

การถ่ายโอนและการตรวจสอบความถูกต้องของ วิธีวิเคราะห์เพรดนิโซโลนในยาเม็ด โดยวิธี UPLC

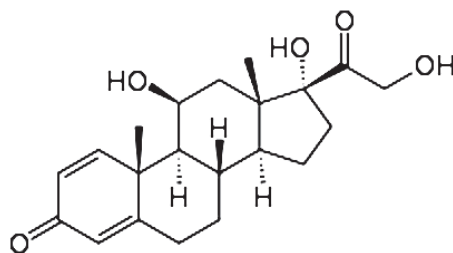
สุภาวดี สุรางค์กุล สิริลักษณ์ สายหล่อ และสมศักดิ์ สุนทรพาณิชย์
สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การถ่ายโอนและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพรดนิโซโลนในยาเม็ดด้วยวิธีอัลตราเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโทกราฟีโดยใช้คอลัมน์ ZORBAX Eclipse Plus C18 ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยมีส่วนผสมของเมธานอลและน้ำในอัตราส่วน 55:45 โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่าการทดสอบความจำเพาะของวิธีไม่พบ การรบกวนของสารละลายตัวที่ถูกเร่งให้สลายตัวภายใต้สภาวะต่างๆ เช่น กรด ด่าง ความร้อน ไฮโดรไลซิส ออกซิเดชัน และแสง พบความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.15–0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 การทดสอบความแม่นยำของวิธีพบค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยที่ 3 ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 100.5 และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับร้อยละ 1.2 การทดสอบความเที่ยง พบว่าการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 6 ซ้ำภายในวันเดียวกัน การวิเคราะห์ตัวอย่างเมื่อเปลี่ยนวันที่วิเคราะห์และเปลี่ยนนักวิเคราะห์ มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับร้อยละ 0.7, 0.6 และ 0.7 ตามลำดับ วิธีวิเคราะห์มีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะการทดสอบต่างๆ คือ การเปลี่ยนคอลัมน์ อุณหภูมิคอลัมน์ สัดส่วนและอัตราการไหลของสารละลายตัวพา โดยไม่มีผลกระทบต่อความเหมาะสมของระบบและปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ เมื่อ เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์นี้กับวิธีที่ระบุไว้ในเภสัชตำรับของประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศอังกฤษ พบว่าวิธีนี้สามารถตรวจ วิเคราะห์ได้รวดเร็วกว่า ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ปริมาณเพรดนิโซโลนในยาเม็ดโดยวิธี UPLC นี้ จึงมีความถูกต้อง แม่นยำ และให้ ผลวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ สามารถนำไปใช้เป็นวิธีทางเลือกอีกวิธีหนึ่งในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในยาเม็ดได้

บทนำ

เพรดนิโซโลน (Prednisolone) เป็นสารสังเคราะห์กลุ่ม Glucocorticoid นำมาใช้ทางการแพทย์ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยยับยั้งการเคลื่อนตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Polymorphonuclear Leukocytes ที่ผ่านมาทางหลอดเลือดฝอยหรือใช้กีดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยลดการผลิตและการทำงานของเม็ดเลือดขาว ชนิด lymphocytes และ eosinophils^(1, 2) เพรดนิโซโลนจัดเป็นยาควบคุมพิเศษ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ยาควบคุมพิเศษ⁽³⁾ ตามข้อ 3 ลำดับที่ 34 ต้องมีแพทย์เป็นผู้สั่งจ่าย ไม่สามารถซื้อหาได้เองตามร้านขายยาทั่วไป เพรดนิโซโลนที่มีใช้ในโรงพยาบาลมีทั้งรูปแบบยาเม็ดและยาแคปซูล ปัจจุบันมีเพรดนิโซโลนในรูปแบบยาเม็ดที่ขึ้นทะเบียนตำรับทั้งสิ้น 126 ตำรับ จำแนกเป็นผลิตในประเทศ 125 ตำรับและนำเข้า 1 ตำรับ⁽⁴⁾

เพรดนิโซโลนมีลักษณะเป็นผงสีขาว ละลายในน้ำ (1:1300) เอทานอล (1:30) คลอโรฟอร์ม (1:180) มีชื่อทางเคมีคือ (11 β)-11, 17, 21-trihydroxypregna-1, 4-diene-3, 20-dione มีสูตรโมเลกุล คือ C₂₁H₂₈O₅ น้ำหนักโมเลกุล 360.4 และมีสูตรโครงสร้างทางเคมี (ภาพที่ 1)⁽⁵⁾



