of metronidazole, the method of such drug has to be efficiently proved. The main objective of this present research was to validate the method for analyzing metronidazole oral suspensions with the dose of metronidazole 50 mg per mL by using high performance liquid chromatography (HPLC).

Methods: The study of method validation for extemporaneous metronidazole suspensions was included in the topics of linearity, precision, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and accuracy. This method validation finally based on the assay of metronidazole tablet from USP 36 NF 31 and such method was evaluated *via* HPLC. The operating system was obtained under the following HPLC conditions: the mobile phase composition of water : methanol in 80 : 20, flow rate of 1 mL/min, volume of injection at 10 µL, HPLC column C18 150 x 4.6 mm containing particle size 5.0 µm. All samples were analyzed using UV detector at the wavelength of 254 nm. **Results:** According to the study of method validation, the r-square of linearity is more than 0.9990 with the range of the concentration 5 – 25 µg/mL. The precision results shown in the percentage of the relative standard deviation (%RSD) were less than 2 in both intraday and interday. From the data of analytical chemistry, the LOD and LOQ can be detected at 0.0081 µg/mL and 0.2460 µg/mL, respectively. Moreover, the accuracy data which are shown in the %recovery of metronidazole, were still in the range of 80 – 120%. **Conclusion:** The proposed method met the general requirement for validation. It was accurate and reliable and was able to act as a stability-indicating method for the determination of metronidazole in the extemporaneous suspensions.

Keyword: Method validation, Metronidazole, Extemporaneous preparation, Suspensions, Stability

IJPS 2017; 13 (Supplement): 219-227

¹⁻² Undergraduate students, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University,
^{3,4,6} Ph.D. (Pharmaceutical Sciences) Assistant Professor, Division of Pharmaceutical Chemistry and Technology,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University,
⁵ Pharmacy Division, Sapphasitthiprasong Hospital.
* **Corresponding author:** Chonladda Pitchayajittipong. Division of Pharmaceutical Chemistry and Technology,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190 Thailand. e-mail:
chonladda_pitch@hotmail.com

บทนำ

ยาเมโทรนิดาโซล (metronidazole) เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม nitroimidazoles ซึ่งออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) นิยมใช้ในการรักษาการติดเชื้อทริโคโมแนส (trichomoniasis) ในปัจจุบันนี้พบว่ายาเมโทรนิดาโซลที่นิยมใช้มักจะอยู่ในรูปแบบยาเม็ดที่ใช้รับประทานในขนาด 400 มิลลิกรัม (American pharmacists association, 2016) ทำให้ผู้ป่วยที่มีปัญหาการกลืนยาเม็ดปฏิเสธการรับประทานยา จึงมีการเตรียมในรูปแบบยาเตรียมเฉพาะคราวรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนขึ้นในโรงพยาบาล ซึ่งยาเตรียมเฉพาะคราวเป็นยาที่เตรียมโดยไม่ใช้สูตรมาตรฐาน (standard formulation) หรือเป็นยาที่เตรียมขึ้นโดยมีเป้าหมายเพื่อให้ยากับผู้ป่วยเฉพาะคราวที่รักษาในโรงพยาบาลให้ผู้ป่วยได้รับยาที่เหมาะสม ซึ่งยาเตรียมเฉพาะคราวมักใช้กับผู้ป่วยเด็ก คนชราหรือผู้ป่วยที่ไม่สามารถกลืนยาเม็ดได้ (Jew K, 2003) โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ได้เตรียมยาเตรียมเฉพาะคราวรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนของยาเมโทรนิดาโซลความแรง 50 mg/mL และทำการศึกษาความคงสภาพทางเคมีของยาเตรียมดังกล่าวโดยวิเคราะห์ปริมาณยาคงเหลือในตำรับ ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากการค้นคว้าพบข้อมูลด้านการศึกษาความคงตัวของ metronidazole suspensions ที่อยู่ในรูปของ benzoate (Vu et al., 2008) แต่ข้อมูลของ metronidazole suspensions โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเชิงของการตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ปริมาณ metronidazole ยังมีไม่เพียงพอ งานวิจัยนี้มีการปรับปรุงวิธีการจาก pharmacopeia (USP 36 NF 31, 2013) ขึ้นเพื่อให้มีความเหมาะสมกับสภาวะของเครื่อง HPLC ที่มีอยู่ อัน

