การประยุกต์ใช้สารเจนิพินจากผลพุดและการออกแบบวิธีบำบัดของเสียจากปฏิบัติการเพื่อพัฒนากระบวนการวิเคราะห์ยาอย่างปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

Application of Gardenia Fruit-Derived Genipin and Design of Laboratory Waste Treatment for the Development of Safe-for-Operator and Eco-Friendly Drug Assay Process

วีรภัทร วิโนทพรรษ์[1], คาเซน คงภัควรรธนะ[1] ศิริรัตน์ เดชพิทยานันท์[1],
อุดมลักษณ์ สุขสราญ[1], สุวภาพ ปฐมเจริญสุขชัย[1], นพรัตน์ นันทรัตนพงศ์[1] และ ธีรศักดิ์ โรจนราธา[1]
Weerapath Winotapun[1], Khachen Kongpakwattana[1], Sirirat Dejpittayanunt[1], Udomluck Suksaran[1],
Suwaparp Pathomcharoensukchai[1], Nopparat Nantaratanapong[1] and Theerasak Rojanarata[1]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีใหม่ในการวิเคราะห์หาปริมาณยากาบาเพนตินในวัตถุดิบและเภสัชภัณฑ์แคปซูล ให้มีประสิทธิภาพ ทำได้ง่าย ใช้เครื่องมือที่ไม่ซับซ้อน และคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงานและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยนำสารเจนิพินจากผลพุดซึ่งมีความปลอดภัยมาทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนปฐมภูมิของกาบาเพนตินได้ผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินซึ่งสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดได้ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่าขั้นตอนและสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์คือ นำสารละลายตัวอย่างกาบาเพนตินและสารละลายเจนิพินซึ่งเตรียมโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายไปทำปฏิกิริยากันที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาปริมาณของกาบาเพนตินในตัวอย่าง จากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พบว่าวิธีนี้ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับปริมาณกาบาเพนตินในช่วง 0.15-0.50 มิลลิโมลาร์ มีความถูกต้อง แม่นยำ และจำเพาะเจาะจงโดยไม่ถูกรบกวนจากสารเจือปนที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับตัวยารวมถึงสารปรุงแต่งในตำรับ สีที่เกิดขึ้นมีความคงตัวดี และสามารถวิเคราะห์ปริมาณตัวยาในวัตถุดิบและเภสัชภัณฑ์แคปซูลได้ไม่แตกต่างจากวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน โดยทุกขั้นตอนของการวิเคราะห์ปราศจากการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นอันตราย นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้ออกแบบกรรมวิธีบำบัดของเสียที่เกิดขึ้นจากปฏิบัติการควบคู่ไปกับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ โดยใช้แร่เกลือจืดมาดูดซับสีและสารต่างๆ ในสารละลายของเสียเพื่อลดความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งพบว่าของเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วนั้นมีความปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตที่นำมาใช้ทดสอบ ได้แก่ ไรกุ้งและปลาหางนกยูง สรุปได้ว่างานวิจัยนี้สามารถนำสารเจนิพินที่ได้จากธรรมชาติมาใช้ในการวิเคราะห์และควบคุมคุณภาพยาได้ประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรก และเป็นตัวอย่างของกระบวนการวิเคราะห์สารโดยยึดหลักเคมีสีเขียวแบบครบวงจร ตั้งแต่การเลือกใช้สารและกระบวนการที่ปลอดภัย ไปจนถึงการจัดการของเสียที่เกิดขึ้นในขั้นตอนสุดท้าย เพื่อให้มั่นใจได้ว่าของเสียเหล่านั้นจะส่งผลกระทบน้อยที่สุดเมื่อถูกปลดปล่อยไปสู่สิ่งแวดล้อม

[1] คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จ.นครปฐม 73000

[1] Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Sanamchandra Palace Campus, Nakhon Pathom 73000