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของเพรดนิโซโลน

การวิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในยาเม็ดที่ระบุไว้ในเภสัชตำรับของประเทศสหรัฐอเมริกา (USP36) ใช้ normal phase HPLC และใช้ Butyl chloride, Water-saturated Butyl chloride, Tetrahydrofuran, Methanol และ Glacial acetic acid ในอัตราส่วน 95:95:14:7 เป็นสารละลายตัวพา ซึ่งมีส่วนผสมของ chlorinated hydrocarbon ซึ่งมีอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ส่วนวิธีวิเคราะห์ตามเภสัชตำรับของประเทศอังกฤษ (BP 2013) ใช้ reverse-phase HPLC โดยมีเมทานอลและน้ำ ในอัตราส่วน 42:58 เป็นสารละลายตัวพา^(6, 7) เนื่องจากในปัจจุบันเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์มีการพัฒนาเพื่อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นคือ Ultra Performance Liquid Chromatography: UPLC ซึ่งเป็นระบบที่สามารถทนแรงดันได้มากกว่า High Performance Liquid Chromatography: HPLC จึงสามารถใช้กับคอลัมน์ที่มีขนาดอนุภาคเล็กกว่าและความยาวสั้นลง ทำให้ประสิทธิภาพในการแยกสารเพิ่มขึ้น ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นลงและสิ้นเปลืองสารเคมีน้อยลงอีกด้วย โดยเมื่อวิเคราะห์เพรดนิโซโลนด้วยวิธี UPLC พบพีคของเพรดนิโซโลนที่เวลาประมาณ 3.4 นาที ส่วนการวิเคราะห์เพรดนิโซโลนโดยวิธีมาตรฐานตามตำราของประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศอังกฤษพบพีคของเพรดนิโซโลนที่เวลาประมาณ 9.0 และ 5.2 นาทีตามลำดับ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ถ่ายโอนวิธีวิเคราะห์เพรดนิโซโลนในยาเม็ดโดยใช้เทคนิค UPLC และทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามหลักเกณฑ์ของ USP⁽⁸⁾ และ ICH Guideline⁽⁹⁾ โดยศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธี ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ ความแม่นยำ และความเที่ยง และความคงทนของวิธีวิเคราะห์ เพื่อสามารถนำวิธีนี้ไปใช้เป็นวิธีทางเลือก สำหรับการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการที่มีจำนวนตัวอย่างปริมาณมาก ๆ ได้ในคราวเดียวกัน

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง UPLC: Agilent Model Agilent 1290 infinity ประกอบด้วย Binary Pump G4220B, Hip Sampler G4226A, Column Compartment G1316C, DAD Detector G4212A, Software OpenLab-EzChrom, USA Column: ZORBAX Eclipse Plus C18 ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร S.N. USDAZ03529 และ S.N. USDAZ04974