จะนำไปสู่การตรวจสอบความถูกต้องที่มีประสิทธิภาพ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ยาเมโทรนิดาโซลในยาเตรียมเฉพาะคราวรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอน ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ในหัวข้อความเป็นเชิงเส้น (linearity) ความแม่นยำ (precision) ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีการทดสอบสามารถวัดได้ (limit of detection; LOD) ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดสารตัวอย่างโดยมีความเชื่อมั่นระดับหนึ่งได้ (limit of quantitation; LOQ) ความถูกต้อง (accuracy) เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการนำมาใช้ศึกษาความคงสภาพของยาเตรียมดังกล่าวต่อไป

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC แบบวัฏภาคย้อนกลับ (reverse phase column) 150 มิลลิเมตร x 4.6 มิลลิเมตร คอลัมน์ชนิด C18 ขนาดอนุภาค 5.0 ไมโครเมตร (Water symmetry, USA) ที่ประกอบด้วย autosampler และใช้ UV-visible detector ที่ความยาวคลื่น 254 nm ประมวลผลการวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ (software) ได้แก่ Chromeleon version 6.80 วัฏภาคเคลื่อนที่สำหรับการวิเคราะห์ (mobile phase) ประกอบด้วย เมธานอล ต่อ น้ำ (20 : 80) มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที (mL/min) และมีปริมาตรที่ฉีด (injection volume) คือ 10 ไมโครลิตรต่อครั้ง

2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการวิเคราะห์ (method validation) (Huber L., 2010) เพื่อนำมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณด้วยยาเมโทรนิดาโซลในยาเตรียมเฉพาะคราวรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอน โดยมีเกณฑ์บางหัวข้อเป็นไปตาม ICH guideline สำหรับการ

วิจัยนี้มีการทดสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ในหัวข้อดังต่อไปนี้

2.1 ความเป็นเชิงเส้น (Linearity)

Linearity คือความสามารถของวิธีทดสอบที่ให้ผลทดสอบเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่มีอยู่จริงภายในช่วงความเข้มข้นที่กำหนดวิธีการคือเตรียมอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น (Panchon N., 2015)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (standard solution) ของยาเมโทรนิดาโซล ที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/mL}$ โดยชั่งสารมาตรฐานยาเมโทรนิดาโซล อย่างแม่นยำ 5 mg แล้วนำมาละลายและปรับปริมาตรให้เป็นสารละลายมาตรฐาน 25 mL ด้วย methanol จากนั้นนำมาเจือจางด้วย mobile phase ให้มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 $\mu\text{g/mL}$ แล้วนำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC จากนั้นจึงนำผลที่ได้มาสร้างกราฟ โดยแกน x คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานของยาเมโทรนิดาโซล มีหน่วยเป็น $\mu\text{g/mL}$ และแกน y คือ พื้นที่ใต้กราฟ จากนั้นคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (r^2) และค่า r^2 ต้องไม่ต่ำกว่า 0.9990

2.2 ความแม่นยำ (Precision)

Precision คือความสามารถของวิธีทดสอบที่ให้ผลการทดสอบหรือผลการวิเคราะห์ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน โดยทดสอบซ้ำๆ กันหลายครั้ง (Panchon N., 2015)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานของเมโทรนิดาโซล ที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/mL}$ เตรียมโดยการชั่งสารมาตรฐานเมโทรนิดาโซล อย่างแม่นยำ 5 mg แล้วนำมาละลายและปรับปริมาตรให้เป็นสารละลายมาตรฐาน 25 mL ด้วย methanol จากนั้นนำมาเจือจางด้วย mobile phase ให้มีความเข้มข้น 15 $\mu\text{g/mL}$ จำนวน 7 ตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยทำ

การฉีดตัวอย่างละ 1 ครั้ง ($N=7$) เพื่อนำผลมาวิเคราะห์หาค่า %RSD โดยค่า %RSD ไม่ควรเกิน 2%

