



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะ amoxicillin
ในเภสัชภัณฑ์โดยใช้เอ็นไซม์

โดย ผศ.ดร.ธีรศักดิ์ โรจนราธา และ คณะ

มิถุนายน 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะ amoxicillin ในเภสัชภัณฑ์โดยใช้เอ็นไซม์

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|-----------------------------|--------------------|
| 1. ผศ.ดร.ธีรศักดิ์ โรจนราธา | มหาวิทยาลัยศิลปากร |
| 2. ผศ.ดร.สุเทพ ไวยครุฑธา | มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 3. ศ.ดร. วิทยา มีวุฒิสม | มหาวิทยาลัยมหิดล |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำวิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ซึ่งให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยนี้ รวมถึงคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในความอนุเคราะห์สถานที่ทำวิจัย และเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีบางส่วน

คณะผู้ทำวิจัย

บทคัดย่อภาษาไทย

รหัสโครงการ	MRG 5080333
ชื่อโครงการวิจัย	การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะ amoxicillin ในเภสัชภัณฑ์โดยใช้เอนไซม์
ชื่อผู้วิจัยและสถาบัน	ผศ.ดร.ธีรศักดิ์ โรจนราชา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร theerasak@email.pharm.su.ac.th
ระยะเวลาโครงการ	2 ปี (1 ก.ค. 2550- 30 มิ.ย. 2552)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณอะม็อกซิซิลลินในเภสัชภัณฑ์ที่ง่าย รวดเร็ว มีความไว และต้นทุนต่ำ โดยอาศัยปฏิกิริยาซึ่งเร่งด้วยเอนไซม์ 2 ปฏิกิริยา ในขั้นตอนแรก หมู่ดี-4-ไฮดรอกซีฟีนิลกลัยซีนในโครงสร้างของอะม็อกซิซิลลินถูกตัดอย่างจำเพาะออกจากโมเลกุลของอะม็อกซิซิลลินโดยเอนไซม์เพนนีซิลลินอะซิเลส จากนั้นดี-4-ไฮดรอกซีฟีนิลกลัยซีนที่เกิดขึ้นเข้าทำปฏิกิริยากับ 2-ออกโซกลูตาเรตโดยมีเอนไซม์ดี-ฟีนิลกลัยซีนอะมิโนทรานสเฟอเรสเป็นตัวเร่งเกิดผลิตภัณฑ์ตัวหนึ่งได้แก่ 4-ไฮดรอกเบนซิลฟอร์เมตซึ่งสามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตได้สูง ดังนั้นปริมาณอะม็อกซิซิลลินจึงถูกวิเคราะห์ได้จากค่าการดูดกลืนแสงซึ่งเพิ่มขึ้น ณ ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาและปรับเลือกสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ ตลอดจนได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น พบว่ากราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณอะม็อกซิซิลลินเริ่มต้นที่มีอยู่ในตัวอย่างกับค่าการดูดกลืนแสงซึ่งเพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงดีมาก ($r^2 = 0.9998$ ในช่วงความเข้มข้นของอะม็อกซิซิลลิน 0 – 100 ไมโครโมลาร์) มีค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด และขีดจำกัดของวิเคราะห์หาปริมาณ เป็น 0.77 และ 2.55 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ เมื่อนำวิธีนี้ไปวิเคราะห์เภสัชภัณฑ์อะม็อกซิซิลลินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับละลายน้ำได้ยาแขวนตะกอน พบว่าวิธีวิเคราะห์มีความถูกต้องและแม่นยำดี ไม่ถูกรบกวนโดยสารปรุงแต่งอื่นๆ ในตำรับ รวมถึงผลิตภัณฑ์อันเกิดจากการสลายตัวของอะม็อกซิซิลลิน นอกจากนี้เนื่องจากทุกขั้นตอนของการวิเคราะห์ปราศจากการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ตลอดจนสารเคมีที่เป็นอันตราย จึงนับว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้เป็นวิธีวิเคราะห์หาปริมาณอะม็อกซิซิลลินในเภสัชภัณฑ์ที่ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

กุญแจคำ: อะม็อกซิซิลลิน เอนไซม์ สเปกโตรโฟโตเมตรี การวิเคราะห์ยา เภสัชภัณฑ์

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project Code: MRG 5080333

Project Title: Development of enzymatic assay of amoxicillin in pharmaceutical preparations

Investigator: Assist. Prof. Dr. THEERASAK ROJANARATA

Faculty of Pharmacy, Silpakorn University

E-mail Address: theerasak@email.pharm.su.ac.th

Project period: 2 years (1 July 2007- 30 June 2009)

Abstract

A simple, fast, sensitive and inexpensive UV-spectrophotometric method for the determination of amoxicillin in pharmaceutical preparations has been developed based on two enzymatic reactions. In this method, d-4-hydroxyphenylglycine side chain of amoxicillin was selectively cleaved off by penicillin acylase. Subsequently, it was reacted with 2-oxoglutarate, by the catalysis of D-phenylglycine aminotransferase, to yield the product with high UV absorption namely 4-hydroxybenzoylformate. The amount of amoxicillin was then determined as a change in absorbance at 335 nm. In this work, the assay conditions were studied and optimized and the method was validated. The calibration curve presented an excellent linearity with r^2 of 0.9998 (0 – 100 μ M amoxicillin). Detection and quantitation limits were 0.77 and 2.55 μ M, respectively. Good accuracy and precision were obtained when the method was tested with amoxicillin capsules and powder for oral suspension. No interference from common excipients in the formulations or degradation products was observed. Finally, since all procedures were performed without the use of any organic solvents or hazardous chemicals which were detrimental to the environment and had a low consumption of reagents, this proposed assay was an ideal green analytical method suitable for the quality control of amoxicillin in pharmaceuticals.

Keywords: Amoxicillin, Enzymatic method, Spectrophotometry, Drug analysis, Pharmaceutical preparations

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญเรื่อง	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญภาพ	vi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	vii
I. บทนำ	
- ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
- วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
- ขอบเขตของการวิจัย	2
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
II. วิธีการดำเนินการวิจัย	
- สารเคมี	4
- เครื่องมือและอุปกรณ์	4
- วิธีทำการวิจัย	5
III. ผลการวิจัยและอภิปรายผล	9
IV. บทสรุปและข้อเสนอแนะ	19
เอกสารอ้างอิง	20
ประวัติผู้วิจัย	21
Out put จากโครงการ	28
ภาคผนวก	

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	9
Retention time ของ 4-hydroxybenzoylformate, D-4-hydroxyphenylglycine, 6-APA และ amoxicillin ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC	
ตารางที่ 2	18
ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ (Enzyme) กับวิธี HPLC ตาม USP	

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	โครงสร้างทางเคมีของ amoxicillin แสดงส่วน D-4-hydroxyphenylglycine ต่ออยู่กับ 6-aminopenicillanic acid (6-APA)	1
รูปที่ 2	ปฏิกิริยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ amoxicillin	5
รูปที่ 3	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ amoxicillin (AMOX) เริ่มต้น กับ D-4-hydroxy phenylglycine (HPG) ที่เกิดขึ้นจากการไฮโดรไลซิส amoxicillin ด้วยเอนไซม์ penicillin acylase	10
รูปที่ 4	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ D-4-hydroxyphenylglycine (HPG) เริ่มต้น กับ D-4-hydroxybenzoylformate (HBZF) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา transamination โดยการเร่งด้วยเอนไซม์ D-phenylglycine aminotransferase	11
รูปที่ 5	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ amoxicillin (AMOX) เริ่มต้น กับ 4-hydroxy-benzoylformate (HBZF) ที่เกิดขึ้นจากการสลาย amoxicillin โดยการเร่งด้วยเอนไซม์ penicillin acylase และ D-phenylglycine aminotransferase	12
รูปที่ 6	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา เมื่อเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 0.1 mM ใน 100 mM Tris buffer, pH 8.0	13
รูปที่ 7	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของของสารละลาย 25 μ M 4-hydroxybenzoylformate เปรียบเทียบที่ pH 9.0 และ 9.5 (วัดใน cuvette ที่มี pathlength 1 cm)	13
รูปที่ 8	การติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกรณีที่มี D-4-hydroxyphenylglycine เจือปนอยู่ใน amoxicillin	14
รูปที่ 9	การติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ณ pH ต่างๆ	15
รูปที่ 10	การติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เมื่อใช้ 2-oxoglutarate ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	16
รูปที่ 11	standard curve แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ amoxicillin เริ่มต้นในช่วง 0 - 100 μ M กับค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปเมื่อสุดปฏิกิริยา (ΔA)	17

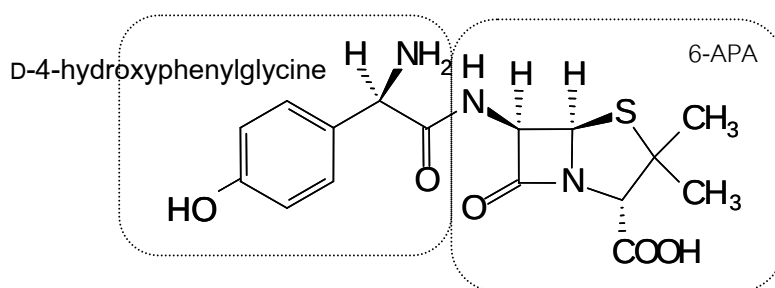
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

μg	=	microgram
HBZF	=	D-4-hydroxybenzoylformate
cm ²	=	square centimeter
Conc	=	concentration
CPT	=	camptothecin
D-phgAT	=	D-phenylglycine aminotransferase enzyme
HBZF	=	D-4-hydroxybenzoylformate
h	=	hour
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mw	=	Molecular weight
nm	=	nanometer
PA	=	Penicillin acylase enzyme
SD	=	standard deviation
UV	=	ultraviolet

I. บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

อะม็อกซิซิลลิน (amoxicillin) เป็นยาปฏิชีวนะกึ่งสังเคราะห์ในกลุ่ม β -lactam ที่มีโครงสร้างประกอบด้วย D-4-hydroxyphenylglycine ต่ออยู่กับ 6-aminopenicillanic acid (6-APA) (รูปที่ 1) ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยยับยั้งกระบวนการสร้างผนังเซลล์ ปัจจุบันมีการนำยา amoxicillin มาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้ออย่างแพร่หลายเนื่องจากสามารถออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้กว้าง จนมีเภสัชภัณฑ์ซึ่งมี amoxicillin เป็นตัวยาสสำคัญอยู่หลากหลาย ทั้งที่เป็นยาเดี่ยวในตำรับ เช่น capsules, powder for oral suspension หรือ dry syrup และชนิดที่เป็นสูตรผสม เช่น amoxicillin/clavulanate⁽¹⁾ การวิเคราะห์หาปริมาณ amoxicillin ในเภสัชภัณฑ์ที่ระบุไว้ในตำรายาและที่มีรายงานในวารสารทางวิชาการ ได้แก่ วิธีไทเทรตแบบ iodometric⁽²⁾, วิธี fluorometry⁽³⁾, chemiluminescence^(4,5), voltametry⁽⁶⁾, สเปกโตรโฟโตเมตรี⁽⁷⁻⁹⁾, วิธีทางจุลชีววิทยา และ high performance liquid chromatography (HPLC)^(2,10-11) วิธีทางจุลชีววิทยาเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ต้องใช้เวลานาน ส่วนวิธี HPLC จะต้องอาศัยเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีราคาแพง เมื่อเทียบกับเทคนิคทางสเปกโตรโฟโตเมตรี นอกจากนี้การแยกและวิเคราะห์สารด้วย HPLC ยังมักใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นส่วนผสมใน mobile phase ซึ่งในปัจจุบันหลายฝ่ายเริ่มให้ความสนใจและตระหนักเกี่ยวกับผลกระทบของการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ดังกล่าวต่อการทำลายสิ่งแวดล้อมมากยิ่งขึ้น รวมถึงปัญหาการขาดแคลนตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น acetonitrile ที่เกิดขึ้นในปัจจุบัน



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ amoxicillin แสดงส่วน D-4-hydroxyphenylglycine ต่ออยู่กับ 6-aminopenicillanic acid (6-APA)

การวิเคราะห์สารโดยใช้เอนไซม์เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการวิเคราะห์เชิงปริมาณสำหรับยา เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะสูงต่อซับสเตรต จึงเลือกทำปฏิกิริยาและให้ผลการวิเคราะห์กับยาหรือสารที่สนใจ ซึ่งอาจปฏิกิริยาอยู่ในเมทริกซ์เท่านั้น โดยไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนการแยกก่อนการวิเคราะห์ (pre-separation) ที่อาจนำมาซึ่งความยุ่งยากและเสียเวลา นอกจากนี้การที่เอนไซม์

จัดเป็นตัวเร่งทางชีวภาพ (biocatalyst) จึงมักทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะและไม้อาศัยสารเคมีที่รุนแรง จึงนับว่าเป็นวิธีการที่สอดคล้องกับ green chemistry ซึ่งส่งผลดีต่อสิ่งแวดล้อม โดยทั่วไปการวิเคราะห์สารโดยใช้เอนไซม์มักทำโดยติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อสารตั้งต้นหรือซับสเตรตเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ ปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นซึ่งตรวจวัดได้โดยเทคนิค เช่น สเปกโตรโฟโตเมตรี (การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของค่าการดูดกลืนแสง) มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารเริ่มต้นที่เราสนใจ⁽¹²⁾

จากการทบทวนงานวิจัยเกี่ยวกับวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ amoxicillin ในเภสัชภัณฑ์ที่มีรายงาน พบว่าส่วนใหญ่เป็นวิธีการที่ต้องอาศัยเครื่องมือซึ่งมีราคาแพง และมีขั้นตอนที่ซับซ้อน อีกทั้งยังไม่พบวิธีการที่อาศัยหลักการทางเอนไซม์ ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะ amoxicillin ในเภสัชภัณฑ์วิธีใหม่โดยใช้เอนไซม์ โดยมุ่งหมายให้ได้วิธีการที่มีขั้นตอนง่าย ไม่ซับซ้อน สะดวก รวดเร็ว ต้นทุนต่ำ และใช้เครื่องมือเพียง UV-spectrophotometer ซึ่งเป็นเครื่องมือพื้นฐานในห้องปฏิบัติการทั่วไป นอกจากนี้เอนไซม์ตัวหนึ่งที่ใช้ในปฏิกิริยาการวิเคราะห์โดยวิธีนี้ได้แก่ D-phenylglycine aminotransferase เป็นเอนไซม์ที่ค้นพบและถูกศึกษาโดยคณะนักวิจัยไทย⁽¹³⁾ งานวิจัยชิ้นนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อต่อยอดการนำเอนไซม์ดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวนะ amoxicillin ในเภสัชภัณฑ์วิธีใหม่โดยใช้หลักการทางเอนไซม์ร่วมกับเทคนิคทางสเปกโตรโฟโตเมตรี
2. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวนะ amoxicillin ในสารตัวอย่างชีวภาพอื่นๆ เช่น ในเลือด น้ำนม หรือเนื้อสัตว์ ในลำดับต่อไป

ขอบเขตการการวิจัย

การวิจัยนี้มีขอบเขตเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาปฏิชีวนะ amoxicillin ที่อยู่ในเภสัชภัณฑ์โดยใช้เอนไซม์ 2 ชนิดร่วมกับเทคนิคทางสเปกโตรโฟโตเมตรี ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นประกอบด้วย การตัดเอาหมู่ดี-4-ไฮดรอกซีฟีนิลกลัยซีนในโครงสร้างของอะม็อกซิซิลลินออกจากโมเลกุลของอะม็อกซิซิลลินอย่างจำเพาะโดยเอนไซม์เพนนิซิลลินอะซิเลสในขั้นตอนแรก จากนั้น ดี-4-ไฮดรอกซีฟีนิลกลัยซีนที่เกิดขึ้นเข้าทำปฏิกิริยากับ 2-ออกโซกลูตาเรต โดยมีเอนไซม์ดี-ฟีนิลกลัยซีนอะมิโนทรานสเฟอเรสเป็นตัวเร่ง และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นตัวหนึ่งได้แก่ 4-ไฮดรอกซีเบนซิลฟอร์เมตซึ่งสามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตได้สูง การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาและปรับเลือกสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ ได้แก่ pH ระยะเวลาของการทำปฏิกิริยา ความเข้มข้นและลำดับการเติมสารและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา แล้วทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น (method validation) และนำไปทดสอบวิเคราะห์เภสัชภัณฑ์ในรูปยาแคปซูล

และยาผงสำหรับละลายน้ำได้ยาแขวนตะกอน (powder for oral suspension) ยี่ห้อต่างๆ ที่มีจำหน่ายในประเทศไทยโดยวิธี HPLC ที่ระบุไว้ในตำรายา The United State Pharmacopoeia เป็นวิธีอ้างอิงเปรียบเทียบ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีวิเคราะห์วิธีใหม่สำหรับหาปริมาณ amoxicillin ในเภสัชภัณฑ์โดยอาศัยหลักการทางเอนไซม์ร่วมกับเทคนิคทางสเปกโตรโฟโตเมตรี ซึ่งมีขั้นตอนที่ง่าย ไม่ซับซ้อน สะดวก รวดเร็ว ต้นทุนต่ำ และไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม

II. วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี

1. 2-oxoglutarate sodium salt
2. 4-hydroxybenzoylformic acid
3. Acetonitrile
4. Amoxicillin reference standard (Lab of Dr.Ehrenstofer, Germany)
5. D-4-hydroxyphenylglycine
6. Dibasic sodium phosphate
7. D-phenylglycine aminotransferase
8. Ethanol
9. Hydrochloric acid
10. Methanol
11. Monobasic sodium phosphate
12. Penicillin acylase (Sigma Aldrich)
13. Potassium hydroxide
14. Pyridoxal-5'-phosphate
15. Sodium hydroxide
16. Tris

เครื่องมือและอุปกรณ์

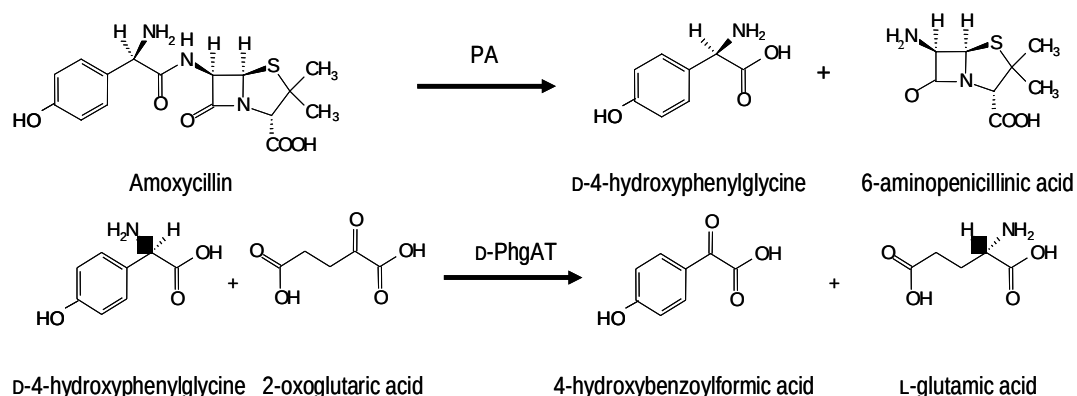
1. Analytical balance
2. Autoclave
3. Centrifuge tubes
4. Eppendorf[®] tubes
5. filter (0.45, 0.22 ไมครอน)
6. High performance liquid chromatography (HPLC)
7. ODS column (5 μ m, 150 mm x 4.5 mm)
8. Shaking incubator
9. Magnetic bar
10. Magnetic stirrer
11. Microcentrifuge
12. Micropipette

13. Micropipette tip
14. pH Meter
15. UV spectrophotometry (Hitachi, Tokyo, Japan)
16. Quartz cuvette
17. Vortex mixer

วิธีทำการวิจัย

1. การศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานของปฏิกิริยาซึ่งเร่งด้วยเอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

ปฏิกิริยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ amoxicillin ประกอบด้วย การตัดเอาหมู่ ดี-4-ไฮดรอกซีฟีนิลกลัยซีนในโครงสร้างของอะม็อกซิซิลลิน ออกจากโมเลกุลของอะม็อกซิซิลลินอย่างจำเพาะโดยเอนไซม์เพนนิซิลลินอะซิเลส จากนั้น ดี-4-ไฮดรอกซีฟีนิลกลัยซีนที่เกิดขึ้นเข้าทำปฏิกิริยากับ 2-ออกโซกลูตาเรต โดยมีเอนไซม์ดี-ฟีนิลกลัยซีนอะมิโนทรานสเฟอเรสเป็นตัวเร่ง และตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นตัวหนึ่งได้แก่ 4-ไฮดรอกซีเบนซิลฟอร์เมตซึ่งสามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตได้สูง ดังนั้นในการวิจัยจึงเริ่มต้นจากศึกษาสมมูลและคุณสมบัติพื้นฐานของปฏิกิริยาดังกล่าว



รูปที่ 2 ปฏิกิริยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ amoxicillin

1.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารต่างๆ ในปฏิกิริยาเพื่อศึกษาสมมูลและคุณสมบัติพื้นฐานของปฏิกิริยา

ได้ทดลองหาวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการแยกและวิเคราะห์ปริมาณสารต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา ได้แก่ 4-hydroxybenzoylformate, D-4-hydroxyphenylglycine, 6-APA และ amoxicillin ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography โดยเลือกใช้คอลัมน์ชนิด ODS (Agilent Eclipse XDB-C15, 5 μ M, 5.6 x 250 cm) และปรับชนิด, อัตราส่วน, pH และ flow rate ของ mobile phase ตลอดจนความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดสารต่างๆ

1.2 การศึกษาสมมูลย์เคมีของปฏิกิริยาและความสมบูรณ์ของปฏิกิริยา

ศึกษาความสมบูรณ์ของปฏิกิริยา และผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่มีผลความสมบูรณ์ของปฏิกิริยา หรือการเกิด substrate inhibition effect ตลอดจนช่วงความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อย่างเป็นเส้นตรง (linearity) โดยการทำปฏิกิริยาเมื่อใช้สารตั้งต้นในปริมาณต่างๆ โดยใช้เอนไซม์ในปริมาณที่เพียงพอ incubate ที่ 37°C นาน 0.5 h แล้วนำปฏิกิริยาไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ D-4-hydroxybenzoylformate, 4-hydroxy phenylglycine, 6-APA และ amoxicillin ด้วยวิธี HPLC ที่ได้พัฒนาขึ้น

1.3 การศึกษาคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของสารต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา และความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวัดผลิตภัณฑ์ 4-hydroxybenzoylformate

ทำโดยเตรียมสารละลายของ D-4-hydroxybenzoylformate, 4-hydroxyphenylglycine, 6-APA, 2-oxoglutarate และ amoxicillin ที่ความเข้มข้น 0.1 mM ในสารละลาย Tris buffer pH 8.0 แล้วนำไป scan เพื่อบันทึก UV-vis absorption spectrum โดยใช้ cuvette ที่มี path length 1 cm

2. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี

2.1 การศึกษาผลของปัจจัยที่เกี่ยวข้อง

จากข้อมูลที่ได้เกี่ยวกับคุณสมบัติของปฏิกิริยาซึ่งเร่งด้วยเอนไซม์ใน 2 ขั้นตอน และข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของสารต่างๆ ซึ่งเกี่ยวข้องในปฏิกิริยา จึงได้นำข้อมูลดังกล่าวนำไปใช้ออกแบบปฏิกิริยาที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี และได้ทำการศึกษาและปรับปรุง พารามิเตอร์ต่างๆ (optimization) เช่น pH ของปฏิกิริยา เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา ฯลฯ จนได้วิธีวิเคราะห์ที่ให้ linearity ที่ดี ใช้เวลาวิเคราะห์น้อย และใช้สารเคมีและเอนไซม์ประหยัดที่สุด ปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่

1. pH
2. ระดับความเข้มข้นของ 2-oxoglutarate
3. เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา
4. ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้

ขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาโดยทั่วไปเป็นดังนี้ ดังนั้นเมื่อต้องการศึกษาผลของปัจจัยใด ก็ vary ปัจจัยนั้น โดยที่ควบคุมปัจจัยอื่น ๆ ให้คงที่ ในขั้นตอนนี้ amoxicillin ที่ใช้ยังคงเป็น pure compound ไม่ได้ใช้ในรูปแบบเภสัชภัณฑ์

1. เตรียม Reaction mixture โดยการผสมสารต่อไปนี้

- sterile deionized water
- 100 mM buffer (final concentration)

- 100 μM pyridoxal-5'-phosphate
- สารละลาย 2-oxoglutarate
- D-phenylglycine aminotransferase enzyme

2. ผสม Reaction mixture เข้ากับ สารละลาย amoxicillin

3. นำไป incubate ที่ 37°C นาน 10 นาที เพื่อให้ hydroxyphenylglycine ซึ่งอาจมีเจือปน อยู่ใน amoxicillin ตั้งแต่เริ่มต้นถูกเปลี่ยนไปเป็น hydroxybenzoylformate

4. นำไปวัด absorbance ที่ 335 nm (สมมติได้ค่าเป็น B) เพื่อไว้ใช้หักลบ ถือเป็นค่า absorbance ของ background ก่อนเริ่มทำปฏิกิริยา

5. เติม Penicillin amidase enzyme แล้วผสมให้เข้ากัน

6. นำไป incubate ที่ 37°C ในระยะเวลาที่เหมาะสมจนปฏิกิริยาเสร็จสิ้นสมบูรณ์

7. นำไปวัด absorbance ที่ 335 nm อีกครั้ง (สมมติได้ค่าเป็น A)

8. คำนวณค่า absorbance ที่เปลี่ยนไป (ΔA) จาก ค่า absorbance ที่วัดได้ในข้อ 6 หักลบ ด้วยค่า absorbance ของ background และค่า absorbance ที่วัดได้จาก blank เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา (blank หมายถึงหลอดที่ทำปฏิกิริยาโดยประกอบด้วยสารทุกตัว แต่ไม่มี amoxicillin) นั่นคือ $\Delta A = A - B - A_{\text{blank}}$

9. สร้าง standard curve แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ amoxicillin เริ่มต้น เป็นแกน X กับค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปเมื่อสุดปฏิกิริยา (ΔA) เป็นแกน Y

2.2 การทดสอบ linearity ของวิธีวิเคราะห์ที่ได้ปรับปรุงแล้ว

ทำโดยสร้าง standard curve แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ amoxicillin เริ่มต้นกับค่าการดูดกลืนแสงเมื่อสุดปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 335 nm แล้วคำนวณค่า r^2

3. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

- Range and linearity

ศึกษาโดยสร้าง calibration curve ซึ่ง plot ระหว่าง ΔA กับ ความเข้มข้นของ amoxicillin เริ่มต้น ที่ได้จากปฏิกิริยาเมื่อใช้สารละลาย amoxicillin ที่มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 μM ($n = 6$ ที่แต่ละความเข้มข้น) แล้วคำนวณ linear regression model และค่า r^2

- Limit of detection, limit of quantitation

คำนวณ Limit of detection จาก $3(\sigma/S)$ และ limit of quantitation จาก $10(\sigma/S)$ เมื่อ σ คือ residual standard deviation ของ regression line และ S คือ slope ของ calibration curve

- Accuracy

Accuracy คำนวณจาก percentage recovery เมื่อเติม amoxicillin ในปริมาณที่ทราบแน่นอนลงไปในการตัวอย่างที่เตรียมจาก capsule และ powder for oral suspension ปริมาณ amoxicillin ที่เติมลงไปมี 3 ระดับ ได้แก่ 25, 50 และ 75 μM แล้วทำการวิเคราะห์หาปริมาณที่เติมลงไปด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้

- Precision (intra-day, inter-day)

Precision ของวิธี ประเมินจากการเติม amoxicillin ในปริมาณที่ทราบแน่นอนลงไปในการตัวอย่างที่เตรียมจาก capsule และ powder for oral suspension ปริมาณ amoxicillin ที่เติมลงไปมี 3 ระดับ ได้แก่ 25, 50 และ 75 μM แล้วทำการวิเคราะห์หาปริมาณที่เติมลงไปด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้ การวิเคราะห์ RSD (relative standard deviation) จาก 3 independent series ภายในวันเดียวกันจะให้ค่า intra-day precision และการวิเคราะห์ RSD จาก 3 independent series คนละวัน 3 วันต่อเนื่องกัน จะให้ค่า inter-day precision

- Specificity

Specificity ของวิธีวิเคราะห์ ประเมินได้จากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ amoxicillin ที่ทราบความเข้มข้น เมื่อเติมสารปรุงแต่งในตำรับ ได้แก่ lactose, sucrose, starch, magnesium stearate, sodium benzoate และ related compound ได้แก่ 6-APA และ D-penicillamine ลงไป แล้วดูว่าทำให้ผลการวิเคราะห์ amoxicillin ที่ได้เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมหรือไม่

4. การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีที่ระบุไว้ใน USP (HPLC method)

การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีอ้างอิง ทำโดยการวิเคราะห์ amoxicillin ในเภสัชภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในประเทศไทยบางยี่ห้อ กับวิธีที่ระบุไว้ใน USP (HPLC method) การวิเคราะห์ capsules เริ่มต้นจากการชั่งผงยาที่ได้จาก capsules 20 เม็ดหรือ powder for oral suspension ให้ได้ปริมาณหนึ่งเพื่อเตรียมสารละลายให้มีความเข้มข้นของ amoxicillin 1 mg/ml นำไปกรอง แล้วฉีดเข้า HPLC โดยใช้ C18 column โดยใช้ mobile phase ที่ประกอบด้วย monobasic potassium phosphate solution, pH 5.0 และ acetonitrile (96:4) detector set at 230 nm ปริมาณ amoxicillin คำนวณจาก peak area ของ sample เทียบกับ peak area ของสารละลาย amoxicillin มาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1.2 mg/ml

III. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานของปฏิกิริยาซึ่งเร่งด้วยเอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

1.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารต่างๆ ในปฏิกิริยาเพื่อศึกษาสมมูลและคุณสมบัติพื้นฐานของปฏิกิริยา

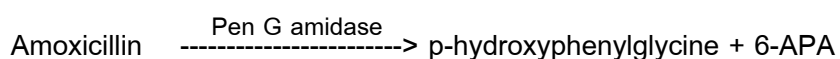
วิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสารต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography ได้แก่ การแยกโดยใช้คอลัมน์ชนิด C18, mobile phase คือ 25 mM potassium phosphate buffer pH 6.5, flow rate 0.6 ml/min และใช้ UV detector ที่ 225 และ 340 nm ได้ retention time เป็นดังนี้

ตารางที่ 1 Retention time ของ 4-hydroxybenzoylformate, D-4-hydroxyphenylglycine, 6-APA และ amoxicillin ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

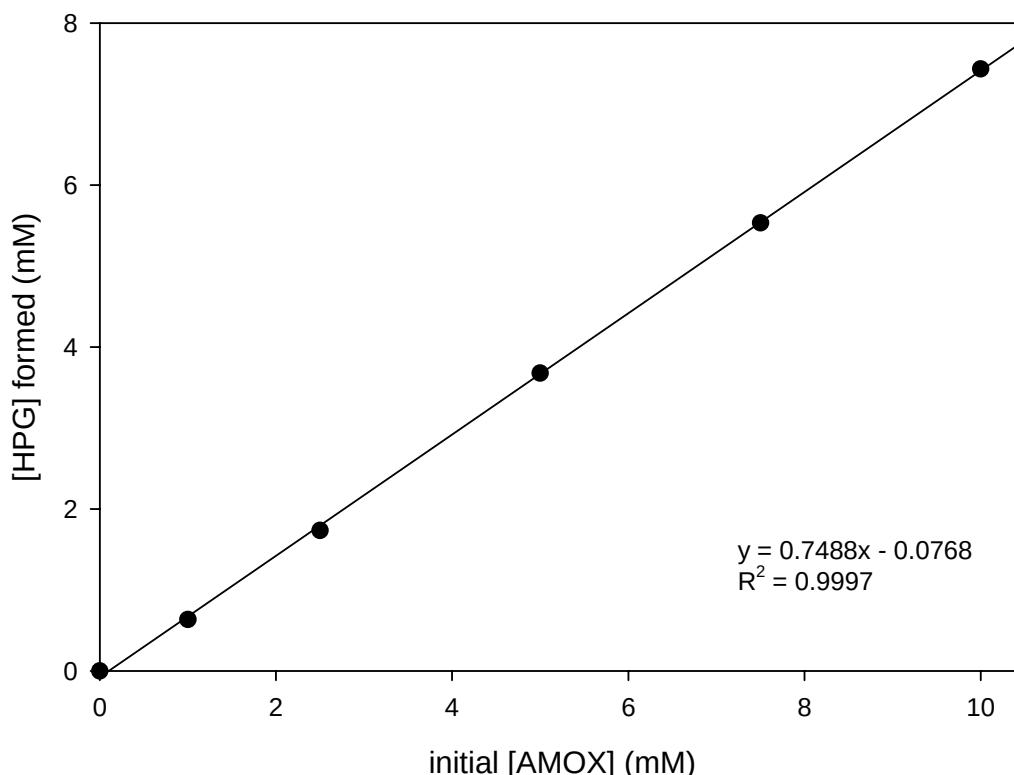
สาร	ความยาวคลื่นที่ใช้ตรวจวัด (nm)	Retention time (min)
4-hydroxybenzoylformate	334	3.5
D-4-hydroxyphenylglycine	225	3.7
6-APA	225	5.0
amoxicillin	225	23.0

1.2 การศึกษาสมมูลย์เคมีของปฏิกิริยาและความสมบูรณ์ของปฏิกิริยา

1.2.1 ปฏิกิริยาในขั้นตอนที่ 1

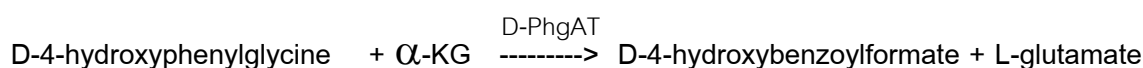


เมื่อทำการศึกษาใน Tris buffer, pH 8.0 (reaction total volume 1 mL) พบว่า % conversion of reactant มีค่าประมาณ 70% เมื่อใช้ amoxicillin เริ่มต้นความเข้มข้น 1-10 mM โดยในช่วงนี้ความเข้มข้นของ D-4-hydroxyphenylglycine ที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรง (linear relationship) กับความเข้มข้นของ amoxicillin เริ่มต้น ($r^2 = 0.9997$)

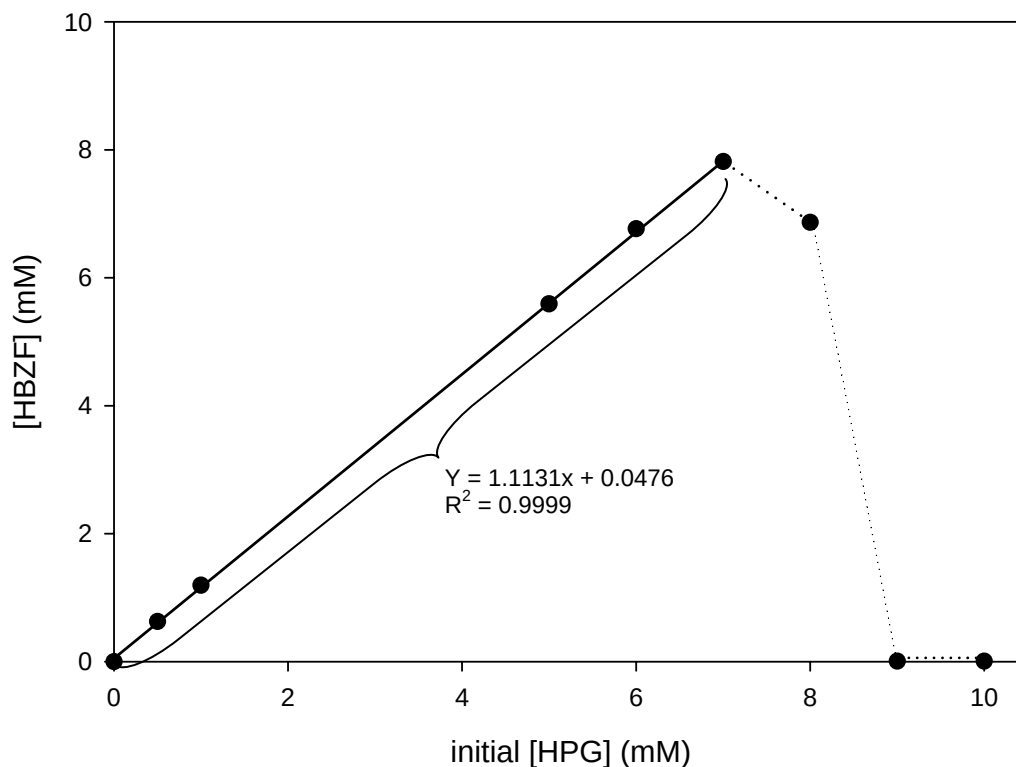


รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ amoxicillin (AMOX) เริ่มต้น กับ D-4-hydroxy phenylglycine (HPG) ที่เกิดขึ้นจากการไฮโดรไลซิส amoxicillin ด้วยเอนไซม์ penicillin acylase

1.2.2 ปฏิกริยาในขั้นตอนที่ 2



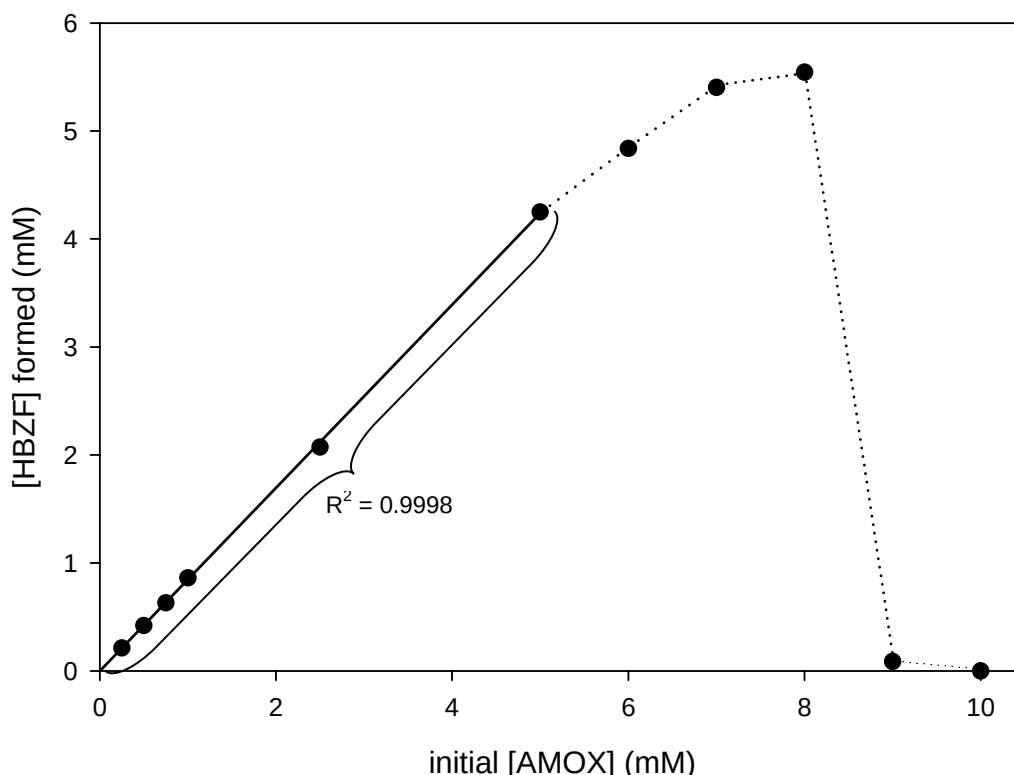
เมื่อทำการศึกษาใน Tris buffer, pH 8.0 (reaction total volume 1 mL) และใช้ [α -KG] เป็น 5 เท่าของ D-4-hydroxyphenylglycine เพื่อ force ให้สมดุลดำเนินไปทางขวา พบว่าปฏิกริยา มีความสมบูรณ์ 100% เมื่อใช้ amoxicillin เริ่มต้นที่มีความเข้มข้น 0.5-7.0 mM โดยในช่วงนี้ความเข้มข้นของ 4-hydroxybenzoylformate ที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของ D-4-hydroxyphenylglycine เริ่มต้น ($r^2 = 0.9999$) แต่หากเพิ่มความเข้มข้นมากกว่านั้น (>7-8 mM) ปฏิกริยาจะเกิดขึ้นน้อยลง และในที่สุดปฏิกริยาจะถูกยับยั้งเมื่อความเข้มข้นของ D-4-hydroxyphenylglycine > 8 mM



รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ D-4-hydroxyphenylglycine (HPG) เริ่มต้น กับ D-4-hydroxybenzoylformate (HBZF) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา transamination โดยการเร่งด้วยเอนไซม์ D-phenylglycine aminotransferase

1.2.3 ปฏิกริยารวมทั้ง 2 ขั้นตอน

เมื่อทำการศึกษาใน Tris buffer, pH 8.0 (reaction total volume 1 mL) และใช้ [2-oxoglutarate] เป็น 5 เท่าของ amoxicillin พบว่าปฏิกิริยามีความสมบูรณ์ประมาณ 80% เมื่อใช้ amoxicillin เริ่มต้นความเข้มข้น 0.25-5.0 mM ในช่วงนี้ความเข้มข้นของ 4-hydroxybenzoylformate ที่เกิดขึ้นแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของ amoxicillin เริ่มต้น ($r^2 = 0.9998$) แต่หากเพิ่มความเข้มข้นมากกว่านั้น (>6-8 mM) ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นน้อยลง และในที่สุดปฏิกิริยาจะถูกยับยั้งเมื่อความเข้มข้นของ amoxicillin > 8 mM



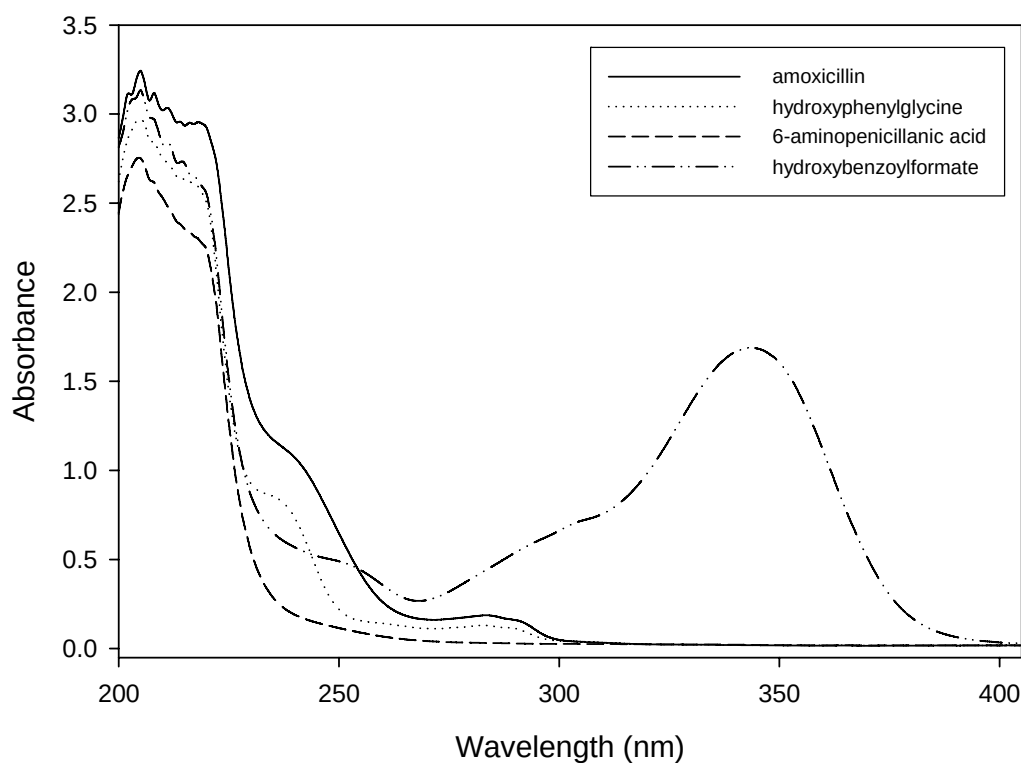
รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ amoxicillin (AMOX) เริ่มต้น กับ 4-hydroxy-benzoylformate (HBZF) ที่เกิดขึ้นจากการสลาย amoxicillin โดยการเร่งด้วยเอนไซม์ penicillin acylase และ D-phenylglycine aminotransferase

1.3 การศึกษาคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของสารต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา

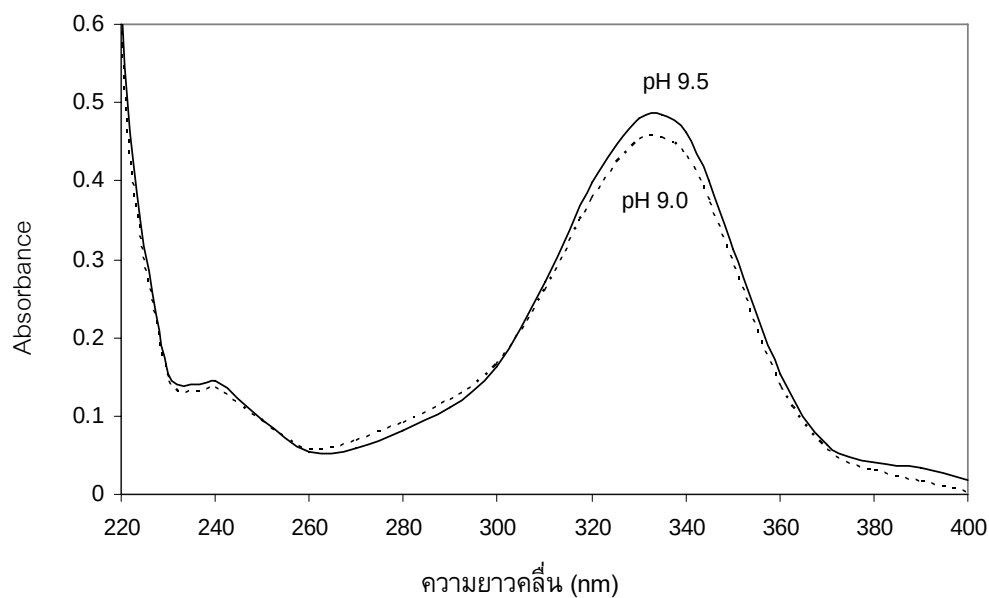
จาก UV absorption spectrum (รูปที่ 6) พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการตรวจวัดตามวิธีการนี้อันได้แก่ 4-hydroxybenzoylformate มีการดูดกลืนแสงได้ดีมากที่ความยาวคลื่น 335 nm ในขณะที่สารอื่นๆ ในปฏิกิริยาได้แก่ amoxicillin, D-4-hydroxyphenylglycine, 6-APA, 2-oxoglutarate รวมทั้ง Tris buffer ไม่มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นนี้ สารอื่นๆ จึงไม่รบกวนการวิเคราะห์หากเลือกวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 nm

นอกจากนี้ ยังพบว่าการดูดกลืนแสงของ 4-hydroxybenzoylformate ยังขึ้นกับ pH โดยพบว่ายิ่ง pH เพิ่มขึ้น การดูดกลืนแสงของ 4-hydroxybenzoylformate จะเพิ่มขึ้น (รูปที่ 7)

ข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ว่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจ 4-hydroxybenzoylformate ได้แก่ 335 nm ซึ่งการดูดกลืนแสงสูงสุด ($\epsilon_{335} = 2.2 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) และ sensitivity ของวิธีวิเคราะห์จะเพิ่มขึ้นหากตรวจวัดสารดังกล่าวในสภาวะเบส



รูปที่ 6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา เมื่อเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 0.1 mM ใน 100 mM Tris buffer, pH 8.0



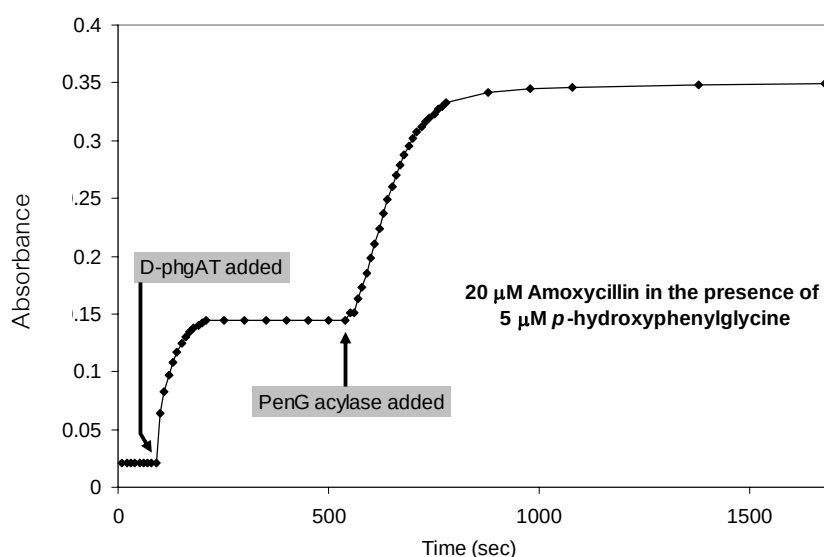
รูปที่ 7 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของของสารละลาย 25 μ M 4-hydroxybenzoylformate เปรียบเทียบที่ pH 9.0 และ 9.5 (วัดใน cuvette ที่มี pathlength 1 cm)

2. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี

2.1 การศึกษาผลของปัจจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 ขั้นตอนในการผสมสารต่างๆ ในปฏิกิริยา

ขั้นตอนและลำดับในการผสมสารเพื่อทำปฏิกิริยาตามวิธีทดลองที่ได้กล่าวไป มีเหตุผลเพื่อที่จะได้หักลบ background ของค่า absorbance อันเกิดจากสารต่างๆ ในปฏิกิริยา รวมถึงค่า absorbance อันเกิดจาก 4-hydroxybenzoylformate ซึ่งเกิดมาจาก D-4-hydroxyphenylglycine ซึ่งอาจมีเจือปนอยู่ใน amoxicillin ตั้งแต่เริ่มต้น ดังนั้นจึงเป็นการกำจัด interference อันเกิดจาก D-4-hydroxyphenylglycine ได้ ผู้ศึกษาได้ทำการทดลองติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกรณีที่มี hydroxyphenylglycine 5 μM เจือปนอยู่ใน amoxicillin เพื่อให้เห็นประโยชน์ของการเติมเอนไซม์ D-phenylglycine aminotransferase ลงไปก่อนในขั้นตอนแรก เพื่อจะได้นำค่า absorbance ที่เกิดจาก hydroxybenzoylformate ที่เกิดขึ้นส่วนนี้ ไปหักลบออกค่า absorbance เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา (รูปที่ 8) อย่างไรก็ตามโดยปกติ (ไม่มีการเติม D-4-hydroxyphenylglycine ลงไปเพิ่ม) background ส่วนนี้ มีค่าน้อยมากในระดับประมาณ 0.03 absorbance unit

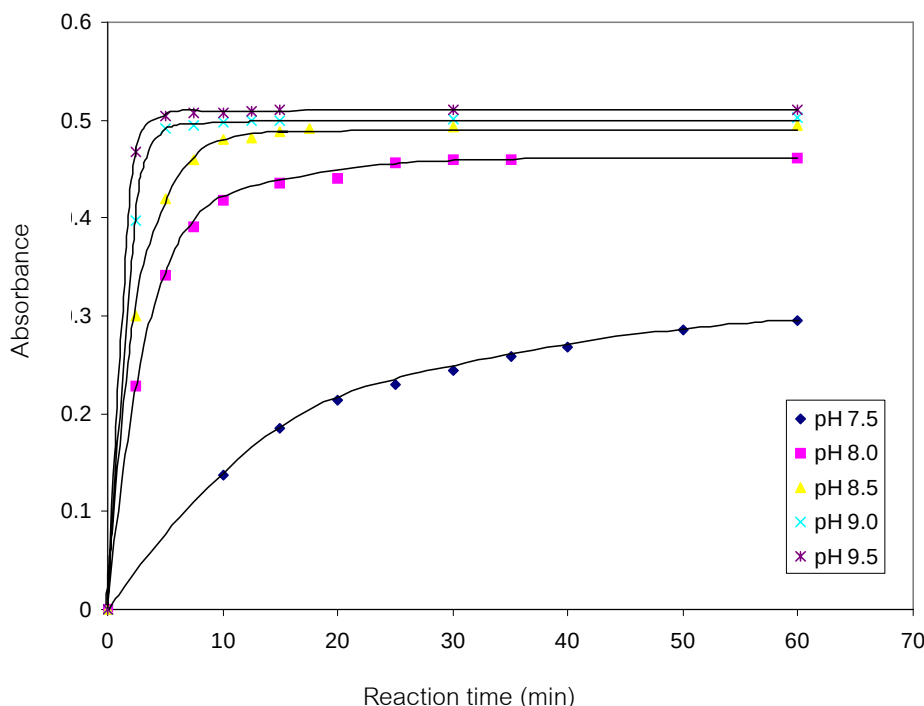


รูปที่ 8 การติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกรณีที่มี D-4-hydroxyphenylglycine เจือปนอยู่ใน amoxicillin

2.1.2 ผลของ pH

แสดงดังรูปที่ 9 เห็นได้ว่าปฏิกิริยาจะเกิดได้อย่างรวดเร็ว และถึง end point ในเวลาไม่เกิน 15 นาทีเมื่อทำปฏิกิริยาที่ pH 9.0 – 9.5 (Tris buffer, 100 mM) ดังนั้น จึงเลือกใช้ pH 9.0 ในการศึกษาต่อไป เพื่อให้ในการวิเคราะห์ใช้เวลาไม่เกิน 15 นาที และ 4-hydroxybenzoylformate เองก็มีการดูดกลืนได้ดีที่ pH ซึ่งเป็นเบส เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่เป็นกลาง อย่างไรก็ตามไม่

เลือก pH 9.5 เนื่องจากมีสภาวะเบสมากเกินไป ซึ่งอาจทำให้เกิดการสลายตัวของ amoxicillin โดยปฏิกิริยาข้างเคียงอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ หรืออาจมีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์



รูปที่ 9 การติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ณ pH ต่างๆ

1.2 ผลของความเข้มข้นของ 2-oxoglutarate

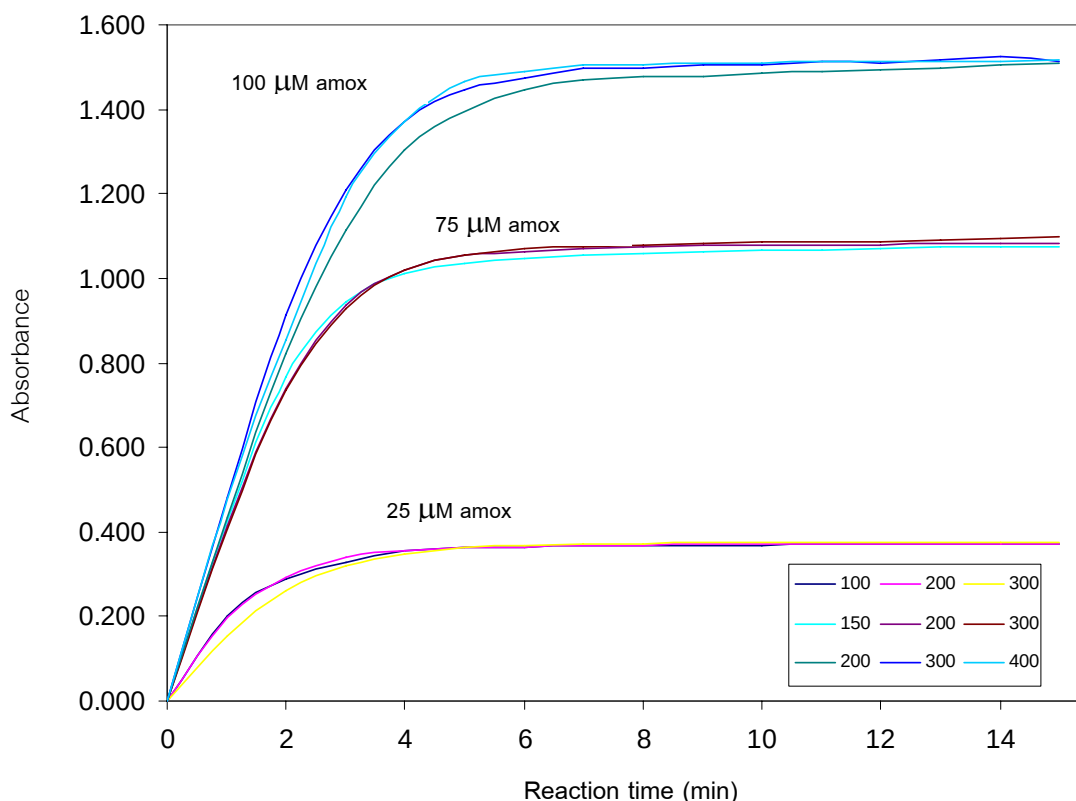
เนื่องจาก 2-oxoglutarate เป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในปฏิกิริยา ผู้ทำการศึกษาจึงตั้งสมมติฐานว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ 2-oxoglutarate ให้อยู่ในระดับที่มากเกินไป อาจช่วยผลักดันให้ปฏิกิริยาดำเนินไปทางด้านหน้าได้สมบูรณ์มากขึ้น หรือช่วยเร่งให้ปฏิกิริยารวดเร็วยิ่งขึ้น ดังนั้น จึงทำการทดลองติดตามปฏิกิริยาเมื่อใช้ [amoxicillin] คงที่ แต่ vary 2-oxoglutarate ดังนี้

A. [amoxicillin] = 25 μM ; [2-oxoglutarate] = 100, 200, 300 μM

B. [amoxicillin] = 75 μM ; [2-oxoglutarate] = 150, 200, 300 μM

B. [amoxicillin] = 100 μM ; [2-oxoglutarate] = 200, 300, 400 μM

พบว่าการใช้ [2-oxoglutarate] เป็นสองเท่าของ [amoxicillin] ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีอัตราเร็วและความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาไม่แตกต่างไปจากการใช้ [2-oxoglutarate] เกินสองเท่าของ [amoxicillin] เมื่อพิจารณาในระยะเวลา 15 นาที (รูปที่ 10) ดังนั้น ในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ [2-oxoglutarate] ที่ 200 μM เพื่อให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของ amoxicillin 100 μM ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้เตรียมกราฟมาตรฐาน



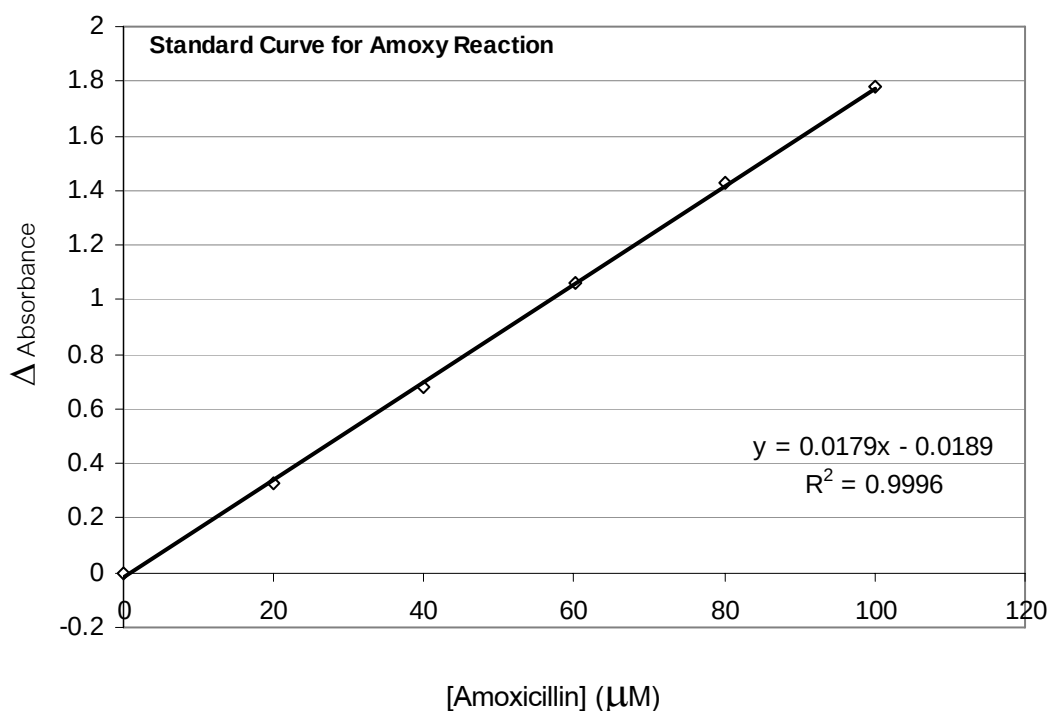
รูปที่ 10 การติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เมื่อใช้ 2-oxoglutarate ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

1.3 ผลของความเข้มข้นของปริมาณเอนไซม์

พบว่าปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ถึง end point ในเวลา 15 min เมื่อใช้ amoxicillin 100 μM ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้เตรียมกราฟมาตรฐาน คือ อย่างต่ำชนิดละ 30 μL ต่อปฏิกิริยาในปริมาตร 1 mL เอนไซม์ปริมาณดังกล่าวเทียบเท่ากับเอนไซม์ PA 1 U ml⁻¹ และ D-phgAT 0.2 U ml⁻¹

2.2 การทดสอบ linearity ของวิธีวิเคราะห์ที่ได้ปรับปรุงแล้ว

เมื่อสร้าง standard curve แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ amoxicillin เริ่มต้นในช่วง 0 - 100 μM กับค่าการดูดกลืนแสงเมื่อสุดปฏิกิริยา (ΔA) ที่ความยาวคลื่น 335 nm โดยใช้ 100 mM Tris buffer, pH 9.0, 200 μM α -ketoglutarate, เอนไซม์อย่างละ 30 μL, incubation time 15 min (หลังจากเติม penicillin acylase แล้ว) ได้ standard curve ดังรูปที่ 11 โดยให้ค่า $r^2 = 0.9996$



รูปที่ 11 standard curve แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ amoxicillin เริ่มต้นในช่วง 0 - 100 μM กับค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปเมื่อสุดปฏิกิริยา (ΔA)

2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) เป็นดังนี้

- Range and linearity : $r^2 = 0.9998$ ในช่วง [amoxicillin] = 0 – 100 μM
- Slope $\pm$ SD = 0.0185 ± 0.0001
- intercept $\pm$ SD = 0.0131 ± 0.0047
- Limit of detection = 0.766 μM , limit of quantitation = 2.552 μM
- Accuracy (ทดสอบใน capsules) (L = 25, M = 50, H = 75 μM , n = 6)
 - 24.52 $\pm$ 0.58 (% recovery = 98.07 $\pm$ 2.32%)
 - 49.51 $\pm$ 0.92 (% recovery = 99.07 $\pm$ 1.85%)
 - 74.65 $\pm$ 1.09 (% recovery = 99.53 $\pm$ 1.46%)
- Accuracy (ทดสอบใน dry syrup) (L = 25, M = 50, H = 75 μM , n = 6)
 - 24.78 $\pm$ 0.93 (% recovery = 99.12 $\pm$ 3.73%)
 - 49.39 $\pm$ 0.77 (% recovery = 99.77 $\pm$ 1.55%)
 - 74.73 $\pm$ 0.95 (% recovery = 99.64 $\pm$ 1.27%)

- Precision (intra-day, inter-day)

- ทดสอบใน capsules (L = 25, M = 50, H = 75 μ M, n = 3)

Intra-day (n = 3) % RSD = 2.60% (L), 1.13% (M), 1.08 (H)

Inter-day (n = 3) % RSD = 4.30% (L), 2.13% (M), 1.14 (H)

- ทดสอบใน dry syrup (L = 25, M = 50, H = 75 μ M, n = 3)

Intra-day (n = 3) % RSD = 2.53% (L), 1.24% (M), 0.82 (H)

Inter-day (n = 3) % RSD = 1.58% (L), 1.47% (M), 0.85 (H)

- Specificity

พบว่าสารปรุงแต่งในตำรับ ได้แก่ lactose, sucrose, starch, magnesium stearate, sodium benzoate และ related compound ได้แก่ 6-APA และ D-penicillamine ไม่มีผลรบกวนการวิเคราะห์โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้

4. การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีที่ระบุไว้ใน USP (HPLC method)

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ (Enzyme) กับวิธีที่ระบุไว้ในเภสัชตำรับ USP (HPLC method) แสดงดังตารางที่ 2 แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้วิเคราะห์ปริมาณ amoxicillin ได้ไม่แตกต่างจากวิธีมาตรฐาน

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ (Enzyme) กับวิธี HPLC ตาม USP

รูปแบบยา	Brand	HPLC		Enzyme	
		% Assayed amount	SD	% Assayed amount	SD
Capsules	SIAM-250	96.80	0.24	97.26	1.51
	DYMOX-250	100.18	0.15	101.25	1.44
	DYMOX-500	101.11	0.10	101.36	1.46
	COAMOX-500	101.20	0.05	101.59	0.93
Dry syrup	IBIA-DS-125	98.86	0.20	98.01	0.97
	IBIA-DS-250	101.19	0.15	99.12	0.72

IV. บทสรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณอะม็อกซิซิลลินในเภสัชภัณฑ์ที่ง่าย รวดเร็ว มีความไว และต้นทุนต่ำ โดยอาศัยปฏิกิริยาซึ่งเร่งด้วยเอนไซม์ 2 ปฏิกิริยา ในขั้นตอนแรก หมู่ดี-4-ไฮดรอกซีฟีนิลกลัยซีนในโครงสร้างของอะม็อกซิซิลลินถูกตัดอย่างจำเพาะออกจากโมเลกุลของอะม็อกซิซิลลินโดยเอนไซม์เพนนิซิลลินอะซิเลส จากนั้นดี-4-ไฮดรอกซีฟีนิลกลัยซีนที่เกิดขึ้นเข้าทำปฏิกิริยากับ 2-ออกโซกลูตาเรตโดยมีเอนไซม์ดี-ฟีนิลกลัยซีนอะมิโนทรานสเฟอเรสเป็นตัวเร่งเกิดผลิตภัณฑ์ตัวหนึ่งได้แก่ 4-ไฮดรอกเบนซิลฟอร์เมตซึ่งสามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตได้สูง ดังนั้นปริมาณอะม็อกซิซิลลินจึงถูกวิเคราะห์ได้จากค่าการดูดกลืนแสงซึ่งเพิ่มขึ้น ณ ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร ข้อสรุปที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้มีดังนี้

1. การใช้เอนไซม์เพนนิซิลลินอะซิเลสเพื่อตัดเอาหมู่ดี-4-ไฮดรอกซีฟีนิลกลัยซีนในโครงสร้างของอะม็อกซิซิลลินออกจากโมเลกุลของอะม็อกซิซิลลิน มีความจำเป็นเนื่องจาก chemical hydrolysis เช่น การใช้กรดหรือด่างทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ และได้ผลิตภัณฑ์อื่นๆ นอกเหนือจาก ดี-4-ไฮดรอกซีฟีนิลกลัยซีน ร่วมด้วย

2. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ ได้แก่ การทำปฏิกิริยาใน 100 mM Tris buffer pH 9.0, [PLP] = 100 mM, [2-oxoglutarate] = 200 mM, [PA] = 1 U ml⁻¹ และ [D-phgAT] = 0.2 U ml⁻¹ ที่ 37°C โดยทำปฏิกิริยากับ D-phgAT ก่อน แล้วจึงทำปฏิกิริยากับ PA

3. กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณอะม็อกซิซิลลินเริ่มต้นที่มีอยู่ในตัวอย่างกับค่าการดูดกลืนแสงซึ่งเพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงดีมาก ($r^2 = 0.9998$ ในช่วงความเข้มข้นของอะม็อกซิซิลลิน 0 – 100 ไมโครโมลาร์) มีค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด และขีดจำกัดของวิเคราะห์หาปริมาณ เป็น 0.77 และ 2.55 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

4. เมื่อนำวิธีนี้ไปวิเคราะห์เภสัชภัณฑ์อะม็อกซิซิลลินในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับละลายน้ำได้ยาแขวนตะกอน พบว่าวิธีวิเคราะห์มีความถูกต้องและแม่นยำดี ไม่ถูกรบกวนโดยสารปรุงแต่งอื่นๆ ในตำรับ รวมถึงผลิตภัณฑ์อันเกิดจากการสลายตัวของอะม็อกซิซิลลิน

5. เนื่องจากทุกขั้นตอนของการวิเคราะห์ปราศจากการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ตลอดจนสารเคมีที่เป็นอันตราย จึงนับว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้เป็นวิธีวิเคราะห์หาปริมาณอะม็อกซิซิลลินในเภสัชภัณฑ์ที่ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม

เอกสารอ้างอิง

- [1] W.A. Remers, J.N. Delagado (Eds.), Wilson and Gisfold's Textbook on Organic Medicinal and Pharmaceautical Chemistry, 10th ed., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York, 1998, pp. 274–290.
- [2] The United States Pharmacopeia 30, National Formulary 25, US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2007.
- [3] A. Muñoz de la Peña, M.I. Acedo-Valenzuela, A. Espinosa-Mansilla and R. Sánchez-Maqueda, Talanta 56 (2002) 635.
- [4] X. Xiaofeng , S. Zhenghua, Spectroscopy 20 (2006) 37.
- [5] S. Yuanyuan, T. Yuhai, Y. Hong, L. Yinhuai, Anal. Sci. 21 (4) (2005) 457.
- [6] B. Uslu, I. Biryol, J. Pharm. Biomed. Anal. 20 (3) (1999) 591.
- [7] L. Quanmin, Y. Zhanjun, Anal. Lett. 39 (4) (2006) 763.
- [8] G.G. Mohamed, J. Pharm. Biomed. Anal. 24 (4) (2001) 561.
- [9] Q.A. Mouayed, H. Hind Haddi, M.A. Anas, Anal. Chimica Acta 554 (1-2) (2005) 184.
- [10] British Pharmacopaeia, H.M. Stationary Office, London (2007).
- [11] P. Srisom, B. Liawruangrath, S. Liawruangrath, Chromatographia 65 (2007) 687.
- [12] H. Bisswanger, Practical Enzymology, Wiley VCH, Weinheim, 2004, p. 35.
- [13] S. Wiyakrutta, V. Meevootisom, J. Biotechnol. 55 (1997) 193.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายธีรศักดิ์ โรจนารธา
(ชื่อ-สกุล ภาษาอังกฤษ) Mr. Theerasak Rojanarata
2. เพศ ชาย สถานะทางการสมรส โสด
3. วัน เดือน ปีเกิด 3 ตุลาคม 2516 อายุ 36 ปี
4. ตำแหน่งปัจจุบัน (อาจารย์, ผศ., รศ., ศ.) ผศ.
5. ที่อยู่ (ที่ทำงาน)
ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ถ. ราชมรรคาใน อ.เมือง จังหวัด นครปฐม 73000
โทรศัพท์ +034-255-800 โทรสาร +034-255-801
6. ที่อยู่ (ที่บ้าน) 4/70 หมู่ 5 ต.สนามจันทร์
จังหวัด นครปฐม รหัสไปรษณีย์ 73000
โทรศัพท์ 0891585587 โทรสาร-
7. E-mail Address theerasak@email.pharm.su.ac.th โทรศัพท์มือถือ 0891585587
8. ประวัติการศึกษา
 - 8.1 ปริญญาตรี สาขาวิชา เภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีที่สำเร็จ 2538 คะแนนเฉลี่ยสะสม 3.64
 - 8.2 ปริญญาโท สาขา - สถาบัน -
ปีที่สำเร็จ - คะแนนเฉลี่ยสะสม -
หัวข้อวิทยานิพนธ์ที่ทำ -
 - 8.3 ปริญญาเอก สาขาวิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ปีที่สำเร็จ 2547 คะแนนเฉลี่ยสะสม 4.00
หัวข้อวิทยานิพนธ์ที่ทำ Genetic engineering of D-phenylglycine aminotransferase to facilitate immobilization and maximize catalytic performance
9. ผลงานวิจัยย้อนหลังตั้งแต่ปี ค.ศ . 2004 ถึงปัจจุบัน
 - 9.1 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ
 1. **T. Rojanarata**, D. Isarangkul, S. Wiyakrutta, V. Meevootisom And J.M. Woodley
Controlled-release Biocatalysis for the Synthesis of D-Phenylglycine. Biocatalysis and Biotransformation, 2004 vol. 22 (3). pp. 195-201 มี impact factor 1.345
 2. Tanasait Ngawhirunpat, Suwannee Panomsuk, Praneet Opanasopit, **Theerasak Rojanarata**, Tomomi Hatanaka. Species difference in percutaneous absorption of

- hydrophilic and lipophilic compounds in shed snake skin. *Pharmazie*. 2006; 61(3), 254-259 มี impact factor 0.696
3. Wanlop Weecharangsan, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, **Theerasak Rojanarata**, Auayporn Apirakaramwong. Chitosan Lactate as a Nonviral Gene Delivery Vector in COS-1 Cells. *AAPS PharmSciTech* (2006)
 4. Praneet Opanasopit, Tanasait. Ngawhirunpat, Amornrut Chaidedgumjorn, **Theerasak. Rojanarata**, Auayporn Apirakaramwong, Sasiprapha Phongying, Chantiga Choochottiro, Suwabun Chirachanchai. Incorporation of camptothecin into N-phthaloyl Chitosan-g-m PEG self assembly micellar system for passive targeting. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* มี impact factor 2.012
 5. Wanlop Weecharangsan, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, Auayporn Apirakaramwong, **Theerasak Rojanarata**, Uracha Ruktanonchai, Robert J. Lee. An investigation of chitosan salts as nonviral gene vectors in CHO-K1 cells. *Int. J. Pharm.* 348,161-168 (2008) impact factor 2.408
 6. Praneet Opanasopit, Auayporn Apirakaramwong, Tanasait Ngawhirunpat, **Theerasak Rojanarata**, Uracha Ruktanonchai. Development and characterization of pectinate micro/nanoparticles for gene delivery. *AAPS PharmSciTech* 9(1):67-74 (2008). impact factor 0.857
 7. Tanasait Ngawhirunpat, Praneet Opanasopit, **Theerasak Rojanarata**, and Suwannee Panomsuk. Evaluation of Simultaneous Permeation and Metabolism of Methyl Nicotinate in Human, Snake, and Shed Snake Skin. *Pharm Dev Technol.* 13 (1):75-83 (2008). impact factor 0.816
 8. **Theerasak Rojanarata**, Maleenart Petchsangsa, **Praneet Opanasopit**, Tanasait Ngawhirunpat, Uracha Ruktanonchai, Warayuth Sajomsang, Supawan Tantayanon. Methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) Chitosan for a Novel Effective Gene Carriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70(1):207-214.(2008) impact factor 2.611
 9. **Theerasak Rojanarata**, Praneet Opanasopit, Sunee Techaarpornkul, Tanasait Ngawhirunpat, Uracha Ruktanonchai. Chitosan - thiamine pyrophosphate as a novel carrier for siRNA delivery. *Pharm Res.* 25(12):2807-14 (2008). impact factor 3.441
 10. Praneet Opanasopit, Maleenart Petchsangsa, **Theerasak Rojanarata**, Tanasait Ngawhirunpat, Warayuth Sajomsang and Uracha Ruktanonchai. Methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosan as effective gene carriers: effect of degree of Substitution. *Carbohydr. Polym.* 75 (2009) 143–149. impact factor 1.782

11. Praneet Opanasopit, Warayuth Sajomsang, Uracha Ruktanonchai, Varissaporn Mayen, **Theerasak Rojanarata**, Tanasait Ngawhirunpat. Methylated N-(4-pyridinylmethyl) chitosan as a novel effective safe gene carrier. *Int. J. Pharm.* 368:127-134 (2008) impact factor 2.408
12. Tittaya Suksamran, Praneet Opanasopit, **Theerasak Rojanarata**, Tanasait Ngawhirunpat, Uracha Ruktanonchai, Pitt Supaphol. Biodegradable alginate microparticles developed by electrohydrodynamic spraying techniques for oral delivery of protein. *J. Microencapsulation*. (in press) (2009). impact factor 1.168
13. Jariya Kowapradit, Praneet Opanasopita, Tanasait Ngawhiranpat, Auayporn Apirakaramwong, **Theerasak Rojanarata**, Uracha Ruktanonchai and Warayuth Sajomsang. Methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosan, a novel chitosan derivative, enhances paracellular permeability across intestinal epithelial cells (Caco-2)" *AASP PharmSciTech*. 9(4)1143-1152 (2008). (IF 0.857).
14. Ngawhirunpat T, Opanasopit P, **Rojanarata T**, Akkaramongkolporn P, Ruktanonchai U, Supaphol P. Development of meloxicam-loaded electrospun polyvinyl alcohol mats as a transdermal therapeutic agent. *Pharm Dev Technol*. 2009;14(1):70-79. impact factor 0.816

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ภายในประเทศ

1. Tanasait Ngawhirunpat, Praneet Opanasopit, Suwannee Panomsuk, **Theerasak Rojanarata**, Usanee Kumprakrob. Skin permeation enhancement of ketoprofen supersaturated solutions with antinucleant polymers. *Thai. J. Pharm Sci*. 2005 ,29 (1-2), 2005, 120-126.

Proceeding

1. Praneet Opanasopit, Maleenart Petchsangsa, Tanasait Ngawhirunpat, **Theerasak Rojanarata**, Auayporn Apirakaramwong, Uracha Ruktanonchai, Warayuth Sajomsang, Supawan Tantayanon. Development of a novel gene carrier using water soluble chitosan derivatives. NSTDA Annual Conference 28-30 March 2007; Thailand Science Park, Pathumthani, Thailand.
2. Praneet Opanasopit, Maleenart Petchsangsa, Tanasait Ngawhirunpat, **Theerasak Rojanarata**, Auayporn Apirakaramwong, Uracha Ruktanonchai, Warayuth Sajomsang, Supawan Tantayanon. Methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) Chitosan for a Novel

Effective Gene Carrier. 34th Annual meeting of the controlled release society July 7-11, 2007; Long Beach Convention Center, Long Beach, California, USA.

3. Kingkan Subsantisuk, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, **Theerasak Rojanarata** and Uracha Ruktanonchai. A Novel Gene Carrier Using Anionic Liposomes Coated by Chitosan Lactate. The 2nd Thailand Nanotechnology Conference (TNC) Nanomaterials for Health, Energy and Environment.13-15 August 2008, Phuket Graceland Resort&Spa, Patong, Phuket, Thailand.
4. Jariya Kowapradit, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, Auayporn Apirakaramwong, **Theerasak Rojanarata**, Uracha Ruktanonchai and Warayuth Sajomsang. Methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) Chitosan on Epithelial Permeability using Caco-2 Cells. The 2nd Thailand Nanotechnology Conference (TNC) Nanomaterials for Health, Energy and Environment.13-15 August 2008, Phuket Graceland Resort&Spa, Patong, Phuket, Thailand.
5. Tittaya Suksamran, Praneet Opanasopit, **Theerasak Rojanarata**, Uracha Ruktanonchai, Pitt Supaphol. Development of protein delivery system using alginate micro/nanoparticles. The 2nd Thailand Nanotechnology Conference (TNC) Nanomaterials for Health, Energy and Environment.13-15 August 2008, Phuket Graceland Resort&Spa, Patong, Phuket, Thailand.
6. Nanthida Wonglertnirant, Praneet Opanasopit, **Theerasak Rojanarata**, Tanasait Ngawhirunpat, Uracha Ruktanonchai and Warisada Sila-on. Development of Lipid Emulsion Formulations for Camptothecin. The 2nd Thailand Nanotechnology Conference (TNC) Nanomaterials for Health, Energy and Environment.13-15 August 2008, Phuket Graceland Resort&Spa, Patong, Phuket, Thailand.
7. **T. Rojanarata**, P. Opanasopit, T. Ngawhirunpat, S. Techaarpornku, U. Ruktanonchai. Chitosan salts as a Novel Effective and Safe Carrier for siRNA Delivery. 36th Annual meeting of the controlled release society July 18-22, 2009, Bella Center, Copenhagen Denmark.
8. P. Opanasopit, **T. Rojanarata**, T. Ngawhirunpat, W. Sajomsang, U. Ruktanonchai. Quaternary Ammonium Chitosan Derivatives as a Novel Effective Gene Carriers. 36th Annual meeting of the controlled release society July 18-22, 2009, Bella Center, Copenhagen Denmark.

Poster presentation

1. P. Opanasopit, T. Ngawhirunpat, S. Panomsuk, A. Chaidedgumjorn, **T. Rojanarata**, S. Chirachanchai. Incorporation of camptothecin into n-phthaloylchitosan-mpeg self-assembly micellar system. The 5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. Geneva Switzerland March 27-30, 2006.
2. Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, Auayporn Apirakaramwong, **Theerasak Rojanarata**, Manee Luangtana-anan, Suwannee Panomsuk. Development of gene delivery systems using pectin nanoparticles. การประชุมเสนอผลงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี 2549 (ครั้งที่ 23) และ JSPS 1st Medicinal chemistry seminar of asia/africa scientific program ในระหว่างวันที่ 14-15 ธันวาคม 2549 คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. Maleenart Petchsangsa, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, **Theerasak Rojanarata**, Auayporn Apirakaramwong, Uracha Ruktanonchai, Warayuth Sajomsang, Supawan Tantayanon. Development of a novel gene delivery carrier using methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosans. การประชุมเสนอผลงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี 2549 (ครั้งที่ 23) และ JSPS 1st Medicinal chemistry seminar of asia/africa scientific program ในระหว่างวันที่ 14-15 ธันวาคม 2549 คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. Praneet Opanasopit, Jariya Kowapradit, Auayporn Apirakaramwong, Tanasait Ngawhirunpat, **Theerasak Rojanarata**, Uracha Ruktanonchai and Warayuth Sajomsang. Methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosan enhanced epithelial permeability. Experimental Biology 2008 Today's Research: Tomorrow's Health, 5-9 April 2008 at San diego Convention Center, San diego, California, USA.
5. **Theerasak Rojanarata**, Praneet Opanasopit, Auayporn Apirakaramwong, Tanasait Ngawhirunpat, Uracha Ruktanonchai. Nuclear localization signal peptides enhance transfection efficiency of chitosan/DNA complexes delivery. Experimental Biology 2008 Today's Research: Tomorrow's Health, 5-9 April 2008 at San diego Convention Center, San diego, California, USA.
6. Tanasait Ngawhirunpat, Praneet Opanasopit, **Theerasak Rojanarata**, Suwannee Panomsuk, Lawan Chanchome. Simultaneous permeation and metabolism of methyl nicotinate in human, snake, and shed snake skin. Experimental Biology 2008 Today's Research: Tomorrow's Health, 5-9 April 2008 at San diego Convention Center, San diego, California, USA.

7. Jariya Kowapradit, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, Auayporn Apirakaramwong, **Theerasak Rojanarata**, Uracha Ruktanonchai and Warayuth Sajomsang. Methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) Chitosan on Epithelial Permeability using Caco-2 Cells. ในงานการประชุมเสนอผลงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ประจำปี 2551 (ครั้งที่ 25) ในวันที่ 2 ธันวาคม 2551 คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
8. Tittaya Suksamran, Praneet Opanasopit, **Theerasak Rojanarata**, Uracha Ruktanonchai, Pitt Supaphol. Development of protein delivery system using alginate micro/nanoparticles. ในงานการประชุมเสนอผลงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี 2551 (ครั้งที่ 25) ในวันที่ 2 ธันวาคม 2551 คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อื่นๆ

1. วันชัย สุทธะนันท์ และ **ธีรศักดิ์ โรจนราธา** “ตำรับแคปซูลเมตริกซ์กึ่งแข็ง (Semisolid Matrix Capsule Formulations) ไทยเภสัชสาร ปีที่ 20 ฉบับที่ 2, 2539 หน้า 89-98
2. **ธีรศักดิ์ โรจนราธา** “เอแนนทิโอเมอร์ (Enantiomer): บทบาทต่อฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของยา” ไทยเภสัชยนิพนธ์ ปีที่ 2 ฉบับเดือนมีนาคม 2548 หน้า 1-12
3. **ธีรศักดิ์ โรจนราธา** “ปั๊มขับยาปฏิชีวนะและสารยับยั้ง (Antibiotic Efflux Pumps and inhibitors)” ไทยเภสัชยนิพนธ์ ปีที่ 2 ฉบับเดือนมิถุนายน 2548 หน้า 1-11
4. **ธีรศักดิ์ โรจนราธา** “โฟเลต: จากวิตามินสู่การพัฒนายา (Folate: from vitamin to drug discovery)” ไทยเภสัชยนิพนธ์ ปีที่ 3 ฉบับเดือนเมษายน 2549 หน้า 1-15
5. **ธีรศักดิ์ โรจนราธา** และปรานีต โอปนะโสภิต “ระบบนำส่งวัคซีน (Vaccine delivery systems)” วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ 11 (1) 38-48 (2549)
6. **ธีรศักดิ์ โรจนราธา** และวนิดา คำพา “Derivative Spectroscopy เทคนิคที่ไม่ยุ่งยากสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ซับซ้อน” วารสาร LAB.TODAY ปีที่ 6 ฉบับที่ 41 มิถุนายน 2550 หน้า 31 – 35
7. **ธีรศักดิ์ โรจนราธา** และวนิดา คำพา “Green chemistry กับงานวิเคราะห์” วารสาร LAB.TODAY ปีที่ 6 ฉบับที่ 43 ตุลาคม 2550 หน้า 41 – 45
8. **ธีรศักดิ์ โรจนราธา** “ปลูกจิตสำนึกเภสัชกร พึงรักษาสังแวดล้อม” วารสารฟาร์มาไทม์ ปีที่ 5 ฉบับที่ 58 เดือนตุลาคม 2550 หน้า 19 – 24
9. **ธีรศักดิ์ โรจนราธา** “การพัฒนาทางด้านจุลชีพเพื่อเอาชนะการดื้อยา” วารสารวิทยาศาสตร์สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ปีที่ 61 ฉบับที่ 6 เดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม 2550 หน้า 71 – 76

หนังสือ

1. หนังสือ เรื่อง “พื้นฐานการคำนวณในงานวิเคราะห์เชิงปริมาณ” 336 หน้า. ISBN 978-974-641-208-7 พิมพ์ที่โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร--นครปฐม, 2551

10. สาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง

Synthesis and analysis of pharmaceutically-important compounds

Enzyme technology

Controlled drug delivery system

Output ที่ได้จากโครงการ

ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

1. Theerasak Rojanarata, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, Choedchai Saehuan, Suthep Wiyakrutta and Vithaya Meevootisom. Simple, sensitive and green bienzymatic UV-spectrophotometric method for the determination of amoxicillin in pharmaceutical preparations. **Analytical Letters** (manuscript in submission)

(ดูภาคผนวก)