



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การเฝ้าติดตามสายการผลิตในกระบวนการผสมยาเม็ด Diclofenac โดยใช้วิธี
เคมีเมตริกซ์ช่วย FTIR เพื่อเป็นเครื่องมือของเทคโนโลยีการวิเคราะห์ในกระบวนการ

In-line monitoring mixing process in diclofenac tablets by using
chemometrics-assisted FTIR spectroscopic method as complementary
process analytical technology (PAT) tool

โดย

นสภ.ธัญชนก	ปิยะรัตน์วัฒน์	รหัสบัณฑิต 60210030
นสภ.ธัญสินี	ดุษฎยาวัตร	รหัสบัณฑิต 60210031
นสภ.สุพิชญา	หวังฤทธิไกรกุล	รหัสบัณฑิต 60210144

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การเฝ้าติดตามสายการผลิตในกระบวนการผสมยาเม็ด Diclofenac โดยใช้วิธี
เคมีเมตริกซ์ช่วย FTIR เพื่อเป็นเครื่องมือของเทคโนโลยีการวิเคราะห์ในกระบวนการ

In-line monitoring mixing process in diclofenac tablets by using
chemometrics-assisted FTIR spectroscopic method as complementary
process analytical technology (PAT) tool

โดย

นสภ.ธัญชนก	ปิยะรัตน์วัฒน์	รหัสบัณฑิต	60210030
นสภ.ธัญสินี	ดชญาวัตร	รหัสบัณฑิต	60210031
นสภ.สุพิชญา	หวังฤทธิไกรกุล	รหัสบัณฑิต	60210144

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

Diclofenac sodium จัดเป็นยาในกลุ่ม non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs) ใช้สำหรับบรรเทาอาการปวด ลดไข้ ต้านการอักเสบ และปวดข้อเรื้อรัง โดยมีความแรงยาที่ขายตามท้องตลาด 25-100 mg ซึ่งมีสารสำคัญปริมาณต่ำ ทำให้เกิดปัญหาด้านการกระจายตัวในระหว่างกระบวนการผลิต วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อพัฒนาการเฝ้าติดตามสายการผลิตจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อให้มั่นใจว่าตัวยาสามารถกระจายตัวได้ดีเมื่ออยู่ในรูปแบบยาเม็ด โดยวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยวิธี UV-visible spectrophotometry แต่วิธีดังกล่าวต้องมีการเตรียมตัวอย่างทำให้สูญเสียตัวอย่างระหว่างกระบวนการผลิตบางส่วนเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพ นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ต้องใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ทำให้เสียเวลาส่วนหนึ่งในกระบวนการผลิตเพื่อรอผลการวิเคราะห์ดังกล่าว

งานวิจัยเล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิชา 791591 โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ Research Project in Pharmaceutical Sciences จึงได้พัฒนาวิธีการเฝ้าติดตามสายการผลิตในกระบวนการผสมยาเม็ด Diclofenac โดยใช้วิธีเคโมเมตริกซ์ช่วย Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) เพื่อเป็นเครื่องมือของเทคโนโลยีการวิเคราะห์ในกระบวนการ (In-line monitoring mixing process in diclofenac tablets by using chemometrics- assisted FTIR spectroscopic method as complementary process analytical technology (PAT) tool) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญในการเฝ้าติดตามสายการผลิตในกระบวนการผสมยาเม็ด

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานวิจัยเล่มนี้จะมีประโยชน์กับผู้อ่าน หากมีข้อเสนอแนะหรือข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้จัดทำขอน้อมรับและขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้จัดทำ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2564

เรื่อง การเฝ้าติดตามสายการผลิตในกระบวนการผสมยาเม็ด Diclofenac โดยใช้วิธีเคโมเมตริกซ์
ช่วย FTIR เพื่อเป็นเครื่องมือของเทคโนโลยีการวิเคราะห์ในกระบวนการ

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ.ธัญชนก ปิยะรัตน์วัฒน์ รหัสนิต 60210030
2. นสภ.ธัญสินี ดัชญาวัตร รหัสนิต 60210031
3. นสภ.สุพิชญา หวังฤทธิไกรกุล รหัสนิต 60210144

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ญญ.ดร.พุทธิพร คงแก้ว
2. ภก.ผศ.ดร.วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง

บทคัดย่อ

ยา Diclofenac sodium ใช้สำหรับบรรเทาอาการปวด ลดไข้ ต้านการอักเสบ และปวดข้อ
เรื้อรัง โดยความแรงยาที่จำหน่ายในท้องตลาด 25-100 mg ซึ่งมีสารสำคัญปริมาณต่ำ ทำให้เกิด
ปัญหาด้านการกระจายตัวในระหว่างกระบวนการผลิต โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี
วิเคราะห์ปริมาณตัวยาสสำคัญในการเฝ้าติดตามสายการผลิตในกระบวนการผสมยาเม็ดที่มีความ
รวดเร็วและไม่ทำลายตัวอย่างโดยใช้เทคนิค FTIR ร่วมกับ chemometrics เปรียบเทียบกับวิธี
มาตรฐานคือ UV-visible spectrophotometry วิธีที่พัฒนาขึ้นเป็นการนำตัวอย่างในขั้นตอนการ
ผสมของยาเม็ด diclofenac sodium โดยเก็บข้อมูล IR spectrum และนำมาสร้าง PLS-R model
โดย model ที่ให้ผลการวิเคราะห์ดีที่สุดคือ pretreatment data ด้วยวิธี Standard Normal
Variate (SNV) ที่ factor 2 ในด้านความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) มีค่า correlation
coefficient (r) เท่ากับ 0.9890, ความถูกต้อง (accuracy) โดยค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธี
วิเคราะห์ (%recovery) เท่ากับ 92.9-104.0 %, ความแม่นยำ (precision) โดยค่าส่วนเบี่ยง
มาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation; RSD) มีค่าเท่ากับ 2.4 % ค่าแนะนำสำหรับการ
ยอมรับได้ของวิธีวิเคราะห์ความแม่นยำ (HorRat) เท่ากับ 1.2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของตัวยาส
สำคัญมีค่าเท่ากับ 0.9941 ($\text{sig} < 0.05$) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับวิธี
มาตรฐาน ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ปริมาณตัวยาส diclofenac sodium ด้วยเทคนิค FTIR ร่วมกับเทคนิค
chemometrics สามารถนำมาวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสสำคัญในการเฝ้าติดตามสายการผลิตใน
กระบวนการผสมยาเม็ดได้

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2021

: In-line monitoring mixing process in diclofenac tablets by using chemometrics-assisted FTIR spectroscopic method as complementary process analytical technology (PAT) tool

By

1. Miss. Thanchanok Piyaattanawat ID 60210030
2. Miss. Thansinee Datthuyawat ID 60210031
3. Miss. Supichaya Wangritthikraikul ID 60210144

Advisor

1. Dr. Putthiporn Khongkaew
2. Asst. Prof. Dr. Watcharaphong Chaemsawang

ABSTRACT

Diclofenac sodium is a non-steroidal anti-inflammatory drug for relief of pain, fever, inflammatory and osteoarthritis. Tablets containing 25-100 mg of diclofenac sodium active ingredient are commercially available. Normally, the quite low amount of active ingredient usually cause distribution problem in manufacturing process. The aim of this study is to develop a fast method of non-destructive analysis for in-line monitoring mixing process of diclofenac tablets by using chemometrics-assisted FTIR spectroscopic method and compare with the standard method, UV-visible spectrophotometry. The method was developed by using the samples from in-line mixing process of diclofenac tablets and collecting IR spectrum and creating PLS-R model. The optimum model was utilized standard normal variate (SNV) for pretreatment data with factor 2. The linearity of the method shown as the correlation coefficient (r) was 0.9890. The accuracy results displayed as percentages of recovery were 92.9-104.0%. The precision displayed as in percentage of the relative standard deviation (%RSD) was 2.4% and Horwitz's Ratio (HorRat) was 1.2. The statistical analysis result of the quantitative active ingredient was 0.9941 (sig<0.05), which was not statistically different from the standard method. In conclusion, chemometrics- assisted FTIR spectroscopic method can be used to analyze active ingredient for in-line monitoring mixing process in diclofenac tablets.

Major Advisor.....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ภญ.ดร.พุทธิพร คงแก้ว อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย และภก.ผศ.ดร.วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำในการทำงานวิจัยตลอดจนการปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆด้วยความใส่ใจและทุ่มเท คณะผู้จัดทำขอขอบคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณทีมนักวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบคุณภาพเครื่องมือ สารเคมี รวมถึงสอนเกี่ยวกับการใช้เครื่องมือต่างๆ จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอบคุณเพื่อนๆในกลุ่มงานวิจัยที่คอยเป็นกำลังใจให้กันเสมอตลอดการทำงาน ร่วมทุกข์ร่วมสุขและช่วยเหลือกันมาตลอด จนงานวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

คณะผู้จัดทำหวังว่า งานวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย สำหรับข้อบกพร่องต่างๆที่อาจจะเกิดขึ้นนั้น คณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ ที่นี้ และยินดีรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่ได้เข้ามาศึกษา เพื่อนำไปปรับปรุงแก้ไข ให้เป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

คณะผู้จัดทำ

12 มีนาคม 2565

สารบัญ

คำนำ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ซ
บทที่ 1	1
บทนำ	1
ที่มาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์	2
สมมติฐาน	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
กรอบแนวคิด	2
บทที่ 2	3
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 การเฝ้าติดตามกระบวนการผลิต	3
2.2 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Visible Spectrophotometry	3
2.3 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR	6
2.4 การวิเคราะห์ที่ใช้ IR ร่วมกับ chemometrics	6
บทที่ 3	11
วิธีดำเนินการวิจัย	11
3.1 วัตถุดิบและสารเคมี	11
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในโครงงานวิจัย	11
3.3 วิธีเตรียมตำรับ	11
3.4 วิธีวิเคราะห์ปริมาณตัวอย่าง Diclofenac sodium	12

บทที่ 4	15
ผลการวิจัย	15
4.1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของยา Diclofenac sodium ต่อการดูดกลืนแสง	15
4.2 ปริมาณตัวยาสำคัญในสารตัวอย่าง	16
4.3 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของ UV-visible spectrophotometry	18
4.4 อินฟราเรดสเปกตรัมของสารตัวอย่างที่วิเคราะห์	20
4.5 การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคเคโมเมตริกซ์	21
บทที่ 5	27
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	27
บรรณานุกรม	29
ภาคผนวก	32

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 การแบ่งประเภทการทดสอบและพารามิเตอร์ของ method validation ตามแนวทาง ASEAN	4
ตารางที่ 3.1 แสดงพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง	13
ตารางที่ 4.1 ค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน diclofenac sodium และค่า การดูดกลืนแสง	15
ตารางที่ 4.2 ปริมาณตัวยา diclofenac sodium ของ 50 ตัวอย่าง	16
ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำใน Intra-day และ Inter-day	19
ตารางที่ 4.4 แสดงผลการสร้าง PLS-R model สำหรับวิเคราะห์ปริมาณ diclofenac sodium จาก IR spectrum	22
ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณ diclofenac sodium ที่วิเคราะห์ได้จาก PLS-R model ที่ พัฒนาขึ้น	23
ตารางที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบความถูกต้อง	25
ตารางที่ 4.7 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำ	26

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 4.1 กราฟมาตรฐานของยามาตรฐาน diclofenac sodium	16
รูปที่ 4.2 แสดง UV spectrum ของสารมาตรฐาน diclofenac sodium ตำรับยา diclofenac sodium และ Placebo ตามลำดับ	18
รูปที่ 4.3 โครงสร้างทางเคมีของ diclofenac sodium ที่เป็นตัวยาสำคัญของตำรับ	20
รูปที่ 4.4 สเปกตรัมของสารมาตรฐาน diclofenac sodium	20
รูปที่ 4.5 สเปกตรัมของปริมาณตัวยาสำคัญที่ความแรง 5, 10, 25, 50 และ 100 mg/tab	21
รูปที่ 4.6 Calibration model ที่ดีที่สุดของการวิเคราะห์ปริมาณ diclofenac sodium	22
รูปที่ 4.7 กราฟแสดงค่าการทำนายปริมาณ diclofenac sodium ที่วิเคราะห์ได้จาก Calibration model	24
รูปที่ 4.8 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ	25