ABSTRACT

The objective of this research was to develop a novel method which was efficient, facile, safe-for-analyst, environmentally friendly and required unsophisticated instrumentation for the assay of gabapentin in bulk drug and capsules. It was based on the reaction between a safe reagent namely genipin derived from *Gardenia* fruits with primary amino group of gabapentin to form blue product with the maximum absorption at 590 nm. The optimized procedures started with the reaction setup between the solutions of gabapentin and genipin solution prepared in water at pH 7, followed by heating at 80°C for 1 hour. After the color was completely formed, the absorbance values were measured and the quantities of drug in the samples were calculated by the comparison with a standard curve. From the validation studies, it was found that the proposed method showed an excellent linearity in the gabapentin concentration range of 0.15-0.50 mM. It was accurate, precise and insensitive to the interferences from structurally related impurities and commonly used excipients. The method produced stable blue color and gave the assay results in agreement with the pharmacopeial HPLC method. Furthermore, all procedures were performed in absence of the use of toxic organic solvents. Owing to the environmental awareness and responsibility, the treatment of waste generated from the assay was also designed based on the use of gypsum as an adsorbent. After the treatment, the blue product was dramatically removed from the waste solution and the treated waste was proven to be safe for aquatic test organisms i.e. brine shrimps and guppy fishes. Hence, this work was not only the first success in applying naturally-derived genipin to drug analysis and quality control but also a paradigm of fully green analytical process starting from the selection and use of safe reagents and procedures and ending with the waste management to ensure the least impact after release into the environment.

Keyword: Gabapentin, Genipin, Assay, Colorimetry, Environmentally friendly, Waste treatment

Email: weerapath89@hotmail.com

คำนำ

ในอดีตที่ผ่านมา การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาหรือสารมีเป้าหมายเพื่อให้ได้วิธีการซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำ มีความไว และจำเพาะเจาะจงต่อสารที่สนใจ แต่มักให้ความสำคัญน้อยในเรื่องความปลอดภัยของผู้วิเคราะห์ในขณะปฏิบัติงาน ตลอดจนผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นกับสิ่งแวดล้อมเนื่องมาจากผลิตภัณฑ์หรือของเสียที่เกิดขึ้นจากปฏิบัติการ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาต้นแบบของกระบวนการวิเคราะห์ยาที่ปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มีประสิทธิภาพ ทำได้ง่าย มีขั้นตอนไม่ซับซ้อน และไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง โดยเลือกการวิเคราะห์หาปริมาณยากาบาเพนตินมาเป็นกรณีศึกษา เนื่องจากในปัจจุบันวิธีวิเคราะห์หาปริมาณของตัวยาชนิดนี้ในวัตถุดิบและเภสัชภัณฑ์ เช่น วิธีที่กำหนดไว้ในตำรายาของประเทศสหรัฐอเมริกา (USP 32 NF27) และตำรายาของสหราชอาณาจักร (BP 2012) ซึ่งใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ตลอดจนวิธีวิเคราะห์อื่นๆ ที่มีรายงาน เช่น วิธี Gas chromatography-

mass spectrometry (Lente and Gatautis, 1998; Kushnir *et al*., 1999) หรือ UV-vis spectrophotometry (Siddiqui *et al*., 2010) ยังมีข้อจำกัด เช่น บางวิธีต้องอาศัยเครื่องมือที่ซับซ้อนและมีราคาแพง บางวิธีมีความจำเพาะต่ำทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ตัวยาสำคัญแยกออกจากสารสลายตัวที่ปนเปื้อนอยู่ได้ ส่วนวิธีซึ่งอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาให้เกิดสีแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง แม้ว่าจะเป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย ใช้เครื่องมือที่ไม่ซับซ้อนและมีราคาไม่แพง ก็ยังคงใช้สารก่อสีและสารอื่นๆ ร่วมในปฏิกิริยาที่ไม่ปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม เช่น มีรายงานการใช้สารนินไฮดรินที่มีฤทธิ์ส่งเสริมการเกิดเนื้องอกในผิวหนังของหนู (Shukla *et al*., 1994) เป็นสารก่อสีกับหมู่อะมิโนของกาบาเพนตินเพื่อวิเคราะห์ตัวยาชนิดนี้

