

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original article

การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ความคงตัวด้วย UV-Visible Spectrophotometer ของยาหยอดตาเฉพาะคราว Methylprednisolone

ธีรชาติ ชีวาศัยกุล ภ.ม.*

دنخ ปัญจพรผล ภ.ด.**

* กลุ่มงานเภสัชกรรม โรงพยาบาลเมตตาประชารักษ์ (วัดไร่ขิง) นครปฐม

** คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพมหานคร

วันรับ:	21 พ.ค. 2561
วันแก้ไข:	18 ก.ย. 2561
วันตอบรับ:	17 ต.ค. 2561

บทคัดย่อ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยา methylprednisolone ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer รวมถึงศึกษาความคงตัวและสภาวะการเก็บรักษาที่เหมาะสมของตำรับยาหยอดตา methylprednisolone ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสำหรับผู้ป่วยเฉพาะราย โดยศึกษาความคงตัวของยาหยอดตา methylprednisolone ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer เปรียบเทียบการเก็บรักษา 2 สภาวะ โดยอ้างอิงแนวปฏิบัติสากล การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ methylprednisolone ซึ่งปริมาณด้วยเครื่องมือดังกล่าว ได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 248 นาโนเมตรกับความเข้มข้น (ค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด 0.999) มีความแม่นยำ (ค่าเปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ = 0.80-1.80 เปอร์เซ็นต์) และความเที่ยงตรง (ค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ = 100.44-101.20 เปอร์เซ็นต์) การนำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณยาคงเหลือเพื่อศึกษาความคงตัวในยาหยอดตาที่เตรียมจากยาเม็ด methylprednisolone ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.45 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บรรจุขวดแก้วสีชาปิดสนิท และเก็บรักษา 2 สภาวะ คือ ตู้เย็น (2-8 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2 เดือน ผลการประเมินทางกายภาพจากการสังเกตลักษณะทั่วไป พบว่าเกิดความขุ่นในวันที่ 10 และ 67 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องและตู้เย็น ตามลำดับ ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงต่ำกว่าที่เภสัชตำรับกำหนดภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 วัน และในตู้เย็นเป็นเวลา 52 วัน ผลการวิเคราะห์ซึ่งปริมาณพบปริมาณด้วยยาสำคัญคงเหลือมากกว่าร้อยละ 90.0 ตลอดระยะเวลาการศึกษาทั้ง 2 สภาวะ สรุปว่า ตำรับยาหยอดตา methylprednisolone ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สำหรับผู้ป่วยเฉพาะราย จะมีความคงตัวดีที่สุดในตู้เย็นภายใต้อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ระยะเวลาไม่เกิน 51 วัน แต่อย่างไรก็ดีหากมีการเปิดใช้ยาหยอดตาแล้วควรมีอายุของยาไม่เกิน 4 สัปดาห์

คำสำคัญ: ความคงตัว, ยา methylprednisolone, ยาหยอดตาสำหรับผู้ป่วยเฉพาะราย, เครื่อง UV-visible spectrophotometer, การตรวจสอบความถูกต้อง

บทนำ

ยา methylprednisolone เป็นฮอร์โมนสังเคราะห์ในกลุ่ม corticosteroid ใช้สำหรับเป็นยาต้านการอักเสบโดยเข้าไปช่วยควบคุมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย สำหรับโรคที่เกี่ยวกับดวงตา ยา methylprednisolone ถูกนำมาใช้บรรเทาและต้านการอักเสบของดวงตาจากสาเหตุต่างๆ เช่น ป้องกันการอักเสบจากการผ่าตัด ป้องกันการเกิดรอยแผลเป็น รักษาการอักเสบแบบเฉียบพลันของดวงตาและเยื่อぶตา^(1,2) แต่ในปัจจุบันยังไม่มี methylprednisolone รูปแบบยาหยอดตาจำหน่ายในท้องตลาด ดังนั้น โรงพยาบาลจึงต้องเตรียมตำรับยาหยอดตา methylprednisolone สำหรับผู้ป่วยเฉพาะราย โดยนำยา methylprednisolone sodium succinate ชนิดผงยาปราศจากเชื้อสำหรับฉีด ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.45% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และไม่เติมสารกันเสีย เนื่องจากสารกันเสียอาจไปทำอันตรายต่อเซลล์⁽³⁾ ปัจจุบันตำรับยาหยอดตาดังกล่าวได้อ้างอิงกำหนดความคงตัวของยาหลังการผสมจากยาฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ แต่ยังไม่มีการศึกษามาก่อนว่าหากนำมาใช้ในรูปแบบของยาหยอดตาด้วยควรเก็บที่อุณหภูมิเท่าใด และจะมีความคงตัวนานเท่าใด จึงจะเหมาะสม

ความคงตัวของยาหรือเภสัชภัณฑ์มีความสำคัญในทุกกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับยา เริ่มตั้งแต่ ขบวนการเตรียมตำรับยา จนถึงสถานะการเก็บรักษา เนื่องจากยาที่ได้ผลทางเภสัชวิทยาจะต้องมีปริมาณของยา ณ ตำแหน่งเป้าหมายในความเข้มข้นที่มีผลทางการรักษา และมีความคงตัวทางกายภาพ ประกอบกับสี กลิ่น และความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม ดังนั้นการเก็บรักษาเภสัชภัณฑ์ที่ไม่เหมาะสม จะส่งผลให้ตำรับยาเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านกายภาพและเคมี สี กลิ่น และความเป็นกรด-ด่างทำให้เกิดผลกระทบต่อผู้ป่วย โดยเฉพาะการบริหารยาทางตาที่ต้องคำนึงเป็นพิเศษ นอกจากนี้การเสื่อมสลายของตัวยาก็ทำให้ผู้ป่วยได้รับปริมาณยาลดลง ส่งผลให้ปริมาณยาที่ตำแหน่งเป้าหมายต่ำกว่าที่จะให้ผลในการรักษาได้ โดยจะเห็นว่าสิ่งแวดล้อมของการเก็บรักษา