2.3 ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีการทดสอบสามารถวัดได้ (LOD) ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดสารตัวอย่างโดยมีความเชื่อมั่นระดับหนึ่งได้ (LOQ) (Panchon N., 2015)

ค่า LOD คือความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีการทดสอบสามารถวัดได้และค่า LOQ คือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดสารตัวอย่างโดยมีความเชื่อมั่นระดับหนึ่งได้

การหาค่า LOD และ LOQ นั้นสามารถทดสอบโดยการวัด blank โดยใช้สารละลายมาตรฐาน metronidazole ที่ความเข้มข้น 5, 15 และ 25 $\mu\text{g/mL}$ ทำการทดสอบซ้ำจุดละ 7 ครั้ง คำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและหาค่าเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้น เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นเฉลี่ยในแกน x แต่ละจุดและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแกน y ลากเส้นตัดแกน y จุดตัดคือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารละลาย blank (S_0) (Magnusson B., 2014) คำนวณได้จากสมการที่ 1

$$\text{LOD} = 3S_0 \quad \text{สมการที่ 1}$$

$$\text{LOQ} = 10S_0$$

เมื่อ S_0 = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารละลาย Blank (จุดตัดแกน y ของกราฟระหว่างความเข้มข้นเฉลี่ยในแกน x แต่ละจุดและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแกน y)

2.4 ความถูกต้อง (Accuracy)

Accuracy คือคุณลักษณะที่ชี้ว่าผลการทดสอบมีค่าเข้าใกล้ค่าจริง (reference standard) หรือค่าอ้างอิงหรือค่าที่ ยอมรับ เนื่องจากในทางปฏิบัติยากที่จะทราบค่าจริง จึงใช้วิธีเปรียบเทียบกับค่าที่ยอมรับแทน (Kanyanuwat N., 2555)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานในความเข้มข้นที่ 25 mg/mL โดยการชั่งผงยามาตรฐานเมโทรนิดาโซล

อย่างแม่นยำ 250 mg นำมาละลายและเจือจางด้วย methanol ให้มีปริมาตร 10 mL และยาเตรียมเฉพาะ คราวรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนของยาเมโทรนิดาโซล ความเข้มข้น 25 mg/mL จากยาเม็ดเมโทรนิดาโซล ขนาด 400 มิลลิกรัมต่อเม็ด จำนวน 3 เม็ด ทำการ บดยาให้ละเอียดในโกร่ง แล้วใช้น้ำกระสายยา สำเร็จรูปเติมลงเพียงเล็กน้อยเพื่อเป็นสารช่วยให้ ผงยาเปียก ค่อยๆ เติมน้ำกระสายยาลงบดผสมที่ละ น้อยในโกร่ง จากนั้นจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกระสาย ยาให้ครบ 24 mL แล้วแบ่งชุดทดสอบออกเป็น 2 ชุด

1. ไม่เติมสารมาตรฐานเมโทรนิดาโซล

โดยปิเปตสูตรตำรับยาน้ำแขวนตะกอนมา 1 mL ละลายด้วย methanol 5 mL ใน volumetric flask ขนาด 10 mL จากนั้นจึงนำไป sonicate เป็น เวลา 30 นาที ก่อนนำมาปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 10 mL จากนั้น ปิเปตสาร 40 μ L ปรับปริมาตร ให้เป็น 10 mL ด้วย mobile phase ทำซ้ำ 3 ครั้ง

2. เติมสารมาตรฐานเมโทรนิดาโซล

โดยการปิเปต สูตรตำรับยาน้ำแขวนตะกอน ปริมาตร 1 mL ผสมกับสารละลายมาตรฐานเมโทรนิดาโซล 2 mL ละลายด้วย methanol 5 mL ใน volumetric flask ขนาด 10 mL จากนั้นจึงนำไป sonicate เป็น เวลา 30 นาที ก่อนนำมาปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ครบ 10 mL จากนั้นปิเปตสาร 40 μ L ปรับปริมาตร ให้เป็น 10 mL ด้วย mobile phase ทำซ้ำ 3 ครั้ง

วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC จากนั้นคำนวณ %recovery โดยใช้สมการที่ 2

$$\% \text{Recovery} = [(C1-C2)/C3] \times 100 \quad \text{สมการที่ 2}$$

เมื่อ C1 = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน
C2 = ความเข้มข้นของตัวอย่าง
C3 = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป

โดยค่า %recovery ที่ผ่านจะต้องอยู่ในช่วง 80 - 120%

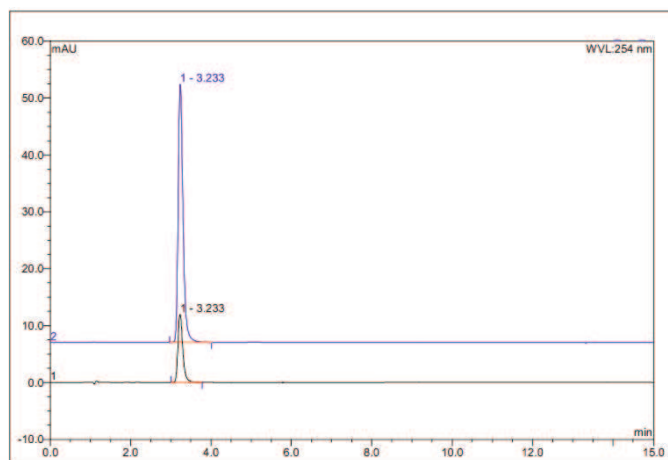
ผลการวิจัย

3.1 ความเป็นเชิงเส้น (Linearity)

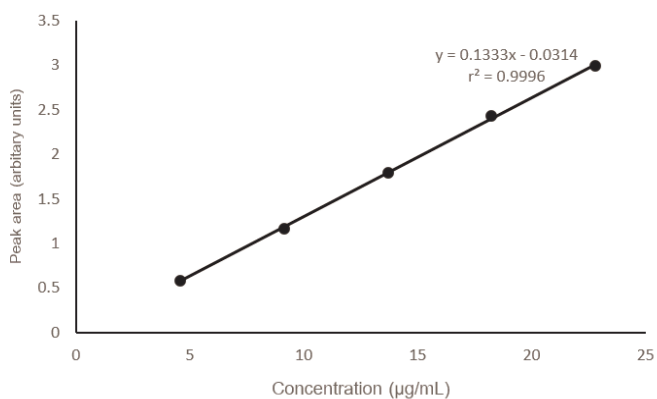
จากโครมาโทแกรมของสารละลาย ยามาตรฐานและสารละลายตัวอย่างเมโทรนิดาโซล พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันของค่า retention time ของตัว ยาในสารละลายมาตรฐานและในสารละลายตัวอย่าง คือตัวยาจะปรากฏในโครมาโทแกรมที่เวลาประมาณ 3 นาที ดังกราฟรูปที่ 1 (ก) แสดงว่าสภาวะที่ใช้ใน การวิเคราะห์เหมาะสมเพื่อใช้แยกตัวยาโทรนิดาโซล จากสารช่วยทางเภสัชกรรมอื่นในตำรับยาเตรียม เฉพาะคราวรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอน

ผลการทดสอบความเป็นเชิงเส้นของ กระบวนการตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการ วิเคราะห์พบว่า ในการทดสอบ intraday มีค่าของ สัมประสิทธิ์การกำหนด (r^2) เท่ากับ 0.9996 โดยมี สมการเส้นตรงได้แก่ $y = 0.1333x - 0.0314$ และในการ ทดสอบ interday พบว่ามีค่า r^2 เท่ากับ 0.9991 และได้ สมการเส้นตรง $y = 0.1350x - 0.0300$ จากค่า r^2 ที่ได้ มีค่าใกล้เคียง 1 นอกจากนี้ยังพบข้อมูลจาก Bempong และคณะ ที่ได้ทำการทดสอบความคงตัวของ metronidazole benzoate โดยการวิเคราะห์ HPLC ใน คนละสภาวะ พบว่ามีค่า linearity ของช่วงความเข้มข้น 0.2-800 μ g/mL มีค่าสัมประสิทธิ์การกำหนดเท่ากับ 1.0000 (Bempong et al., 2005)