จากการสืบค้นข้อมูลเพื่อหาสารก่อสีที่ได้จากธรรมชาติพบว่า เจนิพิน (Genipin) ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากผลของพืชตระกูลพุด สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนปฐมภูมิแล้วได้สารสีน้ำเงินที่มีความคงตัวและปลอดภัย (Sang *et al*., 2003) ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการนำสารชนิดนี้มาใช้เป็นสารแต่งสีในอาหารหรือเป็นสีย้อมสำหรับสิ่งทอ (Park *et al*., 2002) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการนำสารดังกล่าวมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณยา คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเจนิพินมาใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ร่วมกับเทคนิคการวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่าย และใช้เครื่องมือพื้นฐานที่มักมีในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทั่วไปและมีราคาไม่แพง ได้แก่ เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและเภสัชภัณฑ์ในอุตสาหกรรมยา นอกจากนี้ด้วยความตระหนักและรับผิดชอบถึงผลกระทบจากของเสียที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์ที่อาจส่งผลต่อสิ่งแวดล้อม ผู้วิจัยจึงได้ออกแบบกรรมวิธีบำบัดของเสียอย่างง่าย ใช้ค่าใช้จ่ายน้อย ทำได้รวดเร็วและนำไปปฏิบัติได้จริง โดยนำแร่เกลือจืด (Gypsum) ซึ่งมีคุณสมบัติดูดซับสารและสีมาใช้ในการบำบัดของเสียแล้วตรวจสอบยืนยันความปลอดภัยของของเสียหลังจากผ่านการบำบัดด้วยวิธีการทางพิษวิทยา เพื่อให้มั่นใจได้ว่ากระบวนการวิเคราะห์ยาที่พัฒนาขึ้นมีความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมในทุกขั้นตอน

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเตรียมสารละลายมาตรฐานกาบาเพนติน

ชั่งสารมาตรฐานกาบาเพนตินอย่างถูกต้อง 0.085 กรัม ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายมาตรฐานกาบาเพนตินความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ จากนั้นปิเปตสารละลายดังกล่าวปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายมาตรฐานกาบาเพนตินความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งใช้ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน

การเตรียมสารตัวอย่างกาบาเพนตินจากวัตถุดิบกาบาเพนตินและกาบาเพนตินแคปซูล

การเตรียมสารละลายกาบาเพนตินจากวัตถุดิบซึ่งอยู่ในรูปผงแห้ง ทำโดยใช้วิธีการเดียวกันกับการเตรียมสารละลายมาตรฐานกาบาเพนตินให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของกาบาเพนติน 0.5 มิลลิโมลาร์ สำหรับการเตรียมสารละลายกาบาเพนตินจากเภสัชภัณฑ์แคปซูล ทำโดยชั่งน้ำหนักผงยาที่นำออกมาจากแคปซูลจำนวน 20 เม็ด ให้ได้ปริมาณของตัวยากาบาเพนติน 0.085 กรัม ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่า แล้วนำไปสั่นด้วยคลื่นเสียง (sonicate) เป็นเวลา 5 นาที จนตัวยาแตกตัวและละลายจนหมด จากนั้นจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปกรองผ่าน membrane filter ที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้สารละลายกาบาเพนตินที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์

การเตรียมสารละลายเจนิพิน

ชั่งเจนิพิน 10 กรัม ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟตเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายสำหรับใช้ก่อสีที่ประกอบไปด้วยเจนิพินเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ในบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

การวิเคราะห์หาปริมาณกาบาเพนตินโดยปฏิกิริยาการเกิดสีกับเจนิพิน

ปิเปตสารละลายมาตรฐานกาบาเพนตินปริมาตรต่างๆ (180, 240, 360, 480 และ 600 ไมโครลิตร) หรือสารละลายตัวอย่าง (420 ไมโครลิตร) ด้วยไมโครปิเปต ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงในแต่ละหลอดเพื่อปรับปริมาตรจนให้ 600 ไมโครลิตร และสารละลายก่อสีเจนิพิน 600 ไมโครลิตร จะได้ชุดสารละลายมาตรฐานกาบาเพนตินที่ความเข้มข้น 0.15, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 มิลลิโมลาร์ และสารละลายตัวอย่างที่มีกาบาเพนตินเข้มข้นประมาณ 0.35 มิลลิโมลาร์ ซึ่งอยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน จากนั้นนำสารละลายไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วแช่ในน้ำแข็งเพื่อหยุดปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายที่ประกอบด้วยน้ำกลั่น 600 ไมโครลิตรและสารละลายก่อสีเจนิพิน 600 ไมโครลิตร ซึ่งผ่านขั้นตอนการให้ความร้อนมาในลักษณะเดียวกันเป็น blank จากนั้นนำค่าการดูดกลืนที่วัดได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกาบาเพนตินกับค่าการดูดกลืนแสงที่หักลบ blank แล้ว การคำนวณหาปริมาณกาบาเพนตินในตัวอย่างทำได้โดยใช้สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกาบาเพนตินกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