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

ยา diclofenac จัดเป็นยาในกลุ่ม non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs) มีกลไกในการยับยั้งเอนไซม์ที่ชักนำให้เกิดการอักเสบทั้ง cyclo-oxygenase 1 และ cyclo-oxygenase 2 และมีข้อบ่งใช้สำหรับบรรเทาอาการปวด ลดไข้ ต้านการอักเสบ และปวดข้อเรื้อรัง โดยรูปแบบยาที่พบในท้องตลาดมีทั้งยาเม็ดชนิดแตกตัวในลำไส้ (enteric-coated tablets), ยาปลดปล่อยแบบทยอยและออกฤทธิ์นาน (sustained-release tablets), ยาปลดปล่อยทันที (immediated-release tablets)¹ โดยมีความแรงยา 25-100 mg² ซึ่งจากโครงสร้างของตัวยาที่มีขั้วต่าจึงละลายในน้ำได้น้อยและมีค่าการละลายเท่ากับ 0.00237 mg/mL จึงนิยมใช้ในรูปแบบเกลือโซเดียมเพื่อเพิ่มการละลายของตัวยา การเตรียมตำรับ diclofenac sodium ใช้วิธีการเตรียมแบบ wet granulation เนื่องจากสารสำคัญในตำรับมีปริมาณต่ำ³ ทำให้เกิดปัญหาด้านการกระจายตัวในระหว่างกระบวนการผลิต การเฝ้าติดตามสายการผลิตจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อให้มั่นใจว่าตัวยาสามารถกระจายตัวได้ดีเมื่ออยู่ในรูปแบบยาเม็ด

วิธีวิเคราะห์ปริมาณ diclofenac sodium รูปแบบยาเม็ดตามตำรายาคือเทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) โดยการวิเคราะห์ใช้วิธี gradient elution ระหว่าง acetonitrile และ ammonium acetate buffer⁴ ทำให้การวิเคราะห์ดังกล่าวมีขั้นตอนในการเตรียมสารรวมทั้งใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน นอกจากนี้ยา diclofenac sodium มีโครงสร้างที่เป็น UV chromophore ทำให้สามารถดูดกลืนแสงในช่วง ultra violet (200-400 nm) ได้ ดังนั้นจึงสามารถวิเคราะห์ด้วยวิธี UV-visible spectrophotometry ได้เช่นเดียวกัน แต่เทคนิคดังกล่าวใช้ระยะเวลาในการเตรียมเครื่องมือและสารตัวอย่างเป็นระยะเวลานานเช่นเดียวกับเทคนิค HPLC และสามารถวิเคราะห์ได้เฉพาะสารที่มีโครงสร้างที่มี chromophore เท่านั้น⁵ วิธีการวิเคราะห์อื่น ๆ ที่สามารถนำมาวิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญได้โดยไม่ทำลายตัวอย่าง เช่น fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ซึ่งเป็นเทคนิคที่รวดเร็ว ใช้ตัวอย่างปริมาณเล็กน้อยในการวิเคราะห์อีกทั้งยังไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม และลดสารเคมีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์⁶ แต่การใช้เทคนิค FTIR เพื่อหาปริมาณจำเป็นต้องเลือก peak ของสารที่แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันที่จำเพาะต่อตัวยาเพื่อสร้าง calibration curve กับปริมาณยา การเลือก peak ดังกล่าวทำได้ยากหากในสารตัวอย่างมีความบริสุทธิ์ต่ำหรือมีสิ่งเจือปนสูง จึงทำให้เทคนิคนี้ไม่ได้รับความนิยมในการวิเคราะห์ปริมาณสารเท่ากับเทคนิค chromatography

ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจัดทำโครงการนี้ขึ้นเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณตัวยา diclofenac sodium เพื่อใช้ในการเฝ้าติดตามสายการผลิตในกระบวนการผสมยาเม็ด โดยใช้เทคนิค FTIR บันทึกข้อมูล IR

spectrum ของตัวอย่างที่สุ่มจากสายการผลิต และใช้เทคนิค chemometrics เพื่อหาข้อมูลที่สำคัญจาก IR spectrum ที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณ diclofenac sodium ในตัวอย่างด้วยวิธีการวิเคราะห์หลายตัวแปร (multivariate analysis)⁷ เพื่อนำมาใช้ประยุกต์ในส่วนหนึ่งของเทคโนโลยีวิเคราะห์กระบวนการ (Process Analytical Technology, PAT) เพื่อควบคุมการผลิตในระหว่างกระบวนการ โดยมีเป้าหมายเพื่อเป็นการประกันคุณภาพผลิตภัณฑ์สุดท้าย⁸

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญในการเฝ้าติดตามสายการผลิตในกระบวนการผสมยาเม็ด

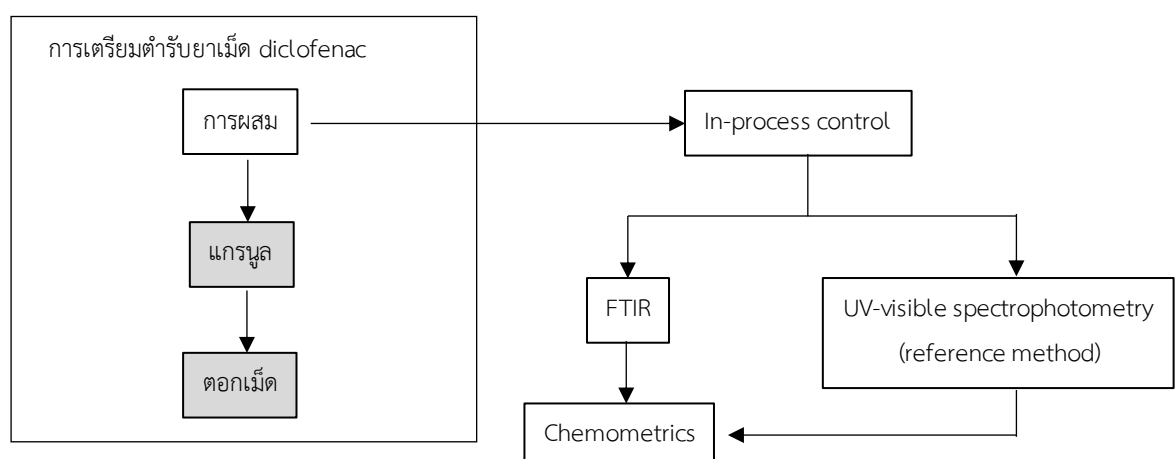
สมมติฐาน

สามารถใช้เทคนิค FTIR ร่วมกับ chemometrics เพื่อเป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญในการเฝ้าติดตามสายการผลิตในกระบวนการผสมยาเม็ดได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีวิเคราะห์ที่ไม่ทำลายตัวอย่างและมีความรวดเร็ว ในการเฝ้าติดตามสายการผลิตในกระบวนการผสมยาเม็ด

กรอบแนวคิด



บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 การเฝ้าติดตามกระบวนการผลิต

การเฝ้าติดตามกระบวนการผลิตเป็นสิ่งที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมยา ซึ่งได้มีการนำ Process Analytical Technology (PAT) มาใช้กับกระบวนการผลิต โดยเป็นระบบสำหรับออกแบบ พัฒนา วิเคราะห์ ควบคุมการผลิต เพื่อประกันว่าตั้งแต่ต้นขั้นตอนกระบวนการผลิตจนถึงขั้นสุดท้ายยาที่ได้มีคุณภาพตามระดับมาตรฐาน ซึ่งได้มีการนำ PAT มาประยุกต์ใช้ในการตรวจติดตามกระบวนการผลิตเพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณในระหว่างกระบวนการผลิต เช่น การผสม การกระจายตัว โดยวิธีในการวิเคราะห์ยาที่มีได้แก่ การวิเคราะห์ด้วย FTIR ร่วมกับ Chemometric, การวิเคราะห์ด้วย UV-visible Spectrophotometry เพื่อการกระจายตัวของตัวยาสำคัญในขั้นตอนการผสมของการผลิตยาเม็ด⁹

2.2 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Visible Spectrophotometry

UV-Visible Spectrophotometry เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์เชิงปริมาณได้ แต่มีข้อเสียคือใช้ระยะเวลาในการเตรียมเครื่องมือและสารตัวอย่างเป็นระยะเวลานาน และสามารถวิเคราะห์ได้เฉพาะสารที่มีโครงสร้างที่มี chromophore เท่านั้น

จากงานวิจัยวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญ diclofenac ด้วยวิธี UV-Spectrophotometry สามารถทำได้โดยใช้ diclofenac sodium ในรูปแบบ bulk และ tablet dosage form โดยนำความเข้มข้นของยาทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ตั้งแต่ 10-30 µg/ml ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 276.20 nm เพื่อสร้างเป็น calibration curve โดยมี validation วิธีวิเคราะห์ ซึ่ง Assay มีค่า 99.42 ± 0.084 , Linearity มีค่า correlation coefficient (r) อยู่ที่ 0.9995, Precision มี %RSD ไม่เกิน 2.0% และ Accuracy มี %recovery เท่ากับ 98.72, 99.36, 99.15%¹⁰

Analytical Method Validation

การทดสอบประเมินวิธีการวิเคราะห์ว่ามีความเหมาะสม สามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างได้ถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้ ตามวัตถุประสงค์ที่กำหนด การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ไม่จำเป็นต้องทำครบทุกหัวข้อ ขึ้นอยู่กับประเภทของวิธีวิเคราะห์ แนวทางการพิจารณาเลือก parameter ในการทำ method validation แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การแบ่งประเภทการทดสอบและพารามิเตอร์ของ method validation ตามแนวทาง ASEAN

Performance Characteristics (parameter)	Type of Analytical Procedure			
	Identification	Testing for Impurities		Assay dissolution (measurement only) Content/potency
		Quantitative	Limit test	
Accuracy	-	+	-	+
Precision				
- Repeatability	-	+	-	+
- Intermediate	-	+	-	+
Specificity	+	+	+	+
Detection limit	-	-	+	-
Quantitation limit	-	+	-	-
Linearity	-	+	-	+
Range	-	+	-	+

+ เป็นพารามิเตอร์ที่ต้องทดสอบ

- เป็นพารามิเตอร์ที่ไม่จำเป็นต้องทดสอบ

Analytical Performance Characteristics (Parameters)

Specificity ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการจำแนกสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากสารอื่นๆ รวมถึงสารปนเปื้อน (impurities) สารที่เกิดจากการสลายตัว (degradants)

Linearity การประเมินความเป็นเส้นตรงระหว่างค่าสัญญาณจากการวิเคราะห์กับความเข้มข้นของสาร โดยต้องประเมินตลอดช่วงที่ระบุสำหรับการวิเคราะห์นั้น ควรใช้ระดับความเข้มข้นอย่างน้อย 5 ระดับ

Range ช่วงระดับความเข้มข้นต่ำสุดและสูงสุดที่วิธีวิเคราะห์นั้นมีค่า linearity, accuracy และ precision ที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์ที่กำหนด

Accuracy ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ แสดงโดยความใกล้เคียงกันระหว่างค่าที่ได้จากการวิเคราะห์นั้น เปรียบเทียบกับค่าจริง หรือค่าอ้างอิงที่เป็นที่ยอมรับ

accuracy ต้องประเมินตลอดช่วงความเข้มข้นที่ระบุสำหรับวิธีวิเคราะห์นั้นโดยทั่วไปจะวิเคราะห์อย่างน้อย 9 ซ้ำที่ 3 ความเข้มข้นที่ครอบคลุม range ที่กำหนดโดยการเติมสารมาตรฐานที่

ทราบความเข้มข้นลงใน sample และหาค่าความต่างของค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าที่แท้จริง แล้วรายงานเป็นค่าร้อยละการคืนกลับ (percent recovery)

Precision คือ ความแม่นยำ ของวิธีวิเคราะห์ แสดงโดยความใกล้เคียงกันระหว่างค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันซ้ำหลายๆครั้งโดยตัวอย่างต้องเป็นเนื้อเดียวกัน หัวข้อ precision นี้แบ่งออกเป็น 3 ระดับคือ

Repeatability คือการแสดงความแม่นยำของการวิเคราะห์ชุดการวิเคราะห์ซ้ำที่ทำในสถานะเดียวกัน ในระยะเวลาที่ห่างกันไม่นาน