Microbalance: Mettler Toledo Model MX5, Switzerland

Balance: Mettler Toledo Model MT261 Delta range, Switzerland

Shaker: GFL Gesellschaft fur Labortechnik mbH Model 3018, Germany

Ultrasonic bath: CREST ULTRASONICS Model CP2600D, Malaysia

Hot air oven: Binder Model FED-115, Germany

Syringe filter: PVDF 0.22 μm , Agela Technologies, USA

สารเคมีและสารมาตรฐาน

Methanol HPLC grade ผลิตภัณท์ของ Macron, USA

Hydrochloric acid 37% AR grade ผลิตภัณท์ของ Carlo Erba, Switzerland

Sodium Hydroxide AR grade ผลิตภัณท์ของ Merck, Germany

Hydrogen Peroxide 35% AR grade ผลิตภัณท์ของ Carlo Erba, Switzerland

น้ำจาก Mili-Q purification system ผลิตภัณท์ของ Milipore, Netherlands

สารมาตรฐาน Prednisolone USP reference standard Lot.No. N1J277

สารมาตรฐาน Prednisolone DMSc reference standard Control.No. WSP48-4/55

ตัวอย่าง

ตัวอย่างยาเม็ดเพรดนิโซโลน ขนาดความแรง 5 มิลลิกรัมต่อเม็ด

วิธีการทดสอบ

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐาน **Prednisolone** ชั่งสารมาตรฐาน Prednisolone USP RS ให้มีน้ำหนักที่ถูกต้อง ประมาณ 10 มิลลิกรัม ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Mobile phase กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สารละลายมาตรฐาน **Prednisolone** สำหรับกราฟมาตรฐาน ชั่งสารมาตรฐาน Prednisolone DMSc RS ให้มีน้ำหนักที่ถูกต้อง ประมาณ 125 มิลลิกรัม ลงใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Mobile phase จากนั้นเจือจางสารละลายที่ได้ให้มีปริมาณที่แน่นอนของ Prednisolone ประมาณ 0.15, 0.175, 0.2, 0.225 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารละลายมาตรฐาน **Prednisolone stock solution** ชั่งสารมาตรฐาน Prednisolone DMSc RS ให้มีน้ำหนักที่ถูกต้อง ประมาณ 100 มิลลิกรัม ลงใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย Mobile phase กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ซึ่งตัวอย่างยาเม็ดเพรดนิโซโลน ไม่น้อยกว่า 20 เม็ด คำนวณหาน้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ด แล้วบดผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นซึ่งผงยาตัวอย่างให้มิน้ำหนักที่ถูกต้องโดยให้มีปริมาณตัวยาประมาณ 10 มิลลิกรัม ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Mobile phase ประมาณ 25 มิลลิลิตร นำไปแช่ 15 นาที จากนั้นนำไป sonicate 10 นาที แล้วปรับปริมาตรด้วย Mobile phase กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

การเปรียบเทียบ Retention time ของวิธีวิเคราะห์โดย UPLC กับวิธีมาตรฐาน

เตรียมสารละลายเพรดนิโซโลนใน Mobile phase ของแต่ละวิธีแล้วฉีดสารละลายเข้าระบบโครมาโทกราฟี (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงระบบโครมาโทกราฟีตามวิธีต่างๆ

พารามิเตอร์	วิธีวิเคราะห์โดย UPLC	USP 36	BP 2014
คอลัมน์	ZORBAX Eclipse Plus C18 ขนาด 2.1 × 100 mm, 1.8 μm	Hypersil silica ขนาด 4.6 × 250 mm, 5 μm	Hypersil BDS C18 ขนาด 4.6 × 200 mm, 5 μm
สารละลายตัวพา	MeOH:H ₂ O (55:45)	C ₄ H ₉ Cl: Water-saturated C ₄ H ₉ Cl:(CH ₂) ₄ O:MeOH: GAA (95:95:14:7)	MeOH:H ₂ O (58:42)
อัตราการไหล	0.3 มิลลิลิตร/นาที	1.0 มิลลิลิตร/นาที	1.0 มิลลิลิตร/นาที
อุณหภูมิของคอลัมน์	35 °C	ambient	ambient
ปริมาตรที่ฉีด	2 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร	20 ไมโครลิตร
เครื่องตรวจวัด	DAD 254 nm	UV 254 nm	UV 254 nm

วิธีตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (Method validation)

1. การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

ซึ่งสารมาตรฐาน Prednisolone DMSc RS ประมาณ 10 mg ลงในหลอดทดลองแล้ว นำไป ทำให้สลายตัวในสภาวะต่างๆ ดังนี้

1. เติม 3 N Sodium Hydroxide จำนวน 100 μl แล้วให้ความร้อนที่ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. เติม 3 N Hydrochloric acid จำนวน 100 μl แล้วให้ความร้อนที่ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. เติม Hydrogen peroxide 35% จำนวน 100 μl แล้วให้ความร้อนที่ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. เติมน้ำจำนวน 100 μl แล้วให้ความร้อนที่ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. ให้ความร้อนที่ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
6. นำไปผึ่งแดด เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

จากนั้นละลายสารมาตรฐานจากสภาวะต่างๆ ข้างต้นด้วย Mobile phase จำนวน 10 มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร วิเคราะห์สารละลายที่ได้ด้วยเครื่อง UPLC เพื่อศึกษาการรบกวนของสารละลายตัว

2. การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

ฉีดสารละลายมาตรฐาน Prednisolone ความเข้มข้นประมาณ 0.15, 0.175, 0.2, 0.225 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับเข้าเครื่อง UPLC แล้วสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ซึ่งต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995

3. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน Prednisolone stock solution (standard addition method) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.16, 0.2 และ 0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 80, 100 และ 120 ของความเข้มข้นที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในตัวอย่าง โดยทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ คำนวณปริมาณเพรดนิโซโลนทั้งหมดที่มีในสารละลายเพื่อคำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) ที่แต่ละระดับความเข้มข้น หาค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการคืนกลับ (% mean recovery) และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% Relative standard deviation, % RSD) โดยที่ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับต้องอยู่ในช่วง 97.0–103.0 และค่า % RSD ไม่เกิน 2.0

4. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

4.1 ความทำซ้ำได้ (Repeatability)

วิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในตัวอย่างยาเม็ด จำนวน 6 ซ้ำ โดยทดสอบในวันเดียวกัน คำนวณปริมาณเพรดนิโซโลนต่อเม็ด ค่าเฉลี่ยและ % RSD โดย % RSD ต้องไม่เกิน 2.0

4.2 Intermediate Precision

วิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในตัวอย่างยาเม็ด จำนวน 6 ซ้ำ โดยทดสอบต่างวัน จำนวน 3 วัน และเปลี่ยนนักวิเคราะห์ จำนวน 3 คน คำนวณปริมาณเพรดนิโซโลนต่อเม็ด ค่าเฉลี่ยและ % RSD โดย % RSD ต้องไม่เกิน 2.0

5. การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

วิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในตัวอย่างยาเม็ด จำนวน 6 ซ้ำ โดยเปลี่ยนแปลงสภาวะของระบบ UPLC คือ อัตราส่วนของสารละลายตัวพา อัตราการไหลของสารละลายตัวพา คอลัมน์ และอุณหภูมิของคอลัมน์ เปรียบเทียบพารามิเตอร์ต่างๆ ที่กำหนดไว้ สำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ UPLC ได้ค่า tailing factor ต้องไม่เกิน 2.0 พร้อมทั้งคำนวณปริมาณเพรดนิโซโลนต่อเม็ด เปรียบเทียบผลวิเคราะห์ที่ได้โดยคำนวณค่า % RSD ต้องไม่เกิน 2.0

6. การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)

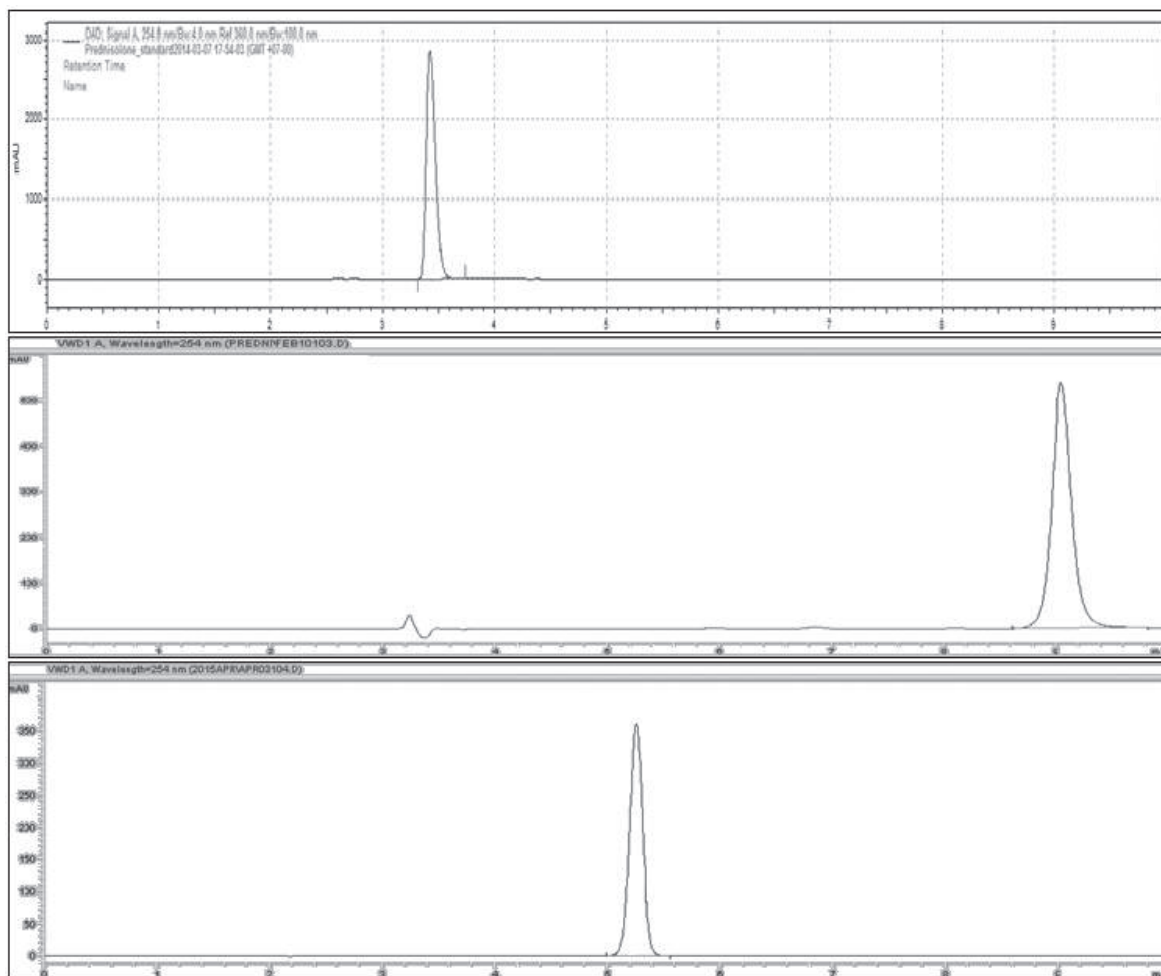
การศึกษานี้ได้ทำการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์เพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025:2005 ที่กำหนดให้ห้องปฏิบัติการทดสอบต้องประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดโดยเป็นไปตามแนวทางการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี^(10, 11)

