

การศึกษาความคงสภาพของยา isoniazid ในตำรับ
ยาเตรียมพิเศษเฉพาะราย

นางสาว ทินมณี ทินกร
นางสาว ธนิกา ปฐมวิชัยวัฒน์

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

พ.ศ.2549

STABILITY STUDY OF ISONIAZID IN
EXTEMPORANEOUS PREPARATION

MISS TINMANEE TINAKORN
MISS THANIKA PATHOMWICHAIWAT

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT
OF THE REQUIREMENT FOR
THE BACHELOR DEGREE OF SCIENCE IN PHARMACY
FACULTY OF PHARMACY
MAHIDOL UNIVERSITY

โครงการพิเศษ

เรื่อง การศึกษาความคงสภาพของยา isoniazid ในตำรับยาเตรียมพิเศษเฉพาะราย

.....

(นางสาวทินมณี ทินกร)

.....

(นางสาวธนิกา ปฐมวิชัยวัฒน์)

.....

(ผศ.ดร. กิตติศักดิ์ ศรีภา)

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(ภก.มานิตย์ เลิศชัยพร)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การศึกษาความคงสภาพของยา isoniazid ในตำรับยาเตรียมพิเศษเฉพาะราย

ทินมณี ทินกร, ธนิกา ปฐมวิชัยวัฒน์

อาจารย์ที่ปรึกษา: กิตติศักดิ์ ศรีภา*, มานิตย์ เลิศชัยพร**

*ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

**กลุ่มงานเภสัชกรรม สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหาราชนิ

คำสำคัญ: Isoniazid, Stability, HPLC

โครงการพิเศษนี้เป็นการศึกษาความคงสภาพของยา isoniazid ในตำรับยาเตรียมพิเศษเฉพาะรายของสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหาราชนิ โดยวิธี HPLC ใช้ Reverse phase column C_{18} (150 x 4.6 mm) (Hypersil) เป็นวัฏภาคคงที่และใช้ 0.04 M octane sulfonic acid pH 3 : acetonitrile อัตราส่วน 80:20 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 ml/min และตรวจวัดโดยใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 254 nm ค่า Retention time ของ peak ยา isoniazid เท่ากับ 2.0 นาที การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ พบว่า ค่า Linearity ระหว่างความเข้มข้นของยา isoniazid กับพื้นที่ใต้ peak เป็นเส้นตรง ในช่วงความเข้มข้น 2.5-25 mcg/ml ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9999 % Recovery อยู่ในช่วง 95.06-97.85 Precision ของเครื่องมือที่ใช้และของวิธีวิเคราะห์มี % RSD เท่ากับ 1.12, 1.36 ในการวิเคราะห์วันเดียวกัน (intra-day) และเท่ากับ 1.13, 0.56 ในการวิเคราะห์ต่างวันกัน (inter-day) จากนั้นศึกษาความคงสภาพของยาโดยเก็บตัวอย่างยาใน 4 สภาวะ คือ ที่อุณหภูมิห้อง ที่มีแสง ในตู้เย็น (4°C) และที่สภาวะเร่ง (45°C , 75 %RH) ทำการวิเคราะห์ปริมาณยาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ คือ ที่สัปดาห์ที่ 0, 1, 2 และ 4 ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ พบว่า peak ของสารที่เกิดจากการสลายตัว และ peak ของส่วนประกอบในตำรับ ไม่รบกวนวิธีวิเคราะห์ และตำรับยาเตรียมพิเศษเฉพาะรายนี้มีความคงสภาพเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 4 สัปดาห์ในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

Abstract

Stability study of isoniazid in extemporaneous preparation

Tinmanee Tinakorn, Thanika Pathomwichaiwat

Project advisor: Kittisak Sripha*, Manit Lertchaiporn**

*Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

** Pharmacy department, The Queen Sirikit National Institute of Child Health (QSNICH)

Keyword: Isoniazid, Stability, HPLC

The purpose of this special project was to study the stability of isoniazid in extemporaneous preparation by means of HPLC assay method. This dosage form was prepared by Pharmacy Department at The Queen Sirikit National Institute of Child Health (QSNICH).

A reverse phase column c_{18} (150 x 4.6 mm) (Hypersil) was used as a stationary phase. A mixture of 0.04 M octane sulfonic acid pH 3 and acetonitrile / 80:20 was used as a mobile phase with flow rate 1.0 ml/min. Detection was carried out by using a UV detector at 254 nm. Retention time of isoniazid peak revealed at 2.0 min. The linearity was obtained in the concentration range of 2.5 - 25 mcg/ml with a correlation coefficient (r^2) of 0.9999. The percentage recovery was in the range of 93.06 – 97.85. The precision of instrument and method, which were reported as % RSD, were 1.12, 1.36 for intra-day, and 1.13, 0.56 for inter-day. The stability study was carried out at different storage conditions such as at room temperature, at 4°C, under sunlight and under accelerate condition (45°C, 75%RH). The analysis of isoniazid was performed at week 0, 1st, 2nd and 4th, respectively.

The result showed that the decomposed products and excipients present in the dosage form did not interfere with the developed assay method. The extemporaneous preparation was stable within four weeks when stand in amber-colored glass bottles at room temperature.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จล่วงตามความมุ่งหมายได้ด้วยดีโดยได้รับความช่วยเหลือจากอาจารย์ที่ปรึกษา คือ ผศ.ดร.กิตติศักดิ์ ศรีภา ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ ภก. มานิตย์ เลิศชัยพร กลุ่มงานเภสัชกรรม สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหาราชนี ที่กรุณาให้คำแนะนำในการศึกษา ค้นคว้า ทำการทดลองและการแปลผลข้อมูลต่าง ๆ จนกระทั่งโครงการสำเร็จล่วง

นอกจากนี้ยังได้รับความช่วยเหลือจาก รศ.ดร.สาธิต พุฒิปิพัฒน์ขจร ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม และ ผศ.ดร.ดวงดาว ฉันทศาสตร์ ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณในการทดลอง รวมถึงเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และเจ้าหน้าที่กลุ่มงานเภสัชกรรม สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหาราชนีในการให้คำแนะนำและแก้ไขปัญหาในด้านต่าง ๆ รวมถึงอำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงาน

คณะผู้ดำเนินงานวิจัย ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีรายนามดังกล่าวไว้ ณ โอกาสนี้

นางสาว ทินมณี ทินกร

นางสาว ธนิกา ปฐมวิชัยวัฒน์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ช
บทนำ	1
ทบทวนวรรณกรรม	2
อุปกรณ์ในการดำเนินการ	7
วิธีดำเนินการทดลอง	9
ผลการทดลอง	16
วิจารณ์ผลการทดลอง	29
ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ	30
เอกสารอ้างอิง	31

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	First-line drugs ในการรักษาวัณโรคในเด็ก	4
2	ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยา isoniazid	16
3	ผลการวิเคราะห์สารสลายตัว (degradation products)	19
4	แสดงพื้นที่ใต้กราฟของ standard isoniazid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	22
5	ผลการวิเคราะห์หา %recovery ของการทดสอบความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์แบบ Standard addition method	23
6	ผลการทดสอบความแม่นยำของเครื่องมือในวันเดียวกัน (intra-day)	24
7	ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (intra-day)	24
8	ผลการทดสอบความแม่นยำของเครื่องมือที่ต่างวันกัน (inter-day)	25
9	ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ที่ต่างวันกัน (inter-day)	26
10	ตารางแสดงผลการศึกษาความคงสภาพของตำรับยาเตรียมพิเศษ isoniazid ในน้ำกระสายยาของสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหาราชนี	27

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	Chromatogram standard isoniazid 0.01 mg/ml mobile phase คือ 0.05 M octane sulfonic acid : acetonitrile ในอัตราส่วน 40:60, 50:50 และ 75:25	17
2	Chromatogram standard isoniazid 0.01 mg/ml mobile phase คือ 0.04 M (A) และ 0.05 M (B) octane sulfonic acid : acetonitrile ในอัตราส่วน 80:20	18
3	Chromatogram sample isoniazid 0.01 mg/ml mobile phase คือ 0.04 M octane sulfonic acid : acetonitrile ในอัตราส่วน 80:20	19
4	Chromatogram degraded product จากปฏิกิริยา Hydrolysis โดย 1 N hydrochloric acid, 0.1 N sodium hydroxide, 3% hydrogen peroxide และ 10% sodium bisulfite	20
5	Chromatogram paraben concentration	21
6	กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) และ ความเข้มข้นของ standard isoniazid	22
7	กราฟแสดงผลการศึกษาความคงสภาพของตำรับยาเตรียมพิเศษ isoniazid ในน้ำกระสายยาของสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหาราชนิ ที่สภาวะต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	28

สัญลักษณ์ และ คำย่อ

HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
mm	=	Millimeter
M	=	Molarity
ml	=	Milliliter
min	=	Minute
μg	=	Microgram
$^{\circ}\text{C}$	=	Degree celcius
%RH	=	percent Relative Humidity
pH	=	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
UV	=	รังสีอุลตราไวโอเล็ต
r^2	=	Correlation coefficient
nm	=	Nanometer
conc.	=	Concentration
AUC	=	Area Under the Curve
% RSD	=	percent Relative Standard Deviation
SD	=	Standard Deviation
\bar{X}	=	Mean

บทนำ

วัณโรคเป็นโรคหนึ่งที่เกิดปัญหาในสังคมไทยมาเป็นเวลานาน โรคนี้พบได้ทั้งในผู้ป่วยที่เป็นเด็กและผู้ใหญ่ การรักษาใช้หลักการรักษาแบบ Combination drug therapy โดยตัวยาหลักที่ใช้คือ isoniazid และต้องใช้เวลาในการรักษานาน ปัจจุบันในประเทศไทยมีการจำหน่ายยา isoniazid แต่เพียงในรูปแบบของยาเม็ด (solid-dosage form) เท่านั้น ทำให้เกิดปัญหาอย่างมากต่อการให้ยาในผู้ป่วยเด็กที่ติดเชื้อวัณโรคที่ต้องการยาในขนาดต่ำ ๆ หรือที่ไม่สามารถรับประทานยาเม็ดได้

ทางสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหาราชนิ เล็งเห็นถึงปัญหาดังกล่าว จึงคิดค้นน้ำกระสายยาเพื่อใช้ในการพัฒนาตำรับจากรูปแบบยาเม็ด (solid-dosage form) มาเป็นยาน้ำแขวนตะกอน (suspension-dosage form) โดยใช้วิธีการเตรียมยาแบบพิเศษเฉพาะราย (extemporaneous preparation) การเตรียมตำรับดังกล่าวทำได้เพียงการบดเม็ดยา isoniazid ใส่ในขวดไว้ก่อน และเมื่อต้องการใช้จึงนำไปกระจายตัวในน้ำกระสายยา และให้รับประทานตามขนาดและระยะเวลาที่กำหนด เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาความคงสภาพ (stability study) ของตำรับที่เตรียมขึ้น จึงทำให้ขาดข้อมูลในการพัฒนาน้ำกระสายยาที่ใช้ในสูตรตำรับ เพื่อให้ตัวยายังคงสภาพได้นานที่สุด ทำให้การรักษามีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาความคงสภาพครั้งนี้ อาจนำไปเป็นข้อมูลเพื่อพัฒนาสูตรตำรับยาน้ำใส (liquid-dosage form) ในรูปของยาน้ำพร้อมใช้ต่อไปในอนาคต ส่งผลให้ผู้ป่วยมีความสะดวกในการใช้ (compliance) เพิ่มขึ้น

คณะผู้ทำวิจัย ร่วมกับสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหาราชนิ เห็นถึงความสำคัญ ของปัญหาข้างต้น จึงมีความสนใจที่จะทดสอบความคงสภาพของตำรับยาเตรียมพิเศษเฉพาะ ราย isoniazid อันจะก่อให้เกิดประโยชน์ในการรักษาวัณโรคในผู้ป่วยเด็ก ในทุกโรงพยาบาลของประเทศไทย

ทบทวนวรรณกรรม

วัณโรคในเด็ก^[1,2]

วัณโรคเป็นโรคติดต่อเรื้อรัง เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* ทำให้มีการอักเสบในปอด โดยในเด็กอาจมีการอักเสบที่อวัยวะส่วนอื่นร่วมด้วย เช่น ต่อมน้ำเหลือง เยื่อหุ้มสมอง หรือกระดูก เป็นต้น

ระบาดวิทยา

เด็กมักจะได้รับเชื้อจากผู้ใหญ่ที่เป็นวัณโรคระยะแพร่เชื้อ โดยเชื้อจะออกมาจากการไอ จาม ทำให้เชื้อกระจายในอากาศ ในห้องที่ปิดบัง เชื้อวัณโรคอาจมีชีวิตอยู่ได้ถึง 1 สัปดาห์ ถ้าเสมหะที่มีเชื้อลงสู่พื้นที่ไม่มีแสงแดดส่อง เชื้ออาจอยู่ได้ในเสมหะแห้งได้นานถึง 6 เดือน เชื้อจะกระจายอยู่ในอากาศ และเข้าสู่ร่างกายทางการหายใจเอาเชื้อเข้าไป บางครั้งเชื้ออาจผ่านจากแม่ไปยังลูกในท้องโดยผ่านทางรกได้

ส่วนใหญ่โรคนี้จะเกิดกับเด็กที่มีฐานะยากจน อยู่ในชุมชนแออัด ผู้ที่ติดเชื้อแต่ไม่มีอาการ และตรวจไม่พบวัณโรคในปอดโดยการ X-rays จะทราบว่าติดเชื้อวัณโรคได้โดยการทดสอบทูเบอร์คิวลินจะให้ผลบวก ผู้ป่วยวัณโรคในผู้ใหญ่ส่วนใหญ่จะเคยติดเชื้อมาก่อนในระยะเด็ก ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้ผู้ติดเชื้อเกิดมีอาการของโรคได้แก่ การติดเชื้อในวัยทารกและในวัยหนุ่มสาว การสัมผัสกับผู้ติดเชื้อ (ได้รับเชื้อเพิ่มขึ้น) ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องโดยเฉพาะการติดเชื้อ HIV ผู้ติดยาเสพติด และโรคขาดอาหาร

อาการและอาการแสดง

ส่วนใหญ่ของเด็กที่ติดเชื้อ จะไม่มีอาการของโรคเมื่อทดสอบทูเบอร์คิวลินได้ผลบวก (ซึ่งเป็นการแสดงว่าเด็กติดเชื้อวัณโรค) การตรวจ X-rays ของปอดก็จะไม่พบผิดปกติในระยะแรก ถ้าเด็กมีสุขภาพและภาวะโภชนาการดี โรคจะยังไม่เกิดขึ้นทันทีเมื่อได้รับเชื้อ อาการที่จะพบได้เร็วที่สุดประมาณ 1-6 เดือนหลังติดเชื้อและพบได้บ่อย คือ มีต่อมน้ำเหลืองโตที่ขั้วปอด ที่คอ และที่อื่นๆ แล้วจึงพบความผิดปกติที่ปอดและอวัยวะอื่น ๆ

1. วัณโรคปอด

เด็กเกือบทั้งหมดที่เป็นวัณโรคจะเริ่มต้นเป็นจุดที่ปอดก่อน เด็กจะมีไข้ต่ำๆ เบื่ออาหาร น้ำหนักตัวลดลง บางคนมีอาการไอเรื้อรัง บางคนมีไอซ้อน ๆ กันคล้ายไอกรน เด็กโตบางคนอาจบ่นเจ็บหน้าอก และเหนื่อยหอบ ถ้าเป็นมากจะมีน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด

2. วัณโรคเยื่อหุ้มสมอง

ในเด็กโตจะเริ่มด้วยอาการเป็นไข้ 1-2 สัปดาห์ ปวดศีรษะ อาเจียน คอแข็ง ซึมมาก จนถึงไม่รู้สีกตัว บางรายอาจมีอาการชัก มีอัตราการเสียชีวิตสูงและมีความพิการเหลืออยู่ถ้าได้รับการรักษาช้า

3. วัณโรคของต่อมน้ำเหลือง

จะมีต่อมน้ำเหลืองบริเวณคอ รักแร้ ขาหนีบโต และบางรายจะโตมากจนมีแผลแตกออกมา มีหนองขึ้นไหลออกมา เป็นแผลเรื้อรัง อาจจะถูกกลามมีต่อมน้ำเหลืองโตติดๆ กันหลายเม็ด ถ้าไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านวัณโรคแต่เนิ่นๆ แผลจะไม่หาย

การวินิจฉัยโรค

ในผู้ที่มีอาการเหมือนกับอาการแสดงของผู้ป่วยวัณโรค การวินิจฉัยที่แน่นอนได้จากการเพาะแยกเชื้อ *M. tuberculosis* จากน้ำล้างกระเพาะ (gastric wash) ในตอนเช้า ทั้งนี้เพราะเด็กมักจะกลืนเสมหะที่มีเชื้อวัณโรคลงในกระเพาะเวลากลางคืน หรือจากเสมหะ จากน้ำในเยื่อหุ้มปอด น้ำไขสันหลัง (ในรายที่มีเยื่อหุ้มสมองอักเสบ) เนื่องจากเชื้อวัณโรคเจริญเติบโตช้า ดังนั้นการเพาะเชื้อต้องใช้เวลาจนถึง 10 สัปดาห์ ปัจจุบันมีวิธีที่อาจใช้เวลาเพียง 2-3 สัปดาห์ หรือสั้นกว่านี้ การทดสอบทูเบอร์คิวลิน เป็นวิธี skin test ที่ทำได้ง่ายที่สุดในการตรวจสถานะของการติดเชื้อวัณโรคในผู้ที่ไม่มีอาการ การทดสอบที่ให้ผลบวกแสดงว่ามีการติดเชื้อ *M. tuberculosis* โดยทั่วไปแล้วในเด็กส่วนใหญ่หลังจากได้รับเชื้อแล้ว 3-6 สัปดาห์ จึงจะให้ปฏิกิริยาทูเบอร์คิวลินเป็นบวก บางรายอาจนานถึง 3 เดือนได้ และผลบวกนี้จะคงอยู่ตลอดไป ถึงแม้จะได้ยารักษาวัณโรคแล้วก็ตาม

การรักษา

ปัจจุบันมียารักษาวัณโรคที่ได้ผลดีหลายชนิด การรักษาจะให้ยาพร้อมกันอย่างน้อย 3 ชนิด เพื่อลดอัตราการดื้อยา และเพิ่มประสิทธิภาพของยา ยาที่ใช้ได้แก่ Streptomycin, Pyrazinamide, Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol ดังตารางที่ 1 (หน้า 4) การรักษาจะได้ผลดีถ้ามารับการรักษาตั้งแต่ระยะเริ่มแรก และจะต้องกินยาอย่างสม่ำเสมอเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 6 เดือน และต้องดูแลให้พักผ่อนและให้อาหารที่มีโปรตีนสูงและมีวิตามิน เพื่อช่วยเพิ่มความต้านทานโรค

ตารางที่ 1 First-line drugs ในการรักษาวัณโรคในเด็ก^[3]

ชื่อยา	dosage (mg/kg/day)	หมายเหตุ
Isoniazid	10-20 in 2 divided dose Maximum dose 300 mg/day	ต้องมีการ monitor อาการเริ่มต้นของ hepatitis
Rifampicin	10-20 in divided dose every 12-24 hours	-
Pyrazinamide	20-40 in divided dose every 12-24 hours Maximum dose < 2 g/day	-
Ethambutol	15-25 once daily Maximum dose 2.5 g/day	ไม่แนะนำให้ใช้ในเด็กที่อายุต่ำกว่า 13 ปี และ monitor visual acuity
Streptomycin	Newborns : 10-20 once daily Infants : 20-30 in divided dose every 12 hours Children : 20-40 once daily Maximum dose 1 g/day	ใช้ในกรณีผู้ป่วยเกิดการดื้อต่อยา isoniazid และ rifampicin

ยา Isoniazid

เป็นยาหลักที่เลือกใช้ในการรักษาและป้องกันวัณโรคและการติดเชื้อพวก tubercle bacillus ที่เป็น sensitive strains ร่วมกับยาอื่น ๆ^[4]

คุณสมบัติทางเคมี^[5]