Intermediate precision คือ การแสดงความแม่นยำของการวิเคราะห์ชุดการวิเคราะห์ที่ทำซ้ำ โดยมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยในการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เช่น เปลี่ยนเครื่องมือ เปลี่ยนนักวิเคราะห์เปลี่ยนวัน

Reproducibility คือการแสดงความแม่นยำของการวิเคราะห์ที่ทำโดยห้องปฏิบัติการหลายห้อง โดยทั่วไปใช้ในการนำเสนอวิธีใหม่ที่จะใช้เป็นวิธีมาตรฐานในเภสัชตำรับ

การรายงานค่า precision แต่ละชนิดให้รายงานเป็น standard deviation, relative standard deviation และ confidence interval

Detection limit หรือ Limit of detection (LOD) คือปริมาณต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์ในตัวอย่างใดๆ ที่สามารถตรวจพบได้แต่ไม่จำเป็นต้องทราบว่าปริมาณที่แน่นอนเท่าใด การหา LOD มีหลายวิธีได้แก่

Based on visual evaluation คือการประเมินด้วยการมองเห็นโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้น และหาค่าต่ำสุดของตัวอย่างที่วิธีวิเคราะห์สามารถตรวจวัดได้

Based on signal-to-noise วิธีนี้สามารถใช้กับเทคนิคที่ให้ baseline noise เช่น เทคนิค HPLC โดยทำการเปรียบเทียบ signal ที่วัดได้จากตัวอย่างที่รู้ความเข้มข้นต่ำของสารที่วิเคราะห์กับตัวอย่างที่เป็น blank เรียกว่า signal-to-noise ratio โดยทั่วไปสำหรับ LOD ค่าที่ยอมรับคือ 3 หรือ 2 ต่อ 1

Based on the standard deviation of the response on the slope

โดย $LOD = 3.3 \sigma/S$

ซึ่ง σ = the standard deviation of the response

S = the slope of the calibration curve

ในการยื่นขอขึ้นทะเบียนตำรับยาวิธีวิเคราะห์สารปนเปื้อนแบบ limit test ต้องมีการแสดงค่า LOD และระบุวิธีที่ใช้ในการประเมินด้วย

Quantitation limit หรือ Limit of quantitation (LOQ) คือปริมาณต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์ ในตัวอย่างที่สามารถตรวจหาเชิงปริมาณโดยมีความเที่ยงและความแม่นยำในเกณฑ์ที่เหมาะสมการหา LOQ มีหลายวิธี ได้แก่

Based on visual evaluation คือ การประเมินด้วยการมองเห็นโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้นและหาค่าต่ำสุดซึ่งสามารถหาปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ด้วยความเที่ยงและความแม่นยำที่เหมาะสม

Based on signal-to-noise วิธีนี้สามารถใช้กับเทคนิคที่ให้ baseline noise เช่น เทคนิค HPLC โดยทำการเปรียบเทียบ signal ที่วัดได้จากตัวอย่างที่รู้ความเข้มข้นต่ำของสารที่วิเคราะห์กับตัวอย่างที่เป็น blank เรียกว่า signal-to-noise ratio โดยทั่วไปสำหรับ LOQ ค่าที่ยอมรับ คือ 10 ต่อ 1

Based on the standard deviation of the response on the slope

โดย $LOD = 10 \sigma/S$

ซึ่ง σ = the standard deviation of the response

S = the slope of the calibration curve

ในการยื่นขอขึ้นทะเบียนตำรับยา วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารปนเปื้อนต้องมีการแสดงค่า LOQ และระบุวิธีที่ใช้ในการประเมินด้วย ¹¹

2.3 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR

FTIR เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ จำแนกประเภทของสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์และหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุล สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยอาศัยหลักการของการดูดกลืนคลื่นรังสีอินฟราเรด เมื่อโมเลกุลได้รับพลังงานจากคลื่นรังสีอินฟราเรดที่มีความถี่ตรงกับความถี่ของการสั่นของพันธะในโมเลกุล จะทำให้โมเลกุลเกิดการดูดกลืนแสง จากนั้นเครื่องมือจะวัดค่าเข้มแสงต่อความถี่หรือความยาวคลื่นได้เป็นสเปกตรัม เป็นเทคนิคที่ไม่ทำลายตัวอย่าง รวดเร็ว ใช้ตัวอย่างปริมาณเล็กน้อยในการวิเคราะห์อีกทั้งยังไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม และลดสารเคมีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ จากงานวิจัยมีการใช้เทคนิค FTIR ในการหาปริมาณด้วยยาสำคัญในสูตรตำรับได้¹²

2.4 การวิเคราะห์ที่ใช้ IR ร่วมกับ chemometrics

จากงานวิจัยมีการใช้เทคนิค Attenuated Total Reflection – Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) ร่วมกับ PLSR ในการวิเคราะห์ยาสูตรผสมของ vildagliptin และ metformin โดยการทดลองแบบ partial factorial design ถูกใช้เพื่อพัฒนา PLSR model ในการทำนายความเข้มข้นของยาทั้ง 2 ตัวที่ไม่ทราบความเข้มข้น ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสม ถูกต้อง และประสบความสำเร็จในการประเมินความแม่นยำ การทำซ้ำของยาสูตรผสม¹³ และมีงานวิจัยที่ใช้เทคนิค ATR-FTIR ร่วมกับ Multivariate curve resolution - alternating least squares (MCR-

ALS) ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนรูปพื้นฐานของยา Cimetidine เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ¹⁴ และมีการนำมาใช้ประยุกต์ในส่วนของ PAT เพื่อติดตามผลตามเวลาจริง และป้องกันอันตรายที่อาจเกิดขึ้นในกระบวนการ ซึ่งนำมาใช้ในอุตสาหกรรมยาและชีวเภสัชภัณฑ์ เพื่อควบคุมคุณภาพทุกขั้นตอนตั้งแต่ขั้นตอนแรกถึงขั้นสุดท้ายในกระบวนการผลิตยา¹⁵

PLS-Regression

การเปรียบเทียบวิธีการทางเคโมเมตริกซ์ที่ใช้ในเคมีวิเคราะห์สามารถพบได้ใน PLS ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้มากที่สุด เนื่องจากขอบเขตและความซับซ้อนทางคณิตศาสตร์ของคำอธิบายทั้งหมดจะไม่ได้แสดงไว้ เพื่อที่จะทำ PLS-Regression ของระบบใดๆ ข้อมูลของสเปกตรัมของสารต้องถูกเปรียบเทียบกับข้อมูลความเข้มข้นของสารนั้น การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในโครงสร้างข้อมูลทั้งสองต้องได้รับการยอมรับและมีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน โดยจำเป็นต้องวัดตัวอย่างจำนวนมาก สำหรับการแสดงผลทางคณิตศาสตร์ของการเปลี่ยนแปลงในชุดข้อมูลทั้งสองจะต้องเขียนเมตริกซ์ของข้อมูล และแฟกเตอร์ของข้อมูลเหล่านั้นจะถูกสร้างขึ้น ซึ่งสามารถใช้สำหรับการทำนายความเข้มข้นแทนสเปกตรัมแบบดั้งเดิมเนื่องจากมีข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับระบบที่ศึกษาทั้งหมด การลดตัวแปรมีประโยชน์โดยข้อมูลที่เกี่ยวเนื่องการวิเคราะห์จากชุดข้อมูลขนาดใหญ่ถูกบีบอัดเป็นแฟกเตอร์ซึ่งจะถูกใช้สำหรับการ Calibration

ในกรณีของ PLS Calibration แฟกเตอร์จะถูกเก็บโดยเรียงลำดับจากมากไปหาน้อย แฟกเตอร์แรกบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงหลักของสเปกตรัม มีความสำคัญที่มากที่สุดสำหรับแบบจำลอง Calibration และเมื่อจำนวนแฟกเตอร์เพิ่มขึ้นการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในโครงสร้างของข้อมูลจะถูกแสดงผล ซึ่งสำคัญสำหรับการประเมินสเปกตรัม โดยจำนวนแฟกเตอร์ที่น้อยจะแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญของโครงสร้างของสเปกตรัม ขณะที่จำนวนแฟกเตอร์ที่สูงจะแสดงถึงส่วนที่เป็นสัญญาณรบกวนของสเปกตรัม

การเลือกจำนวนแฟกเตอร์ที่เหมาะสมมีความสำคัญสำหรับคุณภาพของแบบจำลอง PLS ถ้ามีจำนวนแฟกเตอร์น้อยเกินไปโครงสร้างสเปกตรัมจะไม่สามารถประมวลผลได้ จึงไม่สามารถนำไปสู่การผลการวิเคราะห์ที่มีมาตรฐาน ถ้าจำนวนแฟกเตอร์มีมาก การวิเคราะห์ก็จะไม่ดีเนื่องจากมีสัญญาณรบกวนเชิงสเปกตรัมหลายส่วนมากเกินไป (Overfitting) ใน PLS regression ข้อมูลสเปกตรัมเมตริกซ์ X และข้อมูลความเข้มข้นเมตริกซ์ Y ถูกลดลงเหลือเพียง 2-3 แฟกเตอร์

ใน PLS regression เบื้องต้นข้อมูลจะถูกทำให้เป็นองค์ประกอบหลัก (Principal Components) แล้วจะคำนวณหา scores vectors จากข้อมูลสเปกตรัมและข้อมูลความเข้มข้น ซึ่งวิธีการจะครอบคลุม (Robust) ต่อความไม่ถูกต้องของค่าการวัดค่าอ้างอิงและการวัดค่าตัวอย่าง

โดยทั่วไปจำนวนสำหรับค่าการดูดซับที่ได้จากการวัดจะมากเกินไปกว่าตัวเลขขององค์ประกอบที่แสดงให้เห็น ดังนั้นระบบนี้คือ “over-determined” และไม่เพียงแต่จะสร้างความสัมพันธ์กับจุดของข้อมูลสเปกตรัมจุดเดียว (เช่น จุดสูงสุดของ Calibration แบบตัวแปรเดียว) แต่ยังมีความสัมพันธ์กับโครงสร้างข้อมูลสเปกตรัมทั้งหมด ข้อมูลชุด Calibration ด้วยวิธีนี้จะมีค่าข้อมูลที่ได้มากกว่าการ Calibration ด้วยวิธีตัวแปรเดียวมาก นอกจากนี้ยังมีความเป็นไปได้ที่จะหาตัวแปรที่ผิดปกติ ในระหว่างการวิเคราะห์และสามารถตัดสินใจได้ว่าองค์ประกอบของสิ่งรบกวนที่ไม่รู้ค่า ซึ่งไม่มีความสัมพันธ์กับชุดของข้อมูล ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมตรงข้ามกับการ Calibration แบบตัวแปรเดียว เป็นไปได้ที่จะใช้ข้อมูลเชิงสเปกตรัมของด้านข้างของพีค ซึ่งสามารถวิเคราะห์สเปกตรัมได้โดยโครงสร้างของสเปกตรัมเอง ด้วยเหตุนี้แถบการดูดซับที่ซ้อนทับกัน (overlapping bands) สามารถที่จะแยกออกจากกันได้ ในสเปกตรัม トラบโดที่มีความแปรปรวนในรูปร่างของสเปกตรัมน้อย ในทำนองเดียวกันสามารถรับรู้ถึงโครงสร้างของสเปกตรัมบริเวณที่มีสัญญาณรบกวนมากได้ ซึ่งนำไปสู่การปรับปรุงการทำนายความเข้มข้นสารให้แม่นยำความสำคัญพิเศษของ PLS regression สำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี เกิดจากการสร้างแฟกเตอร์ (Factorization) ของข้อมูล X และ Y โดยไม่เป็นอิสระต่อกันและเกิดขึ้นพร้อมกัน เมื่อประเมินสเปกตรัมของการดูดซับสามารถที่จะประมาณว่าการเปลี่ยนแปลงของข้อมูลสเปกตรัมมีต้นกำเนิดจากความแปรปรวนของความเข้มข้นที่สอดคล้องกัน นั่นหมายความว่า การเปลี่ยนแปลงของข้อมูลสเปกตรัมควรจะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงที่สอดคล้องกันของสเปกตรัม เพราะฉะนั้น scores vectors ของเมทริกซ์ของข้อมูลความเข้มข้นและข้อมูลสเปกตรัมควรจะเหมือนกัน อย่างไรก็ตามในกรณีของตัวอย่างจริง ถ้าเมทริกซ์นั้นถูกลดขนาดลงโดยวิธีการทางคณิตศาสตร์อย่างบริสุทธิ์ ค่าความผิดพลาดในการเตรียมตัวอย่างและในวิธีอ้างอิงที่ใช้ในการวัดค่าความเข้มข้นและการเกิดดริฟท์ (Drift) ของเครื่องวัดและสัญญาณรบกวนในสเปกตรัมจะก่อให้เกิดความแตกต่างของ scores vectors ดังนั้นในวิธี PLS จะสมมติว่า scores vectors ที่เหมือนกัน (Identical) สำหรับชุดข้อมูลทั้งสองที่จำนวนแฟกเตอร์ใดๆ ซึ่งจะถูกละเลือกเมื่อค่าความคลาดเคลื่อนจากค่าเริ่มต้นมีค่าน้อยที่สุด เป็นการประนีประนอมระหว่างความเหมาะสมของแฟกเตอร์ที่ใช้ในการอธิบายตัวอย่างและความสัมพันธ์ที่เพิ่มขึ้นในระหว่างชุดข้อมูล

