การศึกษาสภาวะการเสื่อมสลายของยาคีโตติเฟนรูปแบบยาน้ำเชื่อม ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ปริญญานิพนธ์
ของ
มณฑนา พิมพ์ทอง

เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
มีนาคม 2557

การศึกษาสภาวะการเสื่อมสลายของยาคีโตติเฟนรูปแบบยาน้ำเชื่อม ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ปริญญานิพนธ์

ของ

มณฑนา พิมพ์ทอง

เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
มีนาคม 2557

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การศึกษาสภาวะการเสื่อมสลายของยาคีโตติเฟนรูปแบบยาน้ำเชื่อม ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

บทคัดย่อ

ของ

มณฑนา พิมพ์ทอง

เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
มีนาคม 2557

มณฑนา พิมพ์ทอง. (2557*). การศึกษาสภาวะการเสื่อมสลายของยาคีโตติเฟนรูปแบบยาน้ำเชื่อมด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.* ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (วิทยาการเภสัชภัณฑ์). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ดร. สุวรรณา วรรัตน์,
อาจารย์ ดร.วฐู พรหมพิทยารัตน์

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะการเสื่อมสลายของสารคีโตติเฟน(Ketotifen) ในยาน้ำเชื่อมด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยศึกษาความคงสภาพของสารคีโตติเฟนทั้งในวัตถุดิบและในยาน้ำเชื่อม สภาวะการวิเคราะห์ใช้คอลัมน์ C18 สารละลายเคลื่อนที่เป็นแบบเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่าง 0.035% ไตรเอททิลเอมีน ในเมธานอล และ 0.035% ไตรเอททิลเอมีนในน้ำบริสุทธ์ปราศจากไอออน มีอัตราการไหลของสารละลายเคลื่อนที่ 1.0 ml/min ตรวจวัดด้วยเครื่องวัดแสง UV ที่ความยาวคลื่น 297 nm พบว่าสารคีโตติเฟนมี retention time 7.6 นาที โดยไม่มีสารอื่นรบกวนการวิเคราะห์

ผลการตรวจสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารคีโตติเฟน โดยใช้เทคนิค HPLC นี้มีค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity) ดังสมการ Y= 0.8421 X - 0.1549 ที่ช่วงวิเคราะห์ความเข้มข้น 10-160 µg/ml มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 1.0000 ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (LOD) คือ 0.25 µg ปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (LOQ) คือ 1.00 µg การทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำในช่วงสั้นๆ และวิเคราะห์ต่างวันและเวลามีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%RSD) น้อยกว่า 2 % ความถูกต้องของวิธี ให้ค่าการคืนย้อนกลับอยู่ในช่วง 98.0 - 100.4%

ในการศึกษาความคงสภาพของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมด้วยการนำตัวอย่างยาน้ำเชื่อมมากดดันด้วยสภาวะที่ทำให้เกิดการเสื่อมสลายได้ พบว่าสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมเสื่อมสลายได้อย่างรวดเร็วที่สภาวะแสงยูวีจากแสงแดด ซึ่งยาเสื่อมสภาพเหลือเพียง 73.9 % LA และด้วยสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน มีปริมาณตัวยาสำคัญเหลือเพียง 94.7 % LA จากการวิจัยนี้สารคีโตติเฟนมีการเสื่อมสลายเป็นอัตราส่วนโดยตรงกับเวลา ความคงสภาพสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่เก็บในสภาวะปรกติที่อุณหภูมิ 30 °C 75 % RH เป็นเวลา 12 เดือน และสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 40 °C 75% RH เป็นเวลา 6 เดือน พบว่ามีปริมาณตัวยาสำคัญลดลงเหลือประมาณ 95 % LA ในสภาวะปรกติ และประมาณ 94 % LA ในสภาวะเร่งตามลำดับ ซึ่งอยู่ในมาตรฐานกำหนด 90-110 % LA ซึ่งผลนี้สามารถกำหนดอายุยาได้เบื้องต้น 2 ปี

คำสำคัญ คีโตติเฟน โครมาโทกราฟีของเหลวถมรรถนะสูง วิธีตรวจสอบความถูกต้อง วิธีวิเคราะห์ที่ระบุความคงสภาพ

DEGRADATION STUDY FOR KETOTIFEN SYRUP BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

AN ABSTRACT

BY

MONTHANA PIMTHONG

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements of the

Master of Science in Pharmaceutical Product Development

at Srinakarinwirot University

March 2014

Monthana Pimthong. (2014). *Degradation Study for Ketotifen Syrup by High Performance Liquid Chromatography Method.* Master Thesis M.Sc. (Pharmaceutical Product Development). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University.
Advisor Committees: Associate Professor Dr.Suwanna Vorarat,
Dr. Watoo Phrompittayarat.

This Method described for determination of ketotifen ;(4,9-dihydro-4-(1-methyl-4-piperidinylidene)-10 H benzo[4,5]cyclohepta [1,2-b]thiophen-10-one) in syrup preparation by using HPLC method. Optimal conditions were reversed phase (C-18) with gradient elution system with 0.035% triethylamine in methanol (solvent A) and 0.035% triethylamin in deionized water (solvent B), flow rate at 1.0 ml/min and UV detection 297 nm. Ketotifen syrup preparation was subjected to stress testing (force degradation) in order to demonstrate that degradants from ketotifen and/or excipients did not interfere with the quantification of ketotifen. Then the method was validated for linearity, accuracy, precision, limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) of ketotifen. The linearity of the proposed method was y = 0.8421x - 0.1549 with in range of analysis concentration 10-160 µg/ml. The regression coefficient was 1.0000. Intra-day and inter-day precisions showed the good reproducibility (%RSD < 1). Recovery of the method was 98.0 - 100.4%. The LOD and LOQ were 0.25 µg and 1.0 µg, respectively. Therefore, this HPLC method was proven to has good linearity, specificity, sensitivity, reproducibility and accuracy for routine quality assessment and stability study of ketotifen syrup.

The stress testing of ketotifen substance and ketotifen in syrup with acid, base, photolysis, temperature and oxidizing agent showed that ketotifen was sensitized to UV light and oxidizing agent. The ketotifen in syrup remained 73.9% LA and 94.7 % LA, respectively.

The stability studies of ketotifen in syrup which were long term stability storage at 30°C 75 % RH in 12 months and accelerated condition at 40°C 75 % RH in 6 months showed that ketotifen in syrup remained 95 % LA and 94 %LA, respectively. Those % LA were still in the acceptance value (90-110 % LA). Therefore, shelf life of ketotifen syrup is about two years.

Key words: Ketotifen, High-performance liquid chromatography, Validation, Stability indicating method

ปริญญานิพนธ์
การศึกษาสภาวะการเสื่อมสลายของยาคีโตติเฟนรูปแบบยาน้ำเชื่อม
ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
ของ
มณฑนา พิมพ์ทอง

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... (คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย)
(รองศาตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. 2557

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ที่ปรึกษาหลัก ..... ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุวรรณา วรรัตน์) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชรวีร์ นันท์ธนะวานิช)

.....ที่ปรึกษาร่วม .....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.วฐู พรหมพิทยารัตน์) (อาจารย์ ดร.อังคนา วิชิต)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุวรรณา วรรัตน์)

.....กรรมการ
(อาจารย์ดร.วฐู พรหมพิทยารัตน์)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือให้คำแนะนำจากอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ รองศาตราจารย์ ดร.สุวรรณา วรรัตน์ และอาจารย์ ดร.วฐู พรหมพิทยารัตน์ ที่ให้คำปรึกษาตลอดเวลาทำการวิจัยทุกขั้นตอน ทั้งยังคอยช่วยเหลือแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของผู้วิจัยให้ดีขึ้น

รวมทั้งขอบพระคุณคณาจารย์คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้ในหลากหลายสาขาให้เป็นแนวทางในการทำวิจัย และขอขอบคุณคณะกรรมการสอบปากเปล่า ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชรวีร์ นันท์ธนะวานิช ประธานกรรมการ และกรรมการท่านอื่นๆจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ รองศาตราจารย์ ดร.สุวรรณา วรรัตน์ ดร.วฐู พรหมพิทยารัตน์ และ ดร. อังคณา วิชิต จากคณะเภสัชศาตร์ มหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชียที่ให้คำแนะนำในการสอบ

ทั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คุณสุชาติ ชูครุวงค์ กรรมการผู้จัดการ คุณวรรณา ธเนศานนท์ ผู้จัดการฝ่ายควบคุมคุณภาพ บริษัทโปลิฟาร์มที่ได้สนับสนุนเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

ขอขอบคุณ คุณพ่อคุณแม่ และคนในครอบครัว ที่คอยให้กำลังใจช่วยเหลือ และอยู่เคียงข้างตลอดมา ความสำเร็จและประโยชน์อันเกิดจากงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้เป็นความสำเร็จของท่านเหล่านี้เช่นกัน

มณฑนา พิมพ์ทอง

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลังที่มาของการวิจัย.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ความสำคัญของงานวิจัย.....	2
ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ลักษณะทั่วไป คุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และทางเภสัชวิทยาของสารคีโตติเฟนและสารเสื่อมสลาย.....	4
วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารคีโตติเฟนและสารเสื่อมสลาย.....	8
การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์.....	10
การศึกษาความคงสภาพ.....	12
การประเมินอายุยา.....	13
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	14
อุปกรณ์ และสารเคมี.....	14
วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์.....	14
การเตรียมตัวอย่างสารละลายมาตรฐาน.....	14
การเตรียมตัวอย่างสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม.....	15
การศึกษาหาวิธีวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์.....	15
วิธีวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม	15
ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	16
การศึกษาความคงสภาพของสารคีโตติเฟน.....	17
ศึกษาความคงสภาพของสารคีโตติเฟนวัตถุดิบภายใต้สภาวะกดดัน	17
ศึกษาความคงสภาพของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม ภายใต้สภาวะกดดัน ...	18
ศึกษาอัตราการเกิดการเสื่อมสลายของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมในสภาวะต่าง ๆ.....	18

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 (ต่อ)	
การวิเคราะห์ตัวอย่างยาคีโตติเฟนในน้ำเชื่อมที่มีอายุยาแตกต่างกัน……....	19
การประเมินอายุยา……..……	19
การวิเคราะห์ตัวอย่างยาคีโตติเฟนในน้ำเชื่อมเก็บศึกษาความคงสภาพที่สภาวะปรกติ……..…….	19
การวิเคราะห์ตัวอย่างยาคีโตติเฟนในน้ำเชื่อมเก็บศึกษาความคงสภาพที่สภาวะเร่ง……	19
4 ผลการทดลอง…….……..	20
ผลการศึกษาหาวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมในการแยกสารคีโตติเฟนและสารเสื่อมสลายอื่นๆ…….……..	20
วิเคราะห์สารคีโตติเฟนและสารเสื่อมสลาย…….……	21
วิเคราะห์สารคีโตติเฟนและสารเสื่อมสลายในยาน้ำเชื่อม…….	27
วิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่มีอายุยาแตกต่างกัน ……. …	30
ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ……	33
ความเป็นเส้นตรง……..….	33
ความถูกต้อง……	34
ความแม่นยำ……....	35
ขีดจำกัดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) และ ขีดจำกัดในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (LOD)……..……..	36
ความคงทนของวิธีวิเคราะห์ ..……	36
ความเหมาะสมของระบบที่ใช้วิเคราะห์ ..……..	37
ผลการศึกษาการเสื่อมสลายของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมในสภาวะกดดันต่าง ๆ ในช่วงเวลาต่างกัน……...	38
ผลการศึกษาความคงสภาพของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมเพื่อประเมินอายุยา	42
การประเมินอายุยา…….……..	44

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 อภิปรายผล สรุป และข้อเสนอแนะ.....	45
อภิปรายผล.....	45
สรุปและข้อเสนอแนะ.....	47
งานวิจัยในอนาคต.....	47
บรรณานุกรม.....	48
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	51

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

1 แสดงสารเสื่อมสลายจากสารคีโตติเฟน ฟูมาเรต..... 5
2 แสดงค่า relative retention time ของสารคีโตติเฟนและสารเสื่อมสลาย…..... 8
3 การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนสารละลายเคลื่อนที่..... 15
4 ผลการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในสภาวะกดดัน..... 22
5 ผลการวิเคราะห์คีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่สภาวะกดดัน..... 27
6 ผลการทดลองวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่มีอายุยาแตกต่างกัน..... 30
7 แสดงผลความเข้มข้นของคีโตติเฟน และพื้นที่ใต้กราฟ..... 33
8 แสดงผลค่าคืนย้อนกลับ (% recovery) ของสารคีโตติเฟนในน้ำเชื่อม..... 34
9 ผลแสดงค่า Precision การวิเคราะห์ซ้ำของสารคีโตติเฟนความเข้มข้นต่าง ๆ …..... 35
10 ผลแสดงค่า Precision การวิเคราะห์ซ้ำของคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม…… 35
11 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมืออุปกรณ์ต่างชนิดกัน……. 36
12 ผลการทดสอบ หาความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์……..... 37
13 ผลการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่สภาวะกรด- ด่าง..……. 38
14 ผลการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่สภาวะกดดันด้วยแสงยูวี…… 39
15 ผลการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่สภาวะกดดันด้วยสารออกซิเดชัน (30% H_2O_2)……..... 40
16 ผลการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมเร่งการเสื่อมสลายด้วยสภาวะความร้อนและความชื้นที่ 30°C75%RH และ 40°C 75 %RH …..…… 41
17 ผลการศึกษาความคงสภาพยาคีโตติเฟนในสภาวะเร่ง อุณหภูมิ 30 องศา 75% RH 42
18 แสดงผลการสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมในสภาวะปรกติ…… 43

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แผนภูมิขอบเขตงานวิจัย	3
2 สูตรโครงสร้างสารคีโตติเฟน ไฮโดรเจน ฟูมาเรต	4
3 แสดง Chromatogram ของสารคีโตติเฟนผสมกับสารเสื่อมสลายคีโตติเฟน G	21
4 แสดง Chromatogram ตัวทำละลาย (Diluent) ประกอบด้วย น้ำและเมธานอล อัตราส่วน 50 ต่อ 50 ส่วนโดยปริมาตร	23
5 แสดง Chromatogram วัตถุดิบคีโตติเฟน (Control)	23
6 แสดง Chromatogram ของสารคีโตติเฟนที่กดดันด้วยแสง UV	24
7 แสดง Chromatogram ของสารคีโตติเฟนที่กดดันด้วยความร้อน 105 °C	24
8 แสดง Chromatogram ของสารคีโตติเฟนที่กดดันด้วยกรด 0.1 N HCl	24
9 แสดง Chromatogram ของสารคีโตติเฟนที่กดดันด้วยกรด 0.1 N NaOH	25
10 แสดง Chromatogram ของสารคีโตติเฟนที่กดดันด้วย 3% H_2O_2	25
11 แสดง Chromatogram ของสารคีโตติเฟนที่กดดันด้วย 10% H_2O_2	25
12 แสดง Chromatogram ของสารคีโตติเฟนที่กดดันด้วย 30% H_2O_2	26
13 แสดง Chromatogram ของสารคีโตติเฟนที่กดดันด้วยความร้อน 40°C 75% RH	26
14 แสดง Chromatogram ไซรับเปล่า (Placebo)	28
15 แสดง Chromatogram ของคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม (Control)	28
16 แสดง Chromatogram ของคีโตติเฟนในน้ำเชื่อม เมื่อทำการกดดันสภาวะด้วย 30% Hydrogen peroxide (H2O2)	29
17 แสดง Chromatogram คีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่กดดันด้วยแสง UV จากแสงแดด	29
18 แสดง Chromatogram diluent	31
19 แสดง Chromatogram Placebo syrup	31
20 แสดง Chromatogram สารมาตรฐาน คีโตติเฟน	31
21 แสดง Chromatogramแสดงผลการวิเคราะห์คีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม อายุยา 1 ปี	32
22 แสดง Chromatogramแสดงผลการวิเคราะห์คีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมอายุยา 3 ปี	32
23 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นคีโตติเฟนกับพื้นที่ใต้กราฟ	34

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

24 กราฟแสดงแนวโน้มความคงสภาพยาคีโตติเฟนในน้ำเชื่อมในสภาวะกดดันกรด ด่าง pH 1.2, pH 6.8, pH 9.0..... 38

25 กราฟแสดงแนวโน้มความคงสภาพสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมในสภาวะกดดันด้วยแสงยูวี..... 39

26 กราฟแสดงผลวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่สภาวะกดดันด้วย 30% Hydrogen peroxide..... 40

27 กราฟแสดงแนวโน้มความคงสภาพของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่เร่งด้วยสภาวะความร้อนและความชื้น 30°C 75%RH และ 40°C 75%RH..... 41

28 กราฟแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่เร่งด้วยความร้อนและความชื้น 40°C 75% RH..... 43

29 กราฟแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่เก็บศึกษาความคงสภาพที่สภาวะปกติ 30°C 75 % RH..... 44

บทที่ 1
บทนำ

1. ภูมิหลังที่มาของการวิจัย

คีโตติเฟน (Ketotifen) นิยมใช้ในรูปแบบของเกลือคีโตติเฟนฟูมาเรต (Ketotifen fumarate) [1] ข้อบ่งใช้ของสารนี้คือเป็นยาต้านอาการแพ้ โดยออกฤทธิ์เป็นตัวยับยั้งการหลั่งสารเคมีในร่างกาย (Histamine H_1 receptor antagonist) [2] ปัจจุบันมีการผลิตเภสัชภัณฑ์จากตัวยาคีโตติเฟนที่มีในท้องตลาดหลายรูปแบบ ในประเทศไทยมีการขึ้นทะเบียนเป็นยาแผนปัจจุบันในรูปแบบยาเม็ด ยา-น้ำเชื่อม และยาหยอดตา เป็นจำนวนทั้งสิ้น 73 ตำรับ[3] แต่วิธีวิเคราะห์ยาในตำรับยังไม่ถูกระบุไว้ในตำรายาสากล เช่น เภสัชตำรับประเทศสหรัฐอเมริกา (USP) หรือเภสัชตำรับประเทศอังกฤษ (BP) จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ามีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในตำรับยา เช่น เพื่อวิเคราะห์ในยาหยอดตาและสูตรตำรับยา silicon oil โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) [4]

ในเภสัชตำรับประเทศอังกฤษ มีการวิเคราะห์หาปริมาณสารบริสุทธิ์คีโตติเฟนด้วยเทคนิคการไตเตรตและวิเคราะห์สารเสื่อมสลายในสารบริสุทธิ์คีโตติเฟน ฟูมาเรตด้วยวิธี HPLC พบว่ามีสารเสื่อมสลายหลายชนิด[1] ได้แก่ สารเสื่อมสลายชนิด A, B, C, D, E, F และ G ที่มีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลคล้ายคลึงกันกับคีโตติเฟน ยังไม่มีรายงานว่าได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่สามารถแยกสารเสื่อมสลายออกจากตัวยาสำคัญได้

สาเหตุของงานวิจัยนี้ จากที่ผู้วิจัยได้พบปัญหาในการวิเคราะห์คีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่เก็บไว้ศึกษาความคงสภาพในระยะเวลาหนึ่ง พบว่ามีปริมาณสารคีโตติเฟนลดลงจากเมื่อเริ่มต้น และมีการเสื่อมสลายเป็นสารอื่น ไม่สามารถแยกพีคของตัวยาสำคัญออกจากสารเสื่อมสลายได้ด้วยวิธีวิเคราะห์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ใช้อยู่เดิม ซึ่งวิเคราะห์คีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมโดยใช้สารละลายเคลื่อนที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 2.8 ต่อเตรทตระไฮโดรฟูเรน ต่อ เมธานอล 48 : 2 : 50 คอลัมน์ที่ใช้ C18 ยาว 250 mm กว้าง 4.6 mm ขนาดอนุภาค 5 µm ที่อัตราการไหลของสารละลายเคลื่อนที่ 1.2 ml/min

ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาการเสื่อมสลายของวัตถุดิบคีโตติเฟนและคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมในสภาวะกดดันต่างๆ และศึกษาหาวิธีวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่สามารถแยกสารเสื่อมสลายออกจากตัวยาสำคัญได้โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูงในการวิเคราะห์

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการเกิดการเสื่อมสลายเป็นสารอื่นของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมในสภาวะกดดัน (Stress testing) และในสภาวะเร่ง (Accelerated testing)

2. เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์และตรวจสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ (Method validation) ของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่สามารถแยกตัวยาสำคัญคีโตติเฟนและสารเสื่อมสลายได้