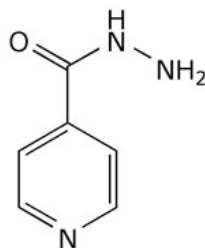
ชื่อสามัญ : Isoniazid, Isonicotinic acid hydrazide

ชื่อทางเคมี : Pyridine-4-carbohydrazide

สูตรโมเลกุล : C₆H₇N₃O

น้ำหนักโมเลกุล : 137.139

สูตรโครงสร้างทางเคมี :



คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา^[6]

กลไกการออกฤทธิ์

ยา isoniazid ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการสร้าง mycolic acid ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์ของเชื้อ *M. tuberculosis*

ขอบเขตการออกฤทธิ์

ยามีฤทธิ์เป็น bacteriostatic ต่อเชื้อ bacilli ที่มีการแบ่งตัวช้า และ ออกฤทธิ์ แบบ bactericidal ต่อเชื้อพวกที่มีการแบ่งตัวเร็วและยังมีฤทธิ์ต่อเชื้อ *M.kasasii* ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Atypical tuberculosis อีกด้วย

เภสัชจลนศาสตร์

ตัวยา isoniazid ถูกดูดซึมจากทางเดินอาหารอย่างรวดเร็ว เมื่อให้ยาในขนาด 300 mg โดยการรับประทาน จะพบระดับยาในเลือด 3-5 µg/ml ภายในเวลา 1-2 ชั่วโมงและยาสามารถกระจายได้ทั่วร่างกายโดยระดับยาในน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยที่มีภาวะเยื่อหุ้มสมองอักเสบจะเท่ากับระดับยาในกระแสเลือด

75-95% ของยาจะถูกขับออกทางปัสสาวะในรูปแบบ metabolites ซึ่งส่วนใหญ่ผ่านกระบวนการ enzymatic acetylation และ enzymatic hydrolysis

ข้อบ่งใช้

Isoniazid เป็นยาที่สำคัญในการรักษาวัณโรคทุกชนิดโดยใช้ร่วมกับยาอื่น หรือสามารถใช้เดี่ยว ๆ ได้ในการป้องกันวัณโรค

ผลข้างเคียง

Allergic reaction สามารถก่อให้เกิดไข้หรือผื่นแดงที่ผิวหนัง และมีรายงานการเกิด drug-induced systemic lupus erythematosus

Isoniazid-induced hepatitis

Peripheral neuropathy

Hematological reactions

Vasculitis associated with antinuclear antibodies อาการมักหายไปเมื่อหยุดยา

การใช้เครื่องมือ HPLC^[7]

Chromatography เป็นเทคนิคการแยกสารที่ประกอบด้วยตัวกลาง 2 ชนิด คือ ตัวกลางอยู่กับที่ เรียกว่า stationary phase และตัวกลางเคลื่อนที่ เรียกว่า mobile phase ซึ่งสามารถหาชนิด

และปริมาณขององค์ประกอบแต่ละตัวโดยการทำให้สารตัวอย่างเกิดการ partition บน stationary phase และ mobile phase ที่เป็นของเหลวจะชะสารตัวอย่างออกมา โดยการเกิด interaction กันระหว่างทั้ง 2 phase ทำให้สารที่มีลักษณะต่างกันถูกชะออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน ทำให้เกิดการแยกที่สมบูรณ์

HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยหลักการของ Chromatography ซึ่ง HPLC จะอาศัย pump ที่มีความดันสูงในการ pump mobile phase เข้าสู่ column ซึ่งเป็น stationary phase เพื่อแยกสารตัวอย่างออกมา เทคนิคนี้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง ทั้งงานวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ เช่น การวิเคราะห์ควบคุมคุณภาพและมาตรฐานยา การศึกษาทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ การวิเคราะห์ยาใน biological fluid การศึกษาความคงตัวของยา และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ การศึกษาระดับยาในร่างกายและการควบคุมการสังเคราะห์ยา เป็นต้น

การวิเคราะห์หาปริมาณของยา Isoniazid โดยวิธี HPLC ที่พบในปัจจุบัน

การศึกษาของ Khuhawar MY, Rind FM^[8] ใช้ column C-18 YMC-ODS เป็น stationary phase และมี methanol : water : isopropanol : acetonitrile : sodium acetate (1 mM) ในอัตราส่วน 51:42:3:2:2 เป็น mobile phase flow rate 1.7 ml/min ใช้ UV detector ที่ 333 nm สารที่วิเคราะห์ ได้แก่ isoniazid B.P., Rambuzid และ Myrene-p tablets

การศึกษาของ Khuhawar MY, Rind FMA และ Rajper AD^[9] ใช้ C-18 column ขนาด 150 mm x 4.6 mm เป็น stationary phase และมี water : methanol : tetrahydrofuran ในอัตราส่วน 59:39:2 เป็น mobile phase flow rate 2 ml/min ใช้ UV detector ที่ 238 nm สารที่วิเคราะห์ ได้แก่ isoniazid raw materials

จาก USP26^[10] กำหนดให้ใช้ column C-18 ขนาด 250 mm x 4.6 mm เป็น stationary phase และมี 4.4 g docusate sodium ใน 600 ml ethanol : 400 ml water เป็น mobile phase flow rate 1.5 ml/min ใช้ UV detector ที่ 254 nm สารที่วิเคราะห์ ได้แก่ isoniazid raw materials

อุปกรณ์ในการดำเนินการ

1. สารเคมี

สารเคมี	บริษัท	Lot or Batch No.
Acetonitrile HPLC grade	Lab-Scan analytical sciences	02 03 0032, 06 05 0219
Octane sulfonic acid sodium salt (10 g)	Fluka	1115203 13805061
Isoniazid standard	องค์การเภสัชกรรม	-
Isoniazid tablet (100 mg/tab)	องค์การเภสัชกรรม	T490258
Distilled water	-	-
น้ำกระสายยา	สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหाराชินี	-

2. อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัท	Specification
HPLC		
LC pump	Shimadzu	LC-10AD
Solvent mixer	Shimadzu	FCV-10AL
Degasser	Shimadzu	DGU-12A
Communicator	Shimadzu	CBM-10A
UV-VIS Detector	Shimadzu	SPD-10A
Column	Symmetry columns (waters)	3.9 x 150 mm Part No. WAT 046980 Serial No. T81871T
Ultrasonic bath	J.P. selecta	-
Analytical balance	Adam	AFA-210LC
Membrane filter 0.45 μ m		
ϕ 13 mm	Linda manufacturing	Mfg. No. M2944
ϕ 47 mm	Linda manufacturing	Lot. No. 0769500832 M321020

อุปกรณ์	บริษัท	Specification
ชุดกรอง	Sartorius	-
ขวดสีชา	-	-
Beaker	-	-
Volumetric flask	-	-
Erlenmayer flask	-	-
Syringe กรอง	-	-
Transferring pipette	-	ขนาด 1, 2, 3, 4, 5 ml

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเตรียม mobile phase (0.04 M octane sulfonic acid)
2. การเตรียม standard isoniazid solution ความเข้มข้น 1 mg/ml
3. การเตรียม standard isoniazid solution ความเข้มข้น 10 µg/ml
4. การเตรียม Sample isoniazid solution ความเข้มข้น 10 µg/ml ใน vehicle ของสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหาราชนี
5. การเตรียมสารที่ใช้ในการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity)
6. การเตรียมสารละลายตัวโดย stress condition^[11]
7. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ตำรับยาเตรียมพิเศษเฉพาะราย isoniazid
8. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)
9. การเตรียมตัวอย่างทดสอบ isoniazid ในน้ำกระสายยา^[12]
10. การวิเคราะห์ความคงสภาพของตำรับยาเตรียมพิเศษเฉพาะราย isoniazid

A. การเตรียมสารที่ใช้ในการดำเนินการทดลอง

- 1 การเตรียม mobile phase (0.04 M octane sulfonic acid)
 - 1.1 ชั่ง octane sulfonic acid 9.3716 g ใส่ใน volumetric flask ขนาด 1000 ml ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml
 - 1.2 ปรับให้มี pH = 3 โดยใช้ 2 N sulfuric acid
 - 1.3 กรอง mobile phase โดยใช้ membrane filter ขนาด 0.45 µm
- 2 การเตรียม standard isoniazid solution ความเข้มข้น 1 mg/ml
 - 2.1 ชั่ง standard isoniazid 50 mg ใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 ml
 - 2.2 ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการกรอง แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 50 ml
- 3 การเตรียม standard isoniazid solution ความเข้มข้น 10 µg/ml
 - 3.1 pipette 1 ml ของ standard isoniazid ความเข้มข้น 1 mg/ml (จากข้อ 2) ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 ml
 - 3.2 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกรอง
- 4 การเตรียม Sample isoniazid solution ความเข้มข้น 10 µg/ml ใน vehicle ของสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหาราชนี^[12]

4.1 บดเม็ดยา isoniazid (100 mg/tab) จำนวน 3 เม็ด ในโกร่งให้เป็นผงละเอียด

4.2 ค่อย ๆ เท vehicle ของสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหาราชนี ปริมาณ 30 ml (จะได้ตำรับยาเตรียมพิเศษเฉพาะราย isoniazid suspension ความเข้มข้น 10 mg/ml)

4.3 pipette สารที่เตรียมได้จากข้อ 4.2 มา 1 ml ใส่ใน volumetric flask ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 ml

4.4 pipette สารที่เตรียมได้จากข้อ 4.3 มา 1 ml ใส่ใน volumetric flask ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 10 ml

4.5 กรอง sample ที่เตรียมได้จากข้อ 4.4 โดยใช้ membrane ขนาด 0.45 μ m

5 การเตรียมสารที่ใช้ในการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity)

5.1 pipette 5 ml และ 1 ml ของ standard isoniazid ความเข้มข้น 1 mg/ml (จากข้อ 2 หน้า 9) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกรองให้ได้ 10 ml และ 100 ml ตามลำดับ จะได้ standard isoniazid 0.5 mg/ml และ 10 μ g/ml ตามลำดับ

5.2 pipette 1 ml ของ standard isoniazid ความเข้มข้น 0.5 mg/ml (จากข้อ 5.1) ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 และ 100 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกรอง จะได้ standard isoniazid 50 μ g/ml และ 5 μ g/ml ตามลำดับ