การพิสูจน์แบบจำลองทางเคโมเมตริกซ์และการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ไม่รู้ค่า

$$Y_{\text{Analysis}} = X_{\text{Analysis}} \cdot b$$

โดย X_{Analysis} : ข้อมูลสเปกตรัมของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

Y_{Analysis} : ค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

การคำนวณ Calibration ฟังก์ชัน b จะทำให้ได้ความเข้มข้นโดยตรงจากสเปกตรัมเหล่านั้น ระดับของความสัมพันธ์ (Correlation) ที่ได้จากข้อมูลเชิงสเปกตรัมกับข้อมูลเชิงความเข้มข้นเป็นสิ่งที่

มีความสำคัญหลักของคุณภาพของการวิเคราะห์ หากมีค่าความสัมพันธ์ที่ดีการวิเคราะห์จะมีความแม่นยำ ในทางกลับกันหากมีค่าความสัมพันธ์ไม่ดีจะไม่สามารถนำไปสู่ผลการวิเคราะห์ที่ดีได้ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะหาค่าฟังก์ชันของการ Calibration b ที่ให้ค่าความสัมพันธ์ที่ดีที่สุด

แบบจำลองที่ต้องการต้องตรวจสอบความถูกต้อง (Validate) ซึ่งทำโดยใช้แบบจำลองทำนายตัวอย่างจำนวนหนึ่งที่รู้ค่าความเข้มข้น การเปรียบเทียบค่าที่ทำนายได้กับค่าจริงจะแสดงให้เห็นถึงความแม่นยำของแบบจำลอง ซึ่งจะใช้พารามิเตอร์ต่างๆในการประเมินชุดของพารามิเตอร์ซึ่งแสดงถึงการทำนายที่มีข้อผิดพลาดน้อยสุดจะชี้ให้เห็นถึงวิธีการที่ดีที่สุด การพิสูจน์วิธีทางเคโมเมตริกซ์ต่างๆทำให้รู้ถึงตัวแปรที่ผิดปกติ (Outlier) และช่วงความถี่ที่เหมาะสมที่สุด และทำให้รู้ถึงจำนวนแพ็คเกจที่เหมาะสมได้ การพิสูจน์ มี 2 วิธี ที่เป็นไปได้คือ การพิสูจน์ภายใน (Internal validation) หรือที่เรียกว่า การพิสูจน์แบบไขว้ (Cross validation) และการพิสูจน์ภายนอก (External validation) หรือที่เรียกว่าการพิสูจน์แบบชุดทดสอบ (Test set validation)

ในกรณีของการพิสูจน์ภายใน ตัวอย่างแต่ละตัวอย่างหรือแต่ละชุดตัวอย่างจะถูกเลือกออกมาจากชุดข้อมูล Calibration แล้วใช้ตัวอย่างที่เหลือสร้างแบบจำลอง และใช้แบบจำลองวิเคราะห์ค่าของตัวอย่างที่ถูกเลือกออกไป การเปรียบเทียบผลกับค่าที่วัดจริง การเลือกตัวอย่างหรือชุดตัวอย่างออกมาก่อนจะทำให้ชุดข้อมูลเป็นอิสระต่อกัน โดยวิธีนี้มีความแม่นยำของการทำนายสามารถประเมินข้อมูลได้ทั้งหมด ตัวอย่างที่ถูกเลือกออกไปจะถูกนำเข้ามาในชุดข้อมูลเดิม แล้วเลือกตัวอย่างชุดที่ 2 ออกไป การเปรียบเทียบค่าที่ทำนายได้กับค่าจริงจะช่วยให้ คำนวณค่าความผิดพลาดของการทำนายของระบบข้อมูลทั้งหมด ซึ่งคือค่า RMSEC (Root Mean Square Error of Cross Validation) สิ่งนี้ใช้สำหรับการประเมินความถูกต้องเฉลี่ยในการทำนายของแบบจำลองเคโมเมตริกซ์ ซึ่งถ้าค่าความผิดพลาด (error) น้อย แสดงว่าแบบจำลองนั้นมีคุณภาพดี

สำหรับการทำการพิสูจน์แบบไขว้ (Cross Validation) มันมีความสำคัญตรงที่ต้องนำตัวอย่างไม่กี่ตัวอย่างออกจากชุดข้อมูลซึ่งแบบจำลองจะถูกสร้างจากข้อมูลที่เหลืออยู่ ทำให้แบบจำลองจึงมีลักษณะเหมือนกับแบบจำลองที่สร้างจากชุดข้อมูลเริ่มต้น สำหรับชุดข้อมูลซึ่งมีตัวอย่างน้อยกว่า 50 ตัวอย่างมีข้อเสนอว่าต้องนำออกที่ละ 1 ตัวอย่างเพื่อทำการพิสูจน์แบบไขว้

การประเมินค่าคุณภาพด้วยวิธีการพิสูจน์ภายนอก ซึ่งตรงกันข้ามกับการพิสูจน์ภายใน ตัวอย่างทั้งหมดของชุด Calibration ถูกใช้ในการทำโมเดล โมเดลนี้ยังคงคงที่สำหรับการพิสูจน์ต่อไป นั่นคือ สเปกตรัมในการวิเคราะห์จะไม่ถูกเอาออกจากชุด Calibration เพื่อที่จะประมาณค่าความคลาดเคลื่อนของการทำนายต้องวัดตัวอย่างอื่นๆและจัดให้เป็นชุดทดสอบสำหรับการพิสูจน์ ตัวอย่างเฉพาะของชุดทดสอบจะถูกวิเคราะห์ โดยชุดข้อมูลของการพิสูจน์ภายนอกจะถูกแบ่งเป็นชุด Calibration และตัวอย่างที่วิเคราะห์ซึ่งตรงข้ามกับการพิสูจน์แบบไขว้ (cross validation) ที่จะไม่มีการ

การแลกเปลี่ยนระหว่าง 2 ชุดตัวอย่าง การเปรียบเทียบผลของการวิเคราะห์ด้วยแบบจำลองกับข้อมูลความเข้มข้นเดิมของชุดทดสอบจะถูกใช้คำนวณ RMSEP (root mean square error of prediction) ซึ่งเป็นตัวแทนการวัดเชิงปริมาณเพื่อทำนายความแม่นยำของแบบจำลองแบบจำลองที่ดีจะต้องมีค่า RMSEP ต่ำ การพิสูจน์ภายในและการพิสูจน์ภายนอกจะนำไปสู่ผลที่ใกล้เคียงกัน

ขั้นตอนการพิสูจน์แบบชุดทดสอบ (a test set validation, external validation)

1. สร้างแบบจำลองโดยใช้สเปกตรัมทั้งหมดในชุด Calibration
2. ประเมินแบบจำลอง โดยใช้ตัวอย่างชุดทดสอบใหม่ โดยรู้ค่าความเข้มข้นโดยคำนวณความผิดพลาดเฉลี่ยของการทำนาย (mean error of prediction, RMSEP) จากค่าความผิดพลาด¹⁶

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

- 3.1.1 Diclofenac sodium
- 3.1.2 Corn starch
- 3.1.3 Lactose
- 3.1.4 Polyvinylpyrrolidone K30
- 3.1.5 Avicel
- 3.1.6 Magnesium stearate
- 3.1.7 Talcum
- 3.1.8 Aerosil

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในโครงการวิจัย

- 3.2.1 UV-Visible spectrophotometer
- 3.2.2 ATR-FTIR

3.3 วิธีเตรียมตำรับ

3.3.1 การศึกษาก่อนการตั้งตำรับ

- 1) เลือกชนิดและปริมาณของสารช่วยที่ใช้ในการตั้งตำรับยาเม็ด diclofenac sodium
- 2) บดผสมสารช่วยในโกร่ง (geometric dilution)
- 3) เติม Isopropyl Alcohol ลงไปผสมจนได้ damp mass
- 4) นำ damp mass ที่ได้มาผ่านแรงให้ได้เป็นแกรนูลเปียก (รูปตัวหนอน)
- 5) อบใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลาประมาณ 20 นาทีจนแกรนูลแห้ง
- 6) นำแกรนูลแห้งที่ได้มาชั่งและเติม Talcum, Aerosil และ Magnesium stearate
- 7) ตอกเม็ดด้วยเครื่อง single punch tablet machine
- 8) ประเมินลักษณะของแกรนูลแห้งและเม็ดยา เช่น น้ำหนัก ความแข็ง เพื่อเลือกตำรับที่ดีที่สุด

3.3.2 การเตรียมสารตัวอย่าง diclofenac sodium ในขั้นตอนการผสม

1) ชั่งน้ำหนัก diclofenac sodium และผสมกับสารช่วยจากตำรับที่เลือก โดยเตรียมตำรับ 5 ความแรง (5, 10, 25, 50 และ 100 mg/tab)

2) สุ่มตัวอย่างให้มีจำนวน 50 ตัวอย่างเพื่อใช้หาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณตัวยา diclofenac sodium

3.4 วิธีวิเคราะห์ปริมาณตัวยา diclofenac sodium

3.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณตัวยาด้วยเทคนิค UV-Visible spectrophotometry

วิธีวิเคราะห์ปริมาณตัวยา diclofenac sodium เพื่อใช้เป็น reference concentrations พัฒนาจากเทคนิค UV-Visible spectrophotometry¹⁰

1) การวิเคราะห์หาความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด

1.1) ละลายสารมาตรฐาน diclofenac sodium ด้วย DI water ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 25 µg/mL

1.2) นำสารละลายมาตรฐานสแกนค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ความยาวคลื่น 220 ถึง 400 nm ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer

1.3) บันทึกสเปกตรัมของสารมาตรฐานเพื่อหาความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด

2) การสร้างกราฟมาตรฐาน

2.1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน diclofenac sodium ใน DI water ให้มีความเข้มข้น 4-40 µg/mL

2.2) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน และสร้าง standard curve ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น

3) การวิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญ

3.1) ละลายสารตัวอย่างด้วย DI water

3.2) นำสารตัวอย่างไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer และคำนวณหาปริมาณยา diclofenac จาก standard curve ความเข้มข้นที่ได้ใช้เป็น reference concentrations

4) การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี UV-visible spectrophotometry โดยพิจารณา specificity, linearity, range, accuracy, precision

3.4.2 การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR)

1) นำตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ATR-FTIR แสดงในตารางที่ 3.1 โดยกำหนดให้ใช้พารามิเตอร์เดียวกันในการวิเคราะห์ทุกตัวอย่าง

ตารางที่ 3.1 แสดงพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

Parameter	Value
Sample compartment	Main
Detector	DTGS KBr
Source	IR
Window	Diamond
Range	4000-649 cm^{-1}
Gain	4.0
Optical velocity	0.4747 cm^{-1}
Aperture	100

2) บันทึก IR spectrum ของสารตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ย

3.4.3 การใช้เทคนิค chemometrics ช่วยในการวิเคราะห์ปริมาณสาร

diclofenac sodium

1) การสร้าง calibration model

1.1) เลือกตัวอย่างแบบสุ่มจำนวน 30 ตัวอย่างเพื่อใช้เป็น calibration set ในการสร้าง calibration model