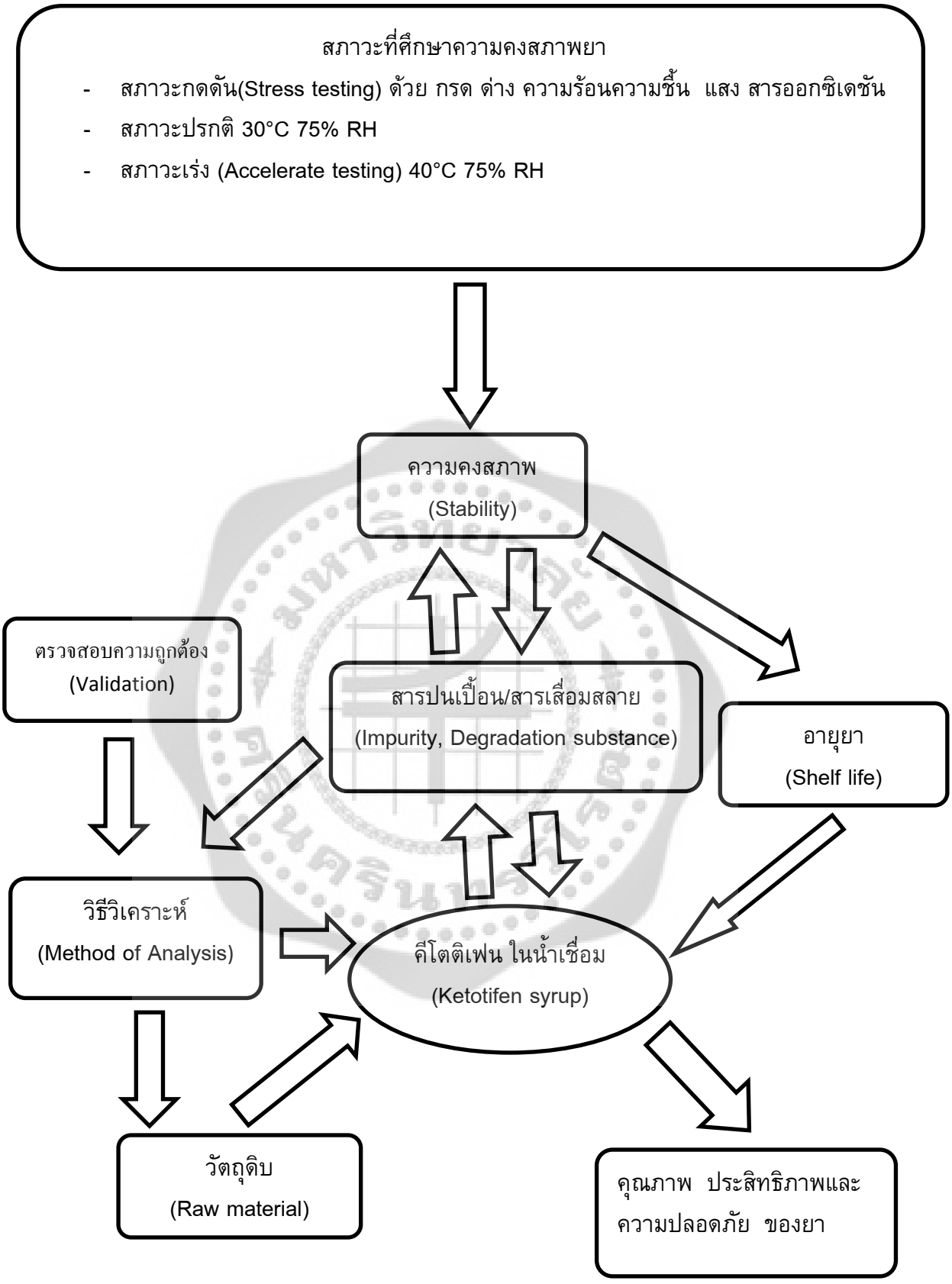
3. ความสำคัญของการวิจัย

วิธีวิเคราะห์ระบุความคงสภาพ (Stability indicating method)[5] มีความสำคัญมากต่อวงการอุตสาหกรรมยา เป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญและสารเสื่อมสลายโดยปราศจากการรบกวนซึ่งกันและกัน การศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์ระบุความคงสภาพของยาถูกกำหนดให้ศึกษาการเสื่อมสลายของตัวยาสำคัญในสภาวะถูกกดดัน เช่น สภาวะที่อุณหภูมิสูง สภาวะความชื้นสูง ปฏิกิริยาย่อยสลายด้วยกรด ด่าง น้ำ แสง หรือทำปฏิกิริยากับสารให้หรือรับอิเลกตรอน โดยหัวข้อการศึกษาเหล่านี้เป็นสภาวะที่อาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยาในระหว่างกระบวนการผลิต การเก็บรักษาและระหว่างการขนส่ง ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพของยา สำหรับในประเทศไทยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้กำหนดให้ใช้ผลการประเมินวิธีวิเคราะห์ประกอบการขึ้นทะเบียนยาตามหลักเกณฑ์ของ ASEAN Harmonization[6] และในกรณีขึ้นทะเบียนยาใหม่ต้องมีการศึกษาความคงสภาพยาตาม ASEAN Guideline on stability study of drug product[7] ต้องเก็บยาเพื่อศึกษาความคงตัวก่อนเพื่อกำหนดอายุยาและสภาวะการเก็บ โดยกำหนดให้มีการศึกษาความคงตัวของยาผลิตขายเพื่อติดตามคุณภาพ ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่ระบุความคงสภาพที่ได้ประเมินแล้ว

ดังนั้นการควบคุมคุณภาพก่อนและหลังการจำหน่ายในท้องตลาดจึงมีความจำเป็นอย่างมาก เพื่อให้มั่นใจได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ออกสู่ผู้บริโภคมีคุณภาพและมีความปลอดภัยตลอดอายุการใช้งานของยา จึงจำเป็นต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่เชื่อถือได้ และสามารถใช้กำหนดอายุยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยวิธีที่สามารถแยกตัวยาสำคัญออกจากสารปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ได้

4. ขอบเขตของงานวิจัย

ผู้วิจัยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนและสารเสื่อมสลายในยาน้ำเชื่อมโดยวิธีวิเคราะห์ที่ใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพื่อใช้กับการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม และศึกษาความคงสภาพของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่สภาวะต่างๆ



ภาพประกอบ 1 แผนภูมิขอบเขตงานวิจัย

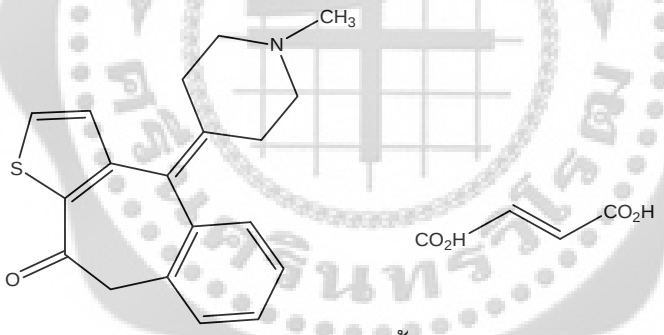
บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี และ งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการค้นคว้าเอกสารความรู้และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องนำเสนอเป็นแนวทางที่เป็นประโยชน์ในการวิจัยดังนี้ ลักษณะและคุณสมบัติทั่วไปทั้งทางกายภาพ ทางเคมี คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารคีโตติเฟน การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ การศึกษาความคงสภาพของสารคีโตติเฟนและสารเสื่อมสลาย และการประเมินอายุยา

1. ลักษณะทั่วไป คุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และทางเภสัชวิทยาของสารคีโต-ติเฟนและสารเสื่อมสลาย

1.1 คีโตติเฟน (Ketotifen) [1]

ชื่อทางเคมี: 4-(1-Methylpiperidin-4-ylidene)-4,9-dihydro10 *H*-benzo[4,5] cyclohepta [1,2*b*] thiophen-10-one hydrogen(*E*)-butenedioate อยู่ในรูปของเกลือ Ketotifen fumarate



น้ำหนักโมเลกุล 425.5

สูตรโมเลกุล $C_{23}H_{23}NO_5S$

ภาพประกอบ 2 สูตรโครงสร้างสารคีโตติเฟน ฟูมาเรต

ลักษณะทางกายภาพ : ผงผลึกสีขาวถึงน้ำตาลอ่อนออกเหลือง

การละลาย : สารคีโตติเฟนละลายได้เล็กน้อยในน้ำและในเมธานอล ละลายได้น้อยมากในอะซิโตไนไตร เมื่ออยู่ในรูปของเกลือจะละลายได้ง่ายในน้ำและกรดอ่อน

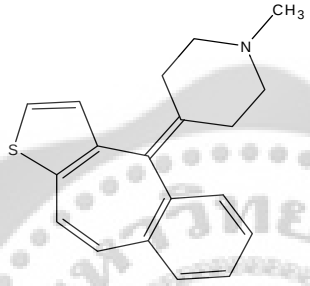
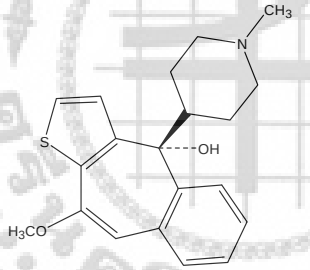
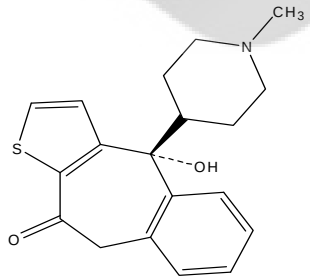
จุดหลอมเหลว: 192°C [2] (Fumarate salt)

ค่าคงที่การแตกตัว (pKa): 8.43 [2]

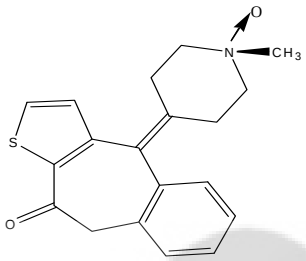
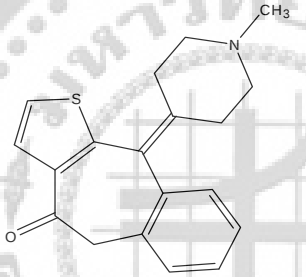
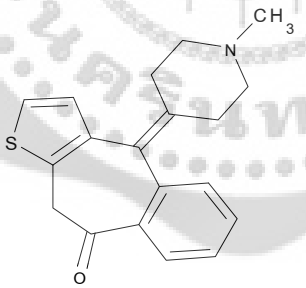
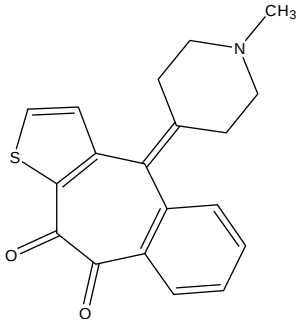
ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งส่วน (Log P): 2.2 [2]

1.2 สารเสื่อมสลาย สารเสื่อมสลายที่เกิดจากสารคีโตติเฟน ฟูมาเรต มีหลายชนิด ได้แก่ สาร A, B, C, D, E, F และ G [1] ดังตารางที่ 1

ตาราง 1 แสดงสารเสื่อมสลายจากสารคีโตติเฟน ฟูมาเรต [1]

ชื่อ	โครงสร้าง	ชื่อทางเคมี	สูตร/น้ำหนักโมเลกุล
Ketotifen impurity A		4-(4*H*-benzo [4,5] Cyclohepta[1,2*b*] thiophen-4-ylidene)-1-methylpiperidine	$C_{19}H_{19}NS$/ 293.43
Ketotife impurity B		4*RS)*-methoxy-4-(1-methylpiperidin-4-yl-4*H*-benzo[4,5]cyclohepta[1,2-*b*]thiophen-4-ol	$C_{20}H_{23}NO_2S$/ 341.48
Ketotifen impurity C		4*RS*)-4)hydroxy-4-(1-methylpiperidin-4-yl)-4,9,dihydro-10*H*-benzon [4,5]cyclohepta[1,2-*b*](C) thaiophen-10-one	$C_{19}H_{21}NO_2S$/ 327.45

ตาราง 1 (ต่อ)

ชื่อ	โครงสร้าง	ชื่อทางเคมี	สูตร/น้ำหนักโมเลกุล
Ketotifen impurity D		10-(1-methylpiperidin)-5,10dihydro-4*H*-benzo [5,6]cyclohepta[1,2-*b*] thiophen-4-one	$C_{19}H_{19}NO_2S$/ 325.43
Ketotifen impurity E		10-(1-methylpiperidin)-5,10dihydro-4*H*-benzo [5,6]cyclohepta[1,2-*b*] thiophen-4-one	$C_{19}H_{19}NOS$/ 309.43
Ketotifen impurity F		4-(1-methylpiperidin-4-ylidene)-4,10-dihydro-9*H* benzo[4,5]cyclohepta [1,2*b*]thiophen-9-one	$C_{19}H_{17}NO_2S$/ 309.43
Ketotifen impurity G		4-(1-methylpiperidin-4-ylidene)-4*H* benzo[4,5] Cyclohepta[1,2]b]thiophn -9,10-dione	$C_{19}H_{17}NO_2S$/ 323.42

ในการศึกษาข้อมูลสารเสื่อมสลายของสารคีโตติเฟน [1] สารเสื่อมสลายเหล่านี้ เป็นสารที่เกิดจากขบวนการสังเคราะห์และเกิดจากการเสื่อมสลายของสารคีโตติเฟนเอง

1.3 คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของสารคีโตติเฟน ใช้รักษาเชิงป้องกันโรคหอบหืด [2] อาการแพ้ที่ไม่ทราบสาเหตุรวมไปถึงสภาวะโพรงจมูกอักเสบและภาวะเยื่อบุตาอักเสบโดยออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งของสารที่ทำให้เกิดอาการแพ้ เป็นยาในกลุ่มที่ใช้รักษาอาการคัน (Antipruritics) ใช้ต้านอาการแพ้ (Anti-allergic agent) ยาจะใช้เวลาอยู่ในร่างกายตั้งแต่เริ่มรับยาจนขจัดออกจากร่างกายจนกระทั่งยาเหลือปริมาณครึ่งหนึ่ง ($t_{1/2}$) ใช้เวลา 21 ชั่วโมง มีความชอบจับกับโปรตีน 75% ดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้มากกว่า 60% สามารถตรวจพบสารหลัก ที่เกิดปฏิกิริยาในร่างกายเมื่อรับประทานยาคีโตติเฟนเข้าสู่ร่างกายได้ในกระแสเลือดและน้ำปัสสาวะ

รูปแบบยาคีโตติเฟน [2] มีทั้งรูปแบบยาน้ำหยอดตา (Eye drop dosage form) มีขนาดยาคีโตติเฟน 0.25% รูปแบบยาน้ำเชื่อม (Syrup dosage form) มีขนาดยาคีโตติเฟน 0.2 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร และรูปแบบยาเม็ด (Solid dosage form) โดยมีขนาดของยาคีโตติเฟนเป็น 1 มิลลิกรัมต่อเม็ด

1.4 อาการข้างเคียงจากยา และความเป็นพิษ (Toxicity) จากคู่มือความปลอดภัยสารเคมี (Material Safety Data Sheet; MSDS) ของสารคีโตติเฟน ฟูมาเรต[8] สารคีโตติเฟนเป็นอันตรายได้จากการกินเข้าไปในปริมาณมาก มีค่าความเป็นพิษ (LD50) เท่ากับ 360 หมายถึงปริมาณสารคีโตติเฟนเท่ากับ 360 mg ต่อน้ำหนักตัว1 kg ที่ทำให้หนูทดลองที่ได้รับสารนี้ตายลงครึ่งหนึ่งจากปริมาณทั้งหมด อาการข้างเคียงที่พบโดยทั่วไปเช่น ปวดศีรษะ เยื่อบุตาอักเสบและโพรงจมูกอักเสบ ในกรณีที่สัมผัสถูกผิวหนังสามารถซึมผ่านทำให้เกิดความระคายเคืองผิวหนังได้

การเก็บรักษาสารคีโตติเฟนทำได้โดยเก็บในภาชนะปิดสนิทแห้ง ภายในอุณหภูมิห้อง ไม่ควรเก็บไว้ใกล้เปลวไฟและสารที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา(Oxidizing agents) นอกจากจะทำให้เกิดอันตรายจากปฏิกิริยาแล้วยังทำให้สารคีโตติเฟนเปลี่ยนสภาพ เพราะสารคีโตติเฟนจะเกิดการเปลี่ยนสภาพเมื่อได้รับความร้อนจากเปลวไฟ สารคีโตติเฟนเกิดปฏิกิริยาได้กับสารคาร์บอนออกไซด์ ไนโตรเจนออกไซด์ ซัลเฟอร์ออกไซด์

และจากคู่มือความปลอดภัยสารเคมี ของสารปนเปื้อนคีโตติเฟนชนิด G [9] มีอันตรายเมื่อรับประทานเข้าไปเกินขนาด ค่าความเป็นพิษของสารคีโตติเฟนชนิด G มีค่า LD 50 เท่ากับ 360 mg/kg ของน้ำหนักตัว สารนี้มีอันตรายมากต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ เมื่อสะสมเป็นเวลานานมีผลต่อสภาพแวดล้อม ผลต่อสุขภาพ ทำให้ความดันเลือดเปลี่ยน เกิดภาวะกดการหายใจ หายใจอ่อน อาจทำให้หัวใจเต้นผิดปกติ อาจเกิดอาการแพ้ได้ เวียนศีรษะ ง่วงนอน เป็นต้น จะเห็นว่าสารนี้มีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต แม้ว่าจะไม่มีการยืนยันอันตรายถึงชีวิตมนุษย์ก็ตามก็ควรหลีกเลี่ยงการได้รับสารนี้ในปริมาณมาก

2. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารคีโตติเฟนและสารเสื่อมสลาย

มีรายงานการศึกษาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารคีโตติเฟน ทั้งในรูปแบบสารบริสุทธิ์คีโตติเฟนและในยารูปแบบต่างๆ ดังนี้

ในตำรับยาประเทศอังกฤษใช้เทคนิคโพเทนทิโอเมตริกไตเตรชัน โดยการไตเตรตสารคีโตติเฟนด้วย 0.1 M กรด เปอร์คลอริค ในการหาปริมาณสาร และใช้เทคนิค HPLC ตรวจสอบสารเสื่อมสลายของสารคีโตติเฟน ฟูมาเรท[1] โดยวิธีนี้มีสภาวะ ดังนี้ ใช้คอลัมน์ C18 ขนาดความยาว 150 mm เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.0 mm ขนาดอนุภาคของวัฏภาคนิ่ง 3 µm ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 40°C ใช้การปรับสัดส่วนระหว่างสารละลายเคลื่อนที่ชนิด A และชนิด B (gradient elution) โดยเตรียมสารละลายเคลื่อนที่ชนิด A ด้วย 175 µl ของไตรเอทิลเอมีน ใน 500 ml ของน้ำบริสุทธิ์ปราศจากไอออน และสารละลายเคลื่อนที่ชนิด B ด้วย 175 µl ของไตรเอทิลเอมีน ใน 500 ml ของเมธานอล ใช้อัตราการไหลของสารละลายเคลื่อนที่แบบคงที่ 1.0 ml/min ตรวจวัดด้วยเครื่องวัดแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 297 nm ปริมาณสารตัวอย่างที่ฉีดสารเข้าเครื่อง 20 µl อัตราส่วนของเวลาที่สารปนเปื้อนถูกพาออกจากคอลัมน์เปรียบเทียบกับสารคีโตติเฟน (Relative retention time) มีค่าแสดงดังตารางที่ 2

ตาราง 2 แสดงค่า relative retention time ของสารคีโตติเฟนและสารเสื่อมสลาย[1]

ชนิด สารปนเปื้อน คีโตติเฟน	Relative retention time
D	0.3
C	0.6
G	0.9
E	1.2
F	1.4
B	1.7
A	2.1

ค่าการแยกชัด (resolution) ของสารปนเปื้อนชนิด G กับ คีโตติเฟน ต้องไม่น้อยกว่า 1.5 และในวิธีควบคุมคุณภาพสารบริสุทธิ์คีโตติเฟนฟูมาเรต มีการควบคุมปริมาณสารปนเปื้อนชนิด A, B, C, D, E, F และ G โดยที่แต่ละชนิดต้องมีไม่เกินชนิดละ 0.2% สารปนเปื้อนชนิดอื่นๆนอกจากนี้ไม่เกิน 0.1% และปริมาณสารปนเปื้อนทุกชนิดรวมกันไม่เกิน 0.5% ของปริมาณสารคีโตติเฟน

ในปีค.ศ. 1998 Naglaa El-Kousy และ Lories I Bebawy [10] มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ใช้เทคนิคอะตอมมิคแอบซอร์ปชันสเปกโตรเมตทรี (Atomic absorption spectrometry; AAS) และเทคนิคการเกิดสี (Colorimetric method) วิเคราะห์ยาที่ใช้ต้านอาการแพ้ 3 ชนิดคือ ฟิโซติเฟน

(Pizotifen) คีโตติเฟน (Ketotifen) และลอลาตาดีน (Loratadine) วิธีนี้สามารถใช้วิเคราะห์ยาทั้ง 3 ชนิดได้โดยไม่มีการรบกวนจากสารช่วย หรือสารกันบูดอื่นๆ

ในปีค.ศ.1998 I.P. Nnane, L.A. และ Damani, A.J. Hutt [4] ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์พร้อมตรวจสอบความถูกต้องของวิธีเพื่อศึกษาความคงสภาพของสารคีโตติเฟน ในสูตรตำรับยาน้ำหยอดตาและสูตรตำรับยา silicon oil โดยใช้ HPLC พบว่าปริมาณสารคีโตติเฟนลดลงเหลือประมาณ 90 %LA หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 6 เดือน สภาวะในการวิเคราะห์ใช้คอลัมน์ C18 ขนาดยาว 300 mm กว้าง 3.9 mm สารละลายเคลื่อนที่เป็นสารผสมระหว่างฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ต่อ เมธานอล ต่อ อะซิโตไนไตร ต่อ ไตรเอทิลเอมีน (29.8: 45: 25: 0.2) อัตราการไหลของสารละลายเคลื่อนที่ 1.0 ml/min วัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (UV)ที่ความยาวคลื่น 299 nm ผลการศึกษาพบว่า ความร้อนจากการใช้เครื่องนึ่งอัด (autoclave) ที่อุณหภูมิ 100°C และการใช้เปอร์ออกไซด์ เป็นสภาวะกดดันที่ทำให้สารคีโตติเฟนเกิดการเสื่อมสลายได้

ในปี ค.ศ.2003 Feras Q, Alali และคณะ [11] ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในตัวอย่างพลาสมาของมนุษย์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงควบคู่กับเทคนิคแมสสเปกโตรเมทริก (Liquid Chromatographic-mass spectrometric; LC-MS) สภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ คอลัมน์ C18 ยาว 150 mm เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.0 mm ขนาดอนุภาคของวัฏภาคนิ่ง 5 µm และ Hypersil BDH C18 ขนาด 150 mm เส้น ผ่าศูนย์กลาง 4.6 mm ขนาดอนุภาคของวัฏภาคนิ่ง 5 µm ใช้สารละลายเคลื่อนที่ปรับอัตราส่วนของสารละลายผสม pH 3.0 ระหว่าง 40% เมทธานอล และ 60% 0.01 M ของแอมโมเนียมอะซิเตต และสารละลายผสม pH 3.0 ระหว่าง 80%เมธานอล และ 20% ของ 0.01M แอมโมเนียมอะซิเตต วิธีนี้สามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารคีโตติเฟนในพลาสมาของมนุษย์ได้ในช่วงความเข้มข้นที่วิเคราะห์ 0.5 - 20.0 ng/ml ความถูกต้องของการวิเคราะห์มีค่าร้อยละการคืนย้อนกลับเท่ากับ 98.04

ในปี ค.ศ. 2010 Sayed Mahdi Ghoreshi และคณะ[12] ได้รายงานการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารคิโตติเฟนโดยใช้เครื่องวัดโพเทนทิโอมิเตอร์ ที่เรียกว่า KET selective electrode ใช้วิเคราะห์สารคีโตติเฟนทั้งในรูปสารละลายบริสุทธิ์และในยาน้ำเชื่อม

ในปี ค.ศ. 2011 Eman Y.Z. Frag และคณะ [13] ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารคีโตติเฟนโดยการใช้เครื่องโพเทนทิโอมิเตอร์ ใช้ขั้วไฟฟ้าที่เคลือบด้วยคาร์บอนชนิดพิเศษและแผ่นพีวีซีที่ใช้โพลิ-เมอร์ วิเคราะห์สารคีโตติเฟนบริสุทธ์ในตัวทำละลาย และคีโตติเฟนในน้ำปัสสาวะ

ในปี ค.ศ. 2012 Selvadurai Mudurai และคณะ [14] รายงานการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาเม็ดด้วยเทคนิค HPLC เพื่อใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ควบคุมคุณภาพยา ใช้คอลัมน์ C18 ยาว 250 mm กว้าง 4.6 mm ใช้สารละลายเคลื่อนที่ผสมระหว่างเมธานอล ต่อ 10 mM แอมโมเนียม อะซิเตต อัตราส่วน 70 ต่อ 30 v/v ปรับ pH 3.5 อัตราการไหลของสารละลายเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 ml/min วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง UV ที่ความยาวคลื่น 298 nm สมการมีความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้นของสารคีโตติเฟนระหว่าง 5 -150 ng/ml ค่าร้อยละการคืนย้อนกลับของสารคีโตติเฟนในยาอยู่ในช่วง 97.36 % - 99.93 %