เช่น แสงและอุณหภูมิ เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการเสื่อมสลายของตัวยາ⁽⁴⁾ ดังนั้นการเก็บรักษาภายใต้สภาวะที่ถูกต้องเหมาะสมกับตัวยาก็จะช่วยรักษาคุณภาพของตำรับยาที่มีความปลอดภัยในการใช้ยา และไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียง

การทดสอบปริมาณตัวยาสัญสำคัญ methylprednisolone ตามเภสัชตำรับจะใช้เทคนิค high performance liquid chromatography ซึ่งเป็นกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจ ระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) หรือคอลัมน์กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ข้อจำกัดของวิธีนี้ คือ เครื่องมือมีราคาสูง มีความยุ่งยาก และใช้ระยะเวลาในการทดสอบมาก จึงมีงานวิจัยเพื่อพัฒนาการหาปริมาณตัวยา methylprednisolone ในเภสัชภัณฑ์โดยใช้หลักการ UV spectrophotometric method โดยเตรียมสารละลายยา methylprednisolone ความเข้มข้นระหว่าง 5-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้ววัดปริมาณตัวยาดังกล่าวด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer และมีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ พบว่าวิธีการนี้สามารถหาปริมาณตัวยา methylprednisolone ได้ และมีความเที่ยงตรงและความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้⁽⁵⁾ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการทดสอบหาปริมาณตัวยาสัญสำคัญได้

ในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์จึงต้องมีการตรวจสอบความถูกต้อง (method validation) ของวิธีวิเคราะห์ที่อ้างอิงมาเพื่อยืนยันว่าวิธีวิเคราะห์สามารถวัดค่าสารตัวอย่างได้แม่นยำหรือใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงที่สุดโดยการตรวจสอบความถูกต้องจะอ้างอิงตามแนวปฏิบัติสากล ICH harmonised tripartite guideline ในหัวข้อ validation analytical procedure: text and methodology Q2(R1) ซึ่งจะมีการทดสอบเพื่อหาความจำเพาะเจาะจง (specificity) ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) ความแม่นยำ (precision) ความเที่ยงตรง (accuracy) ขีดการตรวจวัด (detection limit) และขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (quantitation limit) ของวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ในการหาตัวยาสัญสำคัญในเภสัชภัณฑ์⁽⁶⁻⁷⁾

การศึกษาในครั้งนี้จึงได้พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยา methylprednisolone ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer รวมถึงศึกษาความคงตัว และสภาวะการเก็บรักษาที่เหมาะสมของตำรับยาหยอดตา methylprednisolone ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสำหรับผู้ป่วยเฉพาะราย เพื่อสามารถกำหนดวันหมดอายุของตำรับยาดังกล่าวในสภาวะการเก็บรักษาต่างๆ ได้

วิธีการศึกษา

เป็นการศึกษาเชิงทดลองเพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยา methylprednisolone ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer เพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณตัวยาสำคัญในยาหยอดตา methylprednisolone ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสำหรับผู้ป่วยเฉพาะรายในระหว่างการเก็บรักษาในตู้เย็นและอุณหภูมิห้อง รวมถึงศึกษาความคงตัวของยา โดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น ความขุ่น สี และความเป็นกรด-ด่างของยาเตรียม เพื่อสามารถกำหนดสภาวะการเก็บรักษาที่เหมาะสมและวันหมดอายุของยาหยอดตาสำหรับผู้ป่วยเฉพาะรายตำรับดังกล่าวได้

สารเคมี

ยานี้ด Solu-Medrol™ (methylprednisolone sodium succinate) ขนาด 1,000 มิลลิกรัม บริษัทไฟเซอร์ เบลเยียม lot. no. L41302 วันหมดอายุ 31/10/62 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ปราศจากเชื้อ 0.9% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (0.9% NSS) บริษัทวีแอนด์วี ประเทศไทย Lot. No. 4291015 วันหมดอายุ 27/10/63 และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (SWI) บริษัทเยเนอรัลฮอสปิทัล โปรดักส์ จำกัด (มหาชน) ประเทศไทย Lot. No. 1607104 วันหมดอายุ 23/07/61

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง UV-visible spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific®, EVO600LC, USA) เครื่องวัดความ

เป็นกรด-ด่าง (Eutech instruments®, pH510, Malaysia) ตู้เย็น (Mitsubishi®, MR-F33U, ประเทศไทย)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน methylprednisolone sodium succinate ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.45% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (เตรียมจากสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปราศจากเชื้อ 0.9% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร : น้ำกลั่นปราศจากเชื้อใช้ภายใน ในอัตราส่วน 1:1) ที่ความเข้มข้น 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐาน 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07 และ 0.08 มิลลิลิตรลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.45% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารทดสอบคือ 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

การเตรียมตัวอย่างยาหยอดตา

ยาหยอดตาเฉพาะคราว methylprednisolone sodium succinate ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเตรียมโดยละลายยานี้ด methylprednisolone 7,000 มิลลิกรัมในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.45% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 700 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.02 ไมโครเมตรเพื่อให้ได้สารละลายปราศจากเชื้อ บรรจุใส่ขวดแก้วสีขาปิดสนิทเพื่อควบคุมตัวแปรด้านแสงสว่าง ขวดละ 3 มิลลิลิตร จำนวน 230 ขวด แบ่งเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง 30±2 องศาเซลเซียส วิเคราะห์หาความคงตัวทุกวัน ครั้งละ 3 ตัวอย่าง/สภาวะ (N=3)