1.2) สร้าง calibration model จาก IR spectrum กับปริมาณของ diclofenac sodium ในตัวอย่างที่ได้จากเทคนิค UV-visible spectrophotometry และทำ pretreatment data ด้วยวิธี Standard Normal Variate (SNV), Savitzky-Golay smoothing, Baseline, Normalize, First derivative, Second derivative

1.3) เลือก calibration model ที่ดีที่สุดโดยพิจารณาจากค่า R^2 ของ model ที่ได้ให้มีค่าเข้าใกล้ 1

2) การหาปริมาณ diclofenac sodium ในตัวอย่าง

2.1) สารตัวอย่างที่เหลือ 20 ตัวอย่างนำมาใช้เป็น validation set

2.2) นำ IR spectrum ของสารตัวอย่างกลุ่ม validation set มาวิเคราะห์หาปริมาณ diclofenac sodium โดยใช้ calibration model ที่ดีที่สุดที่สร้างขึ้น

2.3) เปรียบเทียบค่าที่ได้กับค่า reference concentrations

3) การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ¹⁷

3.1) Linearity วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นต้องมีค่า correlation coefficient (*r*) มากกว่า 0.9 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี UV-visible spectrophotometry

3.2) Accuracy วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นต้องมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 97.0-103.0%

3.3) Precision วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นต้องมีค่า %RSD ไม่เกิน 2%

3.4) Root mean squared error of prediction (RMSEP) เป็นค่าพื้นฐานที่ใช้ประเมินความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่เป็น multivariate analysis สามารถคำนวณได้จาก

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{N} \sum (\hat{y}_i - y_{l,ref})^2} \quad (1)$$

เมื่อ N = จำนวนตัวอย่างของ validation set
 $\hat{y}_i$ = ปริมาณ diclofenac sodium ที่ได้จากโมเดล
 $y_{l,ref}$ = ปริมาณ diclofenac sodium จากวิธี reference

บทที่ 4

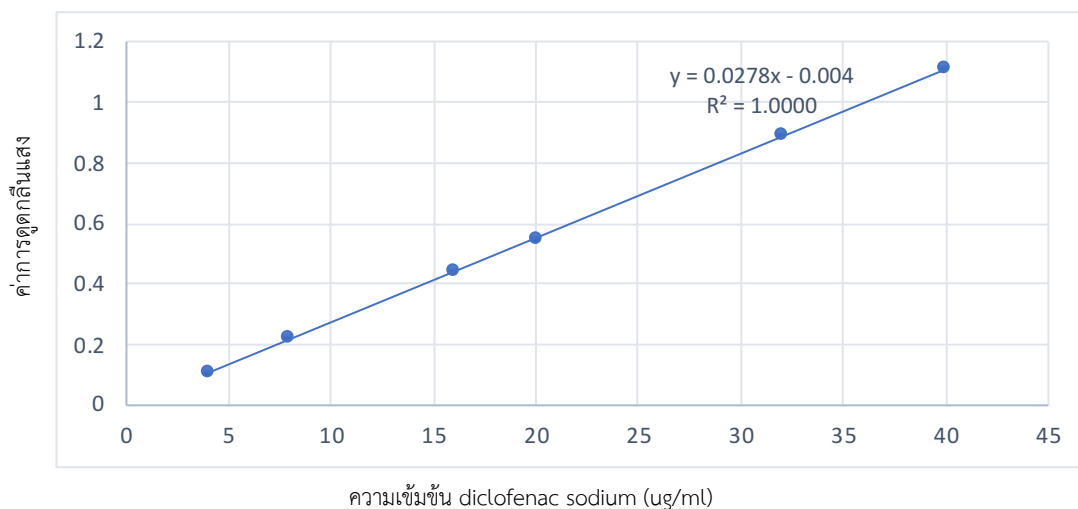
ผลการวิจัย

4.1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของยา diclofenac sodium ต่อค่าการดูดกลืนแสง

สร้างกราฟมาตรฐานของยา diclofenac sodium ความเข้มข้น 4.00-40.00 $\mu\text{g/mL}$ ที่ความยาวคลื่น 276 nm มีค่าการดูดกลืนแสงดังแสดงในตารางที่ 4.1 ได้สมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยา diclofenac sodium และค่าการดูดกลืนแสงคือ $Y = 0.0278X - 0.004$ มีค่าความชันของกราฟเป็น 0.0278 จุดตัดแกน Y ที่ -0.004 และค่า R^2 เท่ากับ 1 ดังรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน diclofenac sodium และค่าการดูดกลืนแสง

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสง	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย
4	0.10569	0.10571
	0.10581	
	0.10562	
8	0.22388	0.22152
	0.22097	
	0.21971	
16	0.43973	0.43930
	0.43906	
	0.43921	
20	0.55119	0.55173
	0.55185	
	0.55216	
32	0.88813	0.88889
	0.88841	
	0.89014	
40	1.10683	1.10726
	1.10736	
	1.10758	



รูปที่ 4.1 กราฟมาตรฐานของยามาตรฐาน diclofenac sodium

4.2 ปริมาณตัวยาสำคัญในสารตัวอย่าง

สุ่มตัวอย่างจากขั้นตอนการผสมของการเตรียมตำรับ diclofenac sodium ที่ความแรง 5, 10, 25, 50 และ 100 mg/tab ความแรงละ 10 ตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-visible spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 276 nm และนำค่าที่ได้คำนวณความเข้มข้นจากสมการเส้นตรงที่ได้จากหัวข้อ 4.2 คำนวณความเข้มข้นของตัวยา diclofenac sodium ได้ปริมาณตัวยา diclofenac sodium ที่แท้จริงของ 50 ตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ปริมาณตัวยา diclofenac sodium ของ 50 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	ปริมาณ diclofenac sodium (mg/tab)			
	วิเคราะห์ครั้งที่ 1	วิเคราะห์ครั้งที่ 2	วิเคราะห์ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
1	5.08	5.22	5.26	5.19
2	5.05	5.04	5.00	5.03
3	5.18	5.20	5.22	5.20
4	4.97	4.99	4.97	4.97
5	4.83	4.84	4.86	4.84
6	4.89	4.93	4.95	4.92
7	5.35	5.40	5.42	5.39
8	5.17	5.18	5.18	5.18
9	4.57	4.58	4.56	4.57
10	4.90	4.89	4.89	4.90

11	10.11	10.20	10.24	10.19
12	11.99	12.05	12.06	12.03
13	10.08	10.05	10.04	10.06
14	10.09	10.10	10.11	10.10
15	9.85	9.92	9.94	9.90
16	10.90	10.91	10.84	10.88
17	11.50	11.49	11.51	11.50
18	9.63	9.63	9.65	9.64
19	9.97	9.99	9.98	9.98
20	10.91	10.92	10.92	10.91
21	25.09	24.93	24.89	24.97
22	24.19	24.16	24.14	24.16
23	24.63	24.55	24.56	24.58
24	24.61	24.76	24.76	24.71
25	24.21	24.29	24.51	24.34
26	24.18	24.08	23.77	24.01
27	23.32	23.21	23.26	23.26
28	24.11	23.94	23.82	23.96
29	24.99	24.94	24.83	24.92
30	24.22	24.08	24.19	24.17
31	48.22	48.97	48.97	48.72
32	48.87	48.75	48.66	48.76
33	47.10	46.77	46.76	46.88
34	48.48	48.47	48.40	48.45
35	50.21	49.92	49.95	50.03
36	50.12	50.06	49.96	50.04
37	45.94	45.76	45.59	45.76
38	46.93	46.79	46.58	46.77
39	46.50	46.65	46.52	46.56
40	51.26	51.35	51.23	51.28

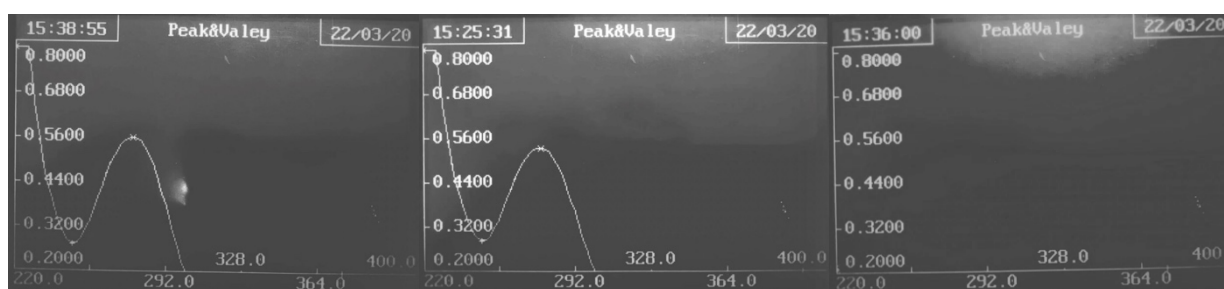
41	99.06	99.84	98.55	99.15
42	100.76	100.11	99.88	100.25
43	97.08	96.95	96.94	96.99
44	99.42	99.34	99.40	99.39
45	97.42	97.46	97.45	97.44
46	97.80	97.00	97.81	97.87
47	100.37	100.27	100.41	100.35
48	98.70	98.65	98.46	98.60
49	102.04	101.64	101.63	101.77
50	99.38	99.49	99.81	99.56

4.3 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของ UV-visible spectrophotometry

4.3.1 Specificity

นำสารละลายมาตรฐาน diclofenac sodium ความเข้มข้น 20.15 µg/mL มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ในช่วงความยาวคลื่น 220 – 400 nm พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น (λ_{max}) ของตัวยา diclofenac sodium เท่ากับ 276 nm

นำตัวอย่างตำรับยา diclofenac sodium ความเข้มข้น 25.7 µg/mL มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ในช่วงความยาวคลื่น 220 – 400 nm พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น (λ_{max}) ของตัวยา diclofenac sodium เท่ากับ 276 nm UV spectrum ของสารมาตรฐานและตำรับยา diclofenac sodium แสดงดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 แสดง UV spectrum ของสารมาตรฐาน diclofenac sodium, ตำรับยา diclofenac sodium และ placebo ตามลำดับ

4.3.2 Linearity

สารละลายมาตรฐาน diclofenac sodium ที่ความเข้มข้น 4.00-40.00 µg/mL วิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ได้ผลดังตารางที่ 4.1 โดยสมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยา diclofenac sodium และค่าการดูดกลืนแสงคือ $Y = 0.0278X - 0.004$ มีค่าความชันของกราฟเป็น 0.0278 จุดตัดแกน Y ที่ -0.004 และค่า R^2 เท่ากับ 1 ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์มีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่าสมการ $Y = 0.0278X - 0.004$ มีความสัมพันธ์เชิงตรง สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญจากค่าการดูดกลืนแสงได้

4.3.3 Limit of quantity (LOQ)

ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจหาเชิงปริมาณโดยมีความเที่ยงและความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิค UV-visible spectrophotometry เท่ากับ 4.01 µg/mL

4.3.4 Accuracy and Precision

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy) โดยใช้สารละลายมาตรฐาน diclofenac sodium ซึ่งตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน diclofenac sodium เรียกว่า spiked sample และตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน diclofenac sodium เรียกว่า unspiked sample ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พิจารณาจากค่า %recovery ของ spiked sample ซึ่งผลการทดสอบพบว่าอยู่ในช่วง 98.8-100.6 % ซึ่งผ่านเกณฑ์ตาม AOAC guideline 2016¹⁷ ที่กำหนดให้มีค่า %recovery อยู่ระหว่าง 97.0 – 103.0

การทดสอบความแม่นยำ (Precision) ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำในสภาวะเดียวกันเพื่อหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยพิจารณาจาก %RSD จากผลการวิเคราะห์พบว่าค่า %RSD ของความเข้มข้นของสารละลายแสดงดังตารางที่ 4.3 และพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.5-1.6 % ซึ่งมาตรฐานกำหนดให้ค่า %RSD ต้องมีค่าไม่เกิน 2% จึงผ่านเกณฑ์แสดงว่าวิธีดังกล่าวมีความแม่นยำในการวิเคราะห์ที่ทดสอบ