ในปี ค.ศ.2012 Kyung-Don Nom และคณะ [15] ได้ศึกษาเปรียบเทียบชีวสมมูลของยาเม็ดคีโตเฟนที่ผลิตที่ประเทศเกาหลีกับยาเม็ดต้นแบบคีโตติเฟน การศึกษาครั้งนี้ใช้เทคนิค LC-MS สภาวะที่เหมาะสมคือสารละลายเคลื่อนที่ 10 mM ของแอมโมเนียมฟอร์เมท pH 3 และอะซิโตไนไตร อัตราส่วน 5 ต่อ 95 v/v ใช้คอลัมน์ C18 อัตราการไหลของสารละลายเคลื่อนที่ 0.2 ml/min ผลการศึกษาปรากฏค่าความสมมูลของยาทั้งสองมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ วิธีนี้สามารถใช้วิเคราะห์สารคีโตติเฟนในเลือดได้

3. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

มีรายงานการศึกษาทบทวนเกี่ยวกับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ระบุความคงสภาพ [5,16,17,18] พบว่าเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ส่วนมากเป็นเทคนิค อัลตราไวโอเลตสเปคโตรเมตรี (UV) เทคนิค อินฟาเรดสเปคโตรสโคปี (IR) เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และเทคนิคทินเลเยอร์โคมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPTLC) แต่ที่นิยมใช้จะเป็นเทคนิค HPLC สำหรับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่ระบุความคงสภาพจะมีขั้นตอนการพัฒนาเป็นลำดับขั้นดังนี้

1. การศึกษาโครงสร้างตัวยาสำคัญ จุดวิกฤต ทางเคมี หมู่ฟังชันก์ที่สำคัญที่ทำให้สารเสื่อมสลายเกิดได้ง่าย

2. การศึกษาคุณสมบัติของตัวยาสำคัญ เช่น ค่าการละลาย (Solubility) ค่าคงที่ของการแตกตัวของกรด (pKa) ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งส่วน (log *P*) ค่าการดูดกลืนแสง (Absorptivity) ค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนคลื่นแสงสูงที่สุด (maximum wavelength)

3. ศึกษาการเสื่อมสลายของสารในสภาวะกดดัน โดยยึดหลักเกณฑ์ ICH guideline Q1A กดดันสารที่สนใจในสภาวะอุณหภูมิและความชื้นสูง การย่อยสลายด้วยน้ำ กรด เบส การให้และรับอิเล็กตรอนในปฏิกิริยาออกซิเดชัน และการเสื่อมสลายด้วยแสง

4. การแยกสารตัวอย่างที่ผ่านการกดดัน ทำการทดลองวิเคราะห์เบื้องต้นให้ได้สภาวะเหมาะสมในการแยกสารสำคัญออกจากสารเสื่อมสลาย คอลัมน์ที่ใช้ สารละลายเคลื่อนที่ เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ ความยาวคลื่นที่ตรวจวัด ปริมาตรการฉีดสาร อัตราการไหล สารเสื่อมสลายที่เกิดจากการกดดันอาจไม่ปรากชัดในภาวะที่ศึกษา อาจใช้เครื่องตรวจวัดที่ตรวจวัดได้หลายความยาวคลื่นในเวลาเดียวกัน (diode array detector) หรือใช้วิธีอื่นควบคู่ไป เช่น ใช้ LC-MS ในขั้นนี้จะได้ทราบจำนวนชนิดของสารเสื่อมสลายที่เกิดขึ้น

5. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ โดยทำการแยกสารเสื่อมสลายและสารที่สนใจออกจากกันได้ชัดเจนโดยการปรับสัดส่วนของสารละลายเคลื่อนที่ ค่าความเป็นกรดด่าง อัตราการไหลของสารละลายเคลื่อนที่ อุณหภูมิควบคุมคอลัมน์ และเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์ เป็นต้น

6. ระบุเอกลักษณ์ของสารเสื่อมสลาย เตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อพิสูจน์ทราบโครง-สร้างในกรณีที่มีสารมาตรฐานอ้างอิงขาย กรณีไม่มีขายต้องเตรียมหรือสังเคราะห์ขึ้นเอง

7. การประเมินวิธีวิเคราะห์ระบุความคงสภาพ (Validation of stability indicating method) ตามมาตรฐาน ICH guideline [5] การตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ระบุความคงสภาพ มีหัวข้อสำคัญๆคือ

7.1 ความจำเพาะเจาะจงและความไว (Specificity/ Selectivity) วิธีวิเคราะห์สามารถแยกสารที่สนใจจากสารอื่นได้ดี ไม่มีสิ่งรบกวน

7.2 ความถูกต้อง (Accuracy) วิธีมีความถูกต้องโดยแสดงให้เห็นถึงความใกล้เคียงกันระหว่างค่าจริงและค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้นของการวิเคราะห์ เตรียมโดยเติมตัวยาสำคัญลงในยาหลอก (Placebo) หรือในผลิตภัณฑ์ยา และรายงานผลเป็นค่าร้อยละการคืนย้อนกลับ (% recovery) การทดลองควรทำอย่างน้อย 9 ตัวอย่าง ที่ 3 ระดับความเข้มข้นที่ครอบคลุมช่วงวิเคราะห์ที่ระบุ

7.3 ความแม่นยำ (Precision) วิธีสามารถใช้วิเคราะห์ซ้ำในตัวอย่างเดียวกันได้หลายๆครั้งโดยไม่มีความแตกต่าง ซึ่งจะแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD)

7.3.1 ความแม่นยำจากการวิเคราะห์ซ้ำในสภาวะเดียวกันในช่วงสั้นๆ (Repeatability Precision) มีแนวทางการทำโดย วิเคราะห์ตัวอย่างสารละลายคีโตติเฟนอย่างน้อย 9 ตัวอย่าง ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่วิเคราะห์ 3 ระดับความเข้มข้น ๆ ละ 3 ตัวอย่าง หรือวิเคราะห์ตัวอย่างคีโตติเฟนอย่างน้อย 6 ตัวอย่าง (ที่ระดับความเข้มข้น 100 %)

7.3.2 ความแม่นยำจากการเปลี่ยนแปลงปัจจัยบางอย่าง (Intermediate precision) เช่น เวลา นักวิเคราะห์ หรือเครื่องมือที่แตกต่างกัน โดยรายงานผลของ precision เป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) หรือร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ความแม่นยำจากการวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการต่างกัน โดยทั่วไปนิยมทำเฉพาะกรณีที่เป็นวิธีใหม่และเพื่อทำเป็นวิธีมาตรฐาน[6]

7.4 สภาพเชิงเส้น (Linearity) มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงระหว่างค่าสัญญาณจากการวิเคราะห์และความเข้มข้นของสาร คำนวณค่าความสัมพันธ์เป็นสมการเส้นตรงและค่าcorrelative coefficient (R^2)

7.5 ช่วงวิเคราะห์ (Range) ช่วงวิเคราะห์ที่เหมาะสม คือผลวิเคราะห์มีความถูกต้องแม่นยำ มีความเป็นเส้นตรงและอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ เช่น 80-120% สำหรับยารูปแบบของแข็งและยาที่มีความคงสภาพที่ดี 50 -120% ในรูปแบบยาฉีด และ 0-20% สำหรับช่วงวิเคราะห์ของสารเสื่อมสลาย

7.6 ขีดจำกัดในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Limit of detection; LOD) การหาค่า LOD หาได้หลายแนวทาง สำหรับเทคนิค HPLC ได้จากค่าสัญญาณตัวอย่างที่มีต่อสัญญาณรบกวน (signal to noise) เท่ากับ 2 ถึง 3 หรือ ได้จากการคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากสูตร

$$LOD = 3.3\ SD / Slope$$

เมื่อ SD เป็น ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Slope เป็น ค่าความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าที่วัดได้จากการวิเคราะห์

7.7 ขีดจำกัดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of Quantitative; LOQ) LOQ หาได้หลายแนวทางเช่นกัน สำหรับ เทคนิค HPLC ใช้ค่าจากสัญญาณตัวอย่างที่มีต่อสัญญาณรบกวน (signal to noise) เท่ากับ 10 หรือได้จากการคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากสูตร

$$LOQ = 10\ SD / Slope$$

เมื่อ SD เป็น ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Slope เป็น ค่าความชันของกราฟความสำพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าที่วัดได้จากการวิเคราะห์

4. การศึกษาความคงสภาพ (Stability Study)

การศึกษาความคงสภาพผลิตภัณฑ์ยา ตาม ICH Guideline Q1A (R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products[17] กำหนดให้ยาที่ผลิตเป็นยาสำเร็จรูปเพื่อขาย ทำการศึกษาความคงตัวในสภาวะเร่ง (accelerated) และสภาวะปกติ (long-term) โดยแบ่งตามเขตพื้นที่ของกลุ่มประเทศที่มีความแตกต่างกันทางด้านสภาพแวดล้อมอุณหภูมิ ความชื้น และแสง สำหรับประเทศไทยอยู่ในเขตที่ IVB ศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ยาที่สภาวะปกติที่อุณหภูมิ 30°C 75%RH และที่สภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 40°C 75%RH โดยตัวอย่างที่จะศึกษาต้องผลิตด้วยเครื่องมือ ขบวนการผลิตและภาชนะการบรรจุ เหมือนกับที่ผลิตสำหรับขายโดยรุ่นที่เก็บศึกษาต้องอย่างน้อย 2 รุ่นผลิตแรก (อย่างน้อย 1 ใน 10 เท่า ของขนาดผลิตหรืออย่างน้อย 100,000 เม็ด สำหรับยาชนิดเม็ดหรือยาชนิดแคปซูล) ข้อกำหนดของการศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ครอบคลุมถึงคุณสมบัติต่างรูปลักษณะ คุณสมบัติทางเคมี ฟิสิกส์ ชีววิทยา คุณสมบัติของการปราศจากเชื้อ รวมทั้งสารประกอบอื่นที่จำเป็น เพื่อให้ยายังคงมีคุณภาพ ความปลอดภัย ประสิทธิภาพ และประสิทธิผลในการรักษา วิธีวิเคราะห์กำหนดให้มีการตรวจสอบความถูกต้องทุกข้อกำหนด และเป็นวิธีที่สามารถแยกสารเสื่อมสลายได้

5. การประเมินอายุยา

การกำหนดอายุยาตาม ICH Guideline Q2A1 Q2B[17] ต้องมีการศึกษายาที่ผลิตตามกำหนดทั้งการศึกษาความคงตัวในสภาวะเร่ง (accelerated) อย่างน้อย 6 เดือน และระยะยาว (long-term) อย่างน้อย 1 ปี เพื่อกำหนดอายุยาเบื้องต้น 2 ปี คุณสมบัติของยาจะต้องคงคุณสมบัติที่ดีมีคุณภาพทั้งรูปลักษณะ คุณสมบัติทางเคมี ฟิสิกส์ ชีววิทยา คุณสมบัติของการปราศจากเชื้อ รวมทั้งสารอื่นๆที่จำเป็น เพื่อให้ยายังคงมีคุณภาพ ความปลอดภัย ประสิทธิภาพ และประสิทธิผลในการรักษากรณีที่มีคุณสมบัติเปลี่ยนไป การกำหนดอายุยาต้องได้รับการประเมินอีกครั้ง

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

ในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้เกี่ยวข้องกับการศึกษาหาวิธีวิเคราะห์เพื่อศึกษาสภาวะการเสื่อมสลายของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม ในบทนี้จะได้กล่าวถึงรายละเอียดในการดำเนินการวิจัย ประกอบด้วย

1. อุปกรณ์ และสารเคมี
2. การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์
3. การศึกษาหาวิธีวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์
4. การศึกษาความคงสภาพของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมในสภาวะกดดัน
5. การประเมินอายุยา

1. อุปกรณ์ และสารเคมี

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) รุ่น Ultimet 3000 2G Dionex (USA) ประกอบด้วย LPG-3400SD Pump WPS-3000SD auto sampler TCC3000SD Column oven DAD 3000 SD คอลัมน์ Hypersil C18 ขนาดยาว 150 mm กว้าง 4.6 mm ขนาดอนุภาคภายใน 3,5 µm (Thermo ประเทศสหรัฐอเมริกา) สารคีโตติเฟน ฟูมาเรต(B.T. Gen S.A. ประเทศสวิสเซอร์แลนด์) สารเสื่อมสลาย คีโตติเฟนชนิด G (EDQM-Council of Europe, ประเทศฝรั่งเศส) น้ำบริสุทธ์ปราศจากไอออน (DI water) (Local , ประเทศไทย) เมธานอล เกรด HPLC (Fischer chemical, ประเทศ อังกฤษ) ไตรเอทิลเอมีน (Merck, ประเทศเยอรมัน) กรดไฮโดรคลอริก (RCI Labscan, ประเทศไทย) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (RCI, Labscan ประเทศไทย)

2. การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์

2.1 การเตรียมตัวอย่างสารละลายมาตรฐาน

2.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานตั้งต้น โดยชั่งสารมาตรฐานคีโตติเฟน ฟูมาเรต ปริมาณ 110 mg ซึ่งจะสมมูลพอดีกับสารคีโตติเฟน 80 mg ใส่ขวดวัดปริมาตร 50 ml ละลายด้วยตัวทำละลายที่ประกอบด้วยน้ำ ต่อ เมธานอล (50:50) (diluents) จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้นมีความเข้มข้นของสารคีโตติเฟนเท่ากับ 1.6 mg/ml

2.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานเจือจาง โดยนำสารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่เตรียมไว้จากข้อ 2.1.1 มาเจือจางต่อด้วยตัวทำละลายที่ประกอบด้วยน้ำ ต่อ เมธานอล (50:50) ให้ได้ช่วงความเข้มข้น 10-160 µg/ml จากนั้นกรองสารละลายมาตรฐานนี้ด้วยแผ่นกรองชนิดไนลอน (Nylon

membrane filter) ขนาด 0.45 µm และ sonicate ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

2.2 การเตรียมตัวอย่างสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม

เตรียมโดย ผสมส่วนประกอบน้ำเชื่อมเปล่า (placebo syrup) ที่ประกอบด้วย น้ำตาล สารกันบูด (เมททิล พาราเบน โพรพิล พาราเบน) โซเดียมเตรต กรดซิทริก สละไซเดอร์ และ น้ำบริสุทธิ์ปราศจากไอออน เติมตัวยาให้ได้ปริมาณตัวยาคีโตติเฟนเท่ากับ 1 mg ใน 5ml ของยาน้ำเชื่อม จากนั้นเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ โดยนำตัวอย่างน้ำเชื่อมปริมาณ 5 ml มาชั่งน้ำหนักให้ได้น้ำหนักแน่นอน ใส่ขวดวัดปริมาตร 25 ml ปรับปริมาตรด้วย diluent กรองสารละลายตัวอย่างด้วยแผ่นกรองชนิดไนลอนขนาด 0.45 µm และ sonicate ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่อง HPLC

3. การศึกษาหาวิธีวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

3.1 วิธีวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณตีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม โดยใช้วิธีวิเคราะห์ตามเภสัชตำรับประเทศอังกฤษ ปี ค.ศ. 2012 (BP 2012) เป็นแนวทาง โดยใช้เทคนิค HPLC วิเคราะห์หาสารเสื่อมสลายจากสารคีโตติเฟนในวัตถุดิบเป็นแนวทางพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม โดยใช้สารละลายเคลื่อนที่ชนิด A (ไตรเอทิลเอมีน 175 µm ใน 500 ml น้ำบริสุทธิ์ปราศไอออน) และสารละลายเคลื่อนที่ชนิด B (ไตรเอทิลเอมีน 175 µm ใน 500 ml ของเมธานอล) อัตราการไหลของสารละลายเคลื่อนที่เป็น 1.0 ml/min มีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของสารละลายเคลื่อนที่ดังตารางที่ 3 วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงภายใต้แสงยูวีความยาวคลื่น 297 nm ปริมาตรที่ฉีดสารเข้าเครื่อง 20 µl ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ขณะทำการวิเคราะห์ที่ 40° C ใช้คอลัมน์ C18 ขนาดยาว 150 mm กว้าง 4.0 mm ขนาดอนุภาคของวัฏภาคนิ่ง 3 µm เป็นวิธีวิเคราะห์เริ่มต้น นำตัวอย่างที่เตรียมขึ้นตามวิธีในข้อ 2 มาทดลองทำการวิเคราะห์ดูการแยกสารสำคัญคีโตติเฟนจากสารเสื่อมสลายที่เกิดภายใต้แรงกดดัน นำโครมาโตเกรมไปวิเคราะห์ประเมินค่าการแยกชัด (resolution) สำหรับสารแต่ละชนิด

ตาราง 3 การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนสารละลายเคลื่อนที่

Time (min)	Mobile phase A(%v/v)	Mobile phase B (%v/v)
0-12	40	60
12-20	40 —>10	60 —> 90
20-25	10	90
25-27	40	60

3.2 ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) นำวิธีที่เหมาะสมที่ได้จาก 3.1 มาทำการตรวจสอบความถูกต้อง โดยมีหัวข้อที่ตรวจสอบดังนี้

3.2.1 ความเป็นเส้นตรง (Linearity) เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นครอบคลุมช่วงวิเคราะห์ (10-160 µm) วิเคราะห์อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำมาวิเคราะห์ เขียนกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการตอบสนอง คำนวณค่าความเป็นเส้นตรง (regression line) แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r^2) ค่าความชัน (slope) ค่าจุดตัดบนแกน y (y-intercept)

3.2.2 ความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ทำโดยการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานคีโตติเฟน สารละลายคีโตติเฟนที่เป็นวัตถุดิบ เปรียบเทียบกับ diluent (เมธานอล: น้ำ; 50:50 v/v) ยาน้ำเชื่อมหลอก (Placebo syrup) สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่ไม่ได้ผ่านการเร่งและผ่านการเร่งที่สภาวะต่าง ๆ ทำการวิเคราะห์และเปรียบเทียบโครมาโทแกรมที่ได้ จากนั้นวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของพีคของสารคีโตติเฟนด้วย Diode array detector

3.2.3 ความถูกต้อง (Accuracy) เตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ โดยเตรียมสารมาตรฐานคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมหลอก (Placebo syrup) อย่างน้อย 3 ความเข้มข้นในช่วงที่วิเคราะห์มีความเข้มข้นของคีโตติเฟนเท่ากับ 20 - 60 µg /ml เตรียมความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง วัดซ้ำตัวอย่างละ 2 ครั้ง วิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง หาปริมาณตัวยาสำคัญ คำนวณปริมาณยาที่พบเปรียบเทียบกับปริมาณที่เติม คำนวณค่าร้อยละการคืนย้อนกลับ (% recovery) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (% RSD)

3.2.4 ความแม่นยำ (Precision) ทำการแสดงความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำ

3.2.4.1 Repeatability หรือ Inter assay โดยการเตรียมตัวอย่างสารละลายมาตรฐานคีโตติเฟน 3 ความเข้มข้นคือ 20, 40, 80 µg /ml ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่างทำการวิเคราะห์ด้วย HPLCและคำนวณหา % RSD และเตรียมตัวอย่างยาคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมดังข้อ 2.2 จำนวน 6 ตัวอย่างคำนวณหา % RSD ในการวิเคราะห์ซ้ำ

3.2.4.2 Intermediate precision เตรียมตัวอย่างสารมาตรฐานคีคีโตติเฟน 3 ความเข้มข้นคือ 20, 40, 80 µg /ml ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่างทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC วิเคราะห์ ต่างวันที่ ต่างเครื่อง HPLC คำนวณหา % RSD ของพื้นที่ใต้กราฟ

3.2.5 ช่วงวิเคราะห์ (Range) ผลจากค่าความถูกต้อง ความแม่นยำและความเป็นเส้นตรงจะสามารถกำหนดช่วงความเข้มข้นที่ยอมรับเป็นช่วงวิเคราะห์ โดยในยาน้ำเชื่อมช่วงวิเคราะห์ควรจะอยู่ระหว่าง 80-120 % ของความเข้มข้นที่วิเคราะห์เป็นอย่างน้อย เป็นต้น

3.2.6 ขีดจำกัดในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Limit of detection; LOD) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่เครื่องมือสามารถตรวจวัดได้ โดยที่ค่า Signal/ noise เท่ากับ 3

3.2.7 ขีดจำกัดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of quantitative; LOQ) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ผลการวิเคราะห์เชื่อถือได้ โดยที่ค่า Signal/ noise เท่ากับ 3

3.2.8 ความสม่ำเสมอของระบบ (System suitability test) [15] เตรียมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นที่ใช้วิเคราะห์ 40 µg/ml นำไปวิเคราะห์โดยการวัดซ้ำอย่างน้อย 5 ครั้ง คำนวณค่าตัวแปรที่ได้ ประกอบด้วย ค่าการแยกชัด (RS) ค่าประสิทธิภาพของคอลัมน์ (N) ค่าความสมมาตรของพีค ความแม่นยำ ผลที่ได้จะแสดงให้เห็นถึงความเหมาะสมของวิธี และความพร้อมใช้งานของเครื่องมือ

3.2.9 ความคงทนของวิธีวิเคราะห์ (Robustness) โดยการเตรียมตัวอย่างสารละลายคีโตติเฟนความเข้มข้นที่ช่วงความเข้มข้น 10-160 µg/ml เตรียมตัวอย่าง 3 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ตัวอย่าง วิเคราะห์ต่างวัน ใช้เครื่อง HPLC ต่างเครื่องกัน คอลัมน์ต่างบริษัท วิเคราะห์ผลที่ได้นำมาประเมินความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคีโตติเฟนและค่าที่วัดได้จากการทดลอง นำมาทดสอบทางด้านสถิติ t-test และทดสอบความเป็นเส้นตรงโดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคีโตติเฟนและค่าที่วัดได้ เพื่อดูความแตกต่างกันของผลการทดลอง

4. การศึกษาความคงสภาพของสารคีโตติเฟน (Stability Study)

4.1 ศึกษาความคงสภาพของสารคีโตติเฟนวัตถุดิบภายใต้สภาวะกดดัน (Stress Testing)

ศึกษาการเสื่อมสลายของตัวยาสำคัญภายใต้สภาวะกดดัน

4.1.1 สภาวะอุณหภูมิและความชื้น

สภาวะที่อุณหภูมิสูง 105° C 3 ชั่วโมง

สภาวะที่อุณหภูมิ 40°C 75% RH 8 ชั่วโมง

4.1.2 สภาวะกรด ศึกษาภายใต้ 0.1N Hydrochloric acid 1 ชั่วโมง

4.1.3 สภาวะด่าง ศึกษาภายใต้ 0.1N Sodium hydroxide 1 ชั่วโมง

4.1.4 สภาวะที่มีความชื้น โดยใช้น้ำเป็นเวลา 8 ชั่วโมง

4.1.5 สภาวะออกซิเดชัน ใช้ 3-30 %ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 ชั่วโมง