5.3 pipette 5 ml ของ standard isoniazid ความเข้มข้น 50 μ g/ml (จากข้อ 5.2) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกรองให้ได้ 10 ml จะได้ standard isoniazid 25 μ g/ml

5.4 pipette 3 ml และ 1 ml ของ standard isoniazid ความเข้มข้น 25 μ g/ml (จากข้อ 5.3) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกรองให้ได้ 10 ml จะได้ standard isoniazid 7.5 μ g/ml และ 2.5 μ g/ml ตามลำดับ

6. การเตรียมสารละลายตัวโดย stress condition^[11]

6.1 การเตรียมสารละลายตัวจากปฏิกิริยา Hydrolysis โดยกรด

ซึ่ง standard isoniazid ประมาณ 100 mg ละลายใน 1N Hydrochloric acid 50 ml นำไป reflux 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปรับให้เป็นกลางโดยเบส แล้ว pipette สารละลายที่ได้ 5 ml ใส่ volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองสารที่ได้ โดยใช้ membrane filter ขนาด 0.45 μ m

6.2 การเตรียมสารละลายตัวจากปฏิกิริยา Hydrolysis โดยเบส

ซึ่ง isoniazid standard ประมาณ 100 mg ละลายใน 0.1 N sodium hydroxide 50 ml นำไป reflux 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปรับให้เป็นกลางโดยกรด แล้ว pipette

สารละลายที่ได้ 5 ml ใส่ volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองสารที่ได้ โดยใช้ membrane filter ขนาด 0.45 μm

6.3 การเตรียมสารละลายตัวจากปฏิกิริยา Oxidation โดย 3% Hydrogen peroxide

ซึ่ง isoniazid standard ประมาณ 100 mg ละลายใน 3% Hydrogen peroxide 50 ml นำไป reflux 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้ว pipette สารละลายที่ได้ 5 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองสารที่ได้ โดยใช้ membrane filter ขนาด 0.45 μm

6.4 การเตรียมสารละลายตัวจากปฏิกิริยา Reduction โดย 10% Sodium bisulfite

ซึ่ง isoniazid standard ประมาณ 100 mg ละลายใน 10% Sodium bisulfite 50 ml นำไป reflux 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้ว pipette สารละลายที่ได้ 5 ml ใส่ volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองสารที่ได้ โดยใช้ membrane filter ขนาด 0.45 μm

B. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ตำรับยาเตรียมพิเศษเฉพาะราย isoniazid^[10]

ทำการทดลองเพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมของ mobile phase ที่มีส่วนประกอบของ 0.05 M octane sulfonic acid solution pH3 (aqueous phase) และ acetonitrile (organic phase) โดยมีอัตราส่วนที่ทำการทดลอง ดังนี้ 40:60, 50:50, 75:25, 80:20 และ mobile phase ที่มีส่วนประกอบของ 0.04 M octane sulfonic acid solution pH3 (aqueous phase) และ acetonitrile (organic phase) ในอัตราส่วน 80:20 โดยมีสภาวะที่ใช้ในการทดลอง คือ

Column	reverse phase column C ₁₈ , 5 μm particle size, 150 mm length, 4.6 mm internal diameter (Hypersil)
Flow rate	1.0 ml/min
UV detector wavelength	254 nm
Temperature	room temperature (25 °C)
Injection volume	20 μl

สภาวะการทดลองที่เหมาะสมคือ mobile phase ที่มีส่วนประกอบของ 0.04 M octane sulfonic acid solution pH3 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 80:20 (ดังผลการทดลองหน้า 16)

C. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

1. การทดสอบความเฉพาะเจาะจง (specificity)

การทดสอบความเฉพาะเจาะจง ทำได้โดยการเปรียบเทียบ chromatogram ของ standard isoniazid ใน extemporaneous preparation และสารสลายตัวที่ได้จากปฏิกิริยาต่างๆ กัน (ดังรายละเอียด หัวข้อ A ข้อ 6 การเตรียมสารสลายตัวโดย stress condition หน้า 10) เพื่อดูว่าวิธีวิเคราะห์ที่เลือกใช้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่ต้องการได้ และไม่มีการรบกวนจากสารอื่น ๆ ที่มีในตำรับ เช่น สารสลายตัว สารปนเปื้อน สารช่วยในตำรับ ฯลฯ รายละเอียดขั้นตอนการทดลอง มีดังนี้

1.1 นำ isoniazid standard solution 10 µg/ml, isoniazid ใน extemporaneous preparation และ สารสลายตัว (degradation products) ของ isoniazid ที่เตรียมได้จากหัวข้อ A ข้อ 3, 4 และ 6 ตามลำดับ มาวิเคราะห์ด้วย HPLC

1.2 เปรียบเทียบ chromatograms ที่ได้ เพื่อแสดงว่า peak ของสารสลายตัว สารปนเปื้อน และสารช่วยในตำรับ ไม่รบกวน peak ของ standard isoniazid

2. การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity)

การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง เป็นการทดสอบโดยการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ ระหว่างความเข้มข้นของ standard isoniazid เทียบกับพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ที่ได้จากการวิเคราะห์ standard isoniazid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง แสดงด้วยค่า correlation coefficient (r^2) ค่าที่ยอมรับได้ คือ ค่าที่ ≥ 0.9995 และพิจารณาค่าจุดตัดแกนตั้ง (y-intercept) ค่าความชันของกราฟ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) ด้วยรายละเอียดขั้นตอนการทดลอง มีดังนี้

2.1 นำ Standard isoniazid solution ความเข้มข้น 2.5, 5.0, 7.5, 10 และ 25 µg/ml ตามลำดับ (จากหัวข้อ A ข้อ 5 หน้า 10) มาวิเคราะห์ด้วย HPLC

2.2 plot กราฟ ระหว่างค่า AUC และ ความเข้มข้นของ standard isoniazid solution

2.3 คำนวณหาสมการเส้นตรงและค่า correlation coefficient (r^2) โดยมีเกณฑ์การยอมรับคือ $r^2 \geq 0.9995$

3. การทดสอบความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (accuracy test)

การทดสอบความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ ใช้วิธีทดสอบแบบ standard addition method โดยเติม standard isoniazid ที่รู้ความเข้มข้นแน่นอนอย่างน้อย 3 ความเข้มข้น ลงใน sample isoniazid แล้ววิเคราะห์หาค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของความเข้มข้นรวมของแต่ละตัวอย่าง

ตัวอย่างที่มีการเติมสาร standard isoniazid เรียกว่า spiked sample และตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสาร standard isoniazid เรียกว่า unspiked sample ค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์คำนวณในรูปของ %recovery โดยมีเกณฑ์ที่ยอมรับคือ 95-105% รายละเอียดขั้นตอนการทดลอง มีดังนี้

3.1 การเตรียม unspiked sample

pipette 5 ml ของ sample isoniazid ใน extemporaneous preparation (หัวข้อ A ข้อ 4 หน้า 9) ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกรอง

3.2 การเตรียม spiked sample

3.2.1 pipette 5 ml ของ sample isoniazid ใน extemporaneous preparation (หัวข้อ A ข้อ 4 หน้า 9) ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml จำนวน 3 flasks

3.2.2 pipette 1 ml และ 5 ml ของ standard isoniazid solution ความเข้มข้น 10 µg/ml (หัวข้อ A ข้อ 3 หน้า 9) ลงใน flask ที่ 1 และ 3 ตามลำดับ

3.2.3 pipette 1 ml ของ standard isoniazid solution ความเข้มข้น 25 µg/ml (หัวข้อ A ข้อ 5.3 หน้า 10) ลงใน flask ที่ 2

3.2.4 ปรับปริมาตรทุก flask ข้างต้นด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกรองแล้ว

3.3 นำสารที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 และ 3.2 มาวิเคราะห์ด้วย HPLC

3.4 คำนวณหาปริมาณ standard isoniazid ที่ตรวจพบ

3.5 คำนวณหา % recovery โดยมีเกณฑ์ที่ยอมรับคือ 95-105%

การคำนวณ % recovery คำนวณได้โดยสมการดังต่อไปนี้

$$\% \text{ recovery} = \frac{(\text{conc. ที่วิเคราะห์ได้ของ spiked} - \text{conc. ที่วิเคราะห์ได้ของ unspiked})}{\text{conc. standard isoniazid ที่เติม}} \times 100$$

4. การทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ (precision test)

การทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ เป็นการทดสอบว่าวิธีที่เลือกใช้และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ ให้ผลที่ใกล้เคียงกันในทุก ๆ ครั้งที่ทำ การทดลอง และผลที่ได้อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แสดงในรูปของ %RSD มีค่า ≤ 2.0

การทดสอบแบ่งเป็นการทดสอบในวันเดียวกัน (intra-day) เป็นการตรวจสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ด้วยนักวิเคราะห์คนเดียว เครื่องมือและสภาวะการวิเคราะห์เดียวกัน โดยวิเคราะห์ซ้ำในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกันหรือในวันเดียวกัน และการทดสอบต่างวันกัน (inter-day) เป็นการ

ทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ในเวลาที่ต่างกันออกไปทั้งหมด 3 วัน มีรายละเอียดขั้นตอนการทดลองดังนี้

4.1 การทดสอบความแม่นยำของเครื่องมือ

4.1.1 เตรียม standard isoniazid solution ความเข้มข้น 10 µg/ml จำนวน 1 ขวด (ดังวิธีในหัวข้อ A ข้อ 3 หน้า 9)

4.1.2 นำมาวิเคราะห์ HPLC โดยทำการฉีดครั้งละ 10 เข็ม

4.1.3 ทำการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (intra-day) โดยหาค่าเฉลี่ย %RSD ของค่า AUC ทั้ง 10 เข็ม

4.1.4 ทำการวิเคราะห์ที่ต่างวันกันทั้งหมด 3 วัน (inter-day) โดยหาค่าเฉลี่ย AUC ของทั้ง 10 เข็มที่วิเคราะห์ในวันเดียวกัน แล้วนำค่าเฉลี่ยที่ได้ของแต่ละวันมาหา %RSD โดยมีเกณฑ์การยอมรับ คือ $\%RSD \leq 2.0$

