

การหาปริมาณคลอซอกซาโซน อินโดเมธาซินและไอบูโพรเฟนในตัวอย่างยา
โดยใช้โครโมลิท C_{18} เป็นคอลัมน์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Determination of Chlorzoxazone, Indomethacin and Ibuprofen in Pharmaceutical Formulations by
Chromolith C_{18} High-Performance Liquid Chromatography

ประกาย นาอูด, มวรุต ทาชาว และ สมศักดิ์ ศรีไชย*

ภาควิชาเคมี และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Prakay Naudom, Warut Tachao and Somsak Sirichai*

Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry,

Faculty of Science, Burapha University

บทคัดย่อ

มีการพัฒนาโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้โครโมลิท C_{18} เป็นคอลัมน์ซึ่งมีความแม่นยำ สภาพไฟว และรวดเร็ว สำหรับการหาปริมาณของคลอซอกซาโซน อินโดเมธาซิน และไอบูโพรเฟนทำการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์โครโมลิท C_{18} (100 มิลลิเมตร x 4.6 มิลลิเมตร) ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เมทานอล: 0.1% สารละลายกรดฟอสฟอริก (pH 4.2) (70:30 โดยปริมาตร) เป็นเฟสเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที ความยาวคลื่นของการตรวจวัดคือ 215 นาโนเมตร ช่วงความเป็นเส้นตรง ในการวิเคราะห์นี้อยู่ในช่วง 1-100 มิลลิกรัมต่อลิตรขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการหาปริมาณสำหรับคลอซอกซาโซน คือ 0.08 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตรอินโดเมธาซินคือ 0.03 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร และไอบูโพรเฟนคือ 0.06 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ค่าร้อยละของการกลับคืนอยู่ในช่วง 92-106% วิธีที่นำเสนอประยุกต์ใช้ได้เป็นอย่างดีในการหาปริมาณของคลอซอกซาโซน อินโดเมธาซิน และไอบูโพรเฟนในตัวอย่างยา

คำสำคัญ : โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง / โครโมลิท C_{18} / คลอซอกซาโซน / อินโดเมธาซิน / ไอบูโพรเฟน

*Corresponding author. E-mail: sirichai@buu.ac.th

Abstract

An accurate, sensitive, and rapid chromatolith C₁₈ high-performance liquid chromatography for determination of chlorzoxazone, indomethacin, and ibuprofen has been developed. The separation was performed on chromatolith C₁₈ column (100 mm x 4.6 mm) at room temperature using methanol: 0.1% phosphoric acid solution (pH 4.2) (70:30 v/v) as mobile phase at a flow rate of 2.5 mL min⁻¹. Wavelength of detection was set at 215 nm. A linear calibration graph was observed in the range of 1 to 100 mg L⁻¹. The limits of detection (LOD) and the limits of quantification (LOQ) were 0.08 and 0.25 mg L⁻¹ for chlorzoxazone, 0.03 and 0.10 mg L⁻¹ for indomethacin, and 0.06 and 0.20 mg L⁻¹ for ibuprofen, respectively. The recoveries varied from 92 to 106%. The proposed method successfully applied to the determination of chlorzoxazone, indomethacin, and ibuprofen in pharmaceutical formulations.

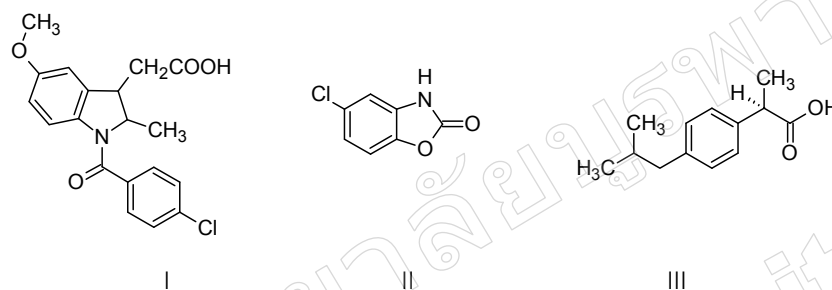
Keywords : High-Performance Liquid Chromatography / chromatolith C₁₈ / chlorzoxazone / indomethacin / ibuprofen