4.1.6 สภาวะใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (จากแสงแดด) 2, 4, 6 ชั่วโมง

เตรียมตัวอย่างในแต่ละสภาวะกดดันต่าง ๆ เปรียบเทียบกับสารละลายที่ไม่มีสารตัวอย่างที่ผ่านสภาวะกดดัน นำสารละลายทั้งหมดไปวิเคราะห์ด้วย HPLC นำผลการศึกษามาวิเคราะห์ถึงการเสื่อมสลาย

4.2 ศึกษาความคงสภาพของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม ภายใต้สภาวะกดดัน (Stress Testing)

4.2.1 สภาวะกดดันที่อุณหภูมิสูง 105 ° C 3 ชั่วโมง

4.2.2 สภาวะกรด ศึกษาภายใต้ 0.1 N Hydrochloric acid 8 ชั่วโมง

4.2.3 สภาวะด่าง ศึกษาภายใต้ 0.1 N. Sodium Hydroxide 8 ชั่วโมง

4.2.4 สภาวะออกซิเดชั่น ใช้ 30%ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 4 ชั่วโมง

4.2.5 สภาวะใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (จากแสงแดด) 3 ชั่วโมง

เตรียมตัวอย่างในแต่ละสภาวะกดดันเปรียบเทียบกับสารละลายที่ไม่มีสารตัวอย่างที่ผ่านสภาวะกดดัน นำสารละลายทั้งหมดไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC นำผลการศึกษามาวิเคราะห์ถึงการเสื่อมสลาย

4.3 ศึกษาอัตราการเกิดการเสื่อมสลายของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมในสภาวะต่าง ๆ

เนื่องจากการเสื่อมสลายของสารคีโตติเฟนในวัตถุดิบและในยาน้ำเชื่อม จากข้อ 4.1 และ 4.2 เป็นการทดสอบความคงสภาพเบื้องต้นของสารคีโตติเฟน ดังนั้นในหัวข้อนี้จึงได้เลือกทำการศึกษาความคงสภาพของยาในสภาวะกดดันที่มีความเสี่ยงสูงและเป็นไปได้จริงในสภาวะการผลิต การบรรจุ การเก็บรักษา นำผลจากข้อ 4.2 มาเป็นแนวทางศึกษาความคงสภาพโดยเตรียมตัวอย่างยาน้ำเชื่อมให้อยู่ในสภาวะที่กำหนดนั้น และวิเคราะห์หาปริมาณสารคีโตติเฟนในตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ ตั้งแต่เริ่มต้น และตามเวลาที่กำหนด

4.3.1 สภาวะออกซิเดชัน 30 % ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่เวลาเริ่มต้น 4, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง

4.3.2 สภาวะใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (จากแสงแดด) ที่เวลาเริ่มต้น 1, 3, 4 และ 8 ชั่วโมง

4.3.3 ที่อุณหภูมิ 30 ° C 75 % RH และ 40 ° C 75 % RH ที่เวลาเริ่มต้น 4, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง

4.3.4 สภาวะกรด-ด่าง โดยใช้บัฟเฟอร์ pH 1.2 บัฟเฟอร์ pH 6.8 และบัฟเฟอร์ pH 9.0 ที่เวลาเริ่มต้น 4, 8 ,12 และ 24 ชั่วโมง

เพื่อหาแนวโน้มการเสื่อมสลายของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่เวลาแตกต่างกัน โดยการเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์หาปริมาณสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมด้วยเครื่อง HPLC

4.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่มีอายุยาแตกต่างกัน

วิเคราะห์ตัวอย่างสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่อายุ 1 ปี และ 3 ปี ที่เก็บไว้ศึกษาความคงสภาพในภาวะปกติที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ 30 °C 75 % RH คำนวณหาปริมาณตัวยาคีโตติเฟน (%LA) ในยาน้ำเชื่อมของยาที่มีอายุยาแตกต่างกัน

5. การประเมินอายุยา

การประเมินโดยทั่วไปนำผลการศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพ คุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพของยาคีโตติเฟนในน้ำเชื่อมที่เก็บศึกษาที่สภาวะปรกติและสภาวะเร่งมาวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาคีโตติเฟน ในการศึกษาในครั้งนี้ศึกษาคุณสมบัติทางเคมี ที่วิเคราะห์จากตัวอย่างที่เก็บศึกษาความคงสภาพดังนี้

5.1 การวิเคราะห์ตัวอย่างสารคีโตติเฟนยาน้ำเชื่อมเก็บศึกษาความคงสภาพที่สภาวะปรกติ (Long term stability)

นำยาคีโตติเฟนในน้ำเชื่อมเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 30 °C 75% RH มาวิเคราะห์ศึกษาความคงสภาพระยะยาวโดยนำออกมาวิเคราะห์หาปริมาณความถี่ที่ 3, 6, 9 และ12 เดือนในปีแรกไปจนกว่าจะครบอายุยาหรือจนกว่ายาจะไม่มีคุณสมบัติตามที่มาตรฐานกำหนด

5.2 การวิเคราะห์ตัวอย่างสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมเก็บศึกษาความคงสภาพที่สภาวะเร่ง (Accelerated stability)

นำยาคีโตติเฟนในน้ำเชื่อมเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 40 °C 75 % RH เพื่อวิเคราะห์ศึกษาความคงสภาพในสภาวะเร่ง ระยะเวลา 6 เดือน ความถี่ในการวิเคราะห์ทุก 1 เดือนจนครบ 6 เดือน

บทที่ 4
ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการหาปริมาณสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม และศึกษาสภาวะการเสื่อมสลายของคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่สภาวะกดดันต่างๆ รวมทั้งศึกษาวิเคราะห์ยาที่เก็บศึกษาความคงสภาพที่สภาวะปกติ และในสภาวะเร่ง

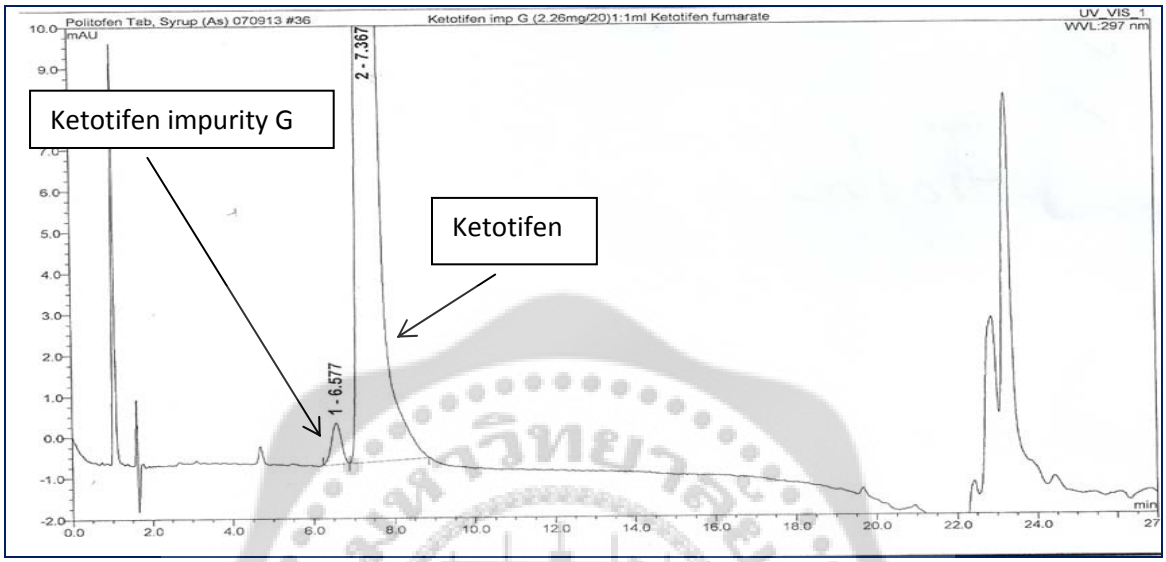
จากที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 2 สารคีโตติเฟนสามารถเสื่อมสลายเป็นสารอื่นได้หลายชนิดไม่ว่าจะเป็นสารเสื่อมสลายคีโตติเฟน ชนิด A B C E F และ G ซึ่งมีสูตรโครงสร้างที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนต้องเริ่มจากการแยกสารเสื่อมสลายต่างๆและสารคีโตติเฟนออกจากกันให้ชัดเจน ไม่รบกวนการวิเคราะห์ ในการทดลองนี้ได้นำมาจากเภสัชตำรับประเทศอังกฤษ ค.ศ. 2012 (BP 2012) ที่ใช้วิเคราะห์หาสารเสื่อมสลายในวัตถุดิบคีโตติเฟนมาใช้เป็นแนวทางการวิเคราะห์หาสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม โดยได้มีการเปลี่ยนแปลงขนาดของคอลัมน์ที่ใช้จาก C18 ขนาดยาว 150 mm กว้าง 4.0 mm ขนาดอนุภาค 3 µm เป็น C18 ขนาดยาว 150 mm กว้าง 4.6 mm ขนาดอนุภาค 5 µm ซึ่งเป็นขนาดที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการเนื่องจากมีข้อจำกัดในด้านเครื่องมือ HPLC และการใช้คอลัมน์ที่ขนาดอนุภาค 3 µm จะทำให้มีค่าความดันสูงมาก เครื่องมือไม่อาจรองรับได้ การเริ่มต้นการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์โดยนำสารคีโติเฟนวัตถุ-ดิบและสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมมาทำการเร่งให้เกิดการเสื่อมสลายในสภาวะกดดันต่าง ๆ เช่น ในกรด ด่าง ความร้อน แสง และสารออกซิเดชัน ระบบที่ใช้ในวิธี HPLC คือสารละลายเคลื่อนที่ชนิด A (ไตรเอทิลเอมีน 0.175 ml ใน 500 ml น้ำบริสุทธิ์ปราศไอออน) และสารละลายเคลื่อนที่ชนิด B (ไตรเอทิลเอมีน 0.175 ml ใน 500 ml เมธานอล) เปลี่ยนแปลงอัตราส่วนสารละลายเคลื่อนที่ดังตารางที่ 3 วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงภายใต้แสงยูวีความยาวคลื่น 297 nm ปริมาตรที่ฉีดสารเข้าเครื่อง 20 µl อัตราการไหลของสารละลายเคลื่อนที่เป็น 1.0 ml/min ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ขณะวิเคราะห์ 40° C

1. ผลการศึกษาหาวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมในการแยกสารคีโตติเฟนและสารเสื่อมสลายอื่น ๆ

ผลจากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานคีโตติเฟน ฟูมาเรตด้วยเทคนิค HPLC และตรวจวัดด้วยเครื่องวัด UV ที่วัดได้หลายความยาวคลื่น (diode array detector) ได้ค่า %RSD Peak purity index ต่ำ เท่ากับ 0.19% และให้ค่า Peak match เท่ากับ 998 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1000 แสดงว่าพีคคีโตติเฟนที่ได้จากการวิเคราะห์นี้มีค่าความบริสุทธิ์สูง ไม่มีการรบกวนจากสารอื่น

เมื่อนำสารเสื่อมสลายคีโตติเฟนชนิด G ผสมกับสารมาตรฐานคีโตติเฟนมาทำการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์นี้ พบว่าสารคีโตติเฟนมี retention time ที่เวลา 7.4 นาที และสารเสื่อมสลายคีโตติเฟนชนิด G ที่เวลา 6.6 นาที (ภาพประกอบที่ 3) ดังนั้นค่า Relative retention time (RT) ของ

สารเสื่อมสลายคีโตติเฟน G ต่อสารคีโตติเฟน คือ 0.9 ค่าการแยกชัดของสารทั้งสองเท่ากับ 1.95 ซึ่งสอดคล้องกับตำรายาประเทศอังกฤษ 2012 ที่กำหนดว่าค่า Relative retention time ของสารเสื่อมสลายคีโตติเฟนชนิด G ต่อสารคีโตติเฟน คือ 0.9 [1] ค่าการแยกชัดมากกว่า 1.5



ภาพประกอบ 3 แสดง Chromatogram ของสารคีโตติเฟนผสมกับสารเสื่อมสลายคีโตติเฟน G

1.1 วิเคราะห์สารคีโตติเฟนและสารเสื่อมสลาย

นำวิธีวิเคราะห์ที่ได้มาวิเคราะห์สารคีโตติเฟนและคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่เร่งการเสื่อมสลายด้วยสภาวะต่าง ๆ พบว่าเกิดการเสื่อมสลายได้สารอื่น และพบว่าตัวทำละลายและสารที่ใช้เป็นตัวช่วยในยาไม่รบกวนการวิเคราะห์ตัวยาสำคัญคีโตติเฟน เวลาที่สารคีโตติเฟนเคลื่อนที่ออก (retention time) ที่เวลา 7.6 นาที และมีสารอื่นเคลื่อนที่ออกที่เวลา 2.3 นาที 2.5 นาที 5.1 นาที 5.6 นาที 8.9 นาที 18.9 นาที และ 22.5 นาที ซึ่งเกิดจากสภาวะกดดันต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเร่งการเสื่อมสลายด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าจะเกิดการเสื่อมสลายเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากขึ้น ที่ความเข้มข้น 30 % ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ 0.1N โซเดียมไฮดรอกไซด์ จะพบว่าปริมาณสารคีโตติเฟนลดลงอย่างมาก จากตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารคีโตติเฟนที่เหลือหลังจากถูกเร่งในสภาวะต่างๆ การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารที่ชัดเจนเกิดจากการเร่งด้วย 30 % ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ด่าง 0.1N NaOH มีปริมาณตัวยาเหลือ 75.3% และ 88.7% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับโครมาโตแกรมที่เกิดขึ้นภาพประกอบที่ 9 และภาพประกอบที่ 10 แสดงโครมาโตแกรมที่มีพีคของสารอื่นเกิดขึ้นชัดเจนที่ตำแหน่งเวลาที่ 2.3 นาที และ 2.5 นาที

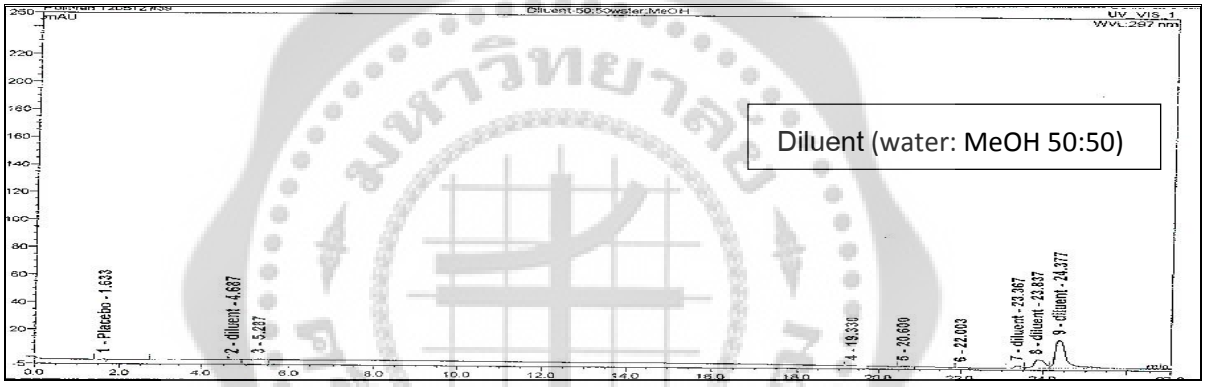
ตาราง 4 ผลการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในสภาวะกดดัน

Condition	Retention time of peak impurity (min)	% w/w ketotifen*
1.RM (Control)	20.5	100.0
2.Photolysis		
RM 2 hr UV light	2.5, 4.0, 20.5	101.6
RM 4 hr UV light	2.5, 4.0, 5.1, 18.9, 20.5	100.3
RM 6 hr UV light	2.5, 4.0, 5.1, 18.9, 20.5, 22.0	103.3
3.Oxidation		
RM 3% H_2O_2	2.3, 2.5, 5.1, 5.6,18.9, 20.5, 22.0	99.1
RM 10% H_2O_2	2.3, 2.5, 3.3, 5.6, 8.9,18.9, 20.5 22.0	86.0
RM 30% H_2O_2	2.3, 2.5, 5.1, 5.6, 8.9,18.97, 20.5 22.0	75.3
4.Moisture		
RM add water	2.3, 2.5, 4.0,18.95, 20.5, 22.0	99.6
5.Acid-basic		
RM add 0.1 N HCl	2.3,18.9, 20.5, 22.0	101.4
RM add 0.1 NaOH	2.5,18.9, 20.5, 22.0	88.7
6.Temperature		
RM at 105° C	4.0, 18.9, , 20.5, 21.9	101.2
RM at 40°C 75%RH	-	99.9

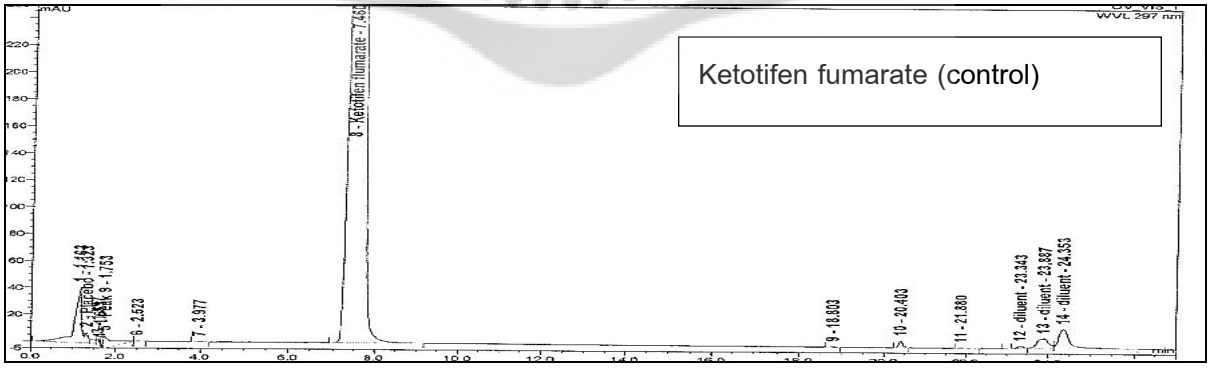
*เมื่อคำนวณเปรียบเทียบกับวัตถุดิบ (RM) Ketotifen Fumarate ให้เป็น 100% w/w

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความจำเพาะเจาะจง ตัวทำละลาย หรือสารเสื่อมสลายใดๆ ที่เกิดจากการกดดันสารคีโตติเฟนที่สภาวะต่างๆ ไม่รบกวนการวิเคราะห์สารคีโตติเฟน ดังแสดงภาพประกอบที่ 4 ถึง 13 แสดงโครมาโตแกรมของสารคีโตติเฟนที่ผ่านการกดดัน

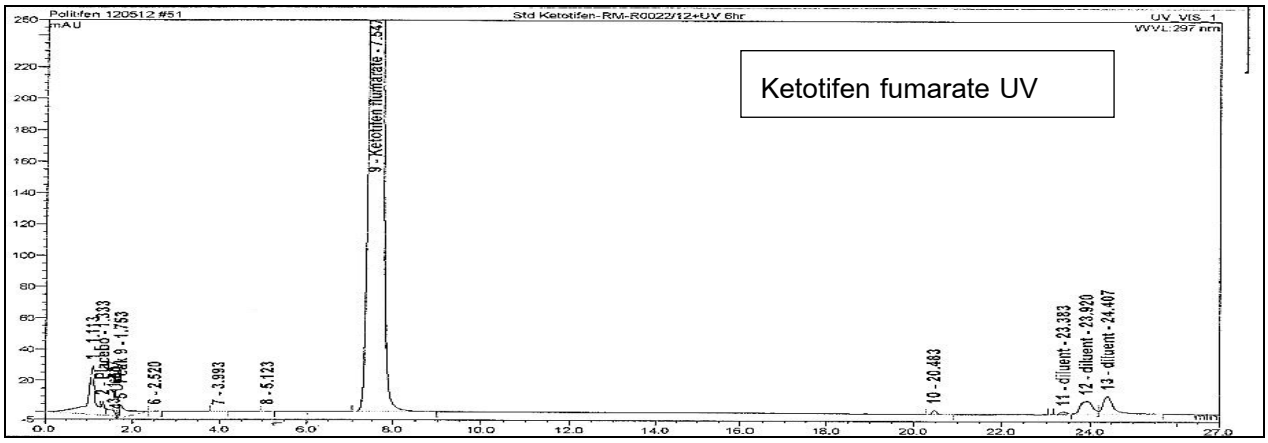
ด้วย กรด ด่าง ความร้อน ความชื้น สารทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน เปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของ diluent และโครมาโตแกรมของสารคีโต-ติเฟนที่ไม่ถูกกดดัน (ภาพประกอบที่ 5) จะเห็นว่าสารคีโตติเฟนที่กดดันด้วยสารออกซิเดชันจะเกิดการเสื่อมสลายเป็นสารอื่นชัดเจน โดยในโครมาโตเกรมมีพีคอื่นออกมาที่เวลา 2.3 และ 2.5 นาที โดยขนาดพีคของสารเสื่อมสลายเป็นอัตราส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คือเมื่อความเข้มข้นของสารสูงขึ้นพีคที่ออกที่เวลา 2.3 และ 2.5 นาที มีค่าความสูงของพีคสูงขึ้น ดังภาพประกอบที่ 10 ถึง ภาพประกอบที่ 12 ส่วนการกดดันด้วยแสง UV ความชื้น กรด ความร้อนที่อุณหภูมิ 105ºC และ 40°C 75% RH สารมีการเสื่อมสลายเล็กน้อยไม่ชัดเจน จากตาราง ที่ 4 ปริมาณสารคีโตติเฟนไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ส่วนในด่าง 0.1 N NaOH มีปริมาณสารคีโตติเฟนลดปริมาณลงมากพอควร แต่จากโครมาโตแกรม มีเพียงพีคเล็กๆเกิดขึ้นเท่านั้น อย่างไรก็ตามไม่มีสารเสื่อมสลายใดที่รบกวนการวิเคราะห์