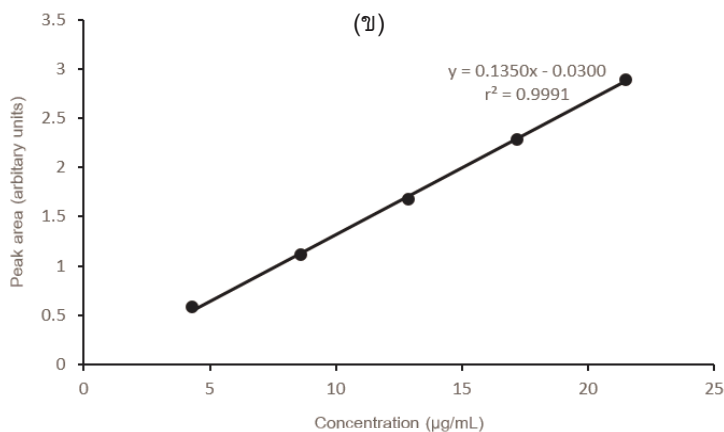
จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงเกิดขึ้นระหว่างความ เข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์ได้และสามารถ ทำนายได้ด้วยสมการเส้นตรงที่อยู่ในช่วงการ ทดสอบคืออยู่ในช่วงความเข้มข้น 5-25 μ g/mL



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 1 แสดง (ก) เปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเมโทรนิดาโซลและสารตัวอย่าง
(ข) ความเป็นเชิงเส้นของ intraday (ค) ความเป็นเชิงเส้นของ interday

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบเรื่องความแม่นยำโดยทำการทดลอง intraday และ interday

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้นเมโทรนิดาโซล (µg/mL)	
	intraday	interday
1	19.2093	13.5326
2	19.9715	13.4007
3	19.6032	13.4252
4	18.9990	13.5489
5	19.5566	13.3148
6	19.5867	13.5298
7	19.5566	13.3919
ค่าเฉลี่ย (Average)	19.4976	13.4491
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	0.3115	0.0891
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)	1.5975	0.6625

3.3 ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีการทดสอบสามารถวัดได้ (LOD) ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดสารตัวอย่างโดยมีความเชื่อมั่นระดับหนึ่งได้ (LOQ)

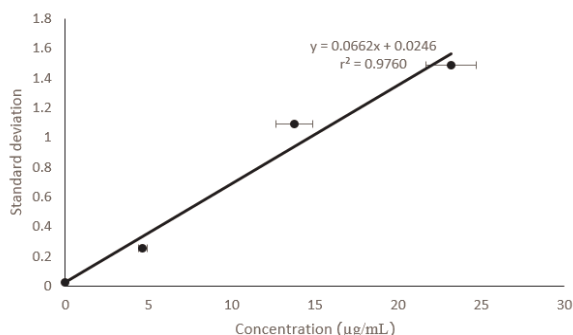
ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีการทดสอบสามารถวัดได้ (LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดสารตัวอย่างโดยมีความเชื่อมั่นระดับหนึ่งได้ (LOQ) แสดงในตารางที่ 2 โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 5, 15 และ 25 µg/mL ความเข้มข้นละ 7 ครั้งในเครื่อง HPLC สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ดังรูปที่ 2 ทำให้ทราบค่า SD of y-intercept (S_0) คือ 0.0246 เมื่อคำนวณพบว่า LOD มีค่า 0.0081 µg/mL และ LOQ มีค่า 0.2460 µg/mL จากข้อมูลนี้แสดงว่าความเข้มข้น

ต่ำสุดที่สามารถวัดสารตัวอย่างโดยมีความเชื่อมั่นระดับหนึ่งคือ 0.2460 µg/mL ซึ่งการทดสอบนี้ใช้ความเข้มข้นต่ำสุดอยู่ที่ 5 µg/mL

นอกจากนี้ Bempong และคณะ (Bempong et al., 2005) ได้ทำการทดสอบความคงตัวของ metronidazole benzoate โดยการวิเคราะห์ HPLC ในคนละสภาวะพบค่า LOD อยู่ที่ 0.0300 µg/mL และค่า LOQ อยู่ที่ 0.2000 µg/mL ซึ่งค่าที่ได้จาก Bempong และคณะมีค่าใกล้เคียงกับผลการวิจัยในครั้งนี้ถึงแม้ว่าจะมีสภาวะที่ใช้ในเครื่องต่างกัน ดังนั้นช่วงของความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการหาความเข้มข้นของตำรับยาน้ำแขวนตะกอนเมโทรนิดาโซลในการวิจัยต่อไป