1. บทนำ

ยาต้านการอักเสบชนิดไม่สเตียรอยด์ (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) เป็นกลุ่มยาที่ใช้กันอย่างกว้างขวางเพื่อบรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อ ปวดข้อกระดูกชนิดเรื้อรัง ปวดข้ออักเสบ ปวดประจำเดือน ไข้หวัดใหญ่ และบรรเทาอาการปวดศีรษะไมเกรน (McCarberg *et al.*, 2012) กลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่มนี้ จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส (cyclooxygenase) ซึ่งเป็นสารเคมีในร่างกายชนิดหนึ่ง ทำให้ลดการหลั่งสารพรอสตาแกลนดิน (prostaglandin) ซึ่งเป็นตัวการของการอักเสบและอาการปวด

ความต้องการใช้ยาต้านการอักเสบชนิดไม่สเตียรอยด์ที่มีเพิ่มขึ้น ทำให้ต้องมีการควบคุมคุณภาพของยาในกลุ่มนี้ในระดับที่สูงขึ้นทั้งการใช้ยาและการผลิตยา ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ยาในกลุ่มนี้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณที่มีความรวดเร็ว ความแม่นยำและความเที่ยง มีการรายงานเทคนิคการวิเคราะห์สารกลุ่มนี้มากมาย ได้แก่ เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว (Chittur *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2002; Cristofol *et al.*, 1998; Sochor *et al.*, 1995; Frye *et al.*, 1996) และเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (Kosjek *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตาม พบว่ายังไม่มีมีการรายงานการใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี C₁₈ ในการวิเคราะห์สารที่สนใจกลุ่มนี้พร้อมกัน ซึ่งข้อได้เปรียบของการใช้คอลัมน์ชนิดนี้คือลดเวลาในการวิเคราะห์ เนื่องจากคอลัมน์ประเภทนี้มีความพรุนมากกว่าคอลัมน์ที่ใช้กันโดยทั่วไป ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว

สมรรถนะสูงซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็ว โดยใช้คอลัมน์โครโมลิท C_{18} สารที่ทำการศึกษาในการวิจัยนี้คืออินโดเมธาซิน (indomethacin, IND) คลอซอกซาโซน (chlorzoxazone, CZX) และไอบูโพรเฟน (ibuprofen, Ibu) โครงสร้างของสารดังกล่าวแสดงดังภาพที่ 1 ผลของตัวแปรต่อการแยกทางโครมาโทกราฟีที่ศึกษาได้แก่ องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ พีเอชของเฟสเคลื่อนที่ และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ วิธีที่นำเสนอนี้สามารถใช้ในการหาปริมาณของสารที่สนใจศึกษาในตัวอย่างยาต่างๆ เช่น อินโดซิด (indocid) อินโดเมด (indomed) บรูเฟน (brufen) ไอบูเฟน (ibufen) คลอซอกซ์ (chlorzox) และซีซอกซ์ (cezoX)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของอินโดเมธาซิน (I) คลอซอกซาโซน (II) และไอบูโพรเฟน (III)

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. สารเคมีและตัวทำละลาย

เมทานอลเป็นเกรดวิเคราะห์ (QREC, ประเทศนิวซีแลนด์) น้ำกลั่นจากเครื่อง Milli-Q water purifier system (Barnstead, ประเทศเยอรมัน) กรองผ่านกระดาษกรองเมมเบรนขนาดรู 0.45 ไมครอน สารมาตรฐานอินโดเมธาซิน คลอซอกซาโซน และไอบูโพรเฟนเป็นเกรดวิเคราะห์จาก Sigma เตรียมในเมทานอล กรดออร์โทฟอสไฟริกเป็นเกรดวิเคราะห์ (Ajax, ประเทศออสเตรเลีย)

2. การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ได้จากร้านขายยาทั่วไป ซึ่งตัวอย่างยาที่ผ่านการบดให้ได้ปริมาณยาที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ ละลายด้วยเมทานอล จากนั้นถ่ายลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตรสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 30 นาที กรองสารละลายตัวอย่างที่ได้ด้วยกระดาษกรองเมมเบรน 0.45 ไมครอนก่อนนำไปทำการวิเคราะห์ แต่ละการวิเคราะห์ทำซ้ำ 3 ครั้ง

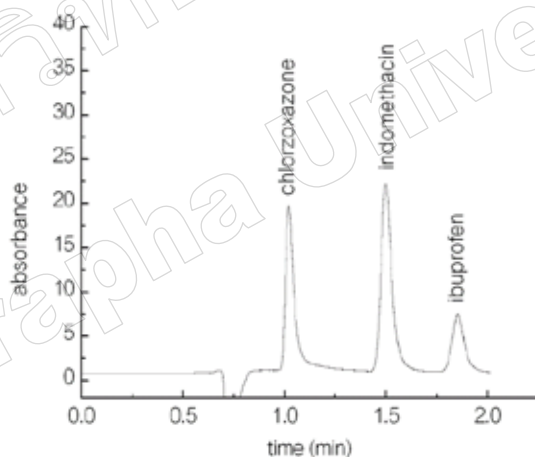
3. การวิเคราะห์คลอซอกซาโซน อินโดเมธาซิน และไอบูโพรเฟนด้วยลิควิดโครมาโทกราฟี

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) รุ่น 1050 ของบริษัท Hewlett Packard (ประเทศเยอรมัน) ระบบ HPLC ประกอบด้วยปั๊ม (pump) ระบบฉีดสาร

(injection system) และทำการตรวจวัดด้วยการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร ตัวบันทึกสัญญาณวิเคราะห์คือ E-corder รุ่น 401 ของบริษัท EDAQ (ประเทศออสเตรเลีย) ตั้งค่า Low pass ที่ 2 kHz และค่า sampling rate ที่ 100 ต่อวินาทีคอลัมน์ที่ใช้คือโครโมลิท (Chromolith) C₁₈ (100 mm x 4.6 mm) ของบริษัท Merck (ประเทศอเมริกา) เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยเมทานอลและสารละลายกรดฟอสฟอริก

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การระบุพีคของคลอซอกซาโซน อินโดเมธาซิน และไอบูโพรเฟนใช้วิธีเปรียบเทียบค่าของเวลาที่สารถูกหน่วงอยู่ในคอลัมน์ หรือเรียกว่า รีเทนชันไทม์ (Retention time, t_R) ซึ่งเป็นเวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่จากจุดฉีดถึงจุดตรวจวัด จากการศึกษา ตัวแปรที่มีผลต่อการแยกของสารที่สนใจศึกษา ได้แก่ ร้อยละของเมทานอลในเฟสเคลื่อนที่ พีเอชของเฟสเคลื่อนที่ และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ พบว่าพีคของสารทั้งหมดสามารถแยกอย่างสมบูรณ์และใช้เวลาที่น้อยที่สุดเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย เมทานอล: 0.1% สารละลายกรดฟอสฟอริก (pH 4.2) อัตราส่วน 70:30 (v/v) และใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่ 2.5 มิลลิลิตรต่อนาทีเวลาในการวิเคราะห์ 2 นาที โครมาโทแกรมภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของคลอซอกซาโซน อินโดเมธาซิน และไอบูโพรเฟน

1. ผลของเมทานอลในเฟสเคลื่อนที่

จากการศึกษาผลของร้อยละเมทานอลในเฟสเคลื่อนที่ โดยเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 60 ถึง 75% เมทานอลต่อ 0.1% สารละลายกรดฟอสฟอริก ผลของเมทานอลในเฟสเคลื่อนที่ต่อโครมาโทแกรมของสารที่สนใจแสดงดังภาพที่3 พบว่าเมื่อค่าร้อยละของเมทานอลเพิ่มขึ้น สารถูกชะออกมาเร็วขึ้น เมื่อพิจารณาถึงการแยกและความเร็วในการวิเคราะห์ สภาวะที่ดีที่สุดคือ เมทานอล:0.1% สารละลายกรดฟอสฟอริก 70:30 (v/v)