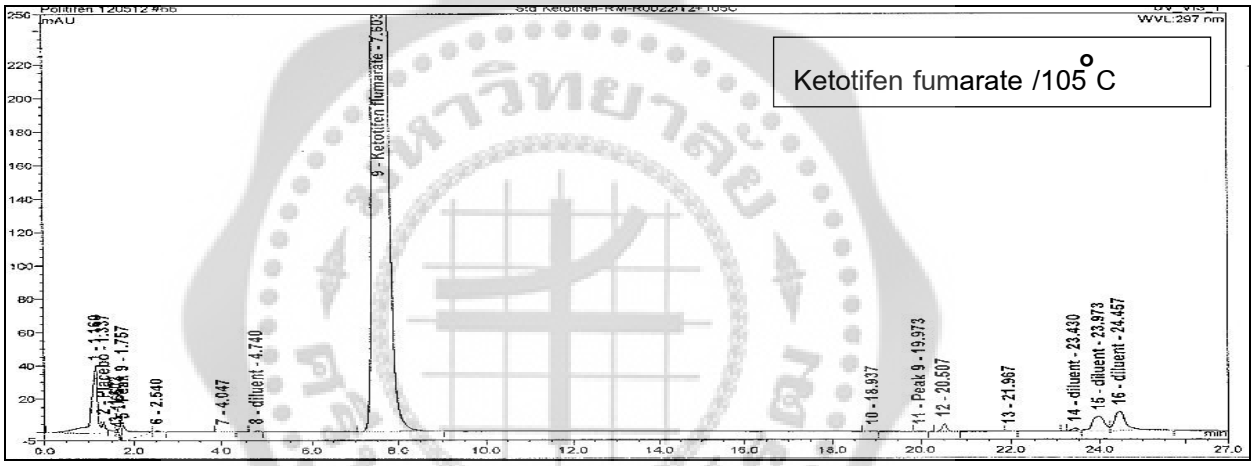
ภาพประกอบ 4 แสดง Chromatogram ตัวทำละลาย (Diluent) ประกอบด้วย น้ำและเมธานอล อัตราส่วน 50 ต่อ 50 ส่วนโดยปริมาตร



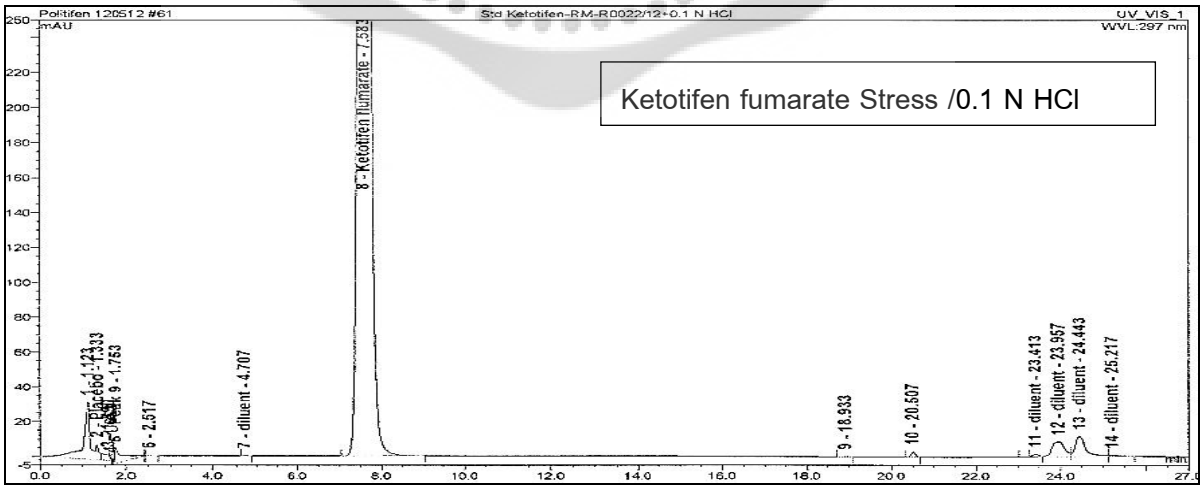
ภาพประกอบ 5 แสดง Chromatogram วัตถุดิบคีโตติเฟน (Control)



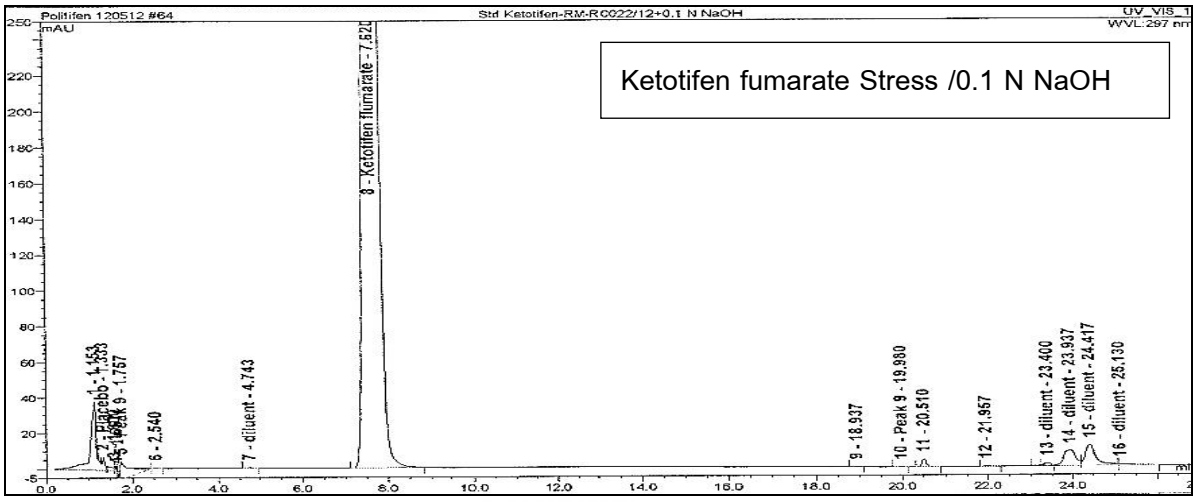
ภาพประกอบ 6 แสดง Chromatogram ของสารคีโตติเฟนที่กดดันด้วยแสง UV



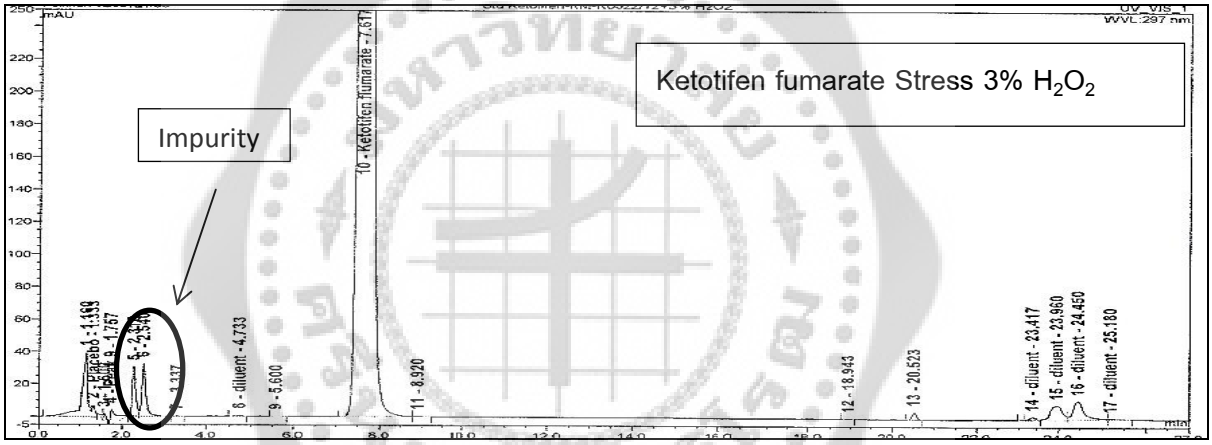
ภาพประกอบ 7 แสดง Chromatogram ของสารคีโตติเฟนที่กดดันด้วยความร้อน 105°C



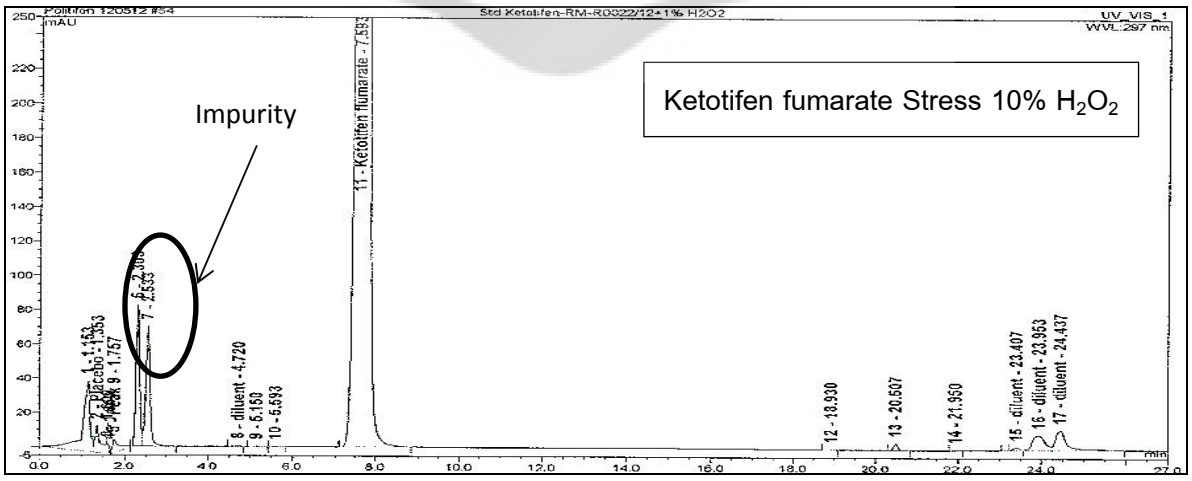
ภาพประกอบ 8 แสดง Chromatogram ของสารคีโตติเฟนที่กดดันด้วยกรด 0.1 N HCl



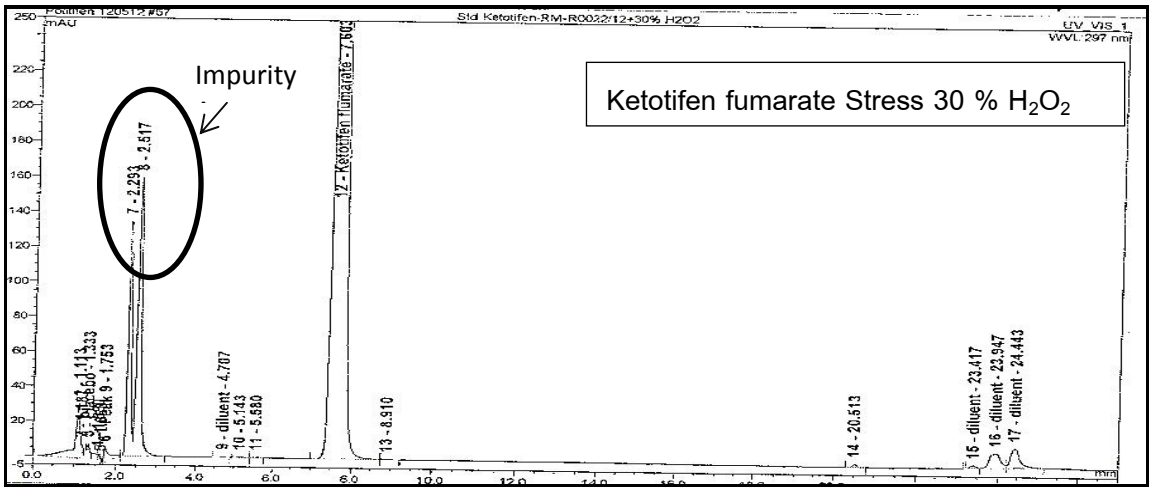
ภาพประกอบ 9 แสดง Chromatogram ของสารคีโตติเฟนที่กดดันด้วยกรด 0.1 N NaOH



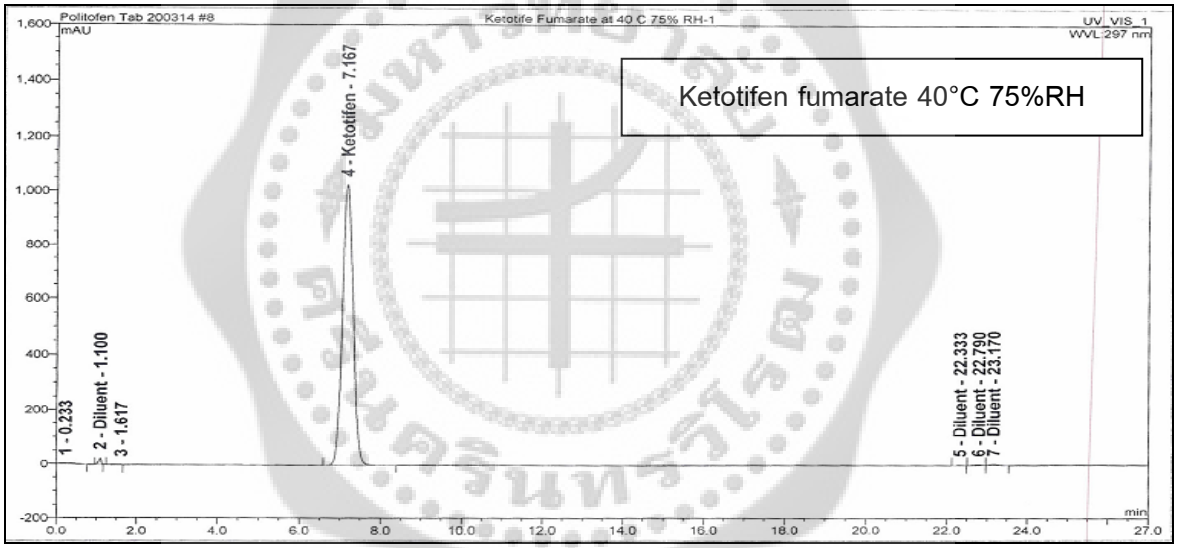
ภาพประกอบ 10 แสดง Chromatogram ของสารคีโตติเฟนที่กดดันด้วย 3% H_2O_2



ภาพประกอบ 11 แสดง Chromatogram ของสารคีโตติเฟนที่กดดันด้วย 10% H_2O_2



ภาพประกอบ 12 แสดง Chromatogram ของสารคีโตติเฟนที่กดดันด้วย 30% H_2O_2



ภาพประกอบ 13 แสดง Chromatogram ของสารคีโตติเฟนที่กดดันด้วยความร้อน 40°C 75%RH

ทำการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนที่ศึกษาที่สภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 40°C 75%RH เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (ภาพประกอบที่ 13) ไม่พบว่าสารคีโตติเฟนเสื่อมสลายไปอย่างชัดเจน ดูได้จาก Chromatogram ไม่มีพีคอื่นเกิดขึ้น พบเพียงพีคของ diluent และ พีคของ Placebo เท่านั้น ปริมาณคีโตติเฟนที่วิเคราะห์ได้มีปริมาณ 99.9 % (n=3)

1.2 วิเคราะห์สารคีโตติเฟนและสารเสื่อมสลายในยาน้ำเชื่อม

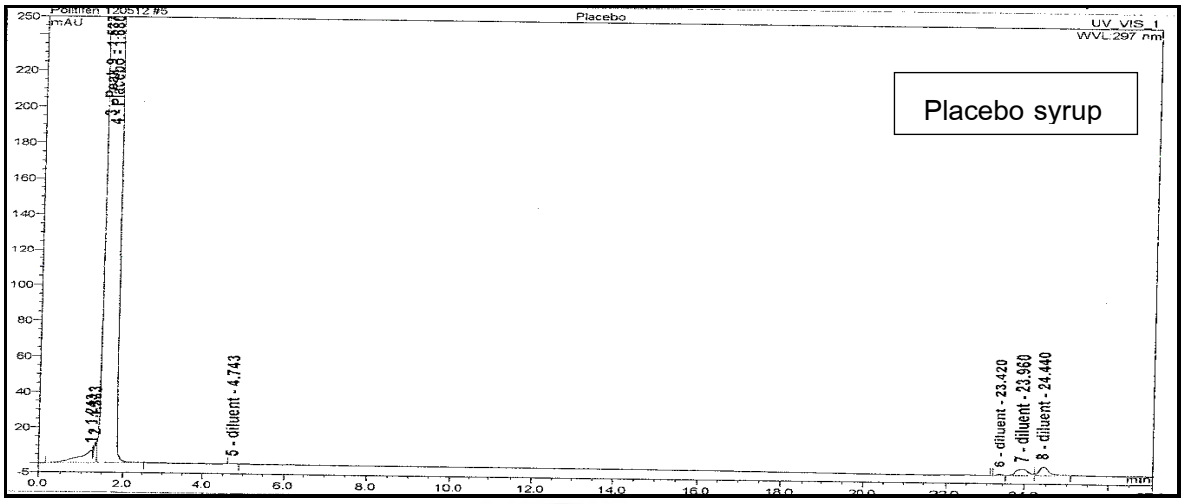
ผลการทดลองจากการนำยาตัวอย่างคีโตติเฟนในน้ำเชื่อมมาทำการกดดันในสภาวะในสภาวะต่างๆ ดังตารางที่ 5 พบว่าการกดดันด้วยสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีสารเสื่อมสลายอื่นออกมาชัดเจนเวลา 2.3 นาที และ 2.6 นาที และเมื่อกดดันด้วยแสงยูวีมีสารเสื่อมสลายอื่นออกมาที่เวลา 4.5 นาทีและ 6.7 นาที ดังตารางที่ 5 และโครมาโตแกรมจากภาพประกอบที่ 16 และ 17

ตาราง 5 ผลการวิเคราะห์สารโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่สภาวะกดดัน

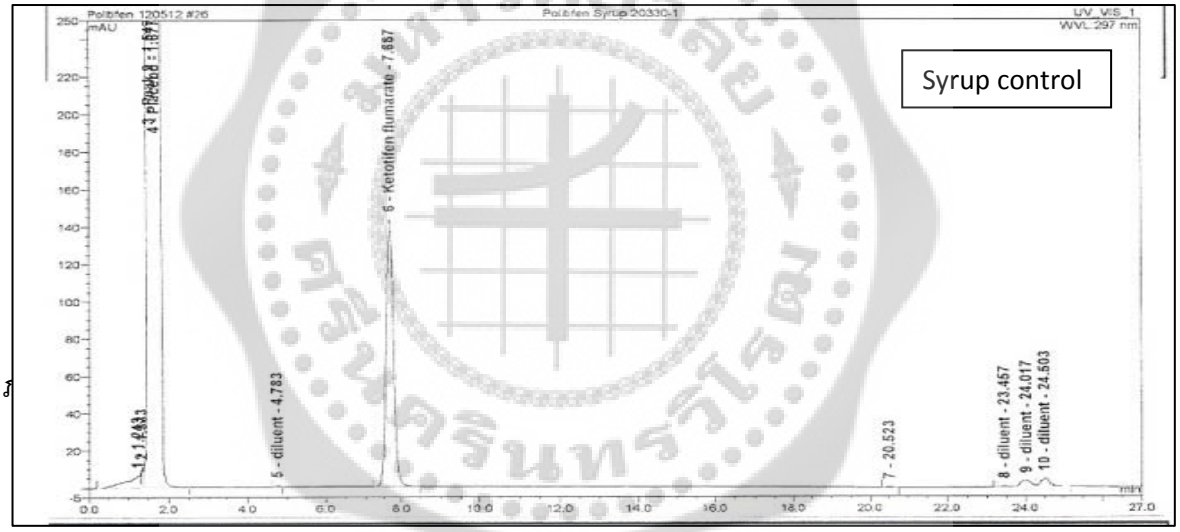
Stress Condition	**RT* of impurity (min)**	**Ketotifen (%LA)**
1. Syrup Control	-	103.6
2. Acid- basic		
Syrup 0.1 N HCl	-	105.6
Syrup 0.1 N NaOH	-	105.5
3. Oxidation		
Syrup 30% H_2O_2	2.3, 2.6	102.6
4. Temperature		
Syrup heat 105 °C	-	104.6**
5. Photolysis		
Syrup UV light	4.5, 6.7	100.1

*RT= Retention time

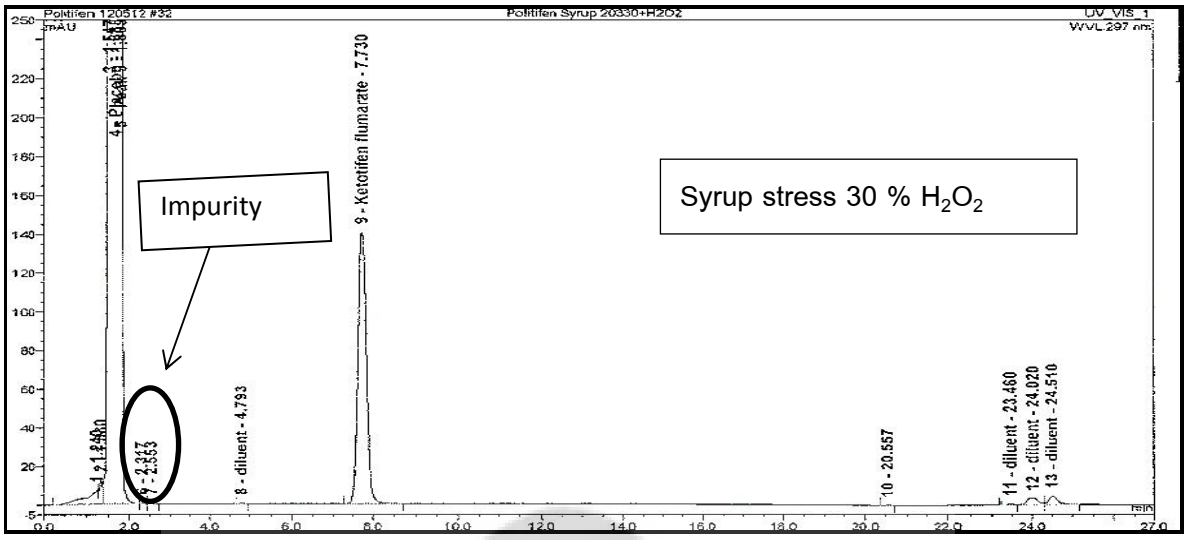
** สีของยาน้ำเชื่อมเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำตาลเข้มขึ้น



