
การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ยาหยอดตาทีโมลอล มาลีเอต ด้วยวิธี UPLC

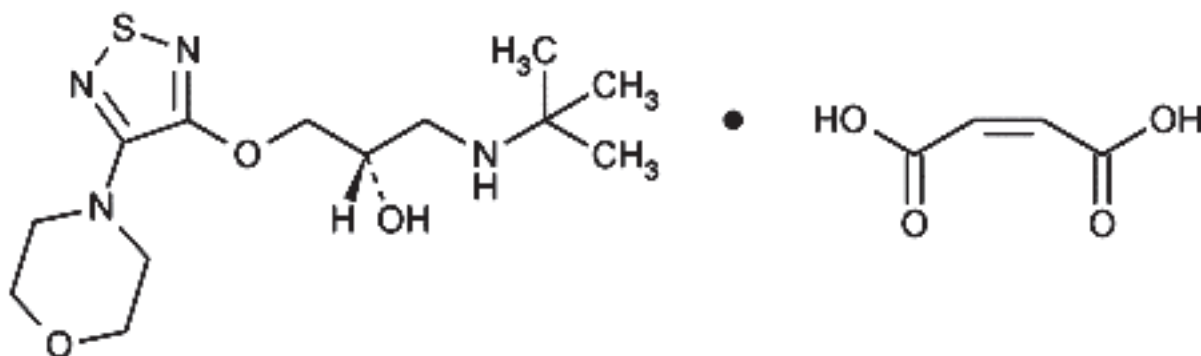
นพภัณฑ วังศ์ธนาภิกขเจริญ กุลธิดา อัมพันธ์ทอง และบรรจง กิติรัตน์ตระกูล
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา ภาควิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง นครราชสีมา 30000

บทคัดย่อ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณตัวยาทีโมลอล มาลีเอต ในยาหยอดตา เพื่อให้ใช้ได้กับเครื่องอัลตราเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี พร้อมทั้งทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ โดยใช้คอลัมน์ Acquity UPLC BEH C18 1.7 μm , $2.1 \times 100 \text{ mm}$ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยมีสัดส่วนตัวพา ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และเมทานอล คือ 65 : 35 อัตราการไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร ผลการทดสอบพบว่าวิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะต่อการหาปริมาณตัวยาทีโมลอล มาลีเอต ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.056-0.423 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.9999 การทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ พบว่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยเท่ากับ 98.2 และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.5 การทดสอบความเที่ยงภายในวันเดียวกันมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.4 และต่างวันกันมีค่าเท่ากับ 1.3 วิธีวิเคราะห์มีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะที่ใช้ทดสอบ คือ การเปลี่ยนสัดส่วนของสารละลายตัวพา และการเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์ ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพยาหยอดตาทีโมลอล มาลีเอต จำนวน 15 ตัวอย่างที่สุ่มจากโรงพยาบาลของรัฐในประเทศไทย ตรวจวิเคราะห์หวัข้อการตรวจเอกลักษณ์ การตรวจปริมาณตัวยาสำคัญ ค่าความเป็นกรด-เบส และการทดสอบความปราศจากเชื้อ พบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีคุณภาพเข้ามาตรฐาน

บทนำ

ในปัจจุบันต้อหินเป็นสาเหตุอันดับแรกๆ ที่นำไปสู่การตาบอด (irreversible blindness) ของประชากร โดยทำให้เกิดการตายของเซลล์และใยประสาทตา โรคต้อหินมักพบในผู้สูงอายุ และมีจำนวนผู้ป่วยมากขึ้นเรื่อยๆ⁽¹⁾ ทิมอลอลเป็นยาในกลุ่ม non-selective beta-adrenergic receptor antagonist ในประเทศไทยขึ้นทะเบียนเป็นยาหยอดตาในรูปเกลือของทิมอลอล มาลีเอต ออกฤทธิ์ลดความดันลูกตาในผู้ป่วยโรคต้อหินที่มีความดันลูกตาสูง ยาหยอดตาทิมอลอล มาลีเอต (Timolol maleate eye drop) เป็นยาในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2556 กลุ่ม 11.4 Drugs for treatment of glaucoma จัดอยู่ในบัญชี ก⁽²⁾ ยาหยอดตาทิมอลอล มาลีเอต ที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทย เฉพาะสูตรยาเดียวที่เป็นยาแผนปัจจุบันสำหรับมนุษย์ มี 18 เลขทะเบียน โดยเป็นผู้ผลิตในประเทศไทย 14 เลขทะเบียน และเป็นผู้ผลิตต่างประเทศ 4 เลขทะเบียน⁽³⁾

ทิมอลอล มาลีเอต มีลักษณะเป็นผงสีขาวละลายได้ในน้ำ และเอทานอล มีชื่อทางเคมี คือ (2S)-1-[(1,1-Dimethylethyl) amino]-3-[[4-(morpholin-4-yl)-1, 2, 5-thiadiazol-3-yl]oxy]propan-2-ol(Z)-butenedioate.⁽⁴⁾ มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{13}H_{24}N_4O_3S \cdot C_4H_4O_4$ มีน้ำหนักโมเลกุล 432.49 และมีสูตรโครงสร้างทางเคมี⁽⁵⁾ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของทิมอลอล มาลีเอต

การวิเคราะห์ปริมาณด้วยยาทิมอลอล มาลีเอต ในยาหยอดตา ที่ระบุไว้ในเภสัชตำรับของประเทศสหรัฐอเมริกา (USP36) ใช้วิธี High-performance Liquid Chromatography (HPLC) คอลัมน์ ขนาด 4.6 mm. × 15 cm. บรรจุอนุภาค L1 ขนาด 5 micron ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 40 องศาเซลเซียส ใช้สารละลายตัวพา คือ phosphate buffer pH 2.8 และเมทานอล ในสัดส่วน 2:1 อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร⁽⁶⁾

เนื่องจากในปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องมือแยกสาร Ultra-performance Liquid Chromatography (UPLC) ที่ใช้หลักการเดียวกันกับ HPLC แต่มีประสิทธิภาพการแยกสารที่ดีกว่า สามารถทนแรงดันได้มากกว่า ใช้คอลัมน์ขนาดเล็กกว่า จึงใช้ระยะเวลาและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ลดลง ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณด้วยยาทิมอลอล มาลีเอต ในยาหยอดตา เพื่อให้ใช้ได้กับ UPLC พร้อมทั้งทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์⁽⁷⁾ ตามหลักเกณฑ์ของ USP⁽⁸⁾ และ ICH Guideline⁽⁹⁾ เพื่อใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในการตรวจคุณภาพยาหยอดตา ทิมอลอล มาลีเอต

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

ยาหยอดตาทีโมลอล มาลีเอต ความแรง 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 15 ตัวอย่าง สุ่มจากโรงพยาบาลของรัฐในประเทศไทย ระหว่างวันที่ 31 ตุลาคม 2557 ถึง 8 ธันวาคม 2557

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี : monobasic sodium phosphate, phosphoric acid, methanol HPLC grade, acetonitrile HPLC grade, น้ำ HPLC grade จากเครื่อง ELGA Purelab Maxima

สารมาตรฐาน : USP Timolol Maleate RS

วิธีการทดสอบ มี 5 ขั้นตอน ดังนี้

1. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ โดยการละลาย monobasic sodium phosphate 11.1 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้อยู่ในช่วง pH 2.8 ± 0.05 ด้วยกรด phosphoric acid
2. การเตรียมสารละลาย Diluent ผสม acetonitrile และสารละลายบัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 2 : 1
3. การเตรียมสารละลายตัวพา ผสมสารละลายบัฟเฟอร์ และเมทานอล ในอัตราส่วน 65 : 35
4. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ซึ่งสารมาตรฐาน USP Timolol Maleate RS 34 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ 25 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้น 0.056, 0.113, 0.141, 0.169, 0.282 และ 0.423 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
5. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง ละลายตัวอย่างเทียบเท่า ทีโมลอล 5 มิลลิกรัม ในสารละลาย Diluent 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

เครื่องมือ และอุปกรณ์ เครื่อง UPLC: Waters Model H-class ประกอบด้วย Quaternary solvent manager, Sample manager FTN, Column Heater Compartment และ PDA e λ Detector ส่วนควบคุมและประมวลผลโดย Empower Software คอลัมน์ Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m, 2.1 \times 100 mm

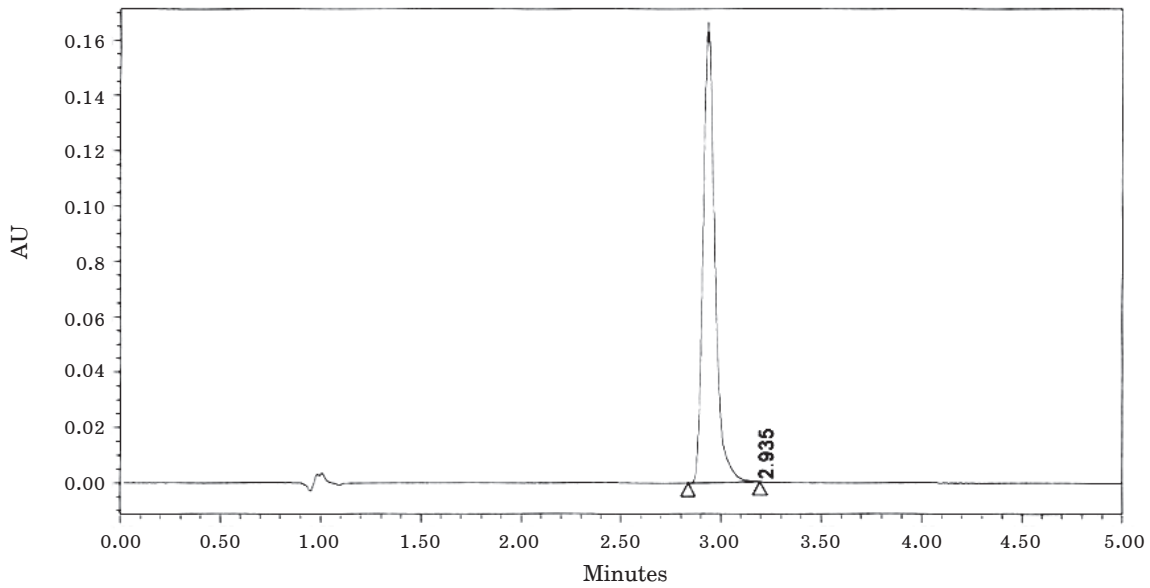
สภาวะที่ใช้ทดสอบ ฉีดสารละลาย 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง UPLC โดยใช้คอลัมน์ Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m, 2.1 \times 100 mm ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยมีสัดส่วนตัวพา Phosphate buffer และเมทานอล คือ 65 : 35 อัตราการไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

การทดสอบความถูกต้องของวิธี (Method Validation) ทดสอบตามหลักเกณฑ์ของ USP⁽⁸⁾ และ ICH Guideline⁽⁹⁾ ในหัวข้อการทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity), การทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range) โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995, การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) โดยการคำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ต้องอยู่ในช่วง 95-105%, การทดสอบความเที่ยง (Precision) โดยการคำนวณ %RSD ของการวิเคราะห์ซ้ำต้องไม่มากกว่า 2.0 และการทดสอบความทนของวิธี (Robustness) โดยการศึกษาวารามิเตอร์ต่างๆ ที่อาจมีผลกระทบต่อวิธีการแล้วคำนวณค่า %RSD ต้องไม่มากกว่า 2.0

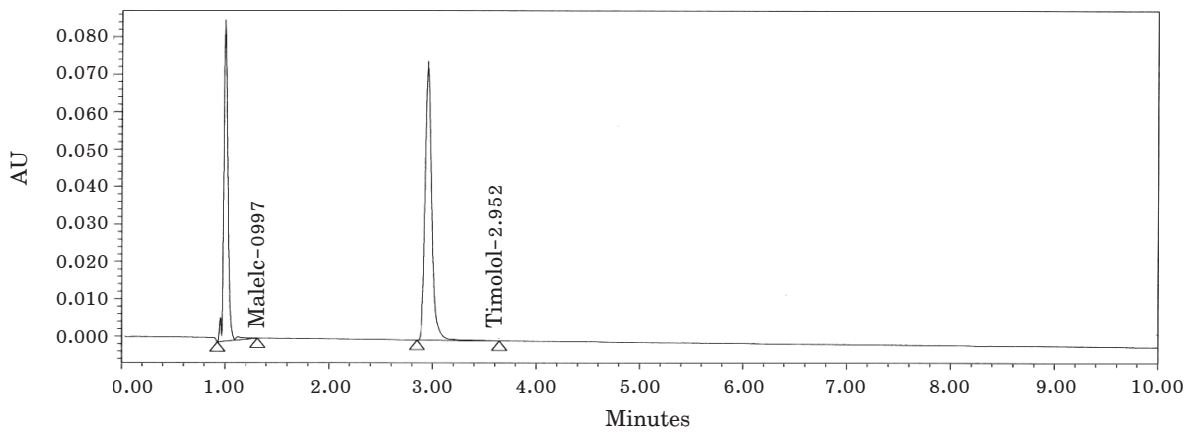
ผล

จากการทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity) โดยนำสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC เปรียบเทียบโครมาโทแกรม (Chromatogram) ของสารละลายตัวอย่าง เทียบกับ

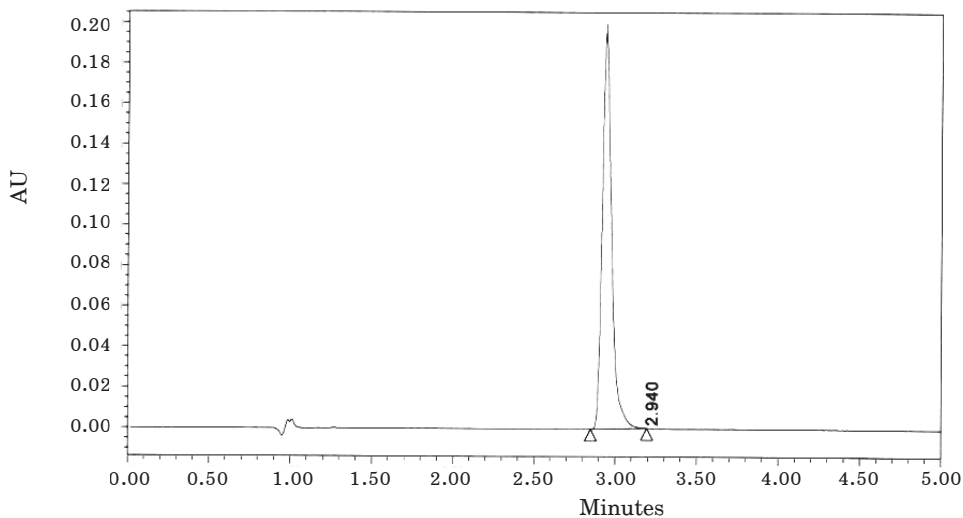
โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน พบว่าสภาวะที่ทดสอบสามารถแยกพีคของ Timolol maleate และ Maleic acid ออกจากกันได้ และไม่มีพีครบกวนการวิเคราะห์ (ภาพที่ 2, 3, 4 และ 5)



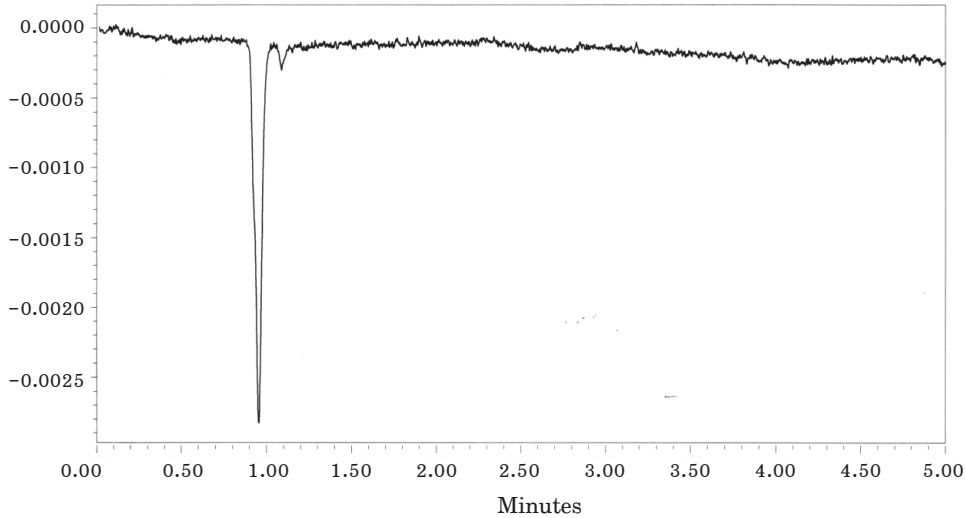
ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของสารละลายผสม Timolol maleate และ Maleic acid



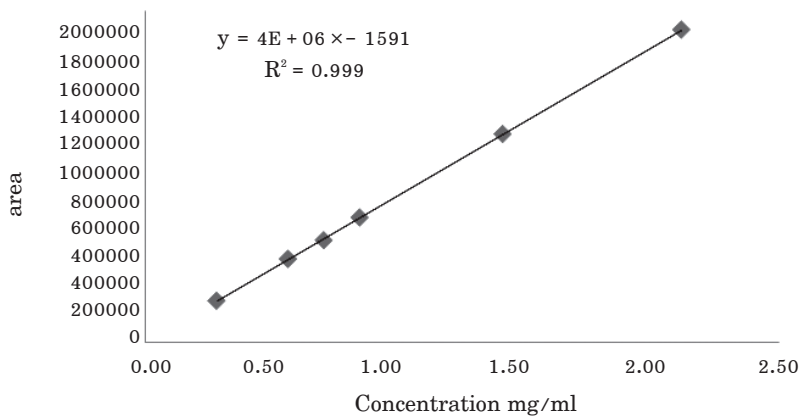
ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่าง



ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมของ Blank

ในการทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range) ด้วยการฉีดสารละลายมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้น 0.056, 0.113, 0.141, 0.169, 0.282 และ 0.423 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น และพื้นที่ใต้พีค พบว่ามีลักษณะเป็นเส้นตรง มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.9999 (ภาพที่ 6)

Timolol maleate



ภาพที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีค

ส่วนการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) จากการฉีดสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐาน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.113, 0.141 และ 0.169 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบค่าร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) เท่ากับ 97.8, 98.2 และ 98.7 % ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบร้อยละของการคืนกลับ

ระดับความเข้มข้น	ความเข้มข้น (mg/ml)	ร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ย
80%	0.113	97.8
100%	0.141	98.2
120%	0.169	98.7
	เฉลี่ย	98.2
	%RSD	0.5

การทดสอบความเที่ยง (Precision) ในส่วนของการทดสอบการทำซ้ำได้ (Repeatability) ด้วยการวิเคราะห์ 6 ซ้ำ ในวันเดียวกันมี %RSD เท่ากับ 0.4 ส่วนการวิเคราะห์ต่างวันกันจำนวน 3 วัน (Intermediate Precision) มี %RSD เท่ากับ 1.3 (ตารางที่ 2 และ 3)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบ Repeatability

ครั้งที่	ความเข้มข้น (mg/ml)
1	0.1478
2	0.1483
3	0.1480
4	0.1483
5	0.1496
6	0.1480
เฉลี่ย	0.148
%RSD	0.42

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบ Intermediate Precision

ครั้งที่	ความเข้มข้น (mg/ml)
1	0.148
2	0.148
3	0.152
เฉลี่ย	0.149
%RSD	1.25

สำหรับการทดสอบความทนของวิธี (Robustness) โดยทดลองเปลี่ยนสภาวะของระบบ UPLC โดยการเปลี่ยนสัดส่วนของสารละลายตัวพัพเฟออร์ และเมทานอล เป็น 55 : 45 และเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 30 และ 35 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์ พบว่า %RSD เท่ากับ 1.0 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ Robustness

สภาวะที่ทดสอบ	ความเข้มข้นเฉลี่ย
สัดส่วนสารละลาย 55 : 45	0.149
อุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส	0.150
อุณหภูมิคอลัมน์ 35 องศาเซลเซียส	0.152
อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส	0.148

หลังจากนั้นได้นำวิธีการทดสอบที่ผ่านเกณฑ์การทดสอบความถูกต้องของวิธีมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างยาหยอดตาทีโมลอล มาลีเอต โดยการสุ่มตัวอย่างยาหยอดตาทีโมลอล มาลีเอต จากโรงพยาบาลของรัฐภายในช่วงเวลาเดือนตุลาคมถึงธันวาคม พ.ศ. 2557 จำนวน 15 ตัวอย่าง 5 ทะเบียนยา/ผู้ผลิต โดยมีหัวข้อการตรวจสอบคุณภาพยาและเกณฑ์มาตรฐานตาม USP 36 พบว่า ตัวอย่างที่สุ่มมาทั้งหมด ร้อยละ 100 มีคุณภาพเข้ามาตรฐาน USP 36 ทุกหัวข้อการวิเคราะห์ (ตารางที่ 5 และ 6)

ตารางที่ 5 หัวข้อการตรวจสอบคุณภาพยา และเกณฑ์มาตรฐานตาม USP 36

หัวข้อตรวจสอบคุณภาพ	เกณฑ์มาตรฐาน
การตรวจเอกลักษณ์ (Identification)	ตรวจพบ Timolol Maleate
ปริมาณตัวยาสำคัญ (Active Ingredient)	90.0 – 110.0 % LA
ค่าความเป็นกรด-เบส (pH)	6.5 – 7.5
การทดสอบความปราศจากเชื้อ (Sterility Test)	Sterile

ตารางที่ 6 ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพยาหยอดตาทีโมลอล มาลีเอต

ประเทศ	ทะเบียนยา/ผู้ผลิต	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนรุ่นการผลิต	ผลวิเคราะห์
ไทย	ก	4	4	เข้ามาตรฐาน
อินเดีย	ข	3	3	เข้ามาตรฐาน
ไทย	ค	2	1	เข้ามาตรฐาน
เบลเยียม	ง	3	2	เข้ามาตรฐาน
ไทย	จ	3	3	เข้ามาตรฐาน
รวม		15	13	

วิจารณ์

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณตัวยาททีโมลอล มาลีเอต ในยาหยอดตา ด้วยวิธี UPLC พบว่า วิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยพิจารณาจากการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.9999 ซึ่งมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995 จึงถือว่าผ่านเกณฑ์กำหนด

การทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 80, 100 และ 120% ของความเข้มข้นที่ใช้ผลวิเคราะห์ทั้ง 3 ระดับ อยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับคือ 95–105% อย่างไรก็ตาม ผลของการทดสอบร้อยละของ

การคืนกลับที่ได้ไม่เป็น normal curve อาจเนื่องมาจากประสิทธิภาพของเครื่องมือ หรือวิธีการวิเคราะห์ ซึ่งควรมีการวิเคราะห์สาเหตุที่แน่นอน เพื่อนำไปพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่ดีขึ้นต่อไป

การทดสอบความเที่ยงของวิธี พบว่า %RSD ของการทำซ้ำ เท่ากับ 0.4 และ %RSD ของการวิเคราะห์ต่างวัน เท่ากับ 1.3 อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ ไม่มากกว่า 2.0

สำหรับการทดสอบความทนของวิธีวิเคราะห์ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการวิเคราะห์ พบว่า %RSD เท่ากับ 1.0 อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ ไม่มากกว่า 2.0

จากการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ตามหัวข้อต่าง ๆ ดังกล่าว จึงสามารถนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณตัวยา timolol maleate ในยาหยอดตาได้ วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ ใช้สารเคมีปริมาณน้อยทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย ลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

การศึกษาคุณภาพยาหยอดตา timolol maleate พบว่า ตัวอย่างที่สุ่มได้จากโรงพยาบาลของรัฐบาล มีจำนวนทั้งสิ้น 15 ตัวอย่าง จากผู้ผลิตจำนวน 5 ราย ตรวจวิเคราะห์ในหัวข้อ ตรวจวิเคราะห์ในหัวข้อการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ (Identification) การหาปริมาณตัวยาสำคัญ (Active ingredient) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความปราศจากเชื้อ (Sterility Test) พบว่า ตัวอย่างทั้งหมด ร้อยละ 100 ผ่านเกณฑ์ที่ระบุไว้ในเภสัชตำรับของประเทศสหรัฐอเมริกา (USP36) ทุกหัวข้อการวิเคราะห์ จึงสรุปได้ว่าตัวอย่างยาหยอดตา timolol maleate ที่ถูกสุ่มทั้งหมดมีคุณภาพตามมาตรฐานสากล

สรุป

วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณตัวยา timolol maleate ในยาหยอดตาได้ และตัวอย่างยาหยอดตา timolol maleate ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ ทุกตัวอย่างมีคุณภาพตามเกณฑ์มาตรฐานสากล

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางฉัตรรัตน์ ปลื้มใจ ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา และนางสาวสุรชนี เสวตศิลา ผู้อำนวยการสำนักยาและวัตถุเสพติด ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงานจนสำเร็จลุล่วง

เอกสารอ้างอิง

1. Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng CY. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* 2014; 121(11): 2081-90.
2. คณะอนุกรรมการพัฒนาบัญชียาหลักแห่งชาติ. บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2556. นนทบุรี: สำนักยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา; 2556.
3. งานบริการข้อมูลผลิตภัณฑ์สุขภาพผ่านอินเทอร์เน็ต. ผลิตภัณฑ์ยา. [ออนไลน์]. [สืบค้น 29 พ.ค. 2557]; เข้าถึงได้จาก: URL: <http://fdaolap.fda.moph.go.th/logistics/drgdrug/DSerch.asp>.
4. Timolol maleate. In: *British pharmacopeia* 2013. London: The Stationary Office; 2012. p. 2162-2164.
5. Timolol maleate. In: *United States pharmacopeia 36 - national formulary 31*. 36th ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2013. p. 5400.
6. Timolol maleate ophthalmic solution. In: *United States pharmacopeia 36 - national formulary 31*. 36th ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2013. p. 5401.

7. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
 8. Validation of compendial procedures. In: United States pharmacopeia 36 – national formulary 31. 36th ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2013. p. 983–987.
 9. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2(R1). Geneva: ICH Secretariat; 2005.
-

UPLC Method Development and Validation for Determination of Timolol Maleate in Ophthalmic Solution

Napanan Wongthanakitcharoen Kulthida Ampantong and Banjong Kitirattrakran
*Regional medical sciences Center 9 Nakhonratchasima, Department of Medical Sciences Amphoe
Muang, Nakhonratchasima 30000, Thailand*

ABSTRACT The method validation for determination of Timolol Maleate in ophthalmic preparation was established using Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). The separation was achieved on a Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m, 2.1 \times 100 mm at 40 degree Celsius. The mobile phase was the mixture of phosphate buffer and methanol (65:35) at the flow rate of 0.25 ml per minute with UV detection at 295 nm. Specificity test showed that Timolol maleate peak was not interfered by other peak. The linearity test showed linear relationship between the area under the peak and concentration levels in range of 0.056 to 0.423 mg per ml with coefficient of determination 0.9999. The percentage mean recovery from 3 concentration levels was 98.2 (%RSD = 0.5). The precision test within same day gave %RSD of 0.4 and different days gave %RSD of 1.3. The robustness test indicate that describe method was robust when the chromatographic condition were changed such as composition and column temperature. The quality of Timolol Maleate eye drop 15 samples were sampling from government hospitals in Thailand. The samples were analyzed for identification test, assay of active ingredient, pH and sterility test. All samples passed the specifications.

Key words : Timolol, UPLC