การบำบัดของเสียที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์

ทำโดยเติมผงแร่เกลือจืด 0.5 กรัมลงในสารละลายของเสีย 25 มิลลิลิตรในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยวิธีวอร์เท็กซ์เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 สารละลายที่ได้จะมีค่าพีเอชลดลง จึงนำไปสะเทินด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อปรับค่าพีเอชให้เป็นกลาง แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 อีกหนึ่งรอบ จะได้ของเสียที่ผ่านการบำบัดแล้ว

การทดสอบความเป็นพิษของของเสียที่ผ่านการบำบัดแล้ว

ศึกษาความเป็นพิษของของเสียก่อนและหลังการบำบัด โดยใช้สิ่งมีชีวิต 2 สปีชีส์เป็นตัวทดสอบ ได้แก่ ไรกุ้ง (*Artemia salina*) และปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulate*) เพศผู้ โดยการทดสอบในไรกุ้งได้ปรับความเข้มข้นของเกลือในสารละลายที่นำมาทดสอบให้มีความเข้มข้น 35 ppt เพื่อให้เหมาะสมกับสภาวะในการดำรงชีวิตของไรกุ้ง ในการทดสอบความเป็นพิษกับทั้งสองสปีชีส์ใช้สิ่งมีชีวิตจำนวน 10 ตัว (n=2) ทดสอบกับสารละลายของเสียที่ถูกเจือจางให้มีความเข้มข้นในระดับต่างๆ ได้แก่ 100, 50, 25,12.5, 6.25, 0 %v/v โดยงดให้อาหารแก่สิ่งมีชีวิต เมื่อครบ 24 ชั่วโมงสังเกตและบันทึกจำนวนสิ่งมีชีวิตที่รอดชีวิต แล้วนำไปคำนวณหาค่า LC50 และ Acute toxicity unit (TUa) จาก 100/LC50 เพื่อประเมินระดับความเป็นพิษของของเสียโดยใช้เกณฑ์ Tua <3 (non-toxic), 3–10 (slightly toxic), 10–50 (toxic), 50–100 (very toxic) และ >100 (extremely toxic) (Robert and Kathleen, 2011)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์

จากการทดลองพบว่า สารละลายสีน้ำเงินซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างกาบาเพนตินและเจนิพินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร (Figure 1) และได้ศึกษาผลของปัจจัยหรือสภาวะต่างๆ ในการเกิดปฏิกิริยาเพื่อปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ให้เหมาะสม ดังรายละเอียดต่อไปนี้

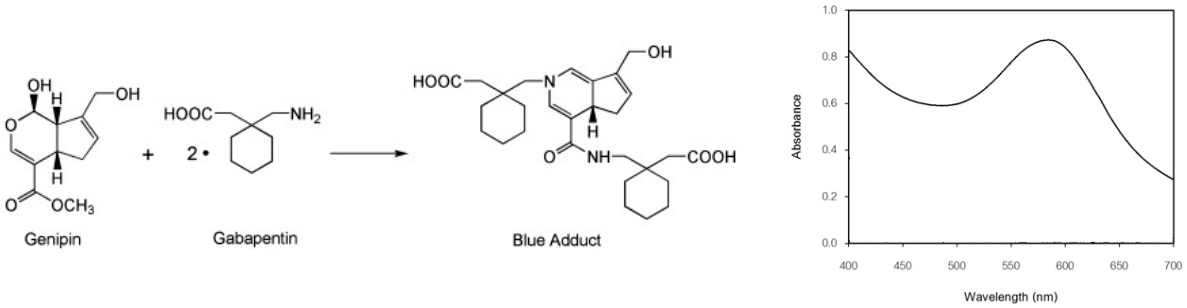
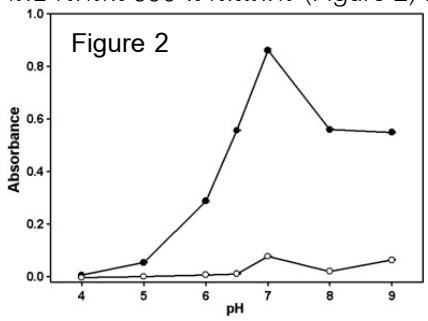