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)^(6,7)

วิธีการตรวจสอบความถูกต้องพัฒนามาจากแนวปฏิบัติสากล ICH Harmonised Tripartite guideline ดังนี้

การทดสอบความเฉพาะเจาะจง (specificity)

เพื่อศึกษาว่าวิธีการวิเคราะห์ที่เลือกใช้สามารถ

วิเคราะห์ตัวอย่างที่ต้องการได้ และไม่มีการรบกวนจากสารอื่นๆ ที่มีในตำรับ เช่น สารละลายตัว สารปนเปื้อน สารช่วยในตำรับ โดยนำสารละลายมาตรฐาน methylprednisolone sodium succinate ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารที่สลายตัวมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ในช่วง 200-600 นาโนเมตร เพื่อหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max})

การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity)

การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงโดยสร้างสมการเชิงเส้นของกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ methylprednisolone sodium succinate เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งคำนวณค่าเฉลี่ยความเป็นเส้นตรงจากการทดสอบจำนวน 3 ตัวอย่าง (N=3) ความสัมพันธ์เชิงเส้นแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (coefficient of determination หรือ R^2) โดยค่าที่ยอมรับได้ คือค่าที่ R^2 มากกว่า 0.995

ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection : LOD)

ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดหรือความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีการวิเคราะห์สามารถทดสอบได้สามารถคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานได้โดยตรงหาได้จากสมการ⁽⁵⁻⁶⁾

$$LOD = 3.3\sigma/S$$

กำหนดให้

- LOD คือ ขีดจำกัดการตรวจวัด
- σ คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ
- S คือ ความชันของกราฟมาตรฐาน

ค่าขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation: LOQ)

ค่าขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณหรือความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีการวิเคราะห์สามารถทดสอบได้โดยมีค่าการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงตรงในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คำนวณได้ตามสมการ⁽⁵⁻⁶⁾

$$LOQ = 10\sigma/S$$

กำหนดให้

- LOQ คือ ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ
- σ คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ
- S คือ ความชันของกราฟมาตรฐาน

การทดสอบความแม่นยำ (precision test)

ทดสอบโดยวัดตัวอย่างชนิดเดียวกันหลายๆ ครั้ง ความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำๆ แสดงเป็นส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) เป็นการทดสอบว่าวิธีที่เลือกใช้ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ให้ผลที่ใกล้เคียงกัน ใน ทุกๆ ครั้ง ที่ทำการทดลอง และผลที่ได้อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แบ่งการทดสอบเป็นการทดสอบในวันเดียวกัน (intra-day) และการทดสอบต่างวันกัน (inter-day) โดยทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้นคือ 12, 18, 24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง

การทดสอบความเที่ยงตรง (accuracy test)

เพื่อทดสอบความเที่ยงตรงของวิธีการวิเคราะห์ โดยใช้สารละลายมาตรฐาน methylprednisolone sodium succinate ซึ่งตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน methylprednisolone sodium succinate เรียกว่า spiked sample โดยเติมทั้งหมด 5 ความเข้มข้นในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 80.0-120.0 ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน methylprednisolone sodium succinate เรียกว่า unspiked sample ค่าความเที่ยงตรงของวิธีการวิเคราะห์วัดในรูปร้อยละการได้กลับคืน (% recovery)

การทดสอบความคงตัวของยาหยอดตาเฉพาะคราว methylprednisolone sodium succinate

ทำสังเกตลักษณะทางกายภาพของแต่ละตัวอย่างในแต่ละวันที่ทดสอบเป็นระยะเวลา 2 เดือน โดยดูการเปลี่ยนแปลงความใส กลิ่น รวมทั้งวัดความเป็นกรด-ด่างของตำรับยาและวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 248 นาโนเมตร แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณตัวยาที่

วิเคราะห์ได้จากกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณหาค่าร้อยละ ปริมาณตามฉลาก (% label amount: % LA) ตาม สูตร⁽⁸⁾

$$\%LA = (\text{ปริมาณยาที่วิเคราะห์ได้} / \text{ปริมาณยาที่ระบุบนฉลาก}) \times 100$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงโดยสร้างสมการเชิงเส้นของกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของยา โดยใช้สถิติการวิเคราะห์สมการถดถอย (linear regression) ค่าสัมประสิทธิ์การกำหนดโดยค่าที่ยอมรับได้ คือมีค่ามากกว่า 0.995

การทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์ ใช้สถิติเชิงพรรณนาแสดงค่าเป็นร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ โดยมีเกณฑ์ยอมรับได้ที่น้อยกว่าร้อยละ 2.0

การทดสอบความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ ใช้สถิติเชิงพรรณนาแสดงค่าเป็นร้อยละการได้กลับคืน โดยมีเกณฑ์ยอมรับได้อยู่ในช่วงร้อยละ 90.0-110.0

การทดสอบหาปริมาณตัวยาสำคัญ ใช้สถิติเชิงพรรณนาแสดงค่าเป็นร้อยละปริมาณตามฉลาก โดยมีเกณฑ์ยอมรับได้ที่มากกว่าร้อยละ 90.0