4.2 การทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

4.2.1 เตรียม sample isoniazid solution ความเข้มข้น 10 µg/ml จำนวน 3 ขวด (ดังวิธีในหัวข้อ A ข้อ 4 หน้า 9)

4.2.2 นำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยทำการฉีดขวดละ 3 เข็ม

4.2.3 ทำการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (intra-day) โดยหาค่าเฉลี่ย AUC ของแต่ละขวด แล้วนำค่าเฉลี่ย AUC ของแต่ละขวดที่คำนวณได้มาหา %RSD

4.2.4 ทำการวิเคราะห์ที่ต่างวันกันทั้งหมด 3 วัน (inter-day) โดยหาค่าเฉลี่ย AUC ของทั้ง 3 ขวดที่วิเคราะห์ในวันเดียวกัน (รวม 9 เข็ม) แล้วนำค่าเฉลี่ยที่ได้ ของแต่ละวันมาหา %RSD โดยมีเกณฑ์การยอมรับ คือ $\%RSD \leq 2.0$

การคำนวณ %RSD คำนวณได้โดยสมการต่อไปนี้

$$\%RSD = \frac{(SD \times 100)}{\bar{X}}$$

D. การศึกษาความคงสภาพของตำรับยาเตรียมพิเศษ isoniazid ในน้ำกระสายยาของสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหาราชนิ

1. การเตรียมตัวอย่างทดสอบ isoniazid ในน้ำกระสายยา^[12]

1.1 เตรียมตัวอย่างทดสอบตามขั้นตอนการเตรียม sample isoniazid solution (หัวข้อ A ข้อ 4.1-4.2 หน้า 10) จำนวนรวม 39 ตัวอย่าง จากนั้นเทใส่ขวดแก้วสีชาที่ปิดสนิท

1.2 นำตัวอย่างทดสอบ 3 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์หาปริมาณเริ่มต้น ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2

1.3 นำตัวอย่างทดสอบที่เหลือ (36 ตัวอย่าง) ไปเก็บไว้ที่สภาวะต่าง ๆ ดังนี้

อุณหภูมิห้อง		จำนวน	9	ขวด
สภาวะเร่ง (45°C, 75%RH)		จำนวน	9	ขวด
เก็บในตู้เย็น (4°C)		จำนวน	9	ขวด
เก็บในที่มืดแสง (ริมหน้าต่าง)		จำนวน	9	ขวด

1.4 เก็บตัวอย่างทดสอบในข้อ 1.5 มาวิเคราะห์ในอาทิตย์ที่ 1, 2, และ 4 ตามลำดับ โดยแต่ละอาทิตย์เก็บสภาวะละ 3 ขวด มาทำการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2

2. การวิเคราะห์ความคงสภาพของตำรับยาเตรียมพิเศษเฉพาะราย isoniazid

2.1 การเตรียมตัวอย่างทดสอบที่นำมาวิเคราะห์

เตรียมตัวอย่างที่ได้จากข้อ 1 ตามการเตรียม Sample isoniazid solution ความเข้มข้น 10 µg/ml (หัวข้อ A ข้อ 4.3-4.5 หน้า 10) จะได้ตัวอย่างทดสอบที่มีความเข้มข้นประมาณ 10 µg/ml

2.2 วิเคราะห์ความคงสภาพของยาด้วย HPLC โดย mobile phase คือ 0.04 M octane sulfonic acid : acetonitrile ในอัตราส่วน 80:20 ตามหัวข้อการพัฒนามาตรวิธีวิเคราะห์ความคงสภาพของตำรับยาเตรียมพิเศษ isoniazid^[10]

2.3 บันทึกและวิเคราะห์หาความคงสภาพของยา isoniazid

2.4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลอง

A. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ตำรับยาเตรียมพิเศษเฉพาะราย isoniazid

จากการทดลองหาสัดส่วนที่เหมาะสมของ mobile phase ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยา isoniazid

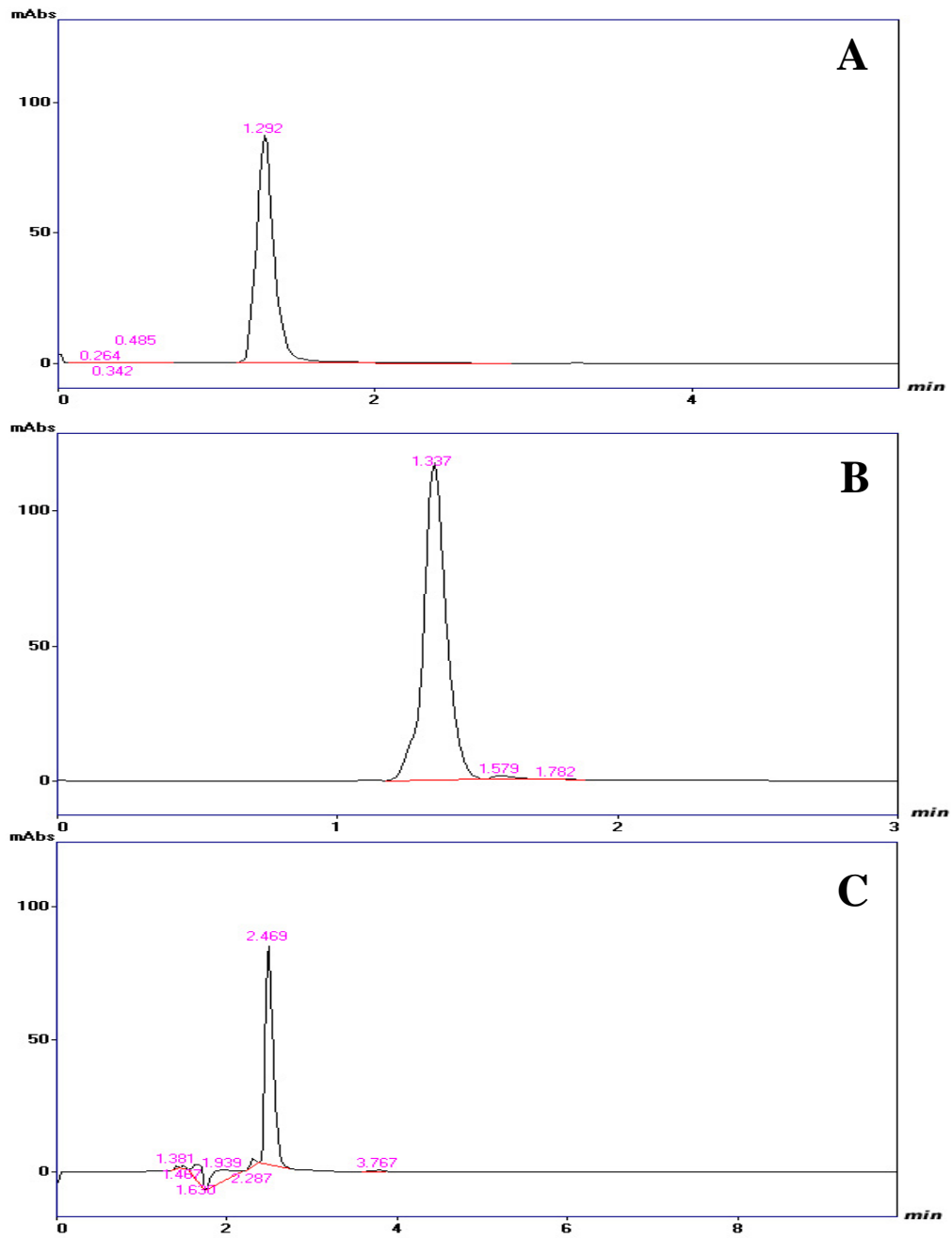
Mobile phase	ratio	retention time (min)	Tailing	resolution
0.05 M octane sulfonic acid : acetonitrile	40 : 60	1.292	1.24	2.71
	50 : 50	1.337	1.04	1.35
	75 : 25	2.469	1.53	1.21
	80 : 20	4.570	1.91	3.02
0.04 M octane sulfonic acid : acetonitrile	80 : 20	2.082	1.71	-*

* ไม่สามารถคำนวณค่า resolution ได้ เนื่องจากมี peak ของยาเพียง peak เดียว

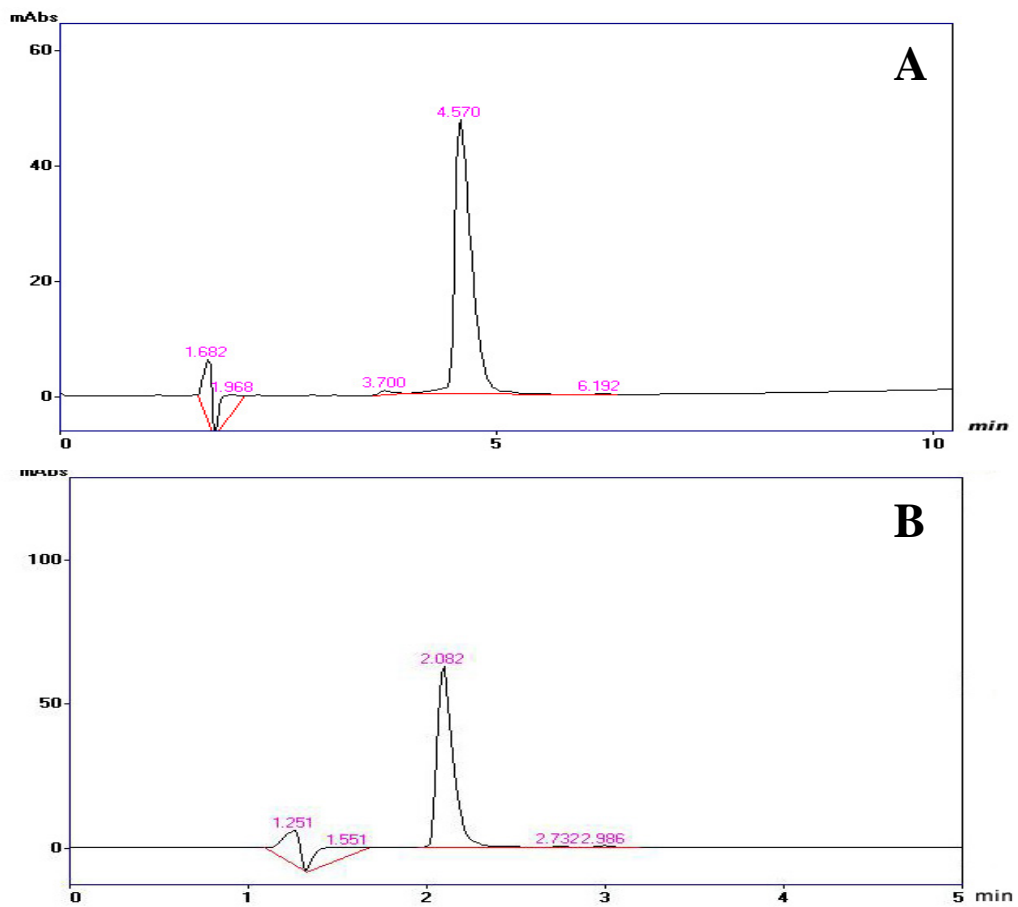
เมื่อวิเคราะห์ยา isoniazid โดยใช้ mobile phase คือ 0.05 M octane sulfonic acid : acetonitrile ในอัตราส่วน 40:60 และ 50:50 พบว่า peak ของยา isoniazid มี retention time เท่ากับ 1.292 และ 1.337 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 1A และ 1B) ซึ่ง peak ของยา isoniazid ที่ได้ ซ้อนทับกับ peak ของ solvent front ที่มี retention time เท่ากับ 1.2 – 1.5 นาที ดังนั้นอัตราส่วน ดังกล่าวจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ยา isoniazid