Figure 1 Proposed scheme for the formation of blue colored adduct from the reaction of gabapentin with genipin and its absorption spectrum

1. ผลของระดับความเป็นกรดด่าง

เมื่อทดลองทำปฏิกิริยาระหว่างกาบาเพนตินและเจนิพินในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดด่างในช่วงพีเอช 4-9 พบว่าที่พีเอช 7 เกิดสารละลายผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินมากที่สุดเมื่อประเมินจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร (Figure 2) ดังนั้นจึงเลือกใช้พีเอช 7 ในการวิเคราะห์



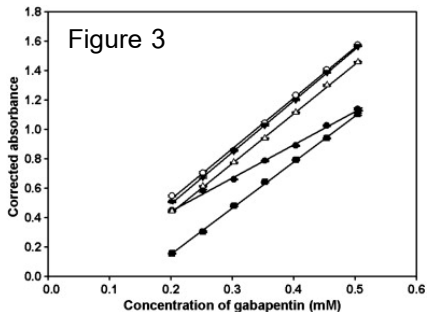


Figure 2 Effect of pH on the reaction of genipin with gabapentin (●) and without gabapentin (○).

Figure 3 Effect of concentration of genipin solution: 1 mM (●), 2 mM (○), 4 mM (▼) and 6 mM (△)

2. ผลของความเข้มข้นของสารก่อสีเจนิพิน

เมื่อใช้สารละลายเจนิพินที่มีความเข้มข้นต่างๆ ในการสร้างกราฟมาตรฐาน พบว่าการใช้เจนิพินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ให้กราฟเส้นตรงที่มีความชันน้อยที่สุด เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเจนิพินเป็น 2 มิลลิโมลาร์พบว่าความชันของกราฟเส้นตรงมีค่าเพิ่มขึ้นและมีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเจนิพินต่อไปเป็น 4, 6 และ 8 มิลลิโมลาร์ แม้ว่ายังคงได้เส้นกราฟที่มีความชันดี แต่ค่าการดูดกลืนแสงกลับลดลง ตามลำดับ (Figure 3) จึงเลือกใช้สารละลายเจนิพินเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ในการวิเคราะห์

3. ผลของอุณหภูมิ

เมื่อทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส) ในการให้ความร้อนกับปฏิกิริยาในระยะเวลาคงที่ 1 ชั่วโมง พบว่าเส้นกราฟมาตรฐานที่เกิดจากอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสมีความชันน้อยที่สุด

เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นทำให้ความชันของเส้นกราฟเพิ่มขึ้นตามไปด้วย (Figure 4) และตั้งแต่ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ให้เส้นกราฟไม่แตกต่างจากอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเลือกให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสในการวิเคราะห์เนื่องจากให้ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์ควบคู่ไปกับการประหยัดพลังงาน

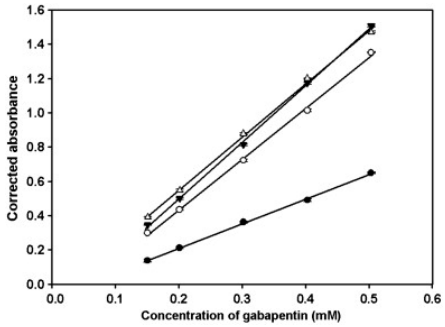


Figure 4 Effect of heating temperature: 60 °C (●), 70 °C (○), 80 °C (▼) and 90 °C (△).

4. **ผลของระยะเวลาในการให้ความร้อน**

เมื่อเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการให้ความร้อน (30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 นาที) พบว่าความเข้มของสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาเริ่มคงที่เมื่อให้ความร้อนนานเป็นเวลา 60 นาที ซึ่งบ่งบอกว่าปฏิกิริยาดำเนินไปจนถึงจุดสมบูรณ์แล้ว ดังนั้นจึงเลือกใช้ระยะเวลาในการให้ความร้อน 60 นาที เนื่องจากประหยัดเวลาและพลังงาน