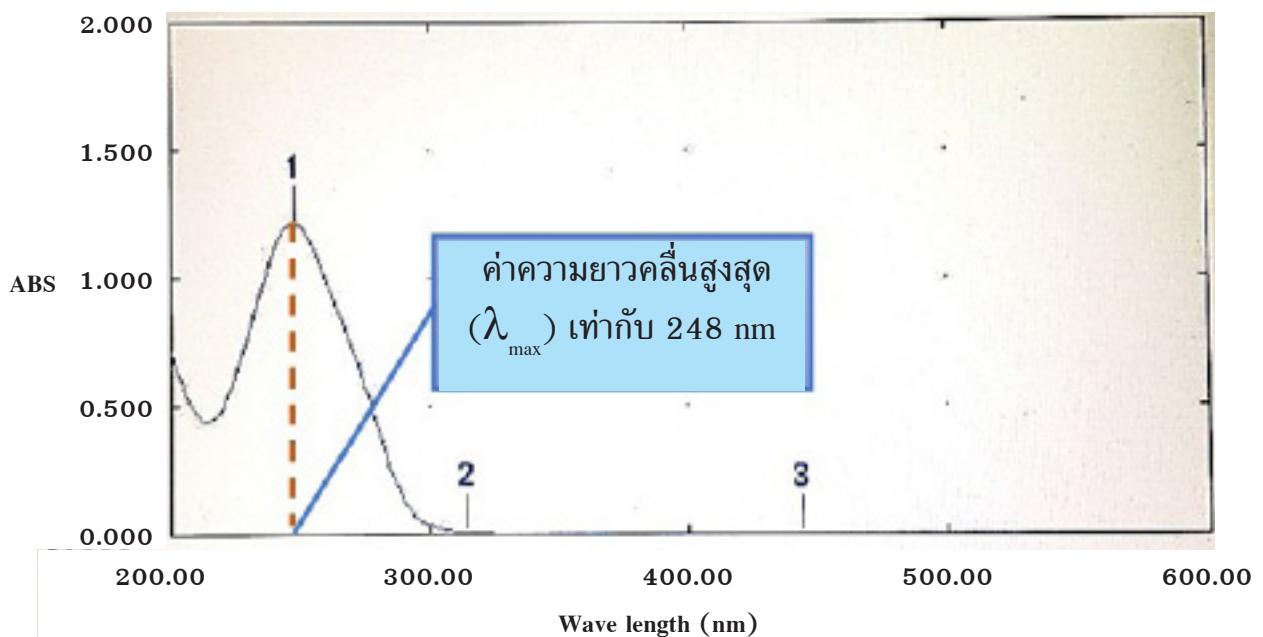
ผลการศึกษา

1. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

1.1 การทดสอบความเฉพาะเจาะจง นำสารละลายมาตรฐาน methylprednisolone sodium succinate ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารที่สลายตัวมาวิเคราะห์ด้วย UV-visible spectrophotometer ในช่วง 200-600 นาโนเมตร พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดของตัวยา methylprednisolone sodium succinate เท่ากับ 248 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 1

1.2 การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง เมื่อใช้ UV-visible spectrophotometer วิเคราะห์หาค่าดูดกลืนแสงของ methylprednisolone sodium succinate ที่ความเข้มข้น 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 และ 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ได้

ภาพที่ 1 การหาความยาวคลื่นสูงสุด



ผลดังตารางที่ 1

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ methylprednisolone sodium succinate เทียบกับการดูดกลืนแสงโดยใช้สถิติการหาสมการถดถอยเพื่อให้ได้สมการจากกราฟมาตรฐานและค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด ได้ค่าพารามิเตอร์เชิงปริมาณของยา methylprednisolone ดังแสดงในตารางที่ 2

ซึ่งจากค่าสัมประสิทธิ์การกำหนดเท่ากับ 0.9999 ซึ่งมีค่ามากกว่าเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ 0.995 แสดงว่าสมการเส้นตรง $y = 0.0257x + 0.0022$ จากกราฟมาตรฐานมี

ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงสูง จึงสามารถใช้ทำนายปริมาณตัวยาจากค่าการดูดกลืนแสงได้

1.3 การทดสอบความแม่นยำ (precision test) ตรวจสอบความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำๆ ในสภาวะเดียวกัน (repeatability) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ในแต่ละความเข้มข้น โดยทดสอบความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่างได้ผลการทดสอบ ดังตารางที่ 3

ทดสอบความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำๆ ในวันเดียวกัน (intraday) และในวันที่

ตารางที่ 1 ค่าดูดกลืนแสงของ methylprednisolone sodium succinate ที่ความเข้มข้น 9-30 µg/mL (N=3)

ความเข้มข้น (µg/mL)	absorbance (ที่ 248 nm)			ค่าเฉลี่ย	SD
	N1	N2	N3		
9	0.2315	0.2342	0.2398	0.2352	0.0042
12	0.3076	0.3093	0.3161	0.3110	0.0037
15	0.3866	0.3858	0.3948	0.3891	0.0041
18	0.4662	0.4652	0.4593	0.4636	0.0030
21	0.5299	0.5391	0.5418	0.5369	0.0062
24	0.6134	0.6157	0.6338	0.6210	0.0091
27	0.6939	0.7021	0.6964	0.6975	0.0034
30	0.7681	0.7069	0.7821	0.7690	0.0103

ตารางที่ 2 พารามิเตอร์เชิงปริมาณของการวิเคราะห์ยา methylprednisolone sodium succinate

พารามิเตอร์	ผลลัพธ์
ความยาวคลื่นสูงสุด (nm)	248
Beer's law limits (µg/mL)	8-31
ขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) (µg/mL)	0.32
ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) (µg/mL)	0.82
ค่าคงที่การดูดกลืนแสง (molar absorptivity) (L/mole.cm)	1.22×10^8
สมการเชิงเส้น	$y = 0.0257x + 0.0022$
ความชัน	0.0257
จุดตัดแกนตั้ง	0.0022
ค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (R ²)	0.9999