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำใน Intra-day และ Inter-day

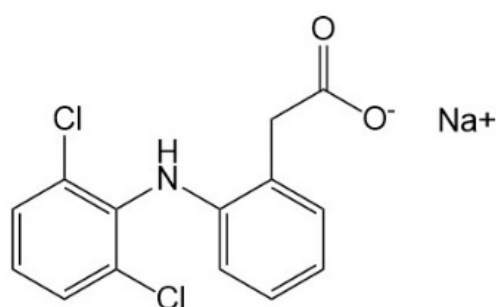
Diclofenac spike concentrations	Accuracy (% Recovery ± SD)			
	Intra-day			Inter-day (n=3)
	Day 1 (n=3)	Day 2 (n=3)	Day 3 (n=3)	
8 µg/mL	97.9 ± 0.9	101.4 ± 0.7	97.1 ± 0.5	98.8 ± 2.3
16 µg/mL	100.1 ± 2.9	103.4 ± 0.9	98.1 ± 1.0	100.5 ± 2.7
40 µg/mL	101.1 ± 1.6	102.9 ± 0.8	97.9 ± 1.7	100.6 ± 2.5

Precision (%RSD)	1.6	1.0	0.5	1.4
------------------	-----	-----	-----	-----

4.4 อินฟราเรดสเปกตรัมของสารตัวอย่างที่วิเคราะห์

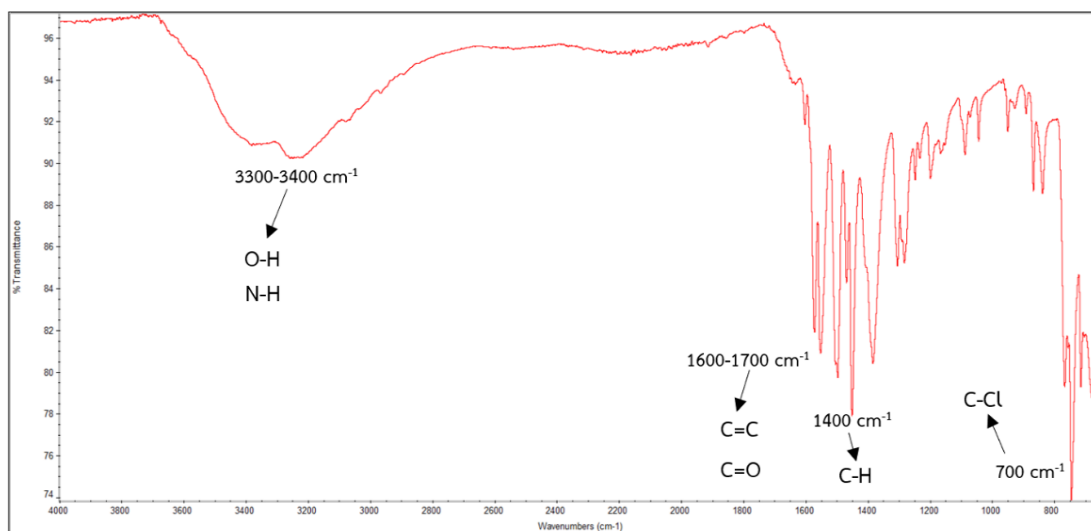
4.4.1 อินฟราเรดสเปกตรัมของสารมาตรฐาน diclofenac sodium

โครงสร้างทางเคมีของ diclofenac sodium ที่เป็นตัวยาสำคัญของตำรับแสดงดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 โครงสร้างทางเคมีของ diclofenac sodium ที่เป็นตัวยาสำคัญของตำรับ

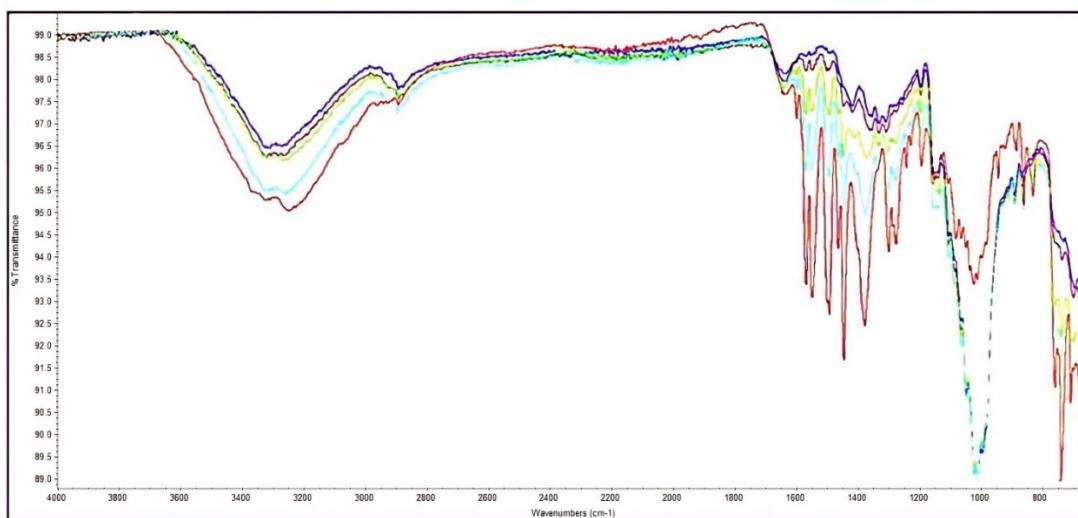
เมื่อนำสารมาตรฐาน diclofenac sodium บันทึกลงอินฟราเรดสเปกตรัมโดยวัดค่า %Transmittance ที่ Wavenumber 649- 4000 cm^{-1} ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ได้สเปกตรัมของสารมาตรฐานดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 สเปกตรัมของสารมาตรฐาน diclofenac sodium

4.4.2 สเปกตรัมของสารตัวอย่าง

สุ่มตัวอย่างในขั้นตอนการผสมของตำรับที่ความแรง 5, 10, 25, 50 และ 100 mg/tab ความแรงละ 10 ตัวอย่างบันทึกอินฟราเรดสเปกตรัมโดยวัดค่า %Transmittance ที่ Wavenumber 649-4000 cm^{-1} ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ได้สเปกตรัมของความแรง 5, 10, 25, 50 และ 100 mg/tab ดังรูปที่ 4.5



— 5 mg — 10 mg — 25 mg — 50 mg — 100 mg

รูปที่ 4.5 สเปกตรัมของปริมาณตัวยาสำคัญที่ความแรง 5, 10, 25, 50 และ 100 mg/tab

4.5 การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค chemometrics

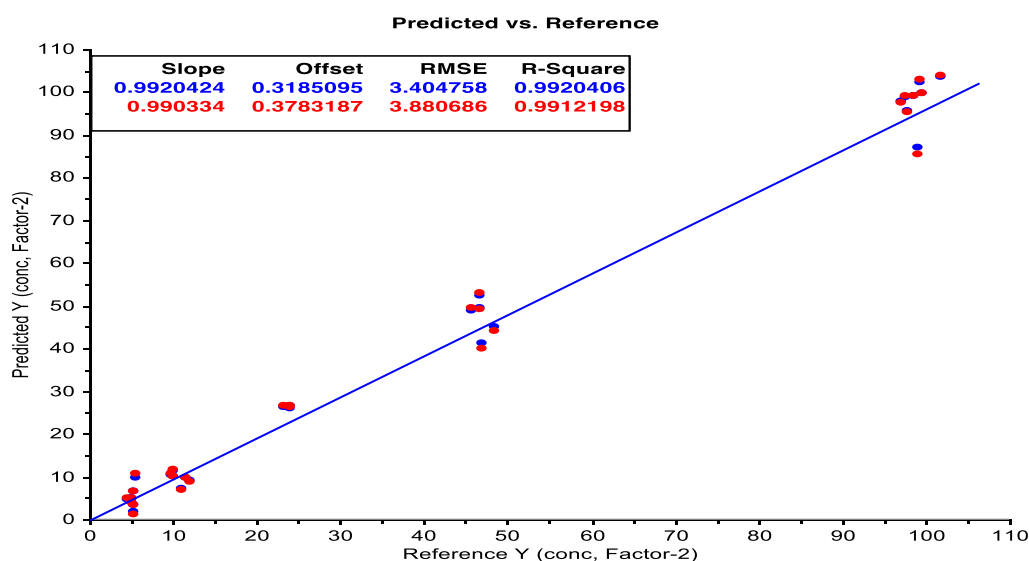
การวิเคราะห์โดยเทคนิค chemometrics ทำโดยนำ IR spectrum และความเข้มข้นที่แท้จริงของ diclofenac sodium ที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค UV-visible spectrophotometry ของแต่ละตัวอย่างมาสร้าง PLS-R model ด้วยโปรแกรม Unscramble X และแบ่งตัวอย่างจำนวน 30 ตัวอย่างเพื่อเป็น calibration set และใช้สำหรับสร้าง model ความสัมพันธ์ระหว่าง IR spectrum และปริมาณของ diclofenac sodium ในตัวอย่างที่ได้จากเทคนิค UV-visible spectrophotometry และตัวอย่างที่เหลือจำนวน 20 ตัวอย่างกำหนดเป็น validation set เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ diclofenac sodium จาก PLS-R model ที่สร้างขึ้นและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

4.5.1 Calibration model

ตัวอย่างจำนวน 30 ตัวอย่างถูกเลือกโดย Kennard-stone sample selection หรือเลือกตัวอย่างที่เป็น outlier จากข้อมูล principle component analysis (PCA) เพื่อกำหนดเป็น calibration set ใช้สำหรับสร้าง PLS-R model เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ diclofenac sodium ในตัวอย่าง ผลของการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วยการสร้าง PLS-R model ด้วยวิธีต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 4.4 โดย PLS-R model ที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีที่สุดสร้างจาก IR spectrum ที่ pretreatment ด้วย SNV มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9920 เมื่อเทียบกับ reference concentration ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-visible spectrophotometry

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการสร้าง PLS-R model สำหรับวิเคราะห์ปริมาณ diclofenac sodium จาก IR spectrum

Pretreatment	Factor	Range (cm ⁻¹)	R ²
Standard Normal Variate (SNV)	2	649-4000	0.9920
Savitzky-Golay smoothing	7	649-4000	0.9935
Baseline	6	649-4000	0.9938
Normalize	5	649-4000	0.9717
First derivative	4	649-4000	0.9960
Second derivative	4	649-4000	0.9996



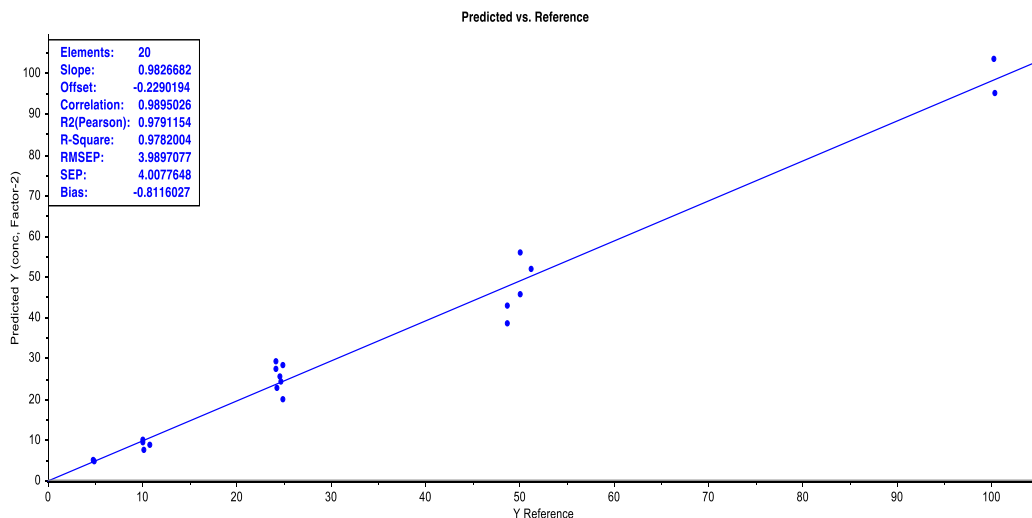
รูปที่ 4.6 Calibration model ที่ดีที่สุดของการวิเคราะห์ปริมาณ diclofenac sodium

4.5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ diclofenac sodium ในสารตัวอย่าง