5. **ความคงตัวของสีที่เกิดขึ้น**

ศึกษาความคงตัวของสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นพบว่า หากตั้งสารละลายทิ้งไว้ในสภาวะปกติที่มีแสง ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายจะลดลงประมาณร้อยละ 1 เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง ดังนั้น จึงแนะนำให้วัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีภายในเวลา 1 ชั่วโมงหลังจากที่ได้สารละลายสีน้ำเงิน อย่างไรก็ตามหากไม่สามารถทำการวัดได้ในทันที ควรเก็บสารละลายไว้ในที่ที่มีการป้องกันแสง เนื่องจากจะช่วยรักษาค่าความเข้มสีของสารละลายได้ โดยทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงน้อยกว่าร้อยละ 1 ในระยะเวลา 6 ชั่วโมง

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

1. **ความเที่ยงของการวิเคราะห์** (Accuracy)

ทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ โดยเติมสารมาตรฐานกาบาเพนติน 3 ระดับความเข้มข้นที่ทราบแน่นอน ได้แก่ 0.15, 0.20 และ 0.25 มิลลิโมลาร์ลงไปในตัวอย่าง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่าได้ค่า % Recovery ของกาบาเพนตินส่วนที่เติมลงไปเป็น 100.37, 100.59 และ 100.49% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วง 98 - 102% และเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับที่กำหนดไว้ (ICH Guideline) จึงสรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์มีความเที่ยง

2. **ความแม่นของการวิเคราะห์** (Presicion)

จากการทดสอบความแม่นของวิธีวิเคราะห์ โดยให้ผู้วิเคราะห์คนเดียวกันทำการวิเคราะห์ซ้ำจำนวน 6 ครั้งภายในวันเดียวกัน (Repeatability) และทำการวิเคราะห์ซ้ำในแต่ละวันภายในเวลา 3 วัน (Intermediate

precision) พบว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณยาในวัตถุดิบและเภสัชภัณฑ์แคปซูลมีค่า % Relative standard deviation อยู่ในช่วง 0.04 – 0.63% ซึ่งน้อยกว่า 2% (ICH Guideline) จึงสรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์มีความแม่นยำ

3. **ความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์** (Specificity)

ศึกษาผลรบกวนจากสารปรุงแต่งในตำรับ เช่น แลกโตส เซลลูโลส ฯลฯ ตลอดจนสารปนเปื้อนตามข้อกำหนดในตำรายา พบว่าสารเหล่านี้ไม่ทำปฏิกิริยาเกิดสีน้ำเงินกับเจนิพินเนื่องจากไม่มีหมู่เอมีนปฐมภูมิในสารดังกล่าว นอกจากนี้เมื่อมีสารเหล่านี้เจือปนอยู่กับตัวยาที่ต้องการวิเคราะห์ พบว่าวิธีวิเคราะห์ยังคงให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณตัวยาได้อย่างถูกต้องด้วยค่า % Recovery ในช่วง 98-102% (ICH Guideline) จึงสรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะต่อตัวยากาบาเพนติน และไม่ถูกรบกวนจากสารเจือปนอื่นๆ ที่มักอยู่ในตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

ผลการศึกษาวิธีการบำบัดของเสียที่เกิดขึ้นด้วยการดูดซับ

เมื่อใช้แร่เกลือจืดเขย่ากับสารละลายของเสียจากการวิเคราะห์ในอัตราส่วน 1:50 พบว่าสามารถดูดซับสีของสารละลายได้มากกว่าร้อยละ 95 ในระยะเวลาเพียง 2 นาที ดังนั้นแร่เกลือจืดจึงเป็นวัสดุซึ่งหาได้ง่าย ราคาถูกที่สามารถนำมาใช้บำบัดของเสียได้ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ง่าย และรวดเร็ว ก่อนที่จะทิ้งสู่สิ่งแวดล้อม

ผลการทดสอบความเป็นพิษของของเสียที่เกิดขึ้น

จากการทดลองพบว่าของเสียที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 %v/v) ทั้งก่อนและหลังการบำบัด ไม่ทำให้เกิดการตายของไรกุ้ง แต่ทำให้ปลาหางนกยูงบางส่วน โดยของเสียก่อนการบำบัดมีค่า LC50 เท่ากับ 17% v/v ซึ่งจัดเป็น “Slightly toxic waste” แต่เมื่อทำการบำบัดของเสียโดยกรรมวิธีการดูดซับแล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษพบว่าค่า LC50 เพิ่มขึ้นเป็น 41% v/v และทำให้ของเสียดังกล่าวจัดเป็น “Non-toxic waste” (Figure 5) จึงสรุปได้ว่าของเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วมีความปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ

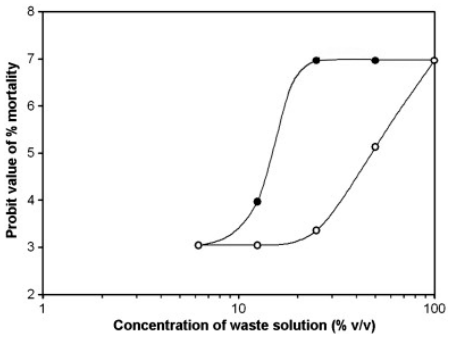


Figure 5 The percentage mortality of guppy fishes at different concentrations of waste solutions before (●) and after (○) the gypsum adsorption treatment.

สรุป

งานวิจัยนี้สามารถพัฒนาวิธีใหม่ในการวิเคราะห์หาปริมาณกาบาเพนติน เพื่อใช้ควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและเภสัชภัณฑ์ในอุตสาหรรมการผลิตยา โดยอาศัยการเกิดสีกับเจนิพินซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติและมีความปลอดภัยได้ประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรก และได้ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้ปรับปรุงขั้นตอนการวิเคราะห์ให้มีประสิทธิภาพ ประหยัดสารและพลังงาน ปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

รวมทั้งยังได้ออกแบบและพัฒนาวิธีการบำบัดของเสียที่เกิดขึ้นจากปฏิบัติการ พร้อมตรวจสอบยืนยันความปลอดภัยต่อระบบนิเวศน์ควบคู่ไปกับวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้น จึงเป็นต้นแบบและมิติใหม่ของกระบวนการวิเคราะห์ยาหรือสารแบบครบวงจรที่มิได้เสร็จสิ้นหรือยุติลงเมื่อได้วิธีการวิเคราะห์แล้วเท่านั้น แต่ยังใส่ใจและรับผิดชอบถึงผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมที่อาจเกิดขึ้นตามมาจากการปฏิบัติงานอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และกรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมที่สนับสนุนทุนในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

The United States Pharmacopeial Convention. United States Pharmacopoeia32/National Formulary 27. Baltimore(MD): United Book Press; 2009.

British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia 2012. 7th ed. London: The General Medical Council; 2012.

Lente, F. V. and V. Gatautis. 1998. Cost-efficient use of gas chromatography-mass spectrometry: A “piggyback” method for analysis of gabapentin. **Clinical Chemistry** 44: 2044-2045.

Kushnir, M. M., J. Crossett, P. I. Brown and F. M. Urry. 1999. Analysisof gabapentin in serum and plasma by solid-phase extraction and gas chromatography mass spectrometry for therapeutic drug monitoring. **Journal of Analytical Toxicology** 23: 1-6.

Siddiqui, F. A., M. S. Arayne, N. Sultana, F. Qureshi, A. Z. Mirza and M. H. Zuberi. 2010. Spectrophotometric determination of gabapentin in pharmaceutical formulations using ninhydrin and π-acceptors. **European Journal of Medicinal Chemistry** 45: 2761-2767.

Shukla, Y., M. Antony, K. P. Gupta and N. K. Mehrotra. 1994. Tomour-promoting activity of ninhydrin on mouse skin. **Food and Chemical Toxicology** 32: 651-4.

Sang, W. L., M. L. Jong, H. B. Seong, S. P. Young and R. H. Tae. 2003. Colorimetric determination of amino acids using genipin from Gardenia jasminoides. **Analytica Chimica Acta** 480: 267-274.

Park, J. E., J. Y. Lee, H. G. Kim, T. R. Hahn and Y. S. J. Paik. 2002. Isolation and characterization of water-soluble intermediates of blue pigments transformed from geniposide of Gardenia jasminoides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50: 6511-6514.

Shannon Aquatic Toxicity Laboratory. Aquatic Toxicity Testing in Ireland (online). Available from: URL:http://www.envirocentre.ie/includes/documents/Aquatic%20Toxicity%20Testing%20in%20Ireland%202011%20ver%205. pdfS, 2011 (accessed on 28.06.12)

ICH Guideline (online). Available from: URL:http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf (accessed on 28.06.12)