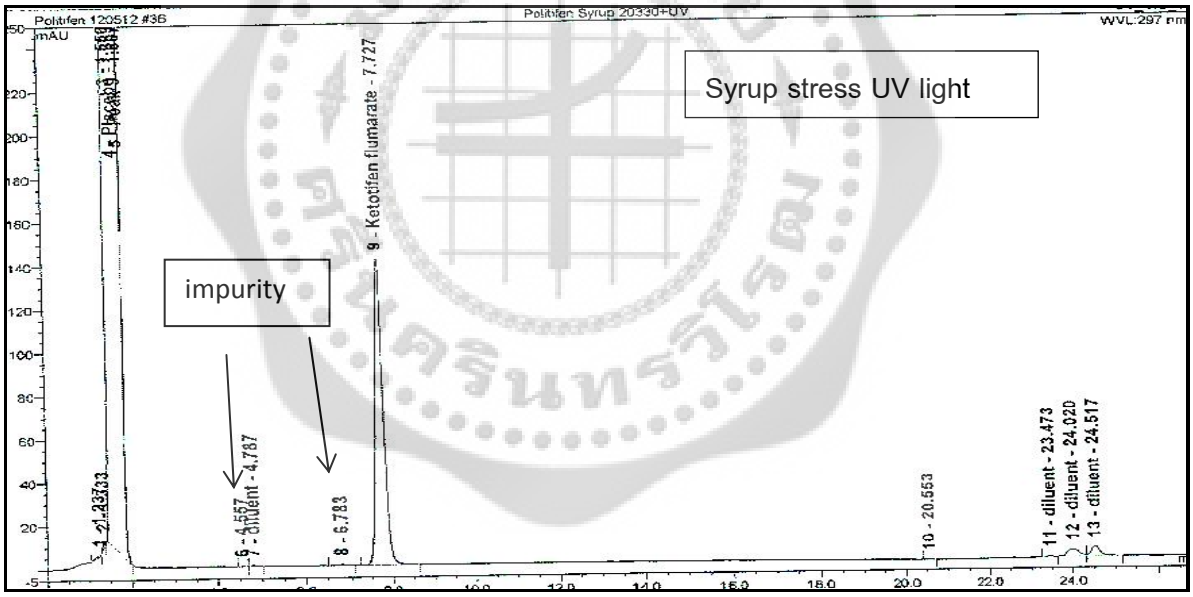
ภาพประกอบ 14 แสดง Chromatogram ไซรับเปล่า (Placebo)



ภาพประกอบ 15 แสดง Chromatogram ของคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม (Control)



ภาพประกอบ 16 แสดง Chromatogramของคีโตติเฟนในน้ำเชื่อม เมื่อทำการกดดันสภาวะด้วย 30% Hydrogen peroxide (H_2O_2)



ภาพประกอบ 17 แสดง Chromatogram คีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่กดดันด้วยแสง UV จากแสงแดด

จากการทดลองดังกล่าวข้างต้นที่ทำการกดดันสารคีโตติเฟนที่เป็นวัตถุดิบและในยาน้ำเชื่อมที่สภาวะต่าง ๆ จะพบว่าวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC นี้ มีความจำเพาะเจาะจงกับสารคีโตติเฟน โดยไม่มีสารอื่นรบกวนการวิเคราะห์ตัวยาคีโตติเฟน ไม่ว่าจะเป็น diluent (ภาพประกอบ 4) สารตัวช่วยในส่วนประกอบในยาน้ำเชื่อมเปล่า (ภาพประกอบที่ 14) และสารเสื่อมสลายที่เกิดจากการกดดันสารคีโตติเฟน (ภาพประกอบที่ 6 ถึง 17)

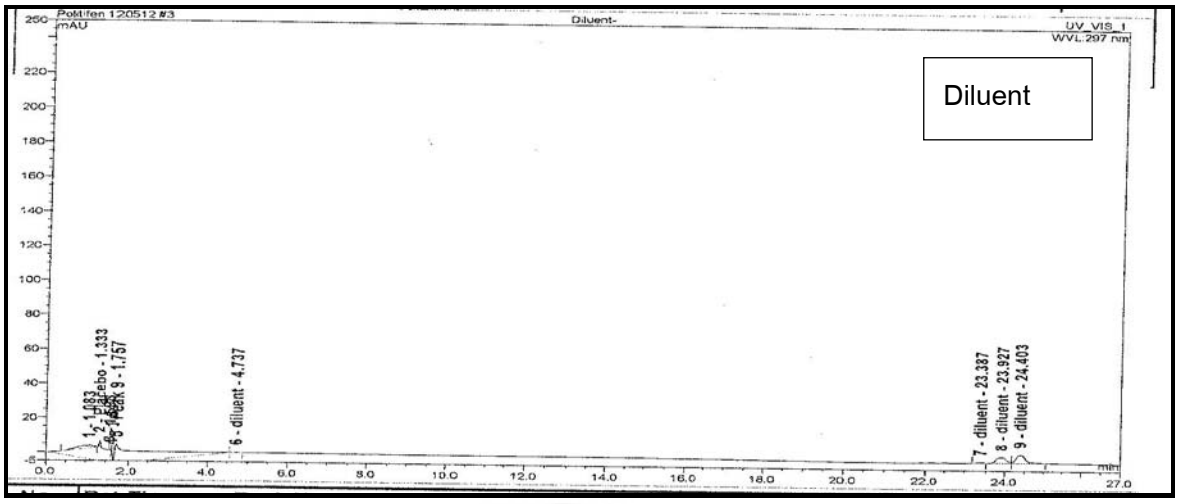
ผลการกดดันคีโตติเฟน ในยาน้ำเชื่อมที่สภาวะต่าง ๆ เกิดการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจนนัก เมื่อเทียบกับที่เกิดในวัตถุดิบ ผลการเสื่อมสลายจะเกิดขึ้นจากการกดดันด้วยสารออกซิเดชัน และจากแสง UV เพียงเล็กน้อย ดังแสดงตามตารางที่ 5 ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะในตัวอย่างยาน้ำเชื่อมมีสารช่วยอื่นที่เป็นส่วนประกอบของน้ำเชื่อม ทำให้สารเร่งการเสื่อมสลายไม่สัมผัสกับสารคีโตติเฟนโดยตรง หรือมีปริมาณไม่เข้มข้นมากพอที่จะทำให้เกิดการเสื่อมสลายได้ชัดเจน เหมือนที่เร่งคีโต-ติเฟนวัตถุดิบ

1.3 วิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่มีอายุยาแตกต่างกัน

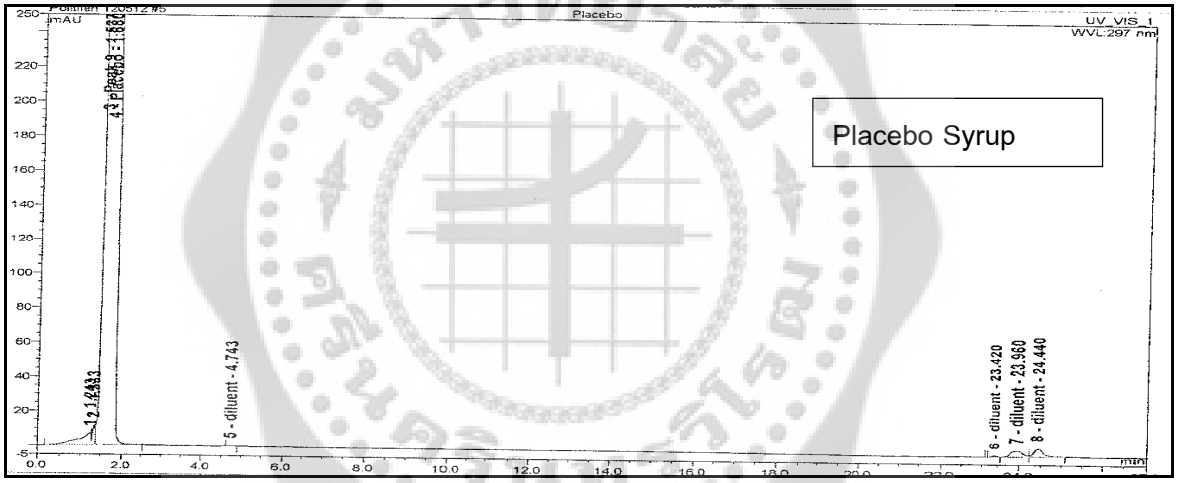
ผลการทดลองนำคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมซึ่งเป็นยาที่ประกอบด้วยคีโตติเฟน 1 มิลลิกรัมในน้ำเชื่อม 5 มิลลิลิตร ที่มีอายุยาแตกต่าง 1ปี และ 3 ปีมาวิเคราะห์เพื่อศึกษาหาปริมาณคีโตติเฟน (%LA) พบว่าสามารถวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาคีโตติเฟนได้ ดังตารางที่ 6 และภาพประกอบที่ 18 ถึง 22

ตาราง 6 ผลการทดลองวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่มีอายุยาแตกต่างกัน

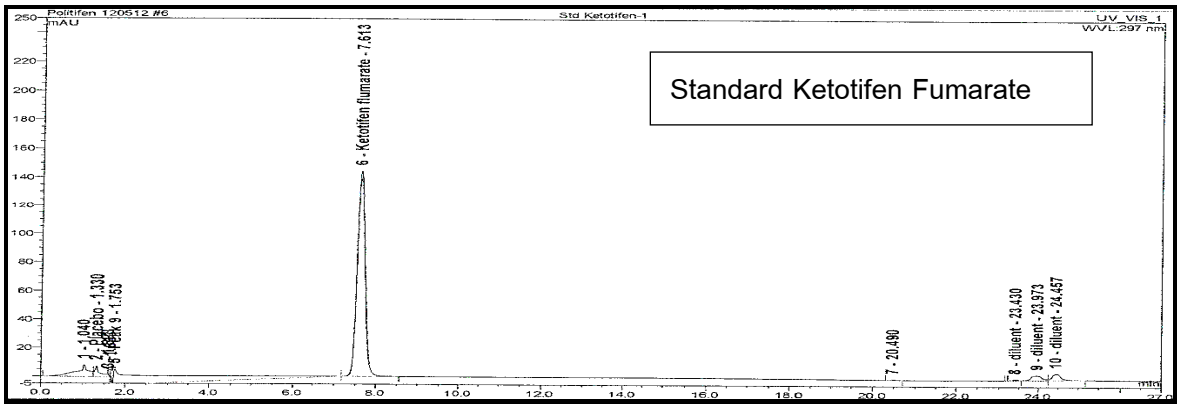
ตัวอย่าง	Retention time of peak impurity (min)	Ketotifen (% LA)
1 ตัวทำละลาย	-	-
2 ยาหลอก(Placebo)	-	-
3 สารมาตรฐานคีโตติเฟน-ฟูมาเรต	20.5	-
4 คีโตติเฟนในน้ำเชื่อมอายุ 1 ปี	20.5	100.4
5 คีโตติเฟนในน้ำเชื่อมอายุ 3 ปี	2.5, 2.8, 3.5, 4.0, 5.5, 6.0, 6.7, 8.9, 20.5	90.3



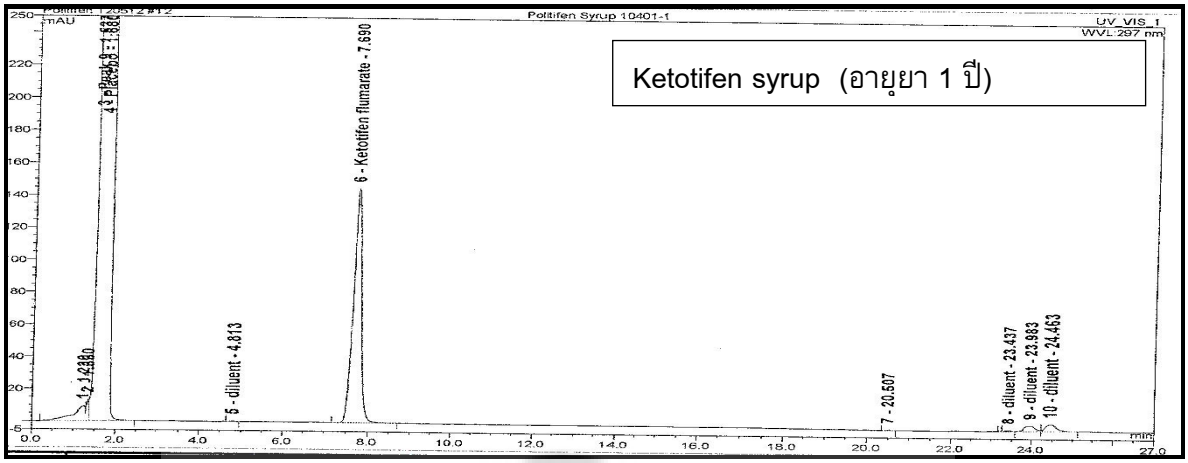
ภาพประกอบ 18 แสดง Chromatogram diluent



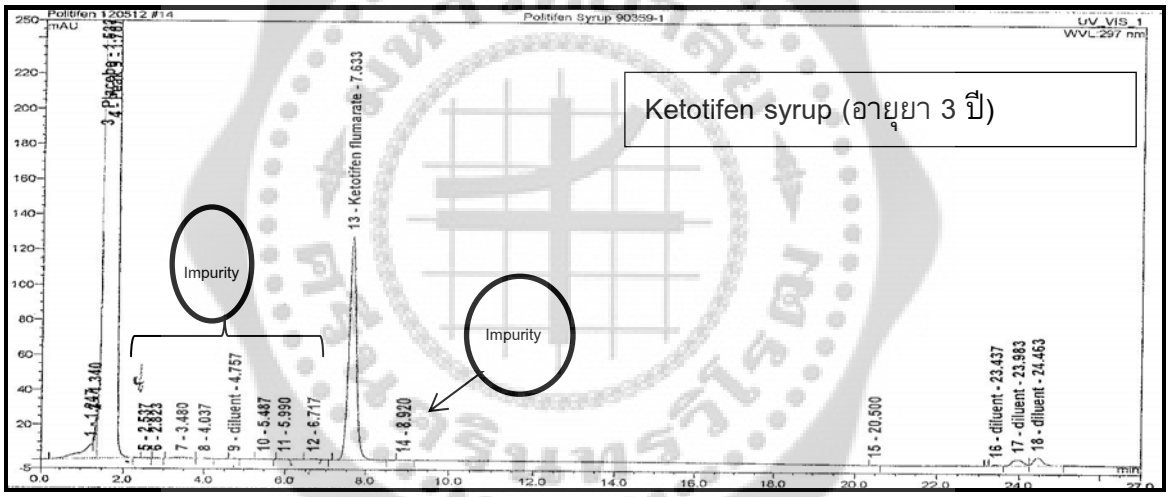
ภาพประกอบ 19 แสดง Chromatogram Placebo syrup



ภาพประกอบ 20 แสดง Chromatogram สารมาตรฐานคีโตติเฟน ฟูมาเรต



ภาพประกอบ 21 แสดง Chromatogramแสดงผลการวิเคราะห์คีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม อายุยา 1 ปี



ภาพประกอบ 22 แสดง Chromatogramแสดงผลการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่ออายุยา 3 ปี

จากการทดลองนำยาคีโตติเฟนที่ผลิตมีอายุหนึ่งปีมาวิเคราะห์ พบว่าไม่มีสารเสื่อมสลายเกิดขึ้นชัดเจน ปริมาณตัวยาคีโตติเฟน มีปริมาณ 100.4% LA (ภาพประกอบที่ 21) ส่วนที่อายุยานาน 3 ปี จะมีสารเสื่อมสลายเกิดขึ้นชัดเจน ดังที่มีพีคออกที่เวลา 2.5 นาที 3.5 นาที 4.0 นาที 5.5 นาที 6.0 นาที 6.7 และ 8.9 นาที (ภาพประกอบที่ 22) ปริมาณตัวยาคีโตติเฟนลดปริมาณลงเหลือ 90.3% LA ส่วนพีคอื่นๆจะมีพีคของน้ำเชื่อมเปล่าเป็นพีคใหญ่ออกที่เวลาประมาณ 1.8 นาที พีคของ diluent เป็นพีคเล็กๆออกที่เวลา 4.7 นาที 23.4 นาที 23.9 นาที 24.4 นาที ส่วนพีคที่เวลา 20.5 นาที มีทั้งในสารมาตรฐาน สารตัวอย่างยาอายุ 1 ปี และ 3 ปี อาจเป็นได้ว่าคือสารปนเปื้อนที่มีอยู่ในตัวยาคีโตติเฟน ฟูมาเรต เริ่มต้นอยู่แล้ว อย่างไรก็ตามสารต่างๆ ไม่ได้รบกวนการวิเคราะห์สารคีโตติเฟน

2. ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ [5]

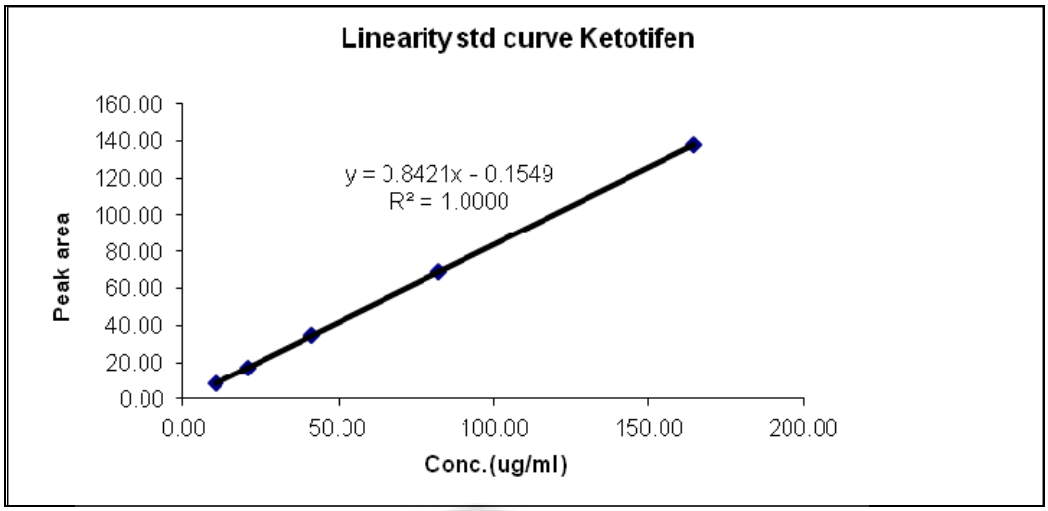
นำวิธีวิเคราะห์ดังข้างต้นที่สามารถแยกตัวยาคีโตติเฟนออกจากสารเสื่อมสลายได้มาทำการตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำและความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์ นำมาตรวจสอบตามหัวข้อดังนี้

2.1. ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารคีโตติเฟนกับค่าการตอบสนอง ในที่นี้คือพื้นที่ใต้พีค (peak area) จากการเตรียมสารมาตรฐานคีโตติเฟนให้มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 10.0-160.0 µg/ml (เตรียม 5 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ วัดตัวอย่างละ 2 ครั้ง) พบว่าค่าพื้นที่ใต้กราฟเป็นสัดส่วนแปรผันตรงกับความเข้มข้น ในแต่ละความเข้มข้นคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน อยู่ในช่วง 0.02-0.09 %RSD นำค่าความเข้มข้นและค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ ได้สมการ Y= 0.8421X-0.1549 และได้ค่า R^2=1.0000 ดังตารางที่ 7 และภาพประกอบที่ 23

ตาราง 7 แสดงผลความเข้มข้นของคีโตติเฟน และพื้นที่ใต้กราฟ

Concentration Ketotifen (µg/ml)	**Peak Area (Mean, mAU*min))**	**%RSD** (n = 3)
10.29	8.552	0.09
20.58	17.152	0.05
41.16	34.516	0.03
82.31	69.116	0.02
164.63	138.232	0.04



ภาพประกอบ 23 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นคีโตติเฟนกับพื้นที่ใต้กราฟ

2.2. ความถูกต้อง(Accuracy)

ผลความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 20-60 µg/ml เมื่อนำสารคีโตติเฟนเติมลงในน้ำเชื่อมเปล่าแล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณคีโตติเฟนที่เติมลงไป คำนวณหาค่าร้อยละการคืนย้อนกลับ (% recovery) ได้อยู่ระหว่าง 98.0 -100.4% ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ 97.0 -103.0% ค่าความแม่นยำมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 0.05 - 0.43% ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 2 ดังตารางที่ 8

ตาราง 8 แสดงผลค่าคืนย้อนกลับ (% recovery) ของสารคีโตติเฟนในน้ำเชื่อม

Concentration added (µg/ml)	**Concentration founded (µg/ml)**	**%Recovery**	**% RSD** (n=3)
20.70	20.89	100.4	0.12
29.57	29.75	99.7	0.05
35.49	35.67	100.0	0.20
44.36	44.55	98.0	0.43
59.15	59.33	99.7	0.38

2.3 ความแม่นยำ (Precision)

2.3.1 ทำการทดลองวิเคราะห์สารคีโตติเฟนที่ความเข้มข้น 20 – 80 µg/ml วิเคราะห์ซ้ำกัน 3 ความเข้มข้นๆละ 3 ซ้ำ ภายในวันเดียวกัน (Intraday - precision) มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.02-0.05 % และเมื่อวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวันเป็นเวลา 20 วัน (Interday-precision) พบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.11-0.53 % ผลแสดงดังตารางที่ 9 จากผลดังกล่าววิธีวิเคราะห์นี้มีความแม่นยำในการวิเคราะห์มากโดยพิจารณาจากค่า % RSD ไม่เกิน 1 [16]

ตาราง 9 ผลแสดงค่า Precision การวิเคราะห์ซ้ำของสารคีโตติเฟนความเข้มข้นต่างๆ

No	Concentration µg/ml Ketotifen	%RSD* Intraday-assay	%RSD* Interday-assay
1	20	0.05	0.18
2	40	0.03	0.53
3	80	0.02	0.11

*n=3

2.3.2 ผลการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม โดยนำยาน้ำเชื่อมที่ผลิตได้มาวิเคราะห์ซ้ำ โดยการเตรียมให้มีจำนวน 6 ตัวอย่าง และวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ครั้ง ตามวิธีวิเคราะห์นี้ พบว่ามี %RSD เท่ากับ 0.45 ตามตารางที่ 10

ตาราง 10 ผลแสดงค่า Precision การวิเคราะห์ซ้ำสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม

ตัวอย่างที่	1	2	3	4	5	6	Mean	%RSD
Assay ketotifen (%LA)	102.6	102.0	102.3	101.6	101.5	101.5	101.9	0.45

2.4 ขีดจำกัดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) และ ขีดจำกัดในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (LOD)

คำนวณค่า LOD และ LOQ จากการวัดค่าอัตราส่วน Signal to noise ratio (S/N) จากของสารละลายมาตรฐานคีโตติเฟนที่ความเข้มข้นต่ำ พบว่าปริมาณสารคีโตติเฟนที่ฉีดเข้าเครื่อง HPLC และทำให้มีค่า S/N เท่ากับ 3 คือ 0.25 µg และปริมาณสารคีโตติเฟนที่ทำให้มีค่า S/N เท่ากับ 10 คือ 1.0 µg

อย่างไรก็ตาม ตาม ICH Guideline [5] การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ในหัวข้อวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญ ไม่จำเป็นต้องหาปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ แต่นิยมหาค่าทั้งสองนี้ในการตรวจสอบความถูกต้องของสารปนเปื้อนหรือสารเสื่อมสลายมากกว่า

2.5 ความคงทนของวิธีวิเคราะห์ (Robustness)