ทดลองปรับอัตราส่วนเป็น 75:25 และ 80:20 พบว่า ค่า retention time ของยา isoniazid มีค่าเท่ากับ 2.469 และ 4.570 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 1C และ 2A) ซึ่งป็นช่วงเวลาที่เหมาะกับการวิเคราะห์ยา isoniazid เมื่อพิจารณาค่า resolution ของอัตราส่วน 75:25 พบว่า มีค่าไม่เป็นไปตามเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ ต้องมีค่า resolution มากกว่า 2.0 ดังนั้นอัตราส่วน 75:25 จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ยา isoniazid

ทดลองเปลี่ยนความเข้มข้นของ octane sulfonic acid จาก 0.05 M เป็น 0.04 M และใช้อัตราส่วนของ octane sulfonic acid ต่อ acetonitrile เท่ากับ 80:20 พบว่า peak ของยา isoniazid มี retention time เท่ากับ 2.082 นาที (รูปที่ 2B)



รูปที่ 1 chromatogram standard isoniazid 0.01 mg/ml mobile phase คือ 0.05 M octane sulfonic acid : acetonitrile ในอัตราส่วน 40:60 (A), 50:50 (B) และ 75:25 (C)



รูปที่ 2 chromatogram standard isoniazid 0.01 mg/ml mobile phase คือ 0.04 M (A) และ 0.05 M (B) octane sulfonic acid : acetonitrile ในอัตราส่วน 80:20

จากผลการทดลองข้างต้น สภาวะที่เหมาะสมที่สามารถนำมาใช้วิเคราะห์ยา isoniazid ได้ คือ 0.05 M octane sulfonic acid และ acetonitrile ในอัตราส่วน 80:20 และ 0.04 M octane sulfonic acid และ acetonitrile ในอัตราส่วน 80:20 เนื่องจากให้ค่า retention time และให้คุณสมบัติของ peak ที่ยอมรับได้ (Tailing factor <2.0 และ Resolution >2.0) แต่เนื่องจาก octane sulfonic acid มีราคาสูง ดังนั้นจึงเลือกใช้ 0.04 M octane sulfonic acid และ acetonitrile ในอัตราส่วน 80:20 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมและเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการทดลอง

B. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

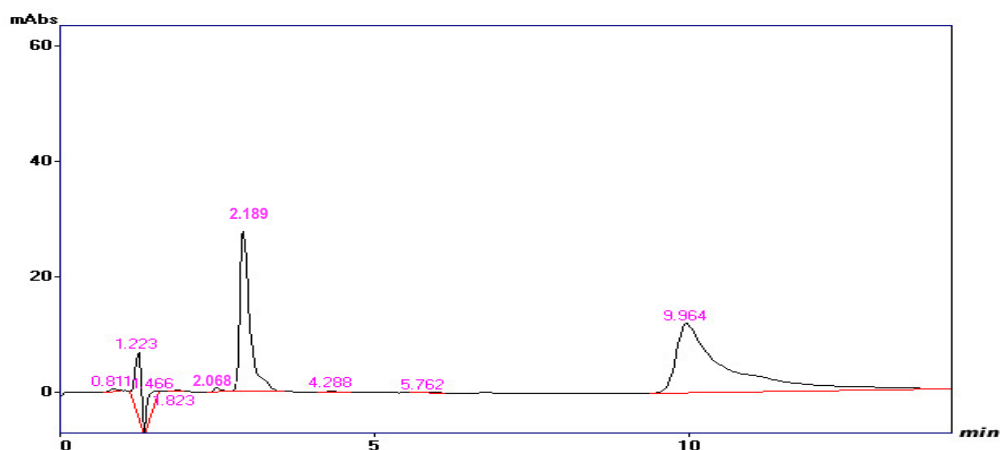
1. การทดสอบความเฉพาะเจาะจง (specificity)

สรุปค่า retention time ของ peak ของสารสลายตัวที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาด้วย reagents ชนิดต่าง ๆ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3

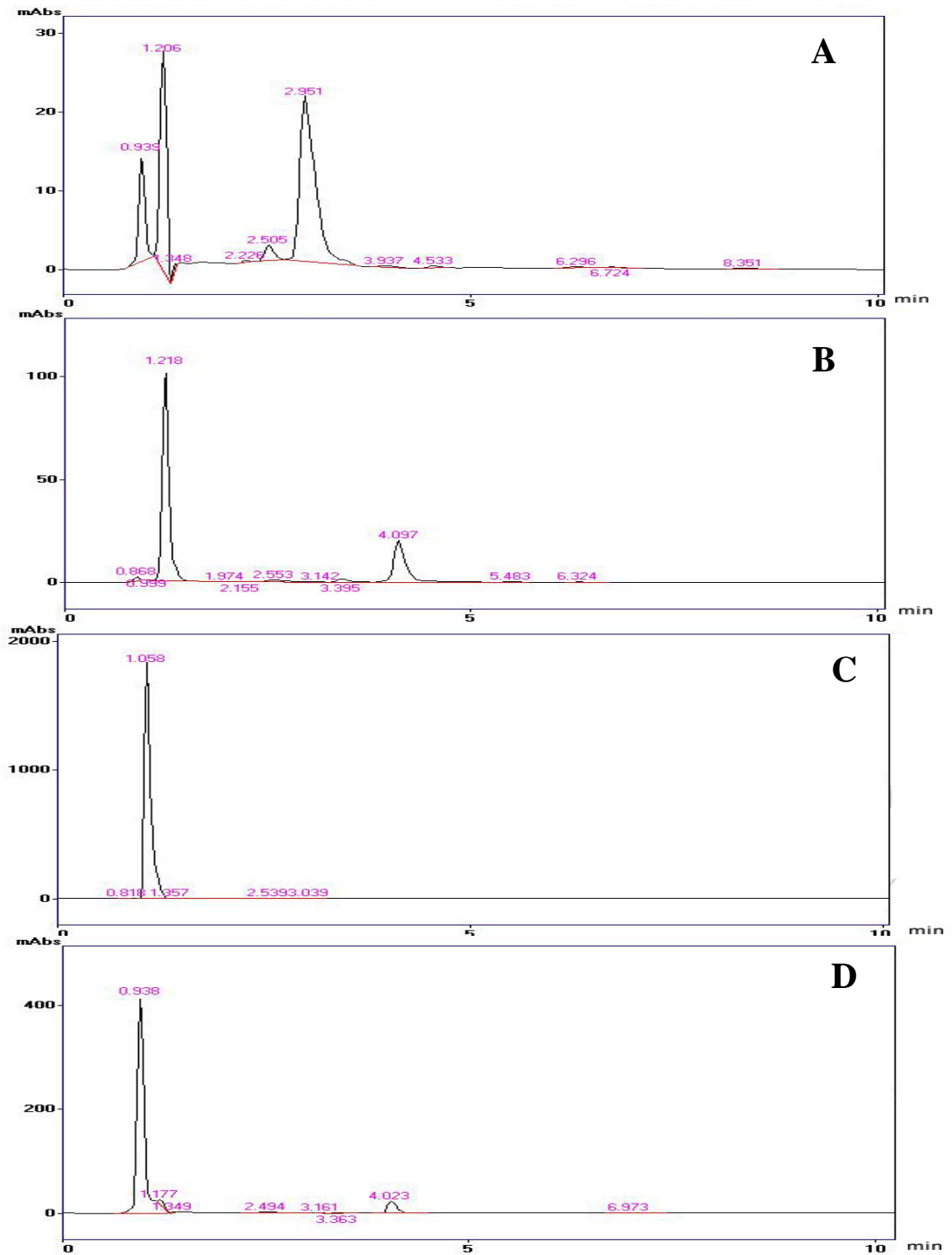
ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์สารสลายตัว (degradation products)

สภาวะที่ทดสอบ	จำนวน peak	Retention time
Hydrolysis โดย 1 N hydrochloric acid	4	0.939, 1.206, 2.505, 2.951
Hydrolysis โดย 0.1 N sodium hydroxide	3	1.218, 3.395, 4.097
Oxidation โดย 3% hydrogen peroxide	4	0.818, 1.058, 1.857, 2.539, 3.039
Reduction โดย 10% sodium bisulfite	5	0.938, 1.177, 2.494, 3.161, 4.023

จากผลการทดลอง พบว่า peak ที่ได้จากการวิเคราะห์ที่สภาวะต่าง ๆ ให้ค่า retention time ที่ไม่ซ้อนทับกับค่า retention time ของ peak ยา isoniazid (รูปที่ 3) ที่ 2.0 นาที แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณยา isoniazid ได้ (รูปที่ 4)