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบเพื่อหาค่า LOD และ LOQ

	ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน (µg/mL)		
	5	15	25
1	4.6000	13.2610	22.6691
2	4.1752	12.1472	20.8713
3	4.5370	12.6674	21.6391
4	4.7331	14.4475	23.9893
5	4.9431	14.2638	24.2247
6	4.6378	14.5599	24.0927
7	4.8932	15.0604	24.8276
Mean	4.6456	13.7725	23.1877
SD	0.2558	1.0878	1.4866
SD of y-intercepts		0.0246	
LOD (µg/mL)		0.0081	
LOQ (µg/mL)		0.2460	



รูปที่ 2 กราฟแสดงผลระหว่างความเข้มข้น (µg/mL) กับ Standard deviation เพื่อใช้ในการหาค่า LOD และ LOQ

3.4 ความถูกต้อง (Accuracy)

ผลการทดสอบ Accuracy เพื่อทดสอบความถูกต้องของกระบวนการ ในการศึกษาใช้วิธี standard addition และพิจารณาความถูกต้องโดยต้องมีค่าของ % recovery ไม่เกิน $\pm 20\%$ เมื่อคำนวณค่าของ %recovery ตามสูตรคำนวณแล้วพบว่ามีความระหว่าง 104.4695% และ 116.2324%

ดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งอยู่ในช่วงที่กำหนดไว้คือ 80-120% ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่ากระบวนการที่ใช้ในการวิเคราะห์ยาเมโทรนิดาโซลในตำรับยาเตรียมเฉพาะกรรรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนมีค่าความถูกต้องผ่านตามเกณฑ์การทดสอบโดยวิธี standard addition

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบความถูกต้องโดยวิธี standard addition และค่า %recovery

Sample	Spike (C1) mg/mL	Non-spike (C2) mg/mL	Standard (C3) mg/mL	%Recovery
1	133.3963	118.4093	12.8940	116.2324
2	132.1426	117.8259	12.8940	111.0338
3	131.5259	118.0556	12.8940	104.4695

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากกระบวนการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พบว่า ทั้งความเป็นเชิงเส้น ความแม่นยำ ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีการทดสอบสามารถวัดได้ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดสารตัวอย่างโดยมีความเชื่อมั่นระดับหนึ่งได้และความถูกต้อง

เข้าเกณฑ์ที่กำหนด ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์ยาเตรียมเฉพาะกรรรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนของตัวยาเมโทรนิดาโซลขนาด 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมีความถูกต้องและเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณยาในกระบวนการศึกษาความคงตัวของตำรับต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาเพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการวิเคราะห์ยาเตรียมเฉพาะคราวรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนของยาเมโทรนิดาโซลในครั้งนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณคณาจารย์ บุคลากร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีและเภสัชกรจากกลุ่มงานเภสัชกรรม โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี ที่ได้ให้การช่วยเหลือสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในด้านสารเคมี อุปกรณ์และสถานที่ในการศึกษาครั้งนี้

References

- American Pharmacists Association. Drug information handbook with international trade names index. 24th edition. The United States; 2015-2016: 1353-56.
- Bempong DK, Manning RG, Mirza T, Bhattacharyya L. A stability-indicating HPLC assay for metronidazole benzoate. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 38: 776-780.
- Huber L. Validation of analytical method. A Germany: Agilent technologies printed. 2010.
- Jew K, Mullen R, Soo-Hoo W. Children hospital of Philadelphia extemporaneous formulations. Maryland. 2003: 10-1, 49.
- Kanyanuwat N, Nakum N. The validation of the test method. Department of primary industries and mines. 2555: 22-24.
- Magnusson B, Örnemark U. Eurachem guide: The fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics, (2nd ed. 2014) [ISBN 978-91-87461-59-0]. 2014 [cited 2017 Jan 30]. Available from: <http://www.eurachem.org/guides/pdf/valid.pdf>.