ตารางที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในความเข้มข้น 9-30 µg/mL (N=3)

Repeatability	Concentration (µg/mL)							
	9	12	15	18	21	24	27	30
absorption	0.2552	0.3091	0.3883	0.4694	0.5599	0.6385	0.7228	0.7826
	0.2590	0.3116	0.4033	0.4774	0.5508	0.6338	0.7161	0.7955
	0.2574	0.3197	0.3951	0.4764	0.5583	0.6319	0.6997	0.7976
CV	0.007	0.018	0.019	0.009	0.009	0.005	0.017	0.010
% RSD	0.74	1.77	1.90	0.92	0.87	0.54	1.67	1.03

แตกต่างกันออกไปทั้งหมด 3 วัน (interday) พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดในแต่ละความเข้มข้น โดยทดสอบความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4 แสดงค่าเป็นร้อยละ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ โดยทุกตัวอย่างมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือน้อยกว่าร้อยละ 2.0

1.4 การทดสอบความเที่ยงตรง (accuracy test) ทดสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ที่วัดได้ค่าใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริง โดยการหาความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นที่เพิ่มเข้าไป จำนวน 5 % ความเข้มข้นได้แก่ ร้อยละ 80.0, 90.0, 100.0, 110.0 และ 120.0 โดยเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง (N=3) พบว่า ร้อยละการได้กลับคืนของแต่ละความเข้มข้นอยู่

ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ อยู่ในช่วงร้อยละ 90.0-110.0 ดังแสดงในตารางที่ 5

2. การทดสอบความคงตัวของยาหยอดตาเฉพาะยี่ห้อ methylprednisolone sodium succinate

จากการทดสอบความคงตัวของยาหยอดตา methylprednisolone sodium succinate ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสำหรับผู้ป่วยเฉพาะราย ซึ่งบรรจุในขวดสีชาเพื่อควบคุมปัจจัยด้านแสงสว่าง โดยเก็บรักษาใน 2 สภาวะคือ เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง 30±2 องศาเซลเซียส สภาวะละ 3 ตัวอย่าง (N=3) ได้ผลการทดสอบดังนี้

2.1 การสังเกตลักษณะทั่วไป ได้แก่ ความขุ่น กลิ่น ประเมินลักษณะทั่วไปของยาหยอดตา methylpredniso-

ตารางที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ความเข้มข้น 12, 18 และ 24 µg/mL ในวันเดียวกัน (intraday) และในวันที่แตกต่างกัน (interday) (N=3)

Precision	Concentration (µg/mL)	Absorbance (N=3)	CV	% RSD
intraday	12	0.3110±0.0045	0.015	1.45
	18	0.4636±0.0037	0.008	0.80
	24	0.6210±0.0112	0.018	1.80
Interday	12	0.3130±0.0037	0.012	1.19
	18	0.4700±0.0059	0.013	1.26
	24	0.6270±0.0071	0.011	1.13

ตารางที่ 5 การทดสอบความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (accuracy test)

Conc. taken ($\mu\text{g/mL}$)	% conc. added (N=3)	Mean %recovery
9	80	100.69 \pm 0.006
	90	100.86 \pm 0.009
	100	100.44 \pm 0.002
	110	100.81 \pm 0.007
	120	101.20 \pm 0.010

lone sodium succinate ภายใต้การเก็บรักษา 2 สภาวะ คือ เก็บในตู้เย็น และที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ลักษณะทางกายภาพในสภาวะการเก็บในตู้เย็นเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพหลังจากเก็บไว้ 67 วัน และที่อุณหภูมิห้องมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วภายในวันที่ 10 ก็เริ่มพบตัวอย่างที่มีลักษณะขุ่น และมีกลิ่นเกิดขึ้นในภายหลัง

2.2 การทดสอบความเป็นกรด-ด่างของตำรับยา methylprednisolone sodium succinate ตามข้อกำหนดจากเภสัชตำรับ United States Pharmacopeia (USP)⁽⁸⁾

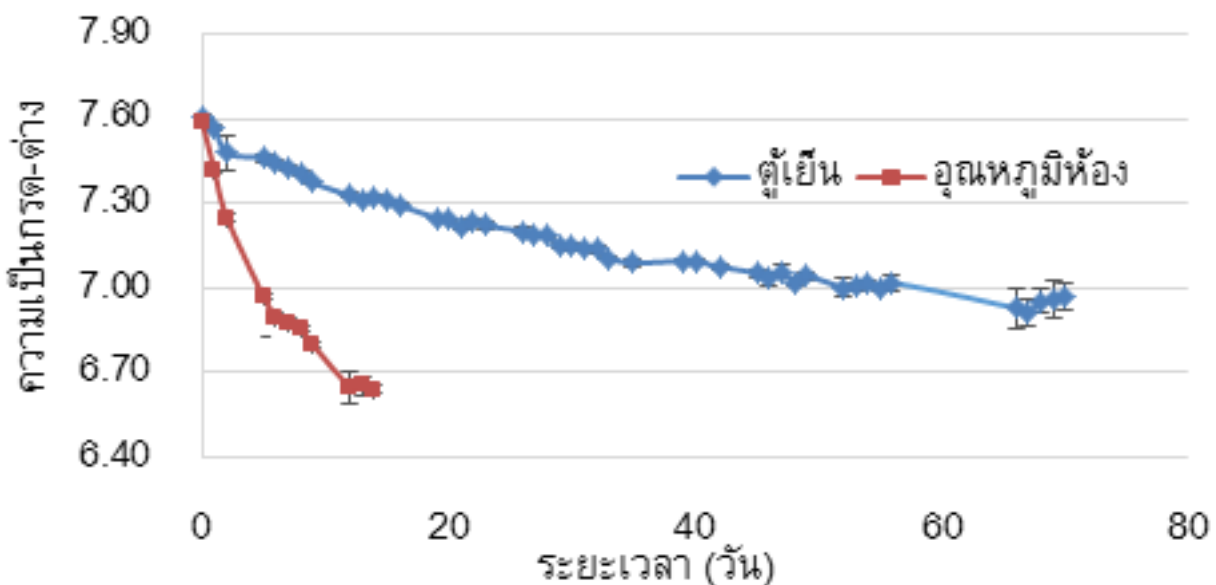
37 กำหนดให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของยา methylprednisolone sodium succinate อยู่ระหว่าง 7-8