ผลการทดลองเปรียบเทียบความคงทนของวิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ HPLC ที่ต่างเครื่องกัน ในเวลาที่แตกต่างกัน และคอลัมน์ต่างชนิดกัน วิเคราะห์สารคีโตติเฟนในช่วงความเข้มข้น 10-160 µg/ml นำค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์มาทดสอบทางด้านสถิติ (t-test) เปรียบเทียบกัน จากเครื่อง HPLC No.1 และ HPLC NO.2 ผลการทดลองของทั้งสองเครื่องมือ ให้ค่า significant เท่ากับ 0.945 ซึ่ง $\geq$ 0.05 แสดงว่าผลการตอบสนองที่ได้จากการใช้เครื่อง HPLC ทั้ง 2 เครื่องไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเชื่อมั่น 95 จึงกล่าวได้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่ใช้มีความคงทน ดังนั้นการปลี่ยนเครื่อง HPLC หรือเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์ วิธีนี้สามารถวิเคราะห์ผลได้ไม่แตกต่างกัน ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 11

ตาราง 11 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมืออุปกรณ์ต่างชนิดกัน

เครื่องมือ	HPLC No 1	HPLC No 2
Column	C18 Phenomenax	C18 Hypersil
	150*4.6mm Particle size 5µm	150*4.6mm Particle size 5µm
Linear equation	Y = 0.8962X - 0.3208	Y = 0.8421X - 0.1549
range	10 - 160 µg/ml	10 - 160 µg/ml
Slope	0.8962	0.8421
Intercept	0.3208	0.1549
R^2	1.0000	1.0000

2.6 ความเหมาะสมของระบบที่ใช้วิเคราะห์ (System suitability) [17]

ตามข้อกำหนดของการตรวจสอบวิธีวิเคราะห์หัวข้อที่สำคัญอีกหนึ่งข้อคือความเหมาะสมของระบบที่วิเคราะห์ ผลจากฉีดสารละลายมาตรฐานซ้ำๆกัน 5 ครั้งจากสารมาตรฐานตัวอย่างเดียวกัน เพื่อหาค่าความเหมาะสมของเครื่องมือและวิธีวิเคราะห์

ตาราง 12 ผลการทดสอบ หาความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

Sample NO	Name	RT (min)	Peak area (mAU*min)	K'	Asymmetry	Plates(N)
1	Ketotifen	7.6	32.354	14.23	1.07	7541
2	Ketotifen	7.6	31.890	14.25	1.08	7587
3	Ketotifen	7.6	32.498	14.23	1.08	7736
4	Ketotifen	7.6	32.556	14.25	1.07	7693
5	Ketotifen	7.6	32.520	14.25	1.08	7562
Average		7.6	32.382	14.24	1.08	7643
%RSD		0.07	0.73	0.08	0.37	0.94

จะเห็นว่าค่าต่างๆที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC มีค่าดังตารางที่ 12 เวลาที่สารคีโตติเฟน ถูกแยกออกมา (RT) ที่เวลา 7.6 นาที ซึ่งไม่นานเกินไปและดูจากค่าคงที่ของการแยก (k') เท่ากับ 14.24 มีความเหมาะสมแยกได้ดี ค่าความสมมาตร (Asymmetry หรือ Tailing factor) ของ พีคคีโตติเฟนเท่ากับ 1.08 ซึ่งมีค่าที่ดีเพราะค่าเข้าใกล้ 1 ค่าที่ยอมรับไม่ควรมากกว่า 2 รวมทั้งประสิทธิภาพการแยกของคอลัมน์ (Plates Number) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7643 โดยทั่วไปยอมรับที่ N มีค่ามากกว่า 2000 ค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำ (Peak area) มีค่า 0.73 % RSD ซึ่งไม่เกิน 1% แสดงให้เห็นว่าระบบเครื่องมีความเหมาะสมในการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมเป็นไปตามมาตรฐานการยอมรับ [19]

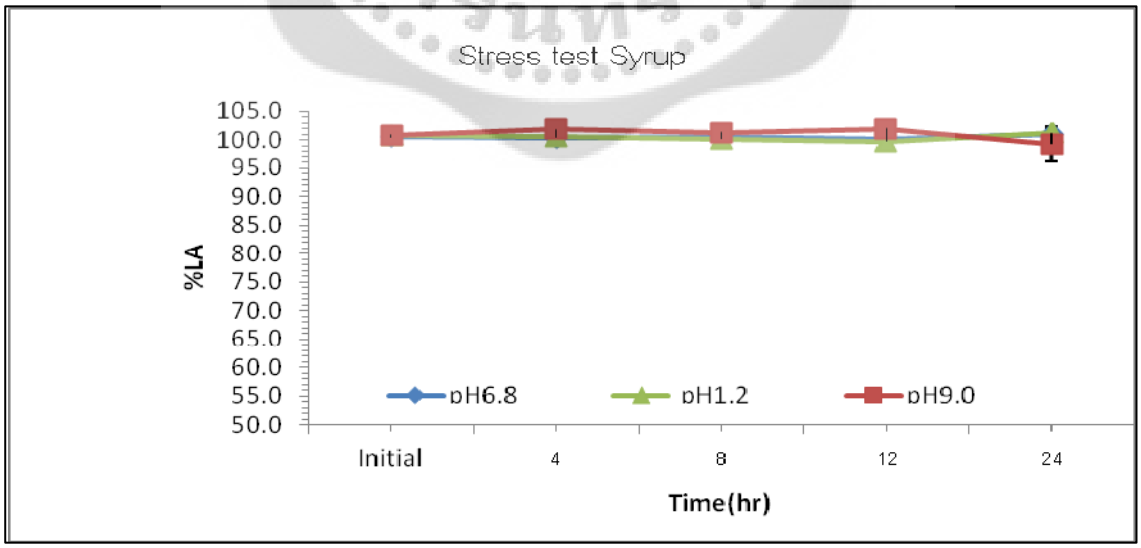
3. ผลการศึกษาการเสื่อมสลายของคีโตติเฟนในรูปแบบยาน้ำเชื่อมในสภาวะกดดันต่าง ๆ ในช่วงเวลาต่างกัน

ผลการทดลองนำยาคีโตติเฟนในน้ำเชื่อมมาทำการทดลองที่สภาวะกดดันโดยการเติม กรด-ด่าง (ในการทดลองนี้ใช้ pH Buffer 1.2, 6.8, 9.0 เป็นตัวแทนศึกษา) สภาวะความร้อนชื้น สภาวะแสงยูวีและสภาวะที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในเวลาที่แตกต่างกัน ผลปรากฏดังตารางที่ 13 ตารางที่ 14 และ ตารางที่ 15 แสดงผลการวิเคราะห์คีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่สภาวะกดดันต่าง ๆ

ตาราง 13 ผลการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่สภาวะกรด- ด่าง

ช่วงวิเคราะห์ (ชั่วโมง)	สภาวะการเร่งสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม					
	pH 1.2		pH 6.8		pH 9.0	
	%LA	SD*	%LA	SD*	%LA	SD*
เริ่มต้น	100.8	0.29	100.5	0.27	100.8	0.78
4	100.7	0.16	100.5	0.47	101.8	0.88
8	100.2	0.24	100.6	0.44	101.3	0.25
12	99.7	0.66	100.1	0.86	101.9	0.81
24	101.1	0.17	101.1	0.50	99.1	3.15

*n=3



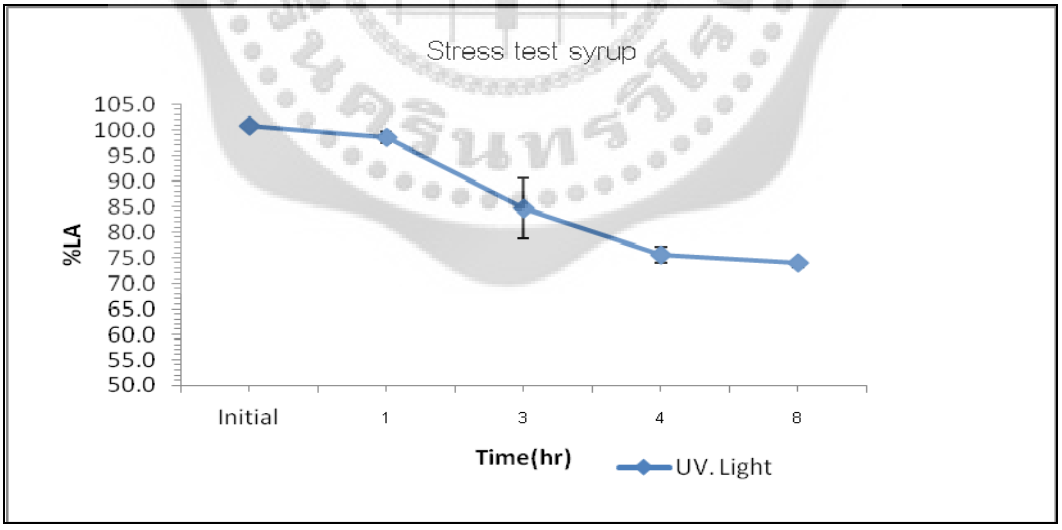
ภาพประกอบ 24 กราฟแสดงแนวโน้มความคงสภาพสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่สภาวะกดดันด้วยกรดด่างที่ pH 1.2, pH 6.8 และ pH 9.0

จะเห็นว่าคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมมีความคงทนต่อสภาวะกรดด่างที่ทดลองได้ดีในเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่ผ่านการกดดันกับปริมาณสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมในตอนเริ่มต้น ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ตาราง 14 ผลการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่สภาวะกดดันด้วยแสงยูวี

ช่วงวิเคราะห์ (ชั่วโมง)	**สภาวะการเร่งยาคีโตติเฟนในน้ำเชื่อม UV. Light**	
	%LA	**SD***
เริ่มต้น	100.8	0.17
1	98.5	1.04
3	84.7	5.93
4	75.5	1.55
8	73.9	0.78

*n=3



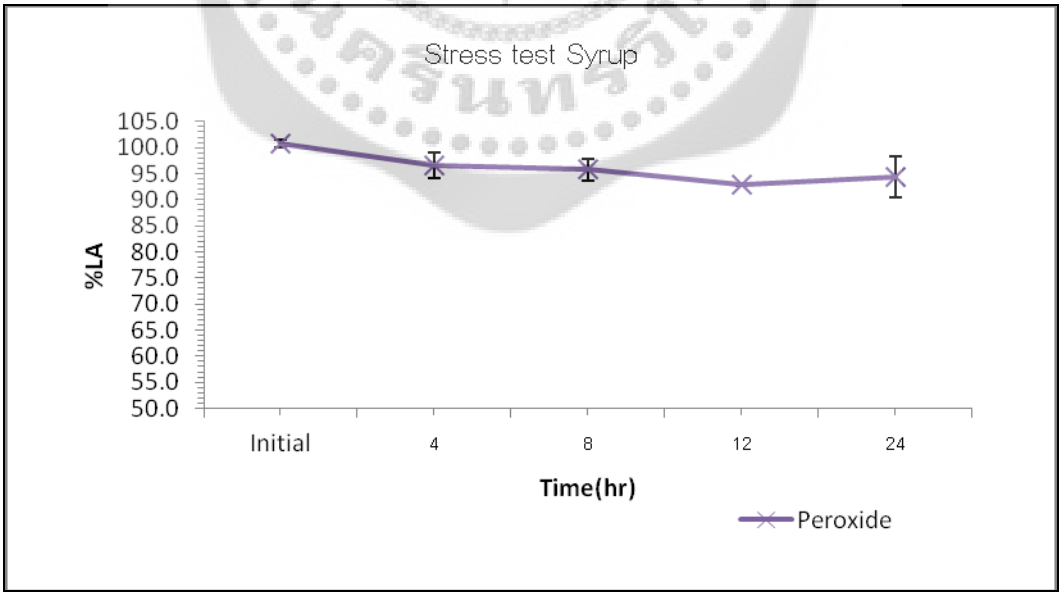
ภาพประกอบ 25 กราฟแสดงแนวโน้มความคงสภาพสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมสภาวะกดดันด้วยแสงยูวี

จากผลการทดลองจะพบว่ามีการเสื่อมสลายของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมจากแสง UV ได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 3 ชั่วโมง สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมลดปริมาณลงเหลือ 84.7 % LA และลดปริมาณลงเหลือ 75.5 % LA ในเวลา 4 ชั่วโมง และ 73.9 % LA ที่เวลา 8 ชั่วโมงตามลำดับ จากปริมาณยาเริ่มต้น 100.8 % LA ดังจะเห็นว่าเส้นกราฟมีแนวโน้มลดลงอย่างเห็นได้ชัด ถึงปริมาณสารคีโตติเฟนที่ลดลงอย่างรวดเร็ว

ตาราง 15 ผลการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในน้ำเชื่อมที่สภาวะกดดันด้วยสารออกซิเดชัน (30% H_2O_2)

ช่วงวิเคราะห์ (ชั่วโมง)	**สภาวะการเร่งสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม 30% H_2O_2**	
	%LA	**SD***
เริ่มต้น	100.8	0.78
4	96.5	2.49
8	95.8	2.17
12	93.0	0.28
24	94.7	3.86

*n=3



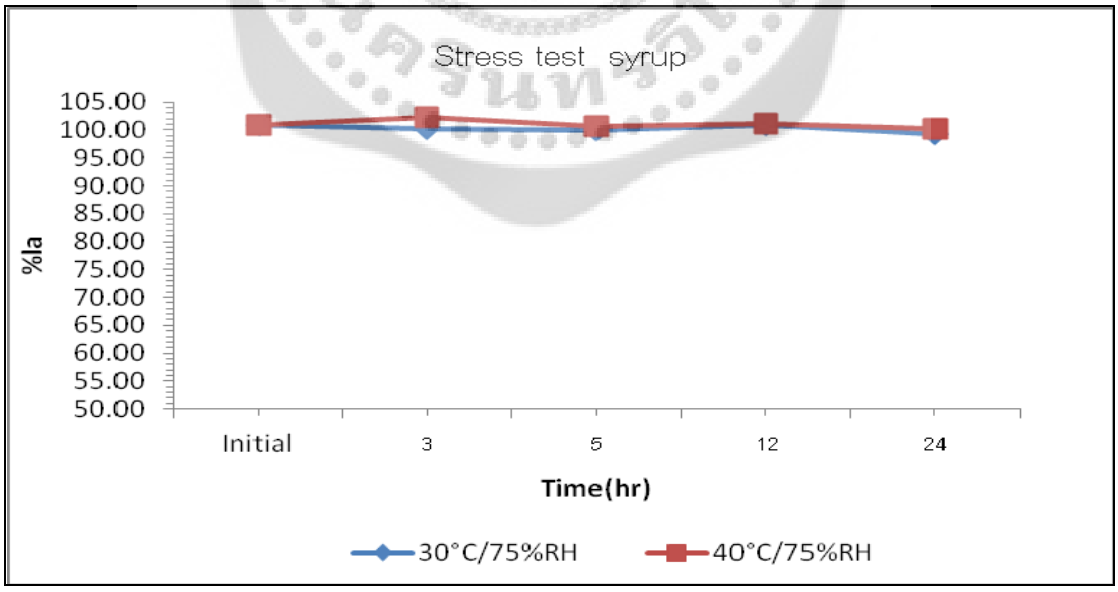
ภาพประกอบ 26 แสดงกราฟผลวิเคราะห์ยาคีโตติเฟนในน้ำเชื่อมที่สภาวะกดดันด้วย 30% Hydrogen peroxide

จากผลการทดลองกดดันคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมด้วย 30% Hydrogen peroxide เมื่อเวลาเปลี่ยนไป 24 ชั่วโมง ปริมาณสารคีโตติเฟนลดลงเหลือ 94.7% LA จากเริ่มต้น 100.8% LA นำมาเขียนกราฟจะเห็นว่าเมื่อ เวลาผ่านไปปริมาณสารคีโตติเฟนมีแนวโนมลดลงดังภาพประกอบ 26

ตาราง 16 ผลการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมเร่งการเสื่อมสลายด้วยสภาวะความร้อนและความชื้นที่ 30°C 75%RH และ 40°C 75%RH

ช่วงวิเคราะห์ (ชั่วโมง)	สภาวะการเร่งสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม 40°C 75%RH		สภาวะการเร่งสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม 30°C 75%RH	
	%LA	SD*	%LA	SD*
เริ่มต้น	100.8	0.29	100.8	0.27
4	102.4	0.16	100.2	0.47
8	100.6	0.24	99.9	0.44
12	101.0	0.66	100.9	0.86
24	100.1	0.17	99.3	0.50

*n=3



ภาพประกอบ 27 กราฟแสดงแนวโน้มความคงสภาพของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่เร่งด้วยสภาวะความร้อนและความชื้น 30°C 75%RH และ 40°C 75%RH

จากการทดลองหาแนวโน้มการเสื่อมสลายของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่เร่งด้วยสภาวะความร้อนและความชื้น 30°C 75%RH และ 40°C 75%RH พบว่าปริมาณสารคีโตติเฟน (%LA) ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาผ่านไป

สรุปได้ว่า จากการศึกษาแนวโน้มการเสื่อมสลายสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมด้วยสภาวะกดดันต่าง ๆ พบว่าการกดดันด้วยแสงยูวีจากแสงแดดทำให้ปริมาณสารคีโตติเฟนลดลงอย่างรวดเร็วอย่างเห็นได้ชัดภายใน 3 ชั่วโมงแรก ก็สามารถทำให้ยาตกมาตรฐานได้ ส่วนการกดดันด้วย 30% เปอร์ออกไซด์ ใช้เวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เกิดการเสื่อมสลายตัวของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมเหลือ 94.2% LA ส่วนสภาวะอื่นๆลดปริมาณสารลงเพียงเล็กน้อย

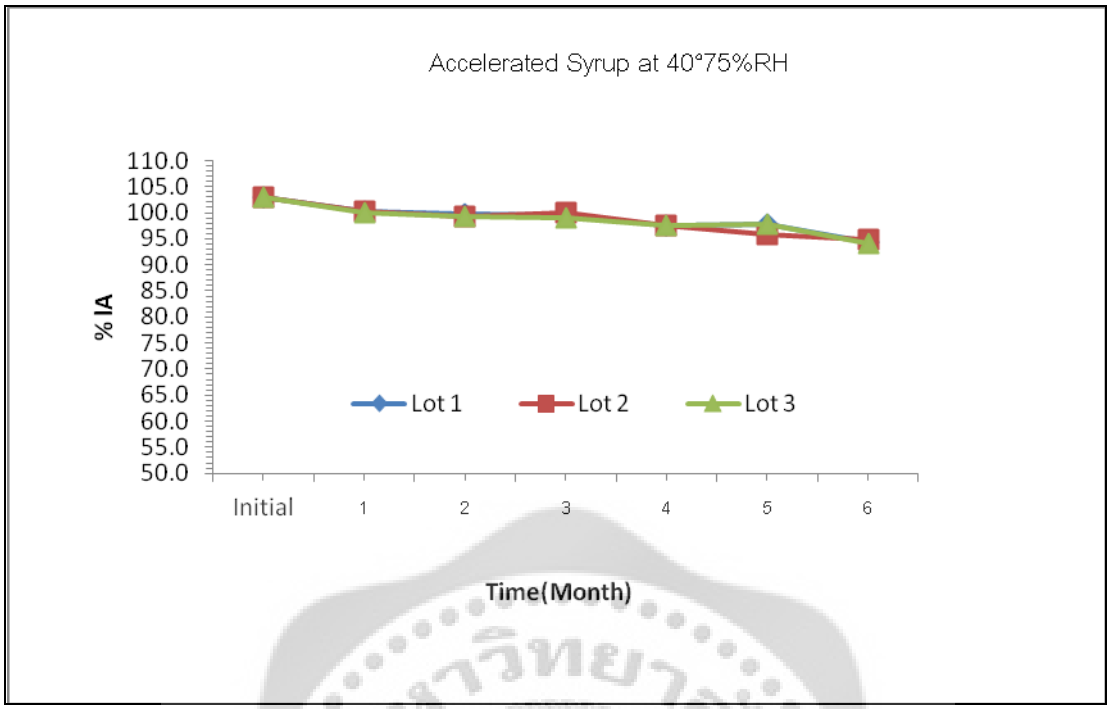
4. ผลการศึกษาความคงสภาพของสารคีโตติเฟนในน้ำเชื่อมเพื่อประเมินอายุยา

การศึกษาเพื่อประเมินอายุยาได้จากผลการวิเคราะห์คีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่เก็บศึกษาความคงสภาพในสภาวะปกติและสภาวะเร่ง ตามข้อกำหนดของ ICH guideline[16] เรื่องการศึกษาความคงสภาพต้องเก็บยาเพื่อศึกษาที่สภาวะปกติอุณหภูมิ 30°C 75% RH และสภาวะเร่ง อุณหภูมิ 40°C 75% RH

ในสภาวะเร่งได้ทำการเก็บยาน้ำเชื่อมมา 3 ตัวอย่างบรรจุในขวดแก้วสีชาเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิสภาวะเร่ง 40°C 75% RH ศึกษาเป็นเวลา 6 เดือน ผลการวิเคราะห์พบว่ายายังอยู่ในมาตรฐาน 90-110% LA ดังแสดงในตารางที่ 16 และภาพประกอบที่ 28 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณยาและเวลาจะเห็นว่าแนวโน้มของการลดลงของยาเมื่อเวลาผ่านไป

ตาราง 17 ผลการศึกษาความคงสภาพสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่สภาวะอุณหภูมิ 40°C 75% RH

	Ketotifen (%LA)						
ตัวอย่าง	เริ่มต้น	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4	เดือนที่ 5	เดือนที่6
1	103.0	100.2	99.7	99.6	97.7	97.7	94.3
2	103.0	100.3	99.2	100.1	97.5	95.7	94.8
3	103.0	99.9	99.3	99.0	97.6	97.7	94.2

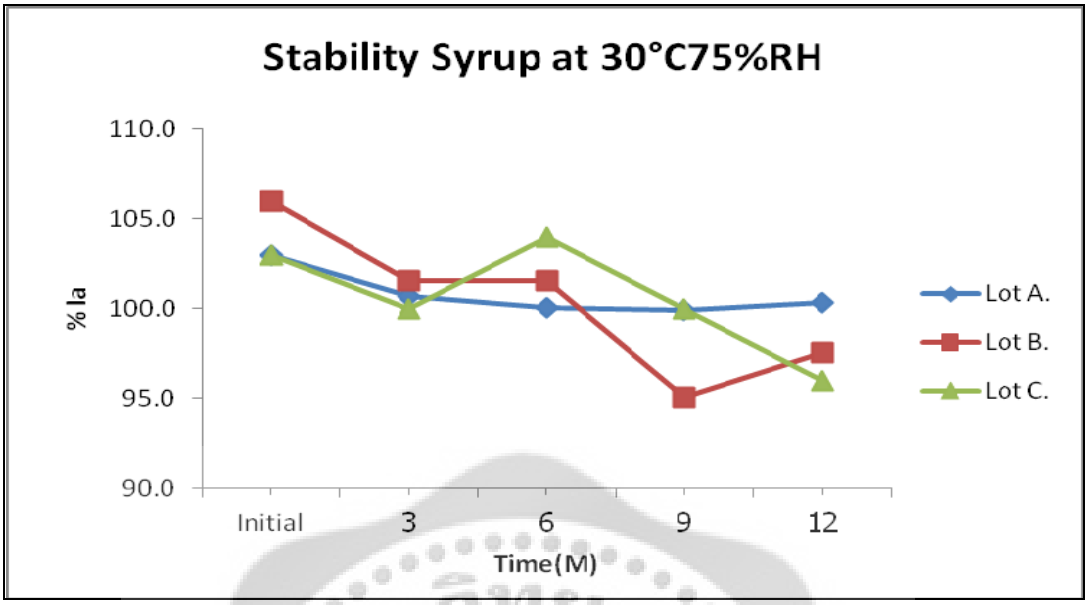


ภาพประกอบ 28 กราฟที่แสดงแนวโน้มปริมาณสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่เร่งด้วยความร้อนและความชื้น 40°C 75% RH