ตัวอย่างที่เหลือจำนวน 20 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์ปริมาณ diclofenac sodium จาก PLS-R model ที่สร้างขึ้น โดยผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 4.5 และเมื่อเปรียบเทียบค่าที่ predict ได้จาก PLS-R model กับ reference concentration แสดงในรูปที่ 4.7

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณ diclofenac sodium ที่วิเคราะห์ได้จาก PLS-R model ที่พัฒนาขึ้น

ID	ปริมาณ diclofenac sodium จาก reference method (mg/tab)	ปริมาณ diclofenac sodium จาก PLS-R model (mg/tab)
5-5-2	4.84	5.00
5-6-2	4.92	4.60
10-1-2	10.19	7.62
10-3-2	10.06	9.34
10-4-2	10.10	10.00
10-6-2	10.88	8.78
25-1-2	24.97	19.95
25-2-2	24.16	27.26
25-3-2	24.58	25.56
25-4-2	24.71	24.27
25-5-2	24.34	22.67
25-9-2	24.92	28.28
25-10-2	24.17	29.18
50-1-2	48.72	38.59
50-2-2	48.76	42.82
50-5-5	50.03	55.90
50-6-2	50.04	45.55
50-10-2	51.28	51.90
100-2-2	100.25	103.63
100-7-2	100.35	95.13



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงค่าการทำนายปริมาณ diclofenac sodium ที่วิเคราะห์ได้จาก Calibration model

4.5.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

1) Linearity

plot ค่าความเข้มข้นที่ predict ได้จาก PLSR model ของตัวอย่างกลุ่ม validation set กับ ค่าความเข้มข้นที่แท้จริงจากวิธีมาตรฐาน ได้ค่า $R^2 = 0.9782$ โดยพิจารณาว่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9890 ควรเข้าใกล้ 1.00 เพื่อบ่งบอกว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเป็นเส้นตรง เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน

2) Accuracy

การวิเคราะห์ความถูกต้องกำหนดให้มี %Recovery อยู่ในช่วง 97.0-103.0 % จากผลการวิเคราะห์พบว่ามี %Recovery อยู่ในช่วง 92.9-104.0 % และคำนวณ linearity regression ระหว่าง ค่าความเข้มข้นที่ predict ได้กับค่าความเข้มข้นที่แท้จริงจากวิธีมาตรฐานจากตัวอย่างกลุ่ม validation set จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยต้องมีค่าความเชื่อมั่น $\pm 95\%$ ของ slope คร่อม 1.0 indicate บ่งบอกความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีมาตรฐาน

การรายงานค่า accuracy = (Slope ($\pm 95\%$ CI)) = 0.9941 (0.9461-1.0420)

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.998256
R Square	0.996515
Adjusted R Square	
Standard Error	2.293539
Observations	10

ANOVA					
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	12032.06	12032.06	2287.324	4.04E-11
Residual	8	42.08258	5.260322		
Total	9	12074.14			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i>	<i>Upper 95.0%</i>
Intercept	-0.1229	1.035294	-0.11871	0.908429	-2.51029	2.264489	-2.51029	2.264489
X Variable 1	0.994103	0.020786	47.82597	4.04E-11	0.946171	1.042036	0.946171	1.042036

รูปที่ 4.8 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

พบว่าความเชื่อมั่น 95% CI มีค่าอยู่ในช่วง 0.9461-1.0420 ซึ่งมีค่าคร่อม 1 สรุปได้ว่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นไม่มีความแตกต่างจากวิธีมาตรฐาน

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบความถูกต้อง

Predicted	Reference	% Recovery
5.00	4.84	103.35
4.60	4.92	93.35
9.34	10.06	92.86
10.00	10.10	99.09
25.56	24.58	103.97
24.27	24.71	98.23
22.67	24.34	93.17
51.90	51.28	101.21
103.63	100.25	103.37
95.13	100.35	94.80

3) Precision

การวิเคราะห์ความแม่นยำกำหนดให้มี %RSD ไม่เกิน 2% จากผลการวิเคราะห์พบว่า มี %RSD เท่ากับ 2.4% ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน จึงพิจารณาจากค่า HorRat ที่กำหนดให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.3-1.3 พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.2

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำ

Predicted	Reference	%Recovery	Mean	SD	RSD	HorRat
5.00	4.84	103.35	101.54	2.43	2.40	1.20
10.00	10.10	99.09				
25.56	24.58	103.10				
24.27	24.71	98.23				
51.90	51.28	101.21				
103.63	100.25	103.37				

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญ โดยใช้วิธีเคโมเมตริกซ์ช่วย FTIR สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเป็นเครื่องมือของเทคโนโลยีการวิเคราะห์ในกระบวนการเฝ้าติดตามสายการผลิตในขั้นตอนการผลิตยา Diclofenac แทนวิธี UV-visible spectrophotometry ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานได้

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาการเฝ้าติดตามสายการผลิตในกระบวนการผสมยาเม็ด Diclofenac โดยใช้วิธีเคโมเมตริกซ์ช่วย FTIR เพื่อเป็นเครื่องมือของเทคโนโลยีการวิเคราะห์ในกระบวนการ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยวิธี UV-visible spectrophotometry พบว่าตัวยา Diclofenac sodium มีความจำเพาะเจาะจงที่ความยาวคลื่นสูงสุดเท่ากับ 276 นาโนเมตร โดยความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของ Diclofenac sodium และค่าการดูดกลืนแสง ได้สมการเส้นตรง $Y = 0.0277X - 0.0118$ โดย Y คือค่าการดูดกลืนแสง X คือ ความเข้มข้นของ Diclofenac sodium และมีค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 0.9999 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ พบว่าความถูกต้องมีค่า %recovery เท่ากับ 98.8-100.6 % ผ่านเกณฑ์ตาม AOAC guideline ที่กำหนดให้มีค่า %recovery อยู่ระหว่าง 97.0 – 103.0 % ความแม่นยำมีค่า %RSD เท่ากับ 1.4 % ซึ่งผลการวิเคราะห์ของสารละลายผ่านเกณฑ์ที่กำหนดให้มีค่า %RSD ต้องไม่เกิน 2% จึงสามารถสรุปได้ว่าวิธี UV-visible spectrophotometry เป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ในการหาปริมาณตัวยา Diclofenac sodium ดำรงได้เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจง แม่นยำและมีความถูกต้อง แต่วิธีดังกล่าวใช้ระยะเวลาในการเตรียมเครื่องมือและสารตัวอย่างเป็นระยะเวลานานและสามารถวิเคราะห์ได้เฉพาะสารที่มีโครงสร้างที่มี chromophore เท่านั้น จึงพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญขึ้น โดยใช้วิธีวิเคราะห์ Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ร่วมกับวิธีเคโมเมตริกซ์

จากผลการศึกษาวิธีวิเคราะห์ Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ร่วมกับวิธีเคโมเมตริกซ์พบว่า จาก calibration model ได้ค่า $R^2 = 0.9920$ ดังนั้นมีค่า correlation coefficient (r) = 0.9960 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่าข้อมูลระหว่าง X และ Y มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พบว่าความถูกต้องมีค่า %recovery เท่ากับ 92.9-104.0 % ความแม่นยำมีค่า %RSD เท่ากับ 2.4 % ซึ่งผลการวิเคราะห์ของสารละลายไม่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนดให้มีค่า %RSD ต้องไม่เกิน 2% จึงพิจารณาจากค่าแนะนำสำหรับการยอมรับได้ของวิธีวิเคราะห์ความแม่นยำ (HorRat) เท่ากับ 1.2 ผ่านเกณฑ์ตาม AOAC guideline ที่กำหนดให้มีค่า HorRat อยู่ระหว่าง 0.3-1.3 และผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ANOVA ของตัวยาสำคัญมีค่า p-value เท่ากับ 0.9941 ($\text{sig} < 0.05$) ซึ่งถือว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญ โดยใช้วิธีเคโมเมตริกซ์ช่วย FTIR สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเป็นเครื่องมือของเทคโนโลยีการวิเคราะห์ในกระบวนการเฝ้าติดตามสายการผลิตในขั้นตอนการผสมยา Diclofenac แทนวิธี UV-visible spectrophotometry ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานได้

รายการสรุปการเงิน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การเฝ้าติดตามสายการผลิตในกระบวนการผสมยาเม็ด Diclofenac โดยใช้
วิธีเคโมเมตริกซ์ช่วย FTIR เพื่อเป็นเครื่องมือของเทคโนโลยีการวิเคราะห์ในกระบวนการ
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ญญ.ดร.พุทธิพร คงแก้ว

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 22 กรกฎาคม พ.ศ.2564 ถึงวันที่ 19 มีนาคม พ.ศ.2565

ระยะเวลาการดำเนินการ 7 เดือน 28 วัน ตั้งแต่วันที่ 22 กรกฎาคม พ.ศ.2564

จำนวนเงินที่ได้รับ (100%) 15,000 บาท เมื่อวันที่ 21 มกราคม พ.ศ.2565

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/ เกิน
ค่าสารเคมี	8,000	8,000	0
ค่าวัสดุอุปกรณ์อื่นๆ	2,500	2,500	0
ค่าเดินทาง	3,000	3,000	0
ค่าจัดทำรูปเล่ม รายงาน	1,000	960	40
ค่าโปสเตอร์	500	540	-40
รวม	15,000	15,000	0

(.....)

ญญ.ดร.พุทธิพร คงแก้ว

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

บรรณานุกรม

1. ธงชัย ก่อสันติรัตน์. ยาลดการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์. Journal of Medicine and Health Sciences Faculty Medicine, Srinakharinwirot University 2010;17(2):98-113.
2. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. สืบค้นผลิตภัณฑ์ยา [Internet]. 2016 [cited 2021 Nov 21].
3. V. B. Khot DAB, J. I. D'Souza, S. S. Shelake, S. V. Patil. Optimization of granulation techniques for development of tablet dosage form. 2017;4(12):4626-39.
4. Thirupathi Dongala AKP, Kiran Kumar Velaveni, and Naresh Kumar Katar. Development and Validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Diclofenac Potassium and its Process Related Impurities in Solid Oral Dosage Form. 2018;9(6):1-15.
5. Rajesh Shukla AD, Vikas Pandey, Dilip Golhani, Alok Pal Jain. Chromophore- An Utility in UV Spectrophotometer. 2012;2012(3):1-3.
6. Khan SA, Khan SB, Khan LU, Farooq A, Akhtar K, Asiri AM. Fourier transform infrared spectroscopy: fundamentals and application in functional groups and nanomaterials characterization. Handbook of Materials Characterization: Springer; 2018. p. 317-44.
7. Zhiwei Li BL, Zhizhong Zhao , Weizhong Ma , Wenju Li ,and Jiadong Wang. Rapid Identification and Quantitative Analysis of Polycarboxylate Superplasticizers Using ATR-FTIR Spectroscopy Combined with Chemometric Methods. 2021;2021:1-13.
8. รองศาสตราจารย์ ลาวัลย์ ศรีพงษ์. เทคโนโลยีการวิเคราะห์กระบวนการ ตอนที่1 หลักการเบื้องต้น. วารสารไทยโภชนาพันธ์. 2553:20-34.
9. รองศาสตราจารย์ ลาวัลย์ ศรีพงษ์. เทคโนโลยีการวิเคราะห์กระบวนการ ตอนที่2 การนำมาใช้ในการผลิตยา. วารสารไทยโภชนาพันธ์. 2553:35-59.
10. Dinesh K Sawant1 PPI. Development and Validation of Simple UV-Spectrophotometric Method for Estimation Diclofenac Sodium in Bulk and Tablet Dosage Form. 2016;2016(4):1-4.
11. ดร.ภญ.สุภาณี ดวงธีรปรีชา. การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ Analytical Method Validation. 2561.