ผล

การเปรียบเทียบ Retention time ของวิธีวิเคราะห์โดย UPLC กับวิธีมาตรฐาน

การวิเคราะห์เพรดนิโซโลนภายใต้สภาวะ UPLC พบพีคของเพรดนิโซโลนที่เวลาประมาณ 3.4 นาที ส่วนการวิเคราะห์เพรดนิโซโลนโดยวิธีมาตรฐานตามตำราของประเทศไทยและประเทศอังกฤษพบพีค

ของเพรดนิโซโลนที่เวลาประมาณ 9.0 และ 5.2 นาที ตามลำดับ ซึ่งวิธีวิเคราะห์โดย UPLC พบพีคของเพรดนิโซโลนเร็วกว่าวิเคราะห์ด้วยวิธีตามตำราของสหรัฐอเมริกาประมาณ 2.6 เท่าและตามตำราของประเทศไทย 1.5 เท่า (ภาพที่ 2)

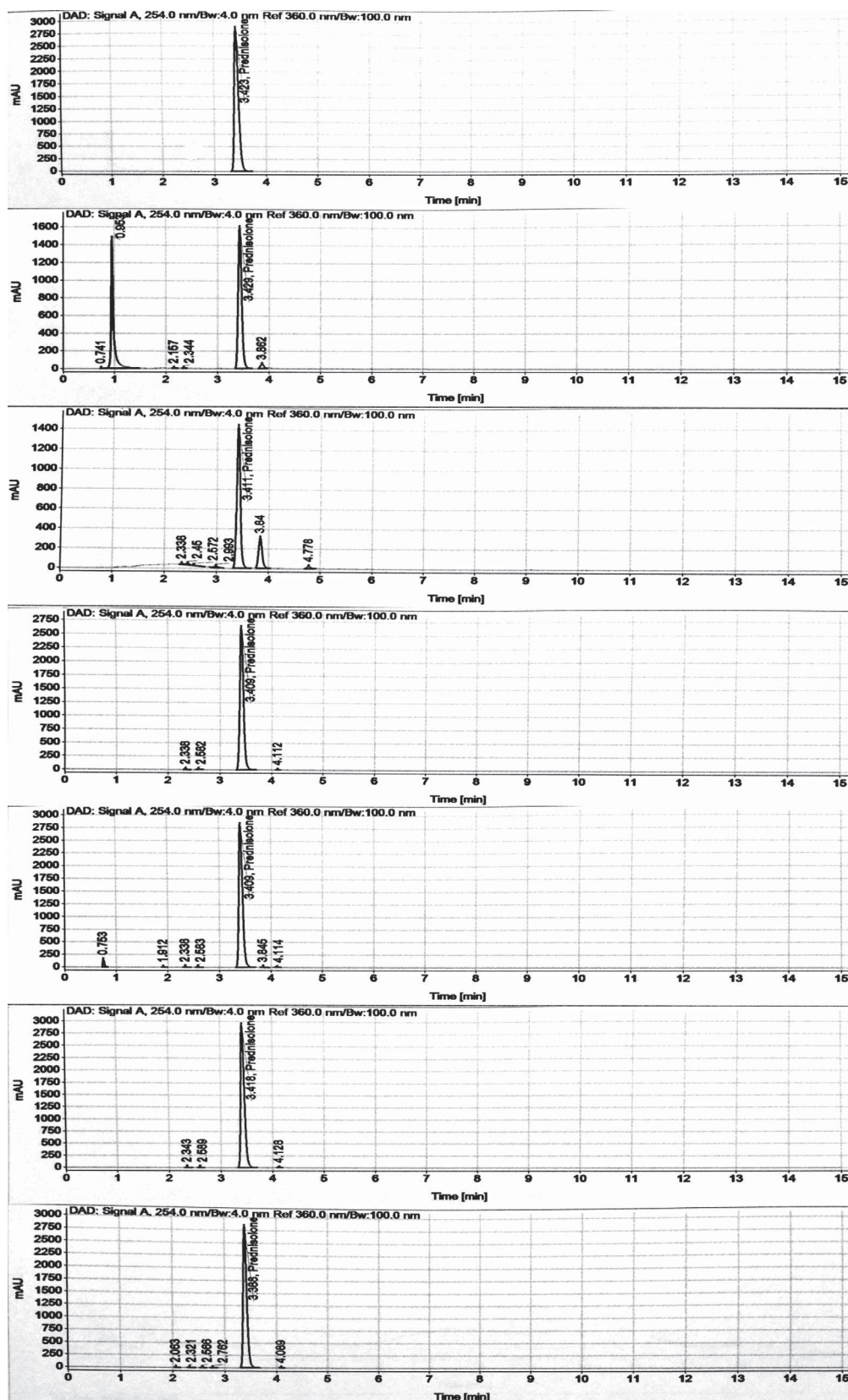


ภาพที่ 2 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเพรดนิโซโลนในระบบโครมาโทกราฟีตามวิธีต่างๆ คือ วิธีวิเคราะห์โดย UPLC (A) ตำราของสหรัฐอเมริกา (USP 36) (B) และตำราของประเทศไทย (BP 2014) (C)

วิธีตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (Method validation)

1. การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

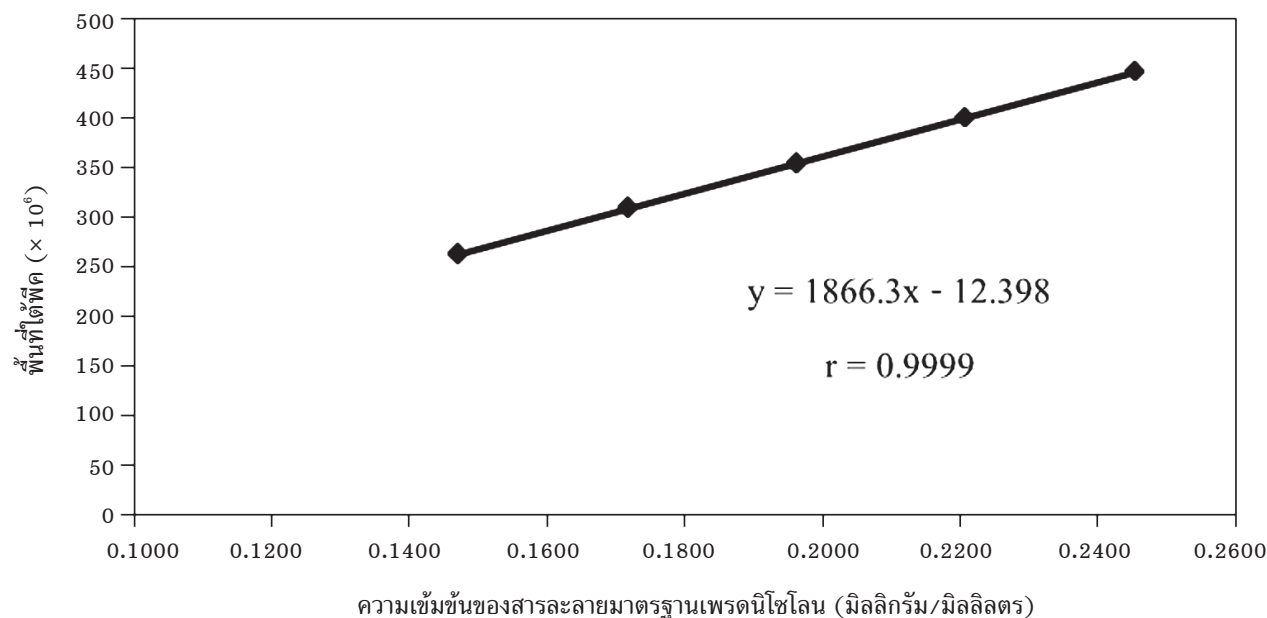
การวิเคราะห์เพรดนิโซโลนภายใต้สภาวะ UPLC พบพีคของเพรดนิโซโลนที่เวลา ประมาณ 3.4 นาที จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีโดยฉีดสารละลายของสารมาตรฐานเพรดนิโซโลนที่ทำให้เกิดการสลายตัวที่สภาวะต่างๆ พบว่าสามารถแยกสารสลายตัวที่เกิดขึ้นออกจากพีคของเพรดนิโซโลนได้ (ภาพที่ 3) โดยมีค่า resolution มากกว่า 2.0



ภาพที่ 3 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเพรดนิโซลोन (A) และสารละลายของสารมาตรฐานเพรดนิโซลोनที่ทำให้เกิดการสลายตัวที่สภาวะต่างๆ คือ สภาวะกรด ที่ 80 °C นาน 1 ชั่วโมง (B), สภาวะด่าง ที่ 80 °C นาน 1 ชั่วโมง (C), สภาวะออกซิเดชัน ที่ 80 °C นาน 1 ชั่วโมง (D), สภาวะไฮโดรไลซิส ที่ 80 °C นาน 1 ชั่วโมง (E), สภาวะที่ 80 °C นาน 1 ชั่วโมง (F) และสภาวะที่ถูกแสงนาน 8 ชั่วโมง (G)

2. การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

จากการฉีดสารละลายมาตรฐาน Prednisolone ที่มีความเข้มข้นประมาณ 0.15, 0.175, 0.2, 0.225 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีค พบว่ากราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเพรดนิโซโลนและพื้นที่ใต้พีค

3. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

จากการฉีดสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐานเพรดนิโซโลน ที่ 3 ระดับความเข้มข้น 0.16, 0.2 และ 0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยเท่ากับ 99.9 ± 1.1 , 100.8 ± 1.4 และ 100.9 ± 0.3 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ระดับความเข้มข้น	ความเข้มข้น (มก./มล.)	ค่าร้อยละของการคืนกลับ			ค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละ ของการคืนกลับ	% RSD
		1	2	3		
80%	0.16	98.9	101.0	99.8	99.9	1.1
100%	0.20	102.4	99.7	100.4	100.8	1.4
120%	0.24	101.2	100.6	100.9	100.9	0.3
		เฉลี่ย			100.5	1.0

4. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

4.1 ความทำซ้ำได้ (Repeatability)

วิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในตัวอย่างยาเม็ด จำนวน 6 ซ้ำ โดยทดสอบในวันเดียวกัน มี % RSD เท่ากับ 0.7 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความทำซ้ำได้

ตัวอย่าง	ปริมาณเพรดนิโซโลน (มิลลิกรัมต่อเม็ด)
1	4.7359
2	4.7743
3	4.7820
4	4.8012
5	4.7576
6	4.8257
เฉลี่ย	4.7795
%RSD	0.66

4.2 Intermediate Precision

วิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในตัวอย่างยาเม็ด จำนวน 6 ซ้ำ โดยทดสอบต่างวัน จำนวน 3 วัน มี % RSD เท่ากับ 0.6 และเมื่อเปลี่ยนนักวิเคราะห์ จำนวน 3 คน มี % RSD เท่ากับ 0.7 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ Intermediate precision

รายการที่ทดสอบ		ปริมาณเพรดนิโซโลน (มิลลิกรัมต่อเม็ด)								Intermediate precision	
		1	2	3	4	5	6	เฉลี่ย	% RSD	เฉลี่ย	% RSD
เปลี่ยนวัน	1	4.7359	4.7743	4.7820	4.8012	4.7576	4.8257	4.7795	0.66		
	2	4.8279	4.8197	4.8140	4.8255	4.8213	4.8053	4.8190	0.17	4.8042	0.57
	3	4.8157	4.8348	4.8102	4.8391	4.7979	4.7879	4.8143	0.42		
เปลี่ยนนักวิเคราะห์	1	4.7359	4.7743	4.7820	4.8012	4.7576	4.8257	4.7795	0.66		
	2	4.8381	4.8402	4.8650	4.8049	4.8264	4.8342	4.8348	0.40	4.8124	0.70
	3	4.7954	4.8100	4.8186	4.8204	4.8456	4.8479	4.8230	0.42		

5. การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

ทดลองเปลี่ยนแปลงสภาวะของระบบ UPLC คือ อัตราส่วนของสารละลายตัวพา อัตราการไหลของสารละลายตัวพา คอลัมน์ และอุณหภูมิของคอลัมน์ ศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆ ที่อาจมีผลกระทบต่อความเหมาะสมของระบบ รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณเพรดนิโซโลนต่อเม็ดเพื่อเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ พบว่าสภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่เบี่ยงเบนไปยังคงให้ผลวิเคราะห์ที่มีค่า % RSD ไม่เกิน 0.9 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบความทนของวิธี

สภาวะของระบบ		RetentionTailing		ปริมาณเพรดนิโซโลน (มิลลิกรัมต่อเม็ด)				% RSD	
		Time	factor	ปริมาณเพรดนิโซโลน		เฉลี่ย	เฉลี่ยรวม		
สัดส่วนของสารละลายตัวพา (MeOH: water)	65/35	1.6	1.35	4.8228	4.8003	4.8081	4.8102	4.8105	0.2
				4.8101	4.8193	4.8003			
	55/45*	3.1	1.26	4.8279	4.8197	4.8140	4.8190		
				4.8255	4.8213	4.8053			
	45/55	7.8	1.20	4.8133	4.7944	4.7957	4.8023		
Flow rate (ml/min)	0.25	3.7	1.25	4.8251	4.7945	4.8027	4.8108	4.8142	0.2
				4.8196	4.8237	4.7993			
	0.30*	3.1	1.26	4.8279	4.8197	4.8140	4.8190		
				4.8255	4.8213	4.8053			
	0.35	2.6	1.25	4.8201	4.7958	4.8092	4.8128		
Column Temperature (°C)	30	3.3	1.26	4.8265	4.7983	4.8170	4.8180	4.8171	0.2
				4.8224	4.8320	4.8199			
	35*	3.1	1.26	4.8279	4.8197	4.8140	4.8190		
				4.8255	4.8213	4.8053			
	40	2.9	1.28	4.8161	4.7974	4.8163	4.8129		
UPLC Column	No.1*	3.1	1.26	4.8279	4.8197	4.8140	4.8190	4.7816	0.9
				4.8255	4.8213	4.8053			
	No.2	3.3	1.22	4.7542	4.7634	4.7343	4.7443		
				4.7493	4.7249	4.7398			