และในการศึกษาความคงตัวของยาที่เก็บในสภาวะปกติ 30°C 75%RH ใช้ตัวอย่างยาที่ผลิตต่างรุ่นผลิตจำนวน 3 ตัวอย่าง บรรจุในขวดแก้วสีชาเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 30°C 75 %RH ผลการทดลองพบว่ามีแนวโน้มลดลง แต่ลดลงน้อยกว่าเมื่อเทียบกับ 40°C 75% RH แต่อย่างไรก็ตามการลดลงยังอยู่ในมาตรฐาน 90-110% LA โดยทั้ง 3 ตัวอย่างมีอายุครบ 12 เดือน ดังตารางที่ 18 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณยาและเวลาจะเห็นว่าแนวโน้มของการลดลงของยาเมื่อเวลาผ่านไปดังแสดงในภาพประกอบ

ตาราง 18 แสดงผลการวิเคราะห์ สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม ที่เก็บศึกษาความคงสภาพที่สภาวะปกติ

			Ketotifen (% LA)		
ตัวอย่าง	**เริ่มต้น**	**3 เดือน**	**6 เดือน**	**9 เดือน**	**12 เดือน**
A.	103.0	100.7	100.1	99.9	100.3
B.	106.0	101.5	101.5	95.1	97.5
C.	103.0	100.0	104.0	100.0	96.0



ภาพประกอบ 29 กราฟแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคีโตติเฟนในน้ำเชื่อมที่เก็บศึกษาความคงสภาพที่สภาวะปกติ 30°C 75 % RH

จากการทดลองพบว่าที่สภาวะเร่ง 40°C 75% RH ตัวยาคีโตติเฟนในน้ำเชื่อมมีการเสื่อมสลายมากกว่าที่สภาวะปรกติ 30°C 75% RH โดยค่า % LA ของคีโตติเฟน ณ. อายุ 6 เดือนของสภาวะเร่งเท่ากับ 94% LA และสภาวะปรกติ มีค่าประมาณ 100% LA และในการหาปริมาณสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่เก็บศึกษาความคงสภาพที่สภาวะปกติ พบว่ายาที่เก็บไว้ครบ 12 เดือนทั้ง 3 รุ่นผลิต ทุกรุ่นผลิตยังคงมีปริมาณตัวยาคีโตติเฟนอยู่ในช่วง มาตรฐานการยอมรับ 90-110 %LA

5. การประเมินอายุยา

จากผลการทดลองในข้อ 4 นำผลการศึกษาความคงสภาพมาประเมินอายุยาได้ตามข้อกำหนดของ ICH Guideline Q1A(R2)[16] จากผลการนำยาตัวอย่างไปเร่งที่อุณหภูมิ 40°C 75%RH เป็นเวลา 6 เดือน และ ในสภาวะปกติ 30°C 75%RH ไปครบ 1 ปี อย่างน้อย 2 รุ่นผลิตยายังคงมีคุณสมบัติทางด้านเคมีอยู่ในช่วงที่กำหนดคือ 90-110% LA โดยการวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านเคมีของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมนี้สามารถกำหนดอายุยาได้เบื้องต้น 2 ปี และติดตามผลการศึกษาความคงสภาพในสภาวะปรกติต่อไปจนครบอายุ 2 ปี หรือศึกษาต่อไปในกรณีต้องการขยายอายุจนกว่ายาจะหมดความคงสภาพยา อย่างไรก็ตามการประเมินอายุยาน้ำเชื่อมต้องพิจารณาไปถึงรูปลักษณะ รส กลิ่น สี ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณเชื้อปนเปื้อน (Microbial limit) ซึ่งในที่นี้ผลการทดสอบอื่นๆผ่านมาตรฐาน(ไม่รายงาน) โดยในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นไปทางด้านการวิเคราะห์ทางเคมีหาปริมาณสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมด้วยเทคนิค HPLC

บทที่ 5
อภิปรายผล สรุป และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผล

การดำเนินการวิจัยนี้เกี่ยวกับการวิเคราะห์หาปริมารสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมและทำการศึกษาสภาวะการเสื่อมสลายของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่สภาวะกดดันต่างๆ เพื่อศึกษาความคงสภาพของยาที่ผลิต และสามารถนำผลการศึกษานี้ไปใช้ประเมินเพื่อกำหนดอายุยาได้ วิธีวิเคราะห์ที่ใช้จำเป็นต้องเป็นวิธีวิเคราะห์ที่สามารถระบุความคงสภาพได้ (Stability indicating method) และสามารถแยกสารอื่นออกจากตัวยาสำคัญ (คีโตติเฟน) ได้ชัดเจน

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมนี้ สามารถแยกสารเสื่อมสลายออกจากตัวยาสำคัญได้โดยใช้ เทคนิค HPLC แบบ gradient elution ใช้สารละลายเคลื่อนที่ชนิด A (0.035% (v/v) ไตรเอทิลเอมีนในน้ำบริสุทธ์ปราศจากไอออน) และสารละลายชนิด B (0.035% (v/v) ไตรเอทิลเอมีนในเมธานอล) คอลัมน์เป็น reversed phase Hypersil C18 ขนาดความยาว 250 mm กว้าง 4.6 mm ขนาดอนุภาคภายในคอลัมน์ 5 µm ตรวจวัดด้วยเครื่องวัดแสง UV ที่ความยาวคลื่น 297 nm โดยการฉีดตัวอย่างปริมาณ 20 µl เข้าเครื่อง HPLC วิธีนี้สามารถแยกสารได้อย่างจำเพาะเจาะจง ไม่มีสารอื่นรบกวนการวิเคราะห์ ไม่ว่าจะเป็น ตัวทำละลาย สารช่วยในน้ำเชื่อม และสารที่เกิดจากการเสื่อมสลายของตัวยาคีโตติเฟนในสภาวะกดดันต่าง ๆ

นำวิธีวิเคราะห์ที่จำเพาะเจาะจงกับสารคีโตติเฟนดังข้างต้นมาทำการตรวจสอบความถูกต้อง(Method validation) พบว่าเป็นวิธีมีความถูกต้องและความแม่นยำสูง โดยพิจารณาจากค่าความเป็นเส้นตรงของความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของสารคีโตติเฟนและค่าที่วัดได้จากเครื่อง HPLC สมการเส้นตรงที่ได้คือ Y= 0.8421X- 0.1549 ค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (R^2) คือ 1.0000 ที่ช่วงความเข้มข้นที่วิเคราะห์ 10-160 µg/ml ค่าความถูกต้องของการเคราะห์สารคีโตติเฟนเมื่อทำการเติมสารคีโตติเฟนลงไปในน้ำเชื่อมเปล่า ให้ค่าร้อยละการคืนย้อนกลับคือ 98.0-100.4% ที่ความเข้มข้นของคีโตติเฟน 20 - 60 µg/ml และให้ความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำทั้งในวันเดียว (Intraday precision) กันและในเวลาต่างวันกัน (Interday precision) โดยให้ร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.02-0.05% และ 0.18-0.53% ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ซ้ำจากตัวอย่างยาเดียวกันจำนวน 6 ซ้ำให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.45% ซึ่งไม่เกิน 2% นอกจากนี้วิธียังมีความคงทนเมื่อมีการเปลี่ยนเครื่องมือยังให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างกัน วิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC นี้มีประสิทธิภาพสูงสามารถตรวจวิเคราะห์สารคีโตติเฟนโดยมีขีดจำกัดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOD) (S/N=3) เท่ากับ 0.25 µg และ ขีดจำกัดในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (LOQ) (S/N=10) เท่ากับ1.0 µg ตามลำดับ

การศึกษาการเกิดการเสื่อมสลายของตัวยาสำคัญคีโตติเฟนและสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อม ด้วยการกดดันสารดังกล่าวในสภาวะที่ทำให้เกิดการเสื่อมสลายได้ จะพบว่าตัวยาคีโตติเฟนวัตถุดิบสามารถเกิดการเสื่อมสลายได้ง่ายกว่าเมื่อสารอยู่ในน้ำเชื่อม โดยที่มีปริมาณตัวยาคีโตติเฟนลดลงได้มากกว่าและเร็วกว่า อาจเนื่องจากในยาน้ำเชื่อมมีสารช่วยอื่นที่ทำให้คีโตติเฟนมีความคงตัว ที่สภาวะกรด ด่าง และน้ำ สารคีโตติเฟนสามารถเกิดปฏิกริยาไฮโดรไลซิสได้ แต่เป็นไปอย่างช้า ๆ ทำให้ปริมาณสารคีโตติเฟนลดลงเพียงเล็กน้อย ดังที่กล่าวมาในบทที่ 2 สารคีโตติเฟนมีสารเสื่อมสลายด้วยกันหลายชนิด ปฏิกิริยาที่สำคัญที่ทำให้เกิดการเสื่อมสลายได้ง่ายคือปฏิกิริยาออกซิเดชัน และปฏิกิริยากับแสง UV ส่วนสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมเกิดการเสื่อมสลายของตัวยาสำคัญได้ชัดเจนในสภาวะกดดันด้วยแสงยูวีได้มากที่สุด และเร็วที่สุด ตามมาเป็นการกดดันด้วยสภาวะที่มีสารออกซิเดชัน ส่วนสภาวะกรด-ด่าง และความร้อนความชื้นที่อุณหภูมิ 30°C 75% RH อุณหภูมิ 40°C 75% RH มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดจากที่มีสารตัวช่วยอื่นๆที่เป็นส่วนประกอบอยู่ในสูตรยา เช่น สารกันบูด บัพเฟอร์ ต้านการเกิดปฏิกิริยา ช่วยไม่ให้สัมผัสกับยาได้โดยตรงเหมือนสารคีโตติเฟนที่เป็นวัตถุดิบ สำหรับยาน้ำเชื่อมที่สภาวะอุณหภูมิสูง 105 °C จะทำให้ยาน้ำเชื่อมมีลักษณะสีที่เปลี่ยนไป เนื่องมาจากน้ำตาลที่ใช้ทำน้ำเชื่อมได้รับความร้อนสูงเกินไป ดังนั้นจึงไม่ควรเก็บยาน้ำเชื่อมไว้ในที่ๆมีอุณหภูมิสูงเกินที่กำหนดเพราะนอกจากจะทำให้ยาเสียสภาพแล้วยังเสี่ยงต่อการเกิดการเสื่อมสลายของยา ทำให้ยาหมดอายุเร็วกว่าที่กำหนดได้

ผลการศึกษาเพื่อประเมินอายุยาคีโตติเฟนในน้ำเชื่อมที่สภาวะเร่ง 40°C 75% RH และที่สภาวะปรกติ 30°C 75% RH ณ เวลาที่แตกต่างกัน พบว่ามีผลการทดลองที่ %LA มีค่าขึ้น-ลง ไม่สอดคล้องในทางเดียวกันในตารางที่ 17 และ 18 อาจเนื่องจากที่วิเคราะห์จากคนละขวดกันในแต่ละเดือน เนื่องจากในการทดลองนี้จะเก็บตัวอย่างยาที่ผลิตรุ่นเดียวกันจำนวน 6 ขวด และ 12 ขวด ตามจำนวนเดือนที่จะวิเคราะห์ การที่ตัวอย่างจากคนละภาชนะบรรจุนี้ทำให้ผลการวิเคราะห์ในแต่ละขวดอาจมีปริมาณตัวยาคีโตติเฟน หรือมีการเสื่อมสลายเกิดไม่เท่ากันได้ (จากตาราง ที่ 14 ผลการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมที่สภาวะกดดันด้วยแสงยูวี มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูงสุด 5.93% และจากตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์สารคีโตติเฟนในน้ำเชื่อมที่สภาวะกดดันด้วยสารออกซิเดชัน มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูงสุด 3.86%) หรืออาจเกิดจากการบรรจุยาคีโตติเฟนในบางขวดฝาไม่สนิทเท่าที่ควร ทำให้น้ำระเหย ยาน้ำเชื่อมมีความเข้มข้นมากขึ้นก็เป็นได้ การทดลองนี้สามารถประเมินอายุยาจากการสรุปผลการศึกษาความคงสภาพของยาในสภาวะเร่งเป็นเวลา 6 เดือนและสภาวะปรกติเป็นเวลา 12 เดือน พบว่ายามีปริมาณสารสำคัญคีโตติเฟนเหลือประมาณ 94% LA จากสภาวะเร่งและลดเหลือประมาณ 98% LA ที่สภาวะปรกติ ซึ่งอยู่ในช่วง 90-110% LA ดังนั้นสามารถกำหนดอายุยาได้เบื้องต้น 2 ปี และติดตามการศึกษาความคงสภาพของยาในสภาวะปรกติต่อไปจนกว่ายาจะครบอายุยาหรือศึกษาเพื่อขยายอายุยาต่อไปหรือศึกษาจนกว่ายาจะไม่มีคุณสมบัติตามมาตรฐานที่กำหนด คือคุณลักษณะทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีววิทยาเป็นต้น

พบว่าอุปสรรคของการวิจัยคือ สารคีโตติเฟนมีสารเสื่อมสลายหลายชนิด สารมาตรฐานของสารเสื่อมสลายมีขายในราคาที่แพง ในครั้งนี้จึงยังไม่มีการศึกษาสารเสื่อมสลายได้ทั้งหมด ศึกษาเพียงสารเสื่อมสลายคีโตติเฟนชนิด G เป็นตัวแทน เนื่องจากพบว่าสารเสื่อมสลายนี้มีค่าสัมประสิทธ์การเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ (Relative retention time: RRT) เมื่อเทียบกับสารคีโตติเฟนมีค่าใกล้เคียงกันมากคือ 0.9 ซึ่งพีคที่ออกมาอาจรบกวนการวิเคราะห์ได้ ซึ่งหมายถึงอาจทำให้ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ดีนัก จากผลการทดลองในสภาวะกดดันต่าง ๆ พบว่าการเสื่อมสลายของสารคีโตติเฟนส่วนใหญ่จะเกิดเป็นสารเสื่อมสลายคีโตติเฟนชนิดอื่นชัดเจนมากกว่าสารเสื่อมสลายชนิด G โดยเกิดในตำแหน่ง นาทีที่ 2.3 และ 2.5 (ภาพประกอบที่ 10 ,11 และ 12) ซึ่งมีขนาดของโครมาโตแกรมที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการเสื่อมสลายของตัวยาคีโตติเฟนที่เพิ่มขึ้น แต่ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยยังไม่มีการตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารเสื่อมสลายที่เกิดขึ้นที่ตำแหน่งนี้ งานวิจัยนี้มุ่งเน้นถึงวิธีที่เหมาะสมที่จะแยกสารออกจากกันมากกว่าการพิสูจน์เอกลักษณ์สาร

สรุป และข้อเสนอแนะ

วิธีการวิเคราะห์คีโตติเฟนด้วย HPLC ที่ใช้นี้มีความเหมาะสมสามารถใช้วิเคราะห์ได้ทั้งยาที่ผลิตขึ้นใหม่และยาที่เก็บศึกษาความคงสภาพได้ถูกต้องแม่นยำตามมาตรฐานการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ตาม ICH Guideline Q2 (R1) [13] โดยไม่มีการรบกวนจากของตัวทำละลาย สารช่วยที่ใช้ในการผลิต สารเสื่อมสลายอื่นๆ โดยเฉพาะสารเสื่อมสลายชนิด G อยู่ใกล้เคียงกันก็สามารถแยกได้ตามมาตรฐาน [16]

จากการศึกษาการเสื่อมสลายของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมในครั้งนี้ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตและควบคุมคุณภาพยาคีโตติเฟนในน้ำเชื่อมเพื่อจำหน่ายเริ่มตั้งแต่ขบวนการเก็บรักษาวัตถุดิบที่เป็นตัวยาสำคัญไม่ให้เกิดการเสื่อมสลายในขั้นตอนการผลิตยา ตั้งแต่ส่วนประกอบในสูตรตำรับของยา ขั้นตอนการผลิต การบรรจุ ภาชนะบรรจุ สภาวะการเก็บรักษา ที่จะสามารถป้องกันเกิดการเสื่อมสลาย จากแสง ความร้อนและความชื้นที่เหมาะสม จากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยสารต่างๆได้ ตลอดจนการใช้วิธีวิเคราะห์ที่ได้รับการตรวจสอบความถูกต้องวิเคราะห์และติดตามคุณภาพของยาตลอดอายุยา อีกทั้งใช้การงานวิจัยนี้เป็นแนวทางในการศึกษายาอื่นๆได้เช่นกัน

งานวิจัยในอนาคต

งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการศึกษาสภาวะการเสื่อมสลายของสารคีโตติเฟนในยาน้ำเชื่อมโดยใช้วิธีวิเคราะห์ที่สามารถแยกสารเสื่อมสลายได้ดีแล้ว ยังสามารถทำการวิจัยในอนาคตได้ถึงการเสื่อมสลายของคีโตติเฟนวัตถุดิบ ชนิดสารเสื่อมสลายใดเกิดขึ้นจากสภาวะต่าง ๆ และสามารถทำการวิจัยเพิ่มเติมในหัวข้อ วิเคราะห์หาปริมาณสารเสื่อมสลายเพื่อกำหนดปริมาณสารเสื่อมสลายในตำรับยาได้ต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

1. British Pharmacopoeia, Ketotifen fumarate. 2012; I&II: 1592. Retrieved 23 Nov 2011;form URL http://www.pharmacopoeia.co.uk/BP2013/ix bin/bp.cgi?a=print&id=7292&tab=a-z index.
2. Ketotifen. Drug bank. Retrieved Mar 2013; form URL http//www drugbank.ac.th
3. ทะเบียนตำรับยา ketotifen. form URL http//www.fdamoph.go.th/logistic/drgdrug/DSerch. asp Retrieved Jan 2013.
4. I.P. Nnane, L.A. Damani, A.J. Hutt, Development and validation stability indicating high performance liquid chromatography assay for Ketotifen in aqueous and silicon oil Formulations. Chromatographia;1998 48(11/12): 789-802.
5. ICH Harmonized Tripartite Guideline Validation of analytical Procedures Text and Methodology Q2 (R1): Step 5 November 2005.
6. จุฑารัตน์ พิมพ์ทนต์, บรรณาธิการ. เทคนิคการเตรียมเอกสารด้านคุณภาพเพื่อขึ้นทะเบียนตำรับยา. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพฯ: พีเอส พริ้นท์; 2554.
7. ASEAN guideline on stability of drug product (on line) update revistion 22 february 2005, 9th ACCSQ-PPWG meeting, Philippines 22-24 Feb, 2005.
8. Material safety data sheet ketotifen Fumarate. Santa cruz biotechnology,inc;USA. 2010:1-5
9. Safety data sheet ketotifen impurity G CRS. European Directorate for quality of Medicines & Healthcare. France; 2009:1-5
10. Naglaa El-Kousy. Lories I. Bewawy. Determination of some antihistaminic drugs by atomic absorption spectrometry and colorimetric methods. Journal and Phamaceutical Biomedical Analysis: 89; 671-679.
11. Feras Q Alali ,Bassam M Tashoush, Naji.M Najib. Determination of Ketotifen in human plasma by LC-MS, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2004; 34: 87-94.
12. Sayed M. Ghoreshi, Mohsen Behpour, Hamid A. Zahrani, Mahshid Golestaneh, Prepration and optimization of a ketotifen sensor and its pharmaceutical applications. Anal. Bioanal Electrochem. 2010; 2(3): 112-4.
13. Eman Y. Z.Frag, Gehad G.Mohamed, Mohamed M. Khalil, Mohammad M.A. Hwehy. Potentiometric determination of ketotifen fumarate in pharmaceutical preparation and urine useing carbon paste and PVC membrane selective electrode. International journal of analytical chemistry.2011 Jun 11;2011:1-7.

14. Selvadurai Muralidharan, Lim B. Han, John L. Yew Ming, Sailishni Kartigayam, Sokkalingam, Arumugam Dhanaraj, Simple and accurate estimate of Ketotifen fumarate by RP-HPLC. IJPCBS. 2012; 2: 392-6.
15. Kyung D. Num, Sung K. Tak, Ji S. Park, Min H. Cho, Sung V. Yim, Wang S. Shim, et al. Bioequivalence assessment of fumatifen® tablet to Zaditen® tablet (ketotifen fumarate 1 mg) by liquid chromatography tandem mass spectrometry, Journal of Pharmaceutical Investigation, (2012) 42:221-228.
16. ICH Harmonized Stability Testing of New Drug Substances and Products, Q1A (R2), Step 5 (2003)
17. Monika Bakshi, Saranjit Sin, Development of validated stability-indicating assay methods—critical review, Jounal Pharm Biomedical Analysis. 2002; 28:1011-40.
18. Peter Riddhiben M., Patel Piyushbhai M., Patel Natubhai M.. Stability indicating HPLC method development-A review, International Research Journal of pharmacy. 2011; 2(5): 79-87.
19. Hua YIN, Method validation basics-HPLC case study, World Health Organization,The prequalification program - assessor's training 19-20 Jan 2011.
20. The United States Pharmacopeia 34. (The National Formulary 27) Buffer solution 2011; 34 (1-2): 964-5.

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาว มณฑนา พิมพ์ทอง
วัน เดือน ปีเกิด	วันที่ 7 มิถุนายน พศ. 2511
สถานที่เกิด	อำเภอวังเหนือ จังหวัดลำปาง
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 747/184 หมู่บ้าน เดอะคอนเนค 8 ถนนบางนาตราด ตำบลบางพลี อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ 10540
ตำแหน่งหน้าที่ในปัจจุบัน	หัวหน้าส่วนวิเคราะห์ยาสำเร็จรูป
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	บริษัทโปลิฟาร์มจำกัด ตำบลบางพลีใหญ่ อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ 10540
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2530	มัธยมศึกษาปีที่ 6 จาก โรงเรียนสุรนารีวิทยา อำเภอเมือง จังหวัด นครราชสีมา
พ.ศ. 2535	ปริญญาวิทยาศาตร์บัณฑิต (เคมี) คณะวิทยาศาสตร์ จาก มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรุงเทพฯ
พ.ศ. 2557	ปริญญาวิทยาศาตรมหาบัณฑิต (วิทยาการเภสัชภัณฑ์) คณะเภสัชศาตร์ จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