จากการทดสอบความเป็นกรด-ด่างตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาภายใต้ 2 สภาวะอุณหภูมิ พบว่าความเป็นกรด-ด่างของทั้ง 2 สภาวะ ลดลงเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น โดยการเก็บในตู้เย็นมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 6.67-7.61 และที่อุณหภูมิห้องมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 6.51-7.60 ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยการเก็บที่อุณหภูมิห้องมีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างเร็วกว่าการเก็บที่อุณหภูมิในตู้เย็น ดังนั้น เมื่อเปรียบเทียบกับข้อกำหนดของเภสัชตำรับ พบว่า การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของตำรับบางตัวอย่างที่การเก็บรักษาในตู้เย็น และที่อุณหภูมิห้อง มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่าค่าที่ยอมรับได้ คือค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าเท่ากับ 7 ในวันที่ 52 และ 6 ตามลำดับ

ภาพที่ 2 กราฟแสดงความเป็นกรด-ด่างที่สภาวะการเก็บรักษาต่างๆ

2.3 การประเมินความคงตัวของทางเคมี วิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer พบว่า ความคงตัวของยาเตรียมทั้ง 2 สภาวะ

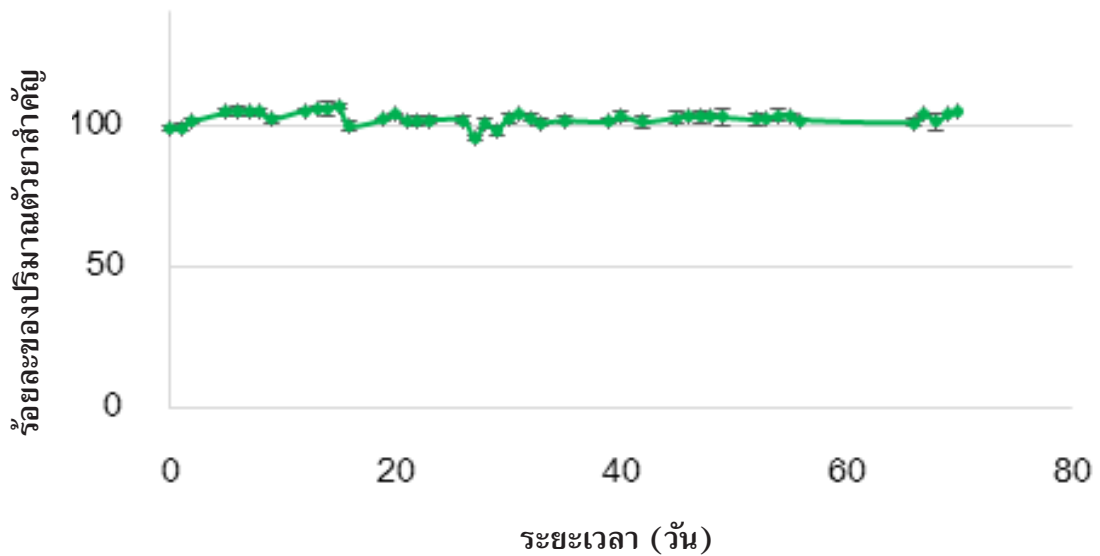
ภาพที่ 2 กราฟแสดงความเป็นกรด-ด่างที่สภาวะการเก็บรักษาต่างๆ



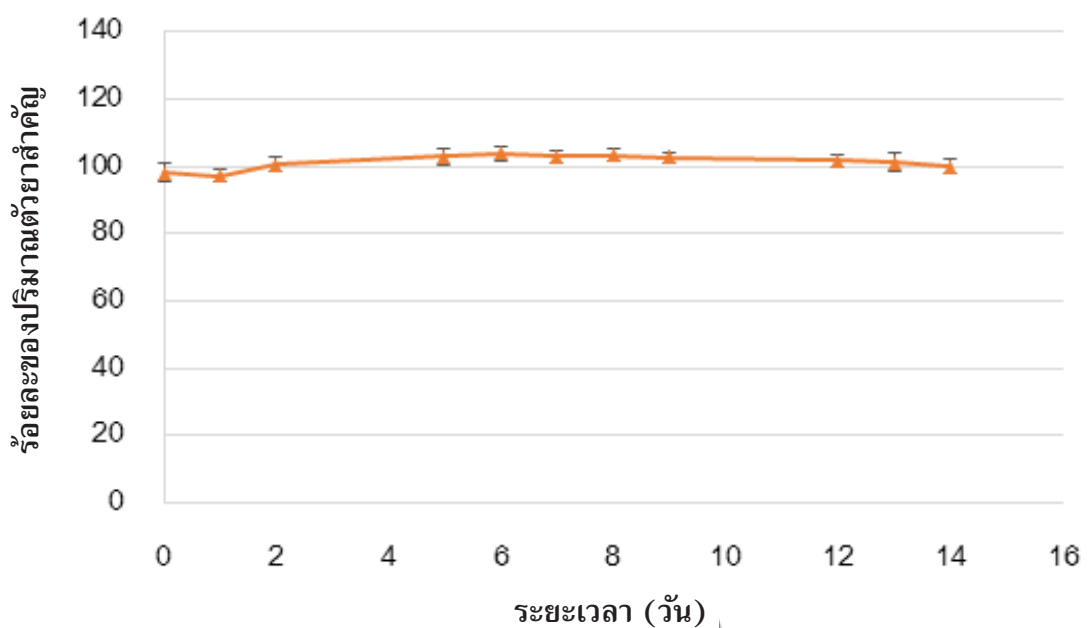
การเก็บรักษามีปริมาณยาเหลืออยู่มากกว่าร้อยละ 90.0 ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยทำการทดสอบในสถานะตู้เย็นเป็นเวลา 70 วัน (ภาพที่ 3) และที่อุณหภูมิห้อง 14 วัน (ภาพที่ 4) แต่การเก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง

พบการเสื่อมสภาพของยาคือเกิดความขุ่น และความเป็นกรด-ด่าง ต่ำกว่าค่าที่ยอมรับได้ตามเภสัชตำรับภายใน 10 วัน จึงทำการทดสอบสถานะนี้เพียง 14 วัน

ภาพที่ 3 กราฟแสดงผลการศึกษาความคงตัวที่เก็บในตู้เย็น



ภาพที่ 4 กราฟแสดงผลการศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง



วิจารณ์

การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยา methylprednisolone sodium succinate ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer พบว่าตัวยา methylprednisolone sodium succinate มีความจำเพาะเจาะจงที่ความยาวคลื่นสูงสุดเท่ากับ 248 นาโนเมตร โดยความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของ methylprednisolone sodium succinate และค่าการดูดกลืนแสง ได้สมการเส้นตรง คือ $y = 0.0257x + 0.0022$ กำหนด y คือ ค่าการดูดกลืนแสง x คือ ความเข้มข้นของ methylprednisolone sodium succinate และมีสัมประสิทธิ์การกำหนด (coefficient of determination หรือ R^2) เท่ากับ 0.9999 ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่ยอมรับคือมากกว่า 0.995 และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พบว่า การวิเคราะห์ตัวยา methylprednisolone sodium succinate ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer มีความแม่นยำ โดยค่าเปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 0.80-1.80% และความเที่ยงตรง มีค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์อยู่ในช่วง 100.44-101.20% ซึ่งอยู่ในข้อกำหนดที่ยอมรับได้ จึงสามารถสรุปได้ว่าเครื่อง UV-visible spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่มีความจำเพาะเจาะจง แม่นยำ และมีความเที่ยงตรง สามารถใช้หาปริมาณตัวยา methylprednisolone sodium succinate ในตำรับยาได้

ยาหยอดตา methylprednisolone sodium succinate ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสำหรับผู้ป่วยเฉพาะรายบรรจุลงในขวดสี่ขาปิดสนิทเพื่อควบคุมตัวแปรด้านแสงสว่าง และเก็บรักษาภายใต้การควบคุมด้านอุณหภูมิ 2 สภาวะ คือ เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง 30 ± 2 องศาเซลเซียส โดยการประเมินผลความคงตัวของตำรับดังนี้ การประเมินลักษณะทางกายภาพ คือ ความขุ่น และกลิ่น พบว่ายาที่เก็บในตู้เย็น (67 วัน) พบความขุ่นของตำรับช้ากว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (10 วัน) ค่าความเป็นกรด-ต่าง

ของตำรับทั้ง 2 สภาวะมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องมีการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ต่างเร็วกว่าการเก็บในตู้เย็นซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลด้านกายภาพ ค่าความเป็นกรด-ต่างที่ลดลง เนื่องจากตัวยา methylprednisolone sodium succinate เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเป็น methylprednisolone และ succinate โดย succinate พบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 218 นาโนเมตร ซึ่งเป็นคนละตำแหน่งกับยา methylprednisolone และ methylprednisolone sodium succinate นอกจากนี้พบปฏิกิริยาออกซิเดชัน ที่ตำแหน่ง $C_{17} : OH$ ของ methylprednisolone เกิดเป็นหมู่กรดคาร์บอกซิลิก และที่ตำแหน่ง $C_{21} : CH_2OH$ เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเป็นกรดอะซิติก ทำให้ตำรับยาหยอดตา methylprednisolone มีความเป็นกรดเพิ่มมากขึ้น โดยอุณหภูมิที่สูงขึ้นเป็นการเร่งปฏิกิริยาข้างต้น ดังนั้น ตำรับที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องจะพบการเสื่อมสลายที่เร็วกว่าการเก็บรักษาในตู้เย็น การที่ตำรับยาหยอดตาที่มีความเป็นกรดมากขึ้นจะทำให้ผู้ป่วยเกิดการระคายเคืองได้

จากการศึกษาพบว่าค่าความเป็นกรด-ต่างของตำรับยาบางขวดลดลงต่ำกว่า 7 เมื่อเก็บรักษาไป 6 วัน ในอุณหภูมิห้องและ 52 วันในตู้เย็น ซึ่งต่ำกว่าข้อกำหนดของเภสัชตำรับ USP 37 ที่ระบุไว้ว่า⁽⁸⁾ ตำรับยา methylprednisolone sodium succinate จะมีความคงตัวเมื่อมีค่าความเป็นกรด-ต่างอยู่ระหว่างช่วง 7-8 จึงถือว่ายาหยอดตา methylprednisolone เสื่อมสภาพในวันที่ 6 และ 52 ในอุณหภูมิห้องและตู้เย็นตามลำดับ

การวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญของ methylprednisolone สำหรับผู้ป่วยเฉพาะรายในการเก็บรักษา 2 สภาวะ ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer พบว่ายาหยอดตา methylprednisolone ที่เก็บรักษาในตู้เย็นและที่อุณหภูมิห้องมีปริมาณตัวยาสำคัญเหลืออยู่มากกว่าร้อยละ 90.0 ตลอดระยะเวลาการศึกษา

สรุป

ตำรับยาหยอดตา methylprednisolone สามารถวัดปริมาณด้วยสำคัญด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจง แม่นยำ และเที่ยงตรง โดยวิธีการนี้ ง่าย สะดวก และรวดเร็วในการวิเคราะห์ จึงสามารถใช้เป็นอีกวิธีการหนึ่งในการวิเคราะห์หาปริมาณยา methylprednisolone ในตำรับยาหยอดตาได้ และการทดสอบความคงตัวของยาหยอดตา methylprednisolone พบว่า เกิดความขุ่นภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และตู้เย็นในวันที่ 10 และ 67 ตามลำดับ ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงต่ำกว่าที่เภสัชตำรับกำหนดภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 วัน และในตู้เย็นเป็นเวลา 52 วัน และทั้ง 2 สภาวะ มีปริมาณด้วยสำคัญมากกว่าร้อยละ 90.0 ตลอดระยะเวลาการศึกษา แสดงว่าการเก็บรักษาหยอดตา methylprednisolone sodium succinate ในอุณหภูมิห้องอาจจะก่อให้เกิดความขุ่นและความเป็นกรด-ด่างที่ลดต่ำลงได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งจะสามารถก่อการระคายเคืองแก่ดวงตาของผู้ป่วยได้ ดังนั้นการเก็บรักษาตำรับยาหยอดตา methylprednisolone sodium succinate ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสำหรับผู้ป่วยเฉพาะรายที่เหมาะสม คือเก็บรักษาในตู้เย็นภายใต้อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ระยะเวลาไม่เกิน 51 วัน แต่อย่างไรก็ดีหากมีการเปิดใช้ยาหยอดตาที่ไม่ได้เติมสารกันเสียแล้วควรมีอายุของยาไม่เกิน 4 สัปดาห์ ภายใต้ อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียที่อาจก่อโรคในผู้ป่วยได้⁽⁹⁾

เอกสารอ้างอิง

1. Kertes PJ, Johnson TK. Evidence-based eye care. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
2. Garg A. Ocular therapeutics. 3rd ed. New Delhi: Ajan-ta Offset & Packagings Ltd.; 2013.
3. Prabhasawat P, Tseng SC. Frequent association of delayed tear clearance in ocular irritation. Br J Ophthalmol 1998;82:666-75.
4. Santianon N. Stability of pharmaceutical and storage. Thai Pharmaceutical and Health Science Journal 2008;3:180-7.
5. Aradhya VKC, Greeshma SE, Sheety ASK, Kumar A. Development and validation of UV spectrophotometric method for the estimation of methylprednisolone in bulk and pharmaceutical products. WJPPS 2018;7:498-503.
6. National Institute of Metrology (Thailand). Evaluation method of Optical Spectrum Analyzer. [Internet]. 2016 [Cited 2017 Sep 24]. Available from: <http://www.nimt.or.th/main/?p=5837>
7. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline; November 2005; Geneva: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; 2005.
8. The United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia. 37th ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention INC; 2014.
9. Prabhasawat P, Chotikavanich S, Leelaporn A. Sterility of non-preservative eye drops. J Med Assoc Thai 2005;88:S6-10.

Abstract: Development and Validation of a Stability Indicating UV-Visible Spectrophotometer Method for Determination of Methylprednisolone Ophthalmic Solution

Terachart Chevadisaiikul, M.Pharm.*; Danuch Panchapornpon, Ph.D.**

** Department of Pharmacy, Mettapracharak (Wat Raikhing) Hospital, Nakhon Pathom Province; ** Faculty of Pharmacy, Siam University, Bangkok, Thailand*

Journal of Health Science 2019;28:743-54.

The aims of this study were to develop and validate a stability-indicating UV spectrophotometric method for methylprednisolone in extemporaneous ophthalmic preparations; and study the stability of 1% w/v methylprednisolone extemporaneous ophthalmic preparations under 2 storage conditions under ICH guideline. The amount of drug was carried out by using of UV-VIS spectrophotometer at 248 nm. Calibration curve between absorbance and drug concentration was linear with R^2 0.999 with the precision (% RSD) of 0.80-1.80, and the accuracy (% recovery) of 100.44-101.20%. Stability of 1% w/v methylprednisolone extemporaneous ophthalmic preparations was studied. Ophthalmic solutions were prepared by dissolving methylprednisolone injection in 0.45% saline solution. The ophthalmic solutions were stored in sterile amber glass bottles at refrigerated temperature (2-8 °C) and room temperature (30±2 °C) within 2 months. Physical characteristic changes were observed in ophthalmic solution stored in refrigerator within 67 days. While physical changes of ophthalmic solution after kept at room temperature were detected within 10 days. The pH value of solutions was lower than that required by United States Pharmacopeia within 6 and 52 days when stored at room temperature and in refrigerator, respectively. However there were still a drug label amount over 90 percent. Conclusion that stability of 1% w/v methylprednisolone extemporaneous ophthalmic preparations was sustained up to 51 days in 2-8 °C. However, once the bottle was opened the eye drop should be used within 4 weeks.

Keywords: stability, methylprednisolone, extemporaneous ophthalmic solution, UV-VIS spectrophotometer, validation