(* หมายถึง สภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่ทำการตรวจวิเคราะห์ความถูกต้อง)

6. การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement uncertainty)

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์เพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025: 2005 ที่กำหนดให้ห้องปฏิบัติการทดสอบต้องมีการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด ดังนั้นแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในตัวอย่างยาเม็ด พิจารณาได้จากสูตรคำนวณ

$$\text{ปริมาณเพรดนิโซโลน (มิลลิกรัมต่อเม็ด)} = \frac{\text{peak area}_{\text{sample}}}{\text{peak area}_{\text{std}}} \times \frac{W_{\text{std}}}{VF_{\text{std}}} \times \frac{P}{100} \times \frac{VF_{\text{sample}}}{W_{\text{sample}}} \times \frac{Av.Wt/unit}{W_{\text{sample}}}$$

peak area_{sample} = พื้นที่ใต้พีคเพรดนิโซโลนในสารละลายตัวอย่าง

peak area_{std} = พื้นที่ใต้พีคเพรดนิโซโลนในสารละลายมาตรฐาน

W_{std} = น้ำหนักของสารมาตรฐานเพรดนิโซโลน (มิลลิกรัม)

VF_{std}	=	ปริมาตรที่ใช้ในการเจือจางสารมาตรฐาน (มิลลิลิตร)
P	=	ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน (% purity)
VF_{sample}	=	ปริมาตรที่ใช้ในการเจือจางตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
Av.Wt/unit	=	น้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ดของยาเม็ดเพรดนิโซโลน (กรัม)
W_{sample}	=	น้ำหนักผงยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ (กรัม)

พิจารณาถึงความไม่แน่นอนที่เกิดจากแต่ละแหล่ง จากนั้นคำนวณหาความไม่แน่นอนรวม (Combined relative standard uncertainty) และค่าความไม่แน่นอนขยาย (Expanded uncertainty) เพื่อรายงานเป็นผลการทดสอบ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์เพรดนิโซโลนในยาเม็ด

Source of Uncertainty	Value, x	Unit	Uncertainty	Distribution	u(xi)	u(xi)/x
Standard						
W_{std}	10.288	mg	0.014878	Normal	0.014878	2.0914×10^{-6}
VF_{std}						
- Calibration	50	ml	0.05	Rectangular	0.028868	
- Temperature	50	ml	0.15	Rectangular	0.086602	
Total					0.091287	1.8257×10^{-3}
Peak area _{std}	369804568.7	-	689791.25	Normal	689791.25	1.8653×10^{-3}
Purity	-	-	-	-	-	-
Sample						
Av. Wt/unit	0.1097	g	0.000015	Normal	0.000015	6.7383×10^{-6}
W_{sample}	0.22037	g	0.000015	Normal	0.000015	1.3536×10^{-4}
VF_{sample}						
- Calibration	50	ml	0.05	Rectangular	0.028868	
- Temperature	50	ml	0.15	Rectangular	0.086602	
Total					0.091287	1.8257×10^{-3}
Peak area _{sample}	344032956.7	-	129060.88	Normal	129060.88	3.7514×10^{-4}
Repeatability	4.7359	-	0.03168	Normal	0.012933	2.7309×10^{-3}
Total relative standard uncertainty : 0.00001986						
Combined relative standard uncertainty : 0.00446						
Test result is 94.7% la. ; Combined standard uncertainty : $0.00446 \times 94.7 = 0.4224$						
Expanded uncertainty at 95% confidence limit : $k = 2, 2 \times 0.4224 = 0.8448\%$ la.						
Reported value : $94.7 \pm 0.8\%$ la.						

วิจารณ์

การถ่ายโอนวิธีวิเคราะห์เพรดนิโซโลนในยาเม็ดด้วยเทคนิค UPLC โดยใช้คอลัมน์ ZORBAX Eclipse Plus C18 ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสโดยมีส่วนผสมของ เมธานอลและน้ำในอัตราส่วน 55:45 เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาทีและตรวจวัด ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นเมื่อถูกเร่งให้สลายตัวภายใต้สภาวะต่างๆ ได้แก่ กรด ต่าง ความร้อน ไฮโดรไลซิส ออกซิเดชันและแสง แสดงถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีต่อเพรดนิโซโลน ซึ่งมีการศึกษา ความคงตัวของเพรดนิโซโลนพบว่าเพรดนิโซโลนสามารถสลายตัวได