12. Ilma Nugrahani EYM, Lidya Chintya. FTIR-derivative as a green method for simultaneous content determination of caffeine, paracetamol, and acetosal in a tablet compared to HPLC. 2019;(104):2-4.
13. Sherif M. Eid SSS, Mohamed R. Elghobashy, Ola M. Abdalla. ATR-FTIR coupled with Chemometrics for quantification of vildagliptin and metformin in pharmaceutical combinations having diverged concentration ranges. 2019:1-26.
14. Natalia L. Calvo RMM, Teodoro S. Kaufman. A dynamic thermal ATR-FTIR/chemometric approach to the analysis of polymorphic interconversions. Cimetidine as a model drug. 2014;(92):90-7.
15. Potumarthi SCR. Chemometrics-Based Process Analytical Technology (PAT) Tools: Applications and Adaptation in Pharmaceutical and Biopharmaceutical Industries. 2013;(169):66-76.
16. รองศาสตราจารย์ ดร.ปานมนัส ศิริสมบูรณ์ นล, น.ส. กรรณพต แก้วสอน, นายพลนณ อ่อนไสว, นายบัณฑิต ทองสร้อย, นายณัฐกรณ์ สอนสงวน, ว่าที่ร้อยตรีสมชาย กลัดสุข. การคาลิเบรชันแบบตัวแปรพหุ แนวทางเชิงปฏิบัติสำหรับการพัฒนาแบบจำลองในเคมีวิเคราะห์[Online].2561[20 มีนาคม 2565]; Available from: URL:<https://nirsresearch.com/หมวดหมู่บทความ-2398-translated-book.html>
17. International A. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. 2016.

(นสภ.ธัญชนก ปิยะรัตน์วัฒน์)
...../...../.....

(นสภ.ธัญสินี ดัษฎยาวัตร)
...../...../.....

(นสภ.สุพิชญา หวังฤทธิไกรกุล)
...../...../.....

อาจารย์ที่ปรึกษา
(ภญ.ดร.พุทธิพร คงแก้ว)
...../...../.....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ภก.ผศ.ดร.วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง)
...../...../.....

ภาคผนวก

วิธีเตรียมตำรับ



รูปที่ 1 แสดงการบดผสมสารช่วยในโกร่ง (geometric dilution)



รูปที่ 2 แสดงการเติม Isopropyl Alcohol ลงไปผสมจนได้ damp mass



รูปที่ 3 แสดงการนำ damp mass ที่ได้มาผ่านแรงให้ได้เป็นแกรนูลเปียก (รูปตัวหนอน)



รูปที่ 4 แสดงการนำแกรนูลเปียกไปอบใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 60 °C จนแกรนูลแห้ง

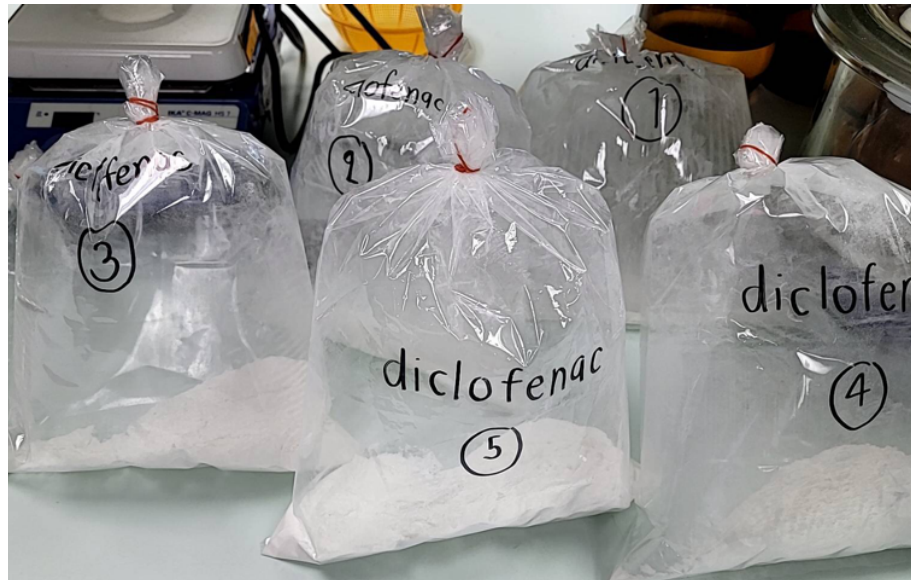


รูปที่ 5 แสดงการนำแกรนูลแห้งที่ได้มาชั่งและเติม Talcum, Aerosil และ Magnesium stearate



รูปที่ 6 แสดงการตอกเม็ดด้วยเครื่อง single punch tablet machine

ผงยา แกรนูลและเม็ดยาในความแรงต่างๆ



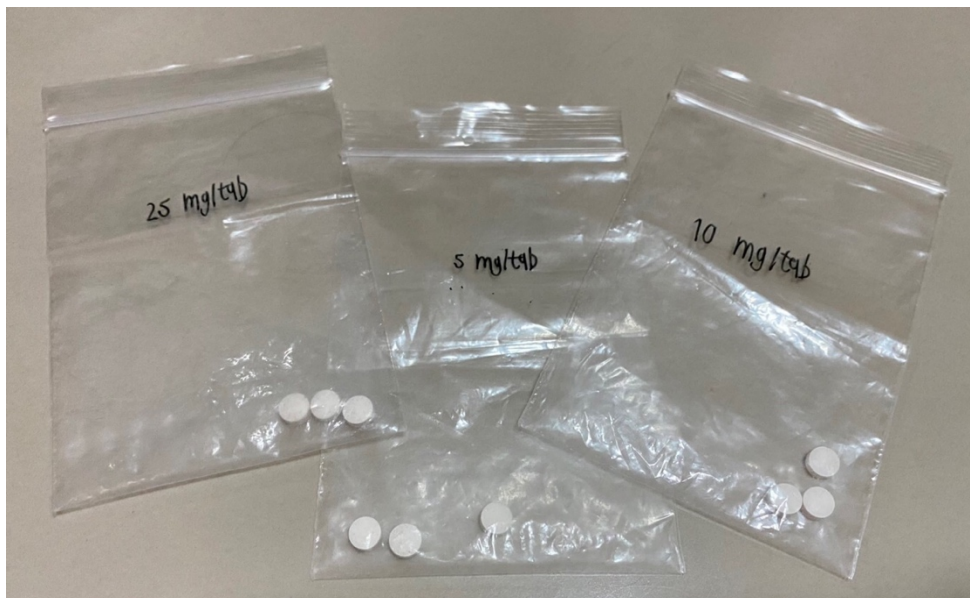
รูปที่ 7 ผงยา Diclofenac sodium 5 ความแรง



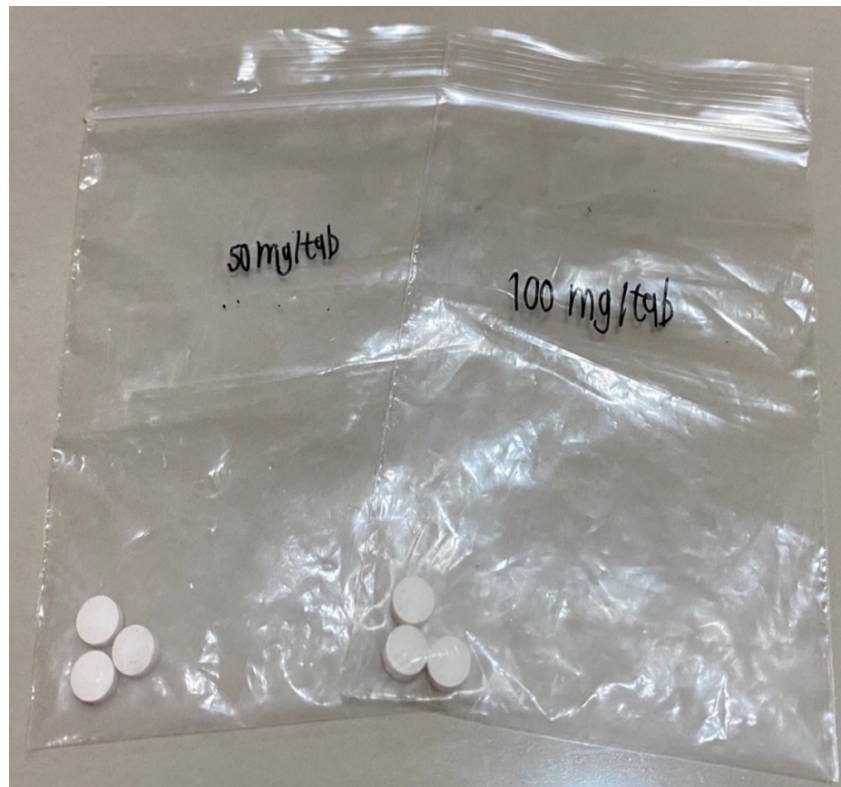
รูปที่ 8 ผงยา Diclofenac sodium



รูปที่ 9 แกรนูลของ Diclofenac sodium



รูปที่ 10 เม็ดยา Diclofenac sodium 5, 10, 25 mg/tab



รูปที่ 10 เม็ดยา Diclofenac sodium 50, 100 mg/tab

ค่าการดูดกลืนแสงของผงยา

ตารางที่ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง diclofenac sodium ที่ความแรง 5 mg/tab

ตัวอย่างที่	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ 1	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ 2	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ 3	ค่าการดูดกลืน แสงเฉลี่ย
1	0.51269	0.52599	0.53053	0.52307
2	0.49972	0.49901	0.49487	0.49787
3	0.50845	0.51003	0.51240	0.51029
4	0.46118	0.46308	0.46145	0.46190
5	0.44647	0.44770	0.44948	0.44788
6	0.46758	0.47064	0.47283	0.47035
7	0.53729	0.54186	0.54386	0.54100
8	0.53275	0.53376	0.53455	0.53369
9	0.43164	0.43229	0.43123	0.43172
10	0.45718	0.45638	0.45634	0.45663

ตารางที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง diclofenac sodium ที่ความแรง 10 mg/tab

ตัวอย่างที่	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ 1	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ 2	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ 3	ค่าการดูดกลืน แสงเฉลี่ย
1	0.53316	0.53784	0.53991	0.53697
2	0.61979	0.62282	0.62320	0.62194
3	0.50647	0.50516	0.50419	0.50527
4	0.52029	0.52066	0.52120	0.52072
5	0.53279	0.53640	0.53711	0.53543
6	0.57841	0.57893	0.57513	0.57749
7	0.59031	0.58996	0.59089	0.59039
8	0.54484	0.54440	0.54567	0.54497
9	0.48779	0.48845	0.48813	0.48812
10	0.58502	0.58575	0.58545	0.58541

ตารางที่ 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง diclofenac sodium ที่ความแรง 25 mg/tab

ตัวอย่างที่	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ 1	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ 2	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ 3	ค่าการดูดกลืน แสงเฉลี่ย
1	0.36795	0.36565	0.36505	0.36621
2	0.36477	0.36427	0.36390	0.36431
3	0.36418	0.36291	0.36301	0.36337
4	0.36451	0.36680	0.36682	0.36604
5	0.35642	0.35751	0.36087	0.35827
6	0.35452	0.35299	0.34848	0.35199
7	0.34446	0.34281	0.34362	0.34363
8	0.35413	0.35163	0.34990	0.35189
9	0.36945	0.36873	0.36723	0.36827
10	0.36017	0.35809	0.35977	0.35694

ตารางที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง diclofenac sodium ที่ความแรง 50 mg/tab

ตัวอย่างที่	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ 1	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ 2	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ 3	ค่าการดูดกลืน แสงเฉลี่ย
1	0.62067	0.63028	0.63025	0.62707
2	0.63247	0.63103	0.62981	0.63110
3	0.60982	0.60554	0.60543	0.60693
4	0.62616	0.62605	0.62509	0.62577
5	0.65634	0.65256	0.65294	0.65395
6	0.67611	0.67525	0.67398	0.67511
7	0.65466	0.65210	0.64971	0.65216
8	0.60284	0.60101	0.59842	0.60076
9	0.60349	0.59993	0.59835	0.60059
10	0.67504	0.67629	0.67469	0.67534

ตารางที่ 5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง diclofenac sodium ที่ความแรง 100 mg/tab

ตัวอย่างที่	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ 1	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ 2	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ 3	ค่าการดูดกลืน แสงเฉลี่ย
1	0.36317	0.36608	0.36128	0.36351
2	0.36769	0.36783	0.36698	0.36750
3	0.35441	0.35391	0.35389	0.35407
4	0.36969	0.36936	0.36961	0.36955
5	0.35854	0.35870	0.35865	0.35863
6	0.36069	0.36142	0.36073	0.36095
7	0.37251	0.37213	0.37264	0.37243
8	0.36330	0.36314	0.36240	0.36295
9	0.37876	0.37728	0.37726	0.37777
10	0.36363	0.36385	0.36523	0.36424