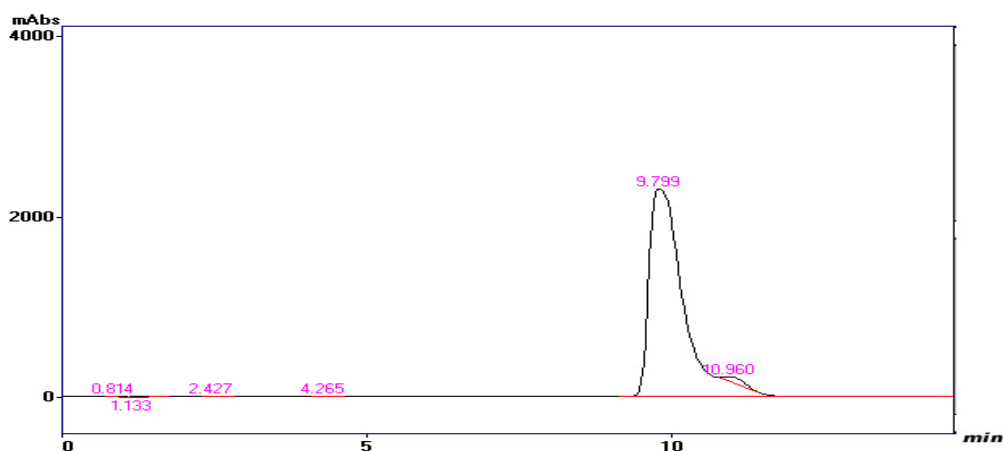


รูปที่ 3 chromatogram sample isoniazid 0.01 mg/ml mobile phase คือ 0.04 M octane sulfonic acid : acetonitrile ในอัตราส่วน 80:20



รูปที่ 4 Chromatogram degraded product จากปฏิกิริยา Hydrolysis โดย 1 N hydrochloric acid (A), 0.1 N sodium hydroxide (B), 3% hydrogen peroxide (C) และ 10% sodium bisulfite (D)

เมื่อวิเคราะห์ sample isoniazid ใน extemporaneous preparation (รูปที่ 3) พบว่า เกิด peak ที่เวลาประมาณ 9.9 นาที และเมื่อทดลองวิเคราะห์ paraben concentration ซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งในน้ำกระสายยาของสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหาราชนี พบว่า เกิด peak ของ paraben concentration ที่เวลาประมาณ 9.8 นาที (รูปที่ 5) แสดงว่า peak ซึ่งปรากฏอยู่ใน chromatogram ของ sample isoniazid ใน extemporaneous preparation คือ peak ของ paraben concentration



รูปที่ 5 chromatogram paraben concentration

2. การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity)

ทำการวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของ standard isoniazid ที่ความเข้มข้น 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 และ 25.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ได้ผลดังตารางที่ 4 จากนั้นนำผลที่ได้มาหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง ความเข้มข้นของ standard isoniazid และ AUC แล้วนำมา plot กราฟ จะได้กราฟเส้นตรงดังรูปที่ 6 พบว่า สมการเส้นตรงที่ได้คือ $y = (4 \times 10^7)x - 7074.7$ มีค่า r^2 เท่ากับ 0.9999 ผ่านเกณฑ์การยอมรับ คือ ค่า $r^2 \geq 0.9995$

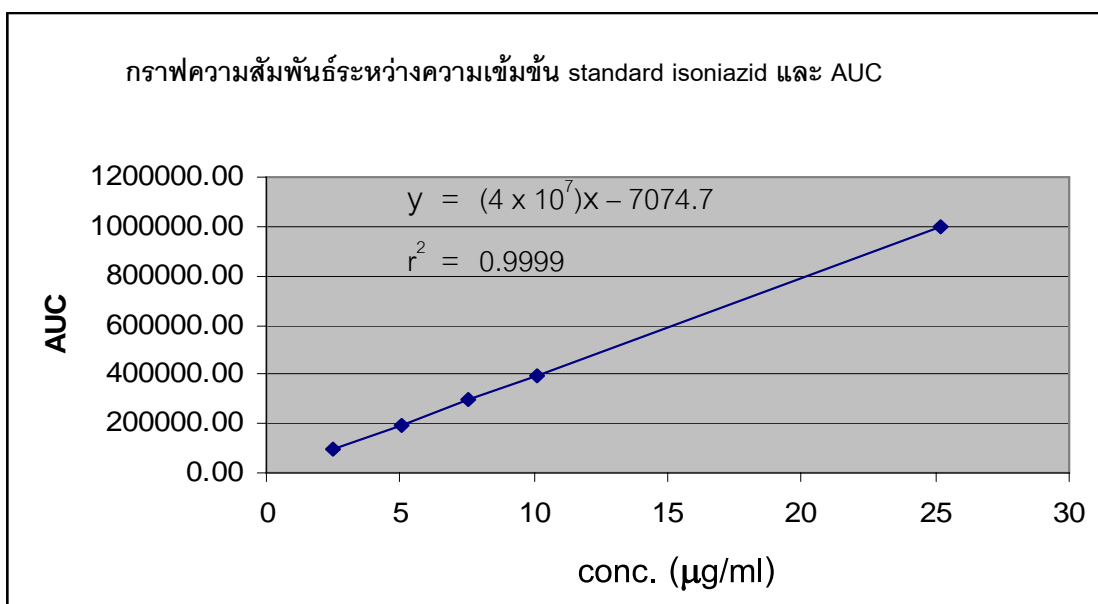
3. การทดสอบความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (accuracy test)

ทำการทดสอบความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 5 ซึ่งมี %recovery อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ คือ 95-105 %

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ที่เลือกใช้ มีความเที่ยงตรงในการวิเคราะห์ปริมาณยา isoniazid ในตำรับยาเตรียมนี้

ตารางที่ 4 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของ standard isoniazid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

conc. (µg/ml)	No. of injection	AUC	average AUC
2.52	1	96683	96837.67
	2	96844	
	3	96986	
5.04	1	191043	190587.00
	2	189875	
	3	190843	
7.56	1	299361	294325.33
	2	293255	
	3	290360	
10.08	1	393403	392702.67
	2	392222	
	3	392483	
25.20	1	982752	997308.00
	2	1003321	
	3	1005851	



รูปที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) และ ความเข้มข้นของ standard isoniazid

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์หา %recovery ของการทดสอบความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์แบบ standard addition method

	ความเข้มข้นของ std.INH ที่เติม (µg/ml)	AUC	average AUC	ความเข้มข้น ของ std.INH ที่ พบ (µg/ml)	%recovery
unspike	0	194306	193545.00		100.31
		193341			
		192988			
spike	1.0	234269	231570.67	0.9506	95.06
		233220			
		227223			
	2.5	284866	290709.67	2.4291	97.16
		285789			
		301474			
	5.0	394488	389239.00	4.8924	97.85
		387827			
		385402			

4. การทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ (precision test)

4.1 การทดสอบความแม่นยำของเครื่องมือ

ทดสอบความแม่นยำของเครื่องมือ โดยวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (intra-day) และ ต่างวันกัน (inter-day) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 6 และ 8 ตามลำดับ โดยมีเกณฑ์การยอมรับ คือ $\%RSD \leq 2.0$

จากผลการทดลอง พบว่า $\%RSD$ จากการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (intra-day) มีค่าเท่ากับ 1.12 และต่างวันกัน (inter-day) มีค่าเท่ากับ 1.13 แสดงว่า เครื่องมือที่ใช้มีความแม่นยำในการวิเคราะห์ปริมาณยา isoniazid

4.2 การทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยทดสอบในวันเดียวกัน (intra-day) และ ต่างวันกัน (inter-day) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 7 และ 9 ตามลำดับ โดยมีเกณฑ์การยอมรับ คือ $\%RSD \leq 2.0$

จากผลการทดลอง พบว่า %RSD จากการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (intra-day) มีค่าเท่ากับ 1.36 และต่างวันกัน (inter-day) มีค่าเท่ากับ 0.56 แสดงว่า วิธีวิเคราะห์ที่ใช้มีความแม่นยำในการวิเคราะห์ปริมาณยา isoniazid

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความแม่นยำของเครื่องมือในวันเดียวกัน (intra-day)

conc.of std.INH (µg/ml)	No. of injection	AUC	%RSD
10	1	396683	1.12
	2	396130	
	3	398308	
	4	396226	
	5	409954	
	6	393869	
	7	395988	
	8	396683	
	9	396130	
	10	398308	

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (intra-day)

No. of sample	conc. of sample (µg/ml)	AUC	Average AUC	%RSD
1	10	393479	393170.7	1.36
		391445		
		394588		
2	10	385471	382983	
		381401		
		382077		
3	10	390357	390625	
		389633		
		391885		

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบความแม่นยำของเครื่องมือที่ต่างวันกัน (inter-day)

Day	conc. of std. INH ($\mu\text{g/ml}$)	AUC	average AUC	%RSD
1	10	396683	397827.90	1.13
		396130		
		398308		
		396226		
		409954		
		393869		
		395988		
		396683		
		396130		
		398308		
2	10	390939	389543.6	
		386583		
		387637		
		391257		
		391034		
		388128		
		389670		
		390290		
		388752		
		391146		
3	10	388038	390984.4	
		387751		
		394648		
		394727		
		394396		
		394200		
		388013		
		391157		
		387462		
		389452		

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ที่ต่างวันกัน (inter-day)

Day	No. of sample	AUC	average AUC	%RSD
1	1	383567	391611.78	0.56
		383841		
		383042		
	2	391804		
		395007		
		395144		
	3	396596		
		399445		
		396060		
2	1	384125	387300.11	0.56
		378585		
		378933		
	2	389474		
		400391		
		394141		
	3	378078		
		399306		
		382668		
3	1	393479	388926.22	0.56
		391445		
		394588		
	2	385471		
		381401		
		382077		
	3	390357		
		389633		
		391885		

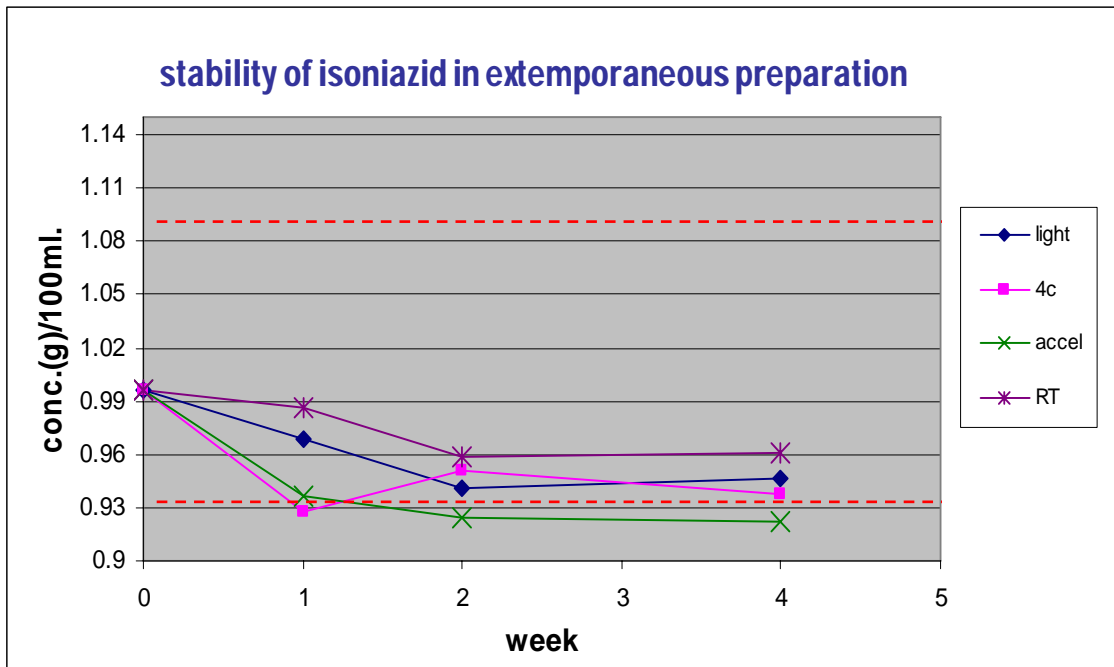
C. ผลการศึกษาความคงสภาพของตำรับยาเตรียมพิเศษ isoniazid ในน้ำกระสายยาของสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหาราชนี

เมื่อทำการวิเคราะห์ตำรับยาเตรียมพิเศษเฉพาะรายที่เก็บไว้ 4 สัปดาห์ ใน 4 สภาวะ คือ ที่อุณหภูมิห้อง สภาวะเร่ง (45°C , 75 %RH) ในตู้เย็น (4 °C) และในที่มืดแสง ได้ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 10 เมื่อนำไปสร้างกราฟ จะได้ดังรูปที่ 7

ตารางที่ 10 ตารางแสดงผลการศึกษาความคงสภาพของตำรับยาเตรียมพิเศษ isoniazid ในน้ำกระสายยาของสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหาราชนี

week	Grams per 100 ml			
	sunlight	4°C	RT	accelerate
0	0.9967	0.9967	0.9967	0.9967
1	0.9689	0.9281	0.9863	0.9363
2	0.9407	0.9505	0.9586	0.9244
4	0.9470	0.9372	0.9612	0.9220

จากกราฟ พบว่า ยา isoniazid ที่วิเคราะห์ได้ในทุกสภาวะมีปริมาณลดลงจากเมื่อเริ่มต้น (สัปดาห์ที่ 0) เมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ตำรับยาเตรียมที่เก็บไว้ในทุก ๆ สภาวะ (ยกเว้นสภาวะเร่ง) ยังอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานตามที่กำหนด คือ มีปริมาณยา isoniazid อยู่ในช่วง 0.39-1.10 g/100 ml ^[10] ส่วนตำรับยาเตรียมที่เก็บในสภาวะเร่งมีปริมาณยาที่วิเคราะห์ได้ต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2



รูปที่ 7 กราฟแสดงผลการศึกษาความคงสภาพของตำรับยาเตรียมพิเศษ isoniazid ในน้ำกระสายยาของสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหาราชนี ที่สภาวะต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากรูปที่ 2 ผลการศึกษาความคงสภาพของตำรับยาเตรียมพิเศษ isoniazid ในน้ำกระสายยาของสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหาราชนี จะเห็นว่าเมื่อเก็บตัวอย่างทดสอบไว้ในตู้เย็น (4 °c) ที่สัปดาห์ที่ 1 ปริมาณยา isoniazid ที่วิเคราะห์ได้ลดต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน แต่เมื่อวิเคราะห์อีกครั้งในสัปดาห์ที่ 3 ปริมาณยา isoniazid ที่วิเคราะห์ได้กลับมีปริมาณเพิ่มขึ้นและมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด (0.93-1.10 g/100ml) อาจเนื่องมาจากตัวอย่างทดสอบที่เตรียมขึ้นทั้ง 3 ตัวอย่าง (สำหรับการวิเคราะห์ในสัปดาห์ที่ 1) มีปริมาณยา isoniazid ที่วิเคราะห์ได้แตกต่างกัน และมี 1 ตัวอย่างที่มีปริมาณยา isoniazid ที่วิเคราะห์ได้ต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดมาก (ในขณะที่อีก 2 ตัวอย่างที่เหลือน้ำผ่านเกณฑ์ที่กำหนด) ซึ่งอาจเกิดจากเม็ดยาที่นำมาใช้เตรียมตัวอย่างทดสอบ มีปริมาณยา isoniazid แตกต่างกัน เมื่อนำปริมาณยาที่วิเคราะห์ได้ของทั้ง 3 ขวดมาหาค่าเฉลี่ย จึงทำให้ตัวอย่างทดสอบที่นำมาวิเคราะห์นี้ มีปริมาณยา isoniazid ต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนด

เมื่อพิจารณาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บตำรับยาเตรียมพิเศษ isoniazid ในน้ำกระสายยาของสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหาราชนี จากผลการศึกษา พบว่า หากเก็บในขวดแก้วสีชา ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง ในตู้เย็น หรือในที่มืด จะสามารถเก็บยาตำรับนี้ได้เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยที่ปริมาณยายังอยู่ในเกณฑ์ที่ USP26^[10] กำหนด โดยสภาวะที่มีปริมาณยา isoniazid คงเหลือมากที่สุด คือ ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง รองลงมาคือสภาวะที่มีแสง และในตู้เย็น ตามลำดับ

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

การวิจัยนี้เกิดขึ้นเนื่องจากมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์และทดสอบความคงสภาพของตำรับยาเตรียมพิเศษเฉพาะราย isoniazid ซึ่งทางสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินีผลิตขึ้น โดยขั้นตอนในการดำเนินงานแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนของการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยา isoniazid โดยวิธี HPLC และส่วนของการทดสอบความคงสภาพของตำรับยาเตรียมซึ่งมีระยะเวลาในการวิเคราะห์ 4 สัปดาห์ จากผลการทดลองปรากฏว่า ตำรับยาเตรียมพิเศษเฉพาะราย isoniazid ซึ่งผลิตโดย สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหาราชินี ที่เก็บในขวดแก้วสีชาจะมีความคงตัวที่เวลา 4 สัปดาห์ เมื่ออยู่ในสภาวะอุณหภูมิห้องที่โดนแสงหรือไม่ก็ตามและในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการวิจัยพบว่าเมื่อผ่านไป 4 สัปดาห์ปริมาณตัวยา isoniazid ในตำรับยังมีค่าที่เกินเกณฑ์ของการเสียสภาพอยู่มากประกอบกับอัตราในการลดลงของตัวยาในแต่ละสัปดาห์ต่ำ ดังนั้นจึงควรมีการทำการทดสอบความคงสภาพต่ออีกจนกว่ายาจะเสียสภาพจริง ๆ เพื่อจะได้ทราบอายุการใช้งานจริงของยาและช่วยยืดอายุการใช้งานของยานี้ออกไปได้ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วย

การวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงในการกำหนดวันหมดอายุของตำรับยาเตรียมพิเศษเฉพาะราย isoniazid ซึ่งมีการผลิตขึ้นและใช้จริงในสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ มหาราชินี นอกจากนี้วิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นในการวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์เพื่อใช้กับการวิเคราะห์ตัวยา isoniazid ใน preparations ต่าง ๆ ได้

เอกสารอ้างอิง

1. Brown L, Clark BJ, Manno CS. Clinical Handbook of Pediatrics. 3rd ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2003.
2. สำนักโรคติดต่อทั่วไป กองควบคุมโรคติดต่อ. โรคติดต่อ [Online]. Available from: http://thaigcd.ddc.moph.go.th/vac_p_BCG.html [Accessed 2006 Jun 15]
3. Taketo CK, Hodding JH, Kraus DM. Pediatric dosage handbook. 9th ed. Ohio: Lexi-Comp Inc, 2002.
4. Chambers HF. Antimycobacterial drugs. In: Katzung BG, editors. Basic & clinical pharmacology. 8th ed. San Francisco: Mc Graw-Hill companies, 2001: 803-806.
5. <http://en.wikipedia.org/wiki/Isoniazid> [Accessed 2006 Jun 21]
6. Petri WA. Antimicrobial agents; Drugs used in the chemotherapy of Tuberculosis *Mycobacterium avium* complex disease, and Leprosy. In: Hardman JG, Limbird LE, editors. Goodman & Gillman's the pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001: 1274-1276.
7. Watson DG. Pharmaceutical analysis. 2nd ed. Edinburgh: Elsevier, 2005: 221-234,267-314.
8. Khuhawar MY, Rind FM. High performance liquid chromatographic determination of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin in pharmaceutical preparations. Pak J Pharm Sci 1998; 11(2): 49-54.
9. Khuhawar MY, Rind FMA, Rajper AD. High-performance liquid chromatographic determination of isoniazid, pyrazinamide, and indomethacin in pharmaceutical preparations. Acta chromatogr 2005; 15: 269-275.
10. The United States Pharmacopeia 26-the National Formulary19. Rockville: the United States Pharmacopeial convention, Inc., 2003.
11. Hong DD, Shah M. Development and validation of HPLC stability-indicating assays. In: Carstensen JT, Rhoder CT, editors. Drug stability principles and practices; revised and expanded. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000: 329-384.

12. มานิตย์ เลิศชัยพร. การพัฒนาน้ำกระสายยาพร้อมใช้เพื่อการเตรียมยาพิเศษเฉพาะรายในสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี. กุมารเวชสาร 2545; ปีที่ 9 ฉบับที่ 3: 249-258.