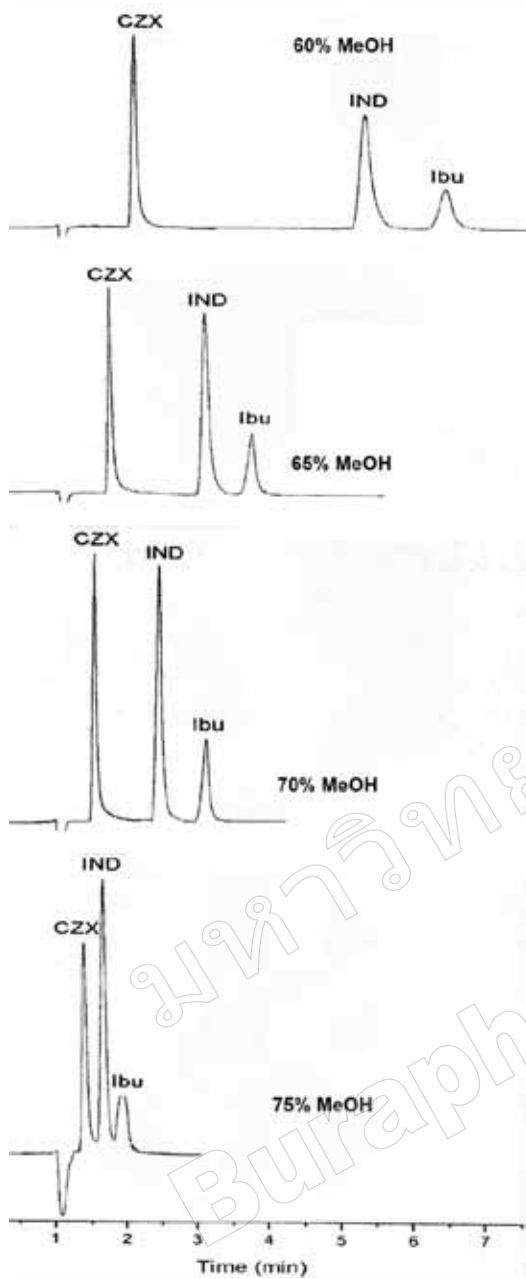
2. ผลของ pH ของเฟสเคลื่อนที่

ทำการศึกษา pH ของเฟสเคลื่อนที่ในช่วง 4.0-4.8 ผลของ pH ของเฟสเคลื่อนที่ต่อโครมาโทแกรมของสารที่สนใจแสดงดังภาพที่ 4 พบว่าเมื่อ pH ของเฟสเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นค่ารีเทนชันไทม์ของอินโดเมธาซินและไอบูโพรเฟนลดลง เนื่องจากที่ pH สูงเกิดการแตกตัวของหมู่คาร์บอกซิลิกในโครงสร้างของอินโดเมธาซินและไอบูโพรเฟนมากขึ้น นอกจากนั้นพบว่าที่ pH ทุกค่าที่ทำการศึกษาสารที่สนใจศึกษาทุกตัวแยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ที่ pH 4.5 และ 4.8 ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงการแยกและเวลาในการวิเคราะห์ จึงเลือกพีเอช 4.2 เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

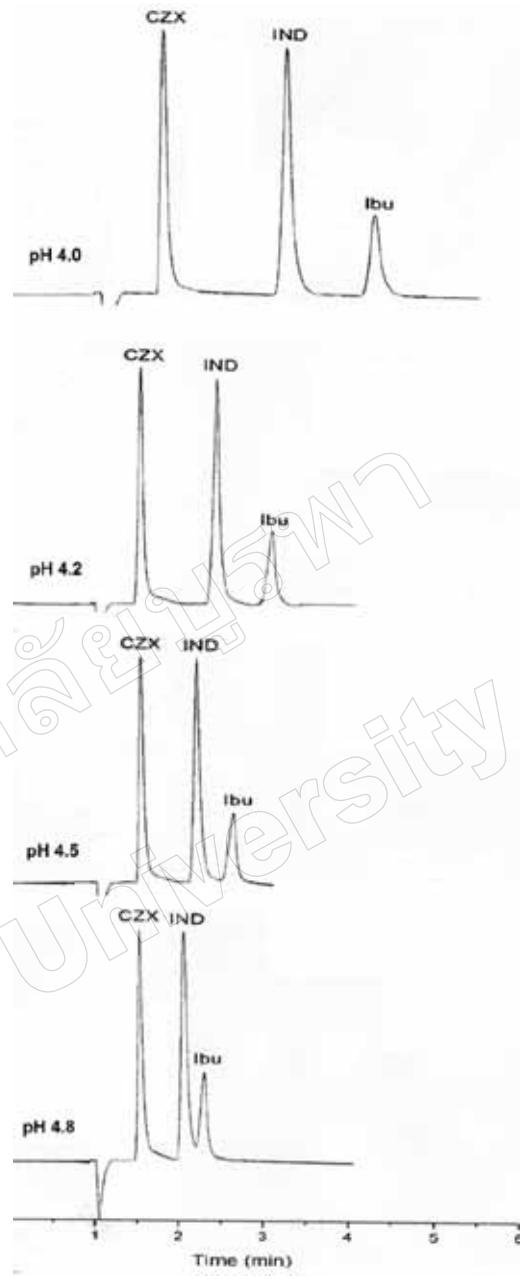
3. ผลของอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ทำการศึกษาคือ 1.5 ถึง 3.0 มิลลิลิตรต่อนาทีผลของอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต่อค่ารีเทนชันไทม์ของสารที่สนใจแสดงดังภาพที่ 5 การเพิ่มอัตราการไหลทำให้เวลาในการวิเคราะห์ลดลง เนื่องจากเวลาในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารกับเฟสอยู่กับที่ลดลง อย่างไรก็ตาม พบว่าเมื่ออัตราการไหลเพิ่มถึง 3.0 มิลลิลิตรต่อนาทีฟีกของคลอซอกซาซินจะชิดกับฟีกของตัวทำละลาย ดังนั้น จึงเลือกอัตราการไหลที่ 2.5 มิลลิลิตรต่อนาทีเป็นอัตราการไหลที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

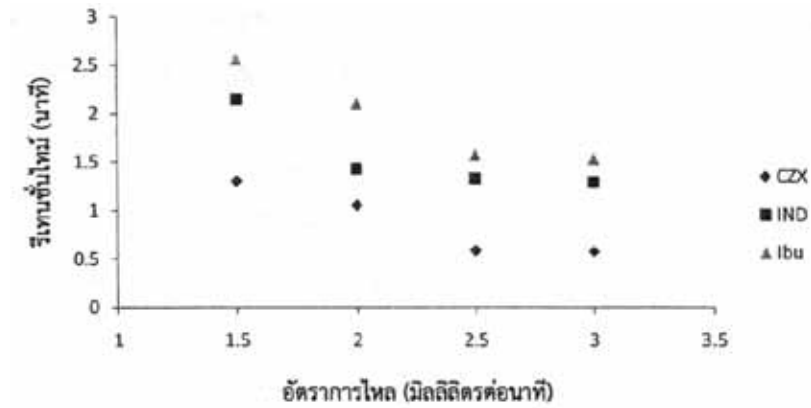
มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University



ภาพที่ 3 ผลของเมทานอลในเฟสเคลื่อนที่ต่อโครมาโทแกรม



ภาพที่ 4 ผลของ pH ของเฟสเคลื่อนที่ต่อโครมาโทแกรม



ภาพที่ 5 ผลของอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต่อค่ารีเทนชันไทม์

4. ศึกษาความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์

กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานอยู่ในช่วง 2.0-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตรค่ารีเทนชันไทม์ ซีดจำกัดของการตรวจวัด ซีดจำกัดของการหาปริมาณ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการหาปริมาณคลอซอกซาโซน อินโดเมธาซิน และ ไอบูโปรเฟนแสดงในตารางที่ 1 ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการหาปริมาณใช้เกณฑ์อัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio) ที่ 3 และ 10 ตามลำดับขีดจำกัดการตรวจวัดของสารสนใจอยู่ในช่วง 0.03 ถึง 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตรและขีดจำกัดการหาปริมาณอยู่ในช่วง 0.10 ถึง 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตรค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (n = 5) ของพื้นที่พีกววิเคราะห์ภายในวันเดียวกันที่ความเข้มข้น 3.0, 5.0 และ 8.0 mg L⁻¹ ของสารสนใจอยู่ในช่วง 2.0 ถึง 4.0% ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (n = 5) ของพื้นที่พีกววิเคราะห์ระหว่างวันที่ความเข้มข้น 3.0, 5.0 และ 8.0 mg L⁻¹ ของสารสนใจอยู่ในช่วง 2.0 ถึง 5.0% ในการทดสอบความแม่นยำของวิธี จะศึกษาในเทอมของร้อยละการกลับคืน (n = 3) ของสารที่ความเข้มข้น 2.0, 4.0 และ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 92-106% ตามลำดับ

ตารางที่ 1 รีเทนชันไทม์ ซีดจำกัดของการตรวจวัด ซีดจำกัดของการหาปริมาณ และสมการเส้นตรง

สาร	รีเทนชันไทม์ (นาที)	LOD (มิลลิกรัมต่อลิตร)	LOQ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สมการเส้นตรง (R ²)
คลอซอกซาโซน	1.04	0.08	0.25	y = 11776x - 3655 (R ² =0.9998)
อินโดเมธาซิน	1.60	0.03	0.10	y = 16437x - 3330 (R ² =0.9998)
ไอบูโปรเฟน	2.04	0.06	0.20	y = 5724x - 2525 (R ² =0.9998)

ตารางที่ 2 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ภายในวันเดียวกัน และระหว่างวัน

สาร	ความเข้มข้น	%RSD	%RSD
	(มิลลิกรัมต่อลิตร)	ภายในวันเดียวกัน	ระหว่างวัน
คลอซอกซาไซน	3.0	2.0	3.0
	5.0	2.0	2.0
	8.0	3.0	2.0
อินโดเมธาซิน	3.0	3.0	2.0
	5.0	2.0	2.0
	8.0	1.0	3.0
ไอบูโพรเฟน	3.0	4.0	4.0
	5.0	2.0	5.0
	8.0	3.0	2.0

5. การหาปริมาณสารสนใจในตัวอย่างยา

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารที่สนใจศึกษาในตัวอย่างยาอินโดเมธาซินและไอบูโพรเฟน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมคือ เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยเมทานอล: 0.1% สารละลายกรดฟอสฟอริก (pH 4.2) อัตราส่วน 70:30 (v/v) และใช้อัตราการไหลของ เฟสเคลื่อนที่ที่ 2.5 มิลลิตรต่อนาทีพบว่าตัวอย่างยาอินโดเมธาซินมีปริมาณยา 25.7 ± 0.4 มิลลิกรัมต่อเม็ด (หรือพบ 102.8% ของที่ระบุในฉลาก) และตัวอย่างยาไอบูโพรเฟนมีปริมาณยา 405.0 ± 2.6 มิลลิกรัมต่อเม็ด (หรือพบ 101.3% ของที่ระบุในฉลาก) ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติแบบ *t*-test พบว่าค่าที่วิเคราะห์กับที่ระบุไว้บนฉลากไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความ เชื่อมั่น 95%

4. สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและใช้คอลัมน์โครโมลิท C_{18} และใช้การดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเล็ตเป็นตัวตรวจวัดเป็นเทคนิคที่ง่าย มีความเฉพาะเจาะจง มีความแม่นยำและความเที่ยงและรวดเร็ว สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมคุณภาพของยา นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้หาปริมาณยาในตัวอย่างยาได้เมื่อเปรียบเทียบกับเวลาในการวิเคราะห์ ด้วยวิธีที่นำเสนอนี้กับเทคนิคการวิเคราะห์สารที่สนใจชนิดเดียวกันและใช้เทคนิคเดียวกัน พบว่าวิธีที่เสนอนี้สามารถวิเคราะห์คลอซอกซาไซน (Venkatesh *et al.*, 2009; Shaikh *et al.*, 2008) อินโดเมธาซิน (Kuhawaret *et al.*, 2005; Tsvetkova *et al.*,

2012) และไอบูโพรเฟน(Shaan et al., 2013; Ahirrao et al., 2013) เร็วกว่าประมาณ 2-5 เท่าประมาณ 8 เท่า และประมาณ 9 เท่า ตามลำดับ

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนทุนวิจัยและห้องปฏิบัติการวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

- Ahirrao, V.K., & Pawar, R.P., (2013). "Simultaneous quantification of famotidine and ibuprofen in pharmaceutical dosage by using validated stability indicating LC method." *Research Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2, 1-9.
- Chittur, S.V., & Tracy, T.S., (1997). "Rapid and sensitive high-performance liquid chromatography assay for 6-hydroxychlorzoxazone and chlorzoxazone in liver microsomes." *Journal of Chromatography B*, 693, 479-483.
- Cristofol, C., Perez, B., Pons, M., Valladares, J.E., Marti, G., & Arboix, M., (1998). "Determination of indomethacin residues in poultry by high-performance liquid chromatography." *Journal of Chromatography B*, 709, 310-314.
- Frye, R.F., & Stiff, D.D., (1996). "Determination of chlorzoxazone and 6-hydroxychlorzoxazone in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography." *Journal of Chromatography B*, 686, 291-296.
- Kuhawar, M.Y., Rind, F.M.A., & Rajper, A.D., (2005). "High-performance liquid chromatographic determination of isoniazid, pyrazinamide, and indomethacin in pharmaceutical preparation." *Acta Chromatographica*, 15, 269-275.
- Kosjek, T., Heath, E., & Krbavcic, A., (2005). "Determination of nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAODs) residues in water samples." *Environment International*, 3, 679-685.
- Liu, S., Kamijo, M., Takayasu, T., & Takayama, Satoshi., (2002). "Direct analysis of indomethacin in rat plasma using a column-switching high-performance liquid chromatography system." *Journal of Chromatography B*, 767, 53-60.
- McCarberg, B., & Gibofsky, A., (2012). "Need to develop new nonsteroidal anti-inflammatory drug formulations." *Clinical Therapeutics*, 34, 1954-1963.

- Shaan, R.A., Haggag, R.S., Belal, S.F., & Agami, M., (2013). "Simultaneous determination of hyoscine, ketoprofen and ibuprofen in pharmaceutical formulations by HPLC-DAD." *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3, 38-47.
- Shaikh, K.A., & Devkhile, A.B., (2008). "Simultaneous determination of aceclofenac, paracetamol, and chlorzoxazone by RP-HPLC in Pharmaceutical dosage form." *Journal of Chromatographic Science*, 46, 649-652.
- Sochor, J., Klimeg, J., Sedlacek, J., & Zahradnicek, M., (1995). "Determination of ibuprofen in erythrocytes and plasma by high performance liquid chromatography." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13, 899-903.
- Tsvetkova, B., Pencheva, I., Zlatkov, A., & Peikov, P., (2012). "High performance liquid chromatographic assay of indomethacin and its related substances in tablet dosage forms." *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 549-552.
- Venkatesh, K., Vaidhyalingam, Y.G., & Rajesh, K.N., (2009). "Simultaneous estimation of paracetamol, chlorzoxazone and aceclofenac in pharmaceutical formulation by HPLC method." *International Journal of ChemTech Research*, 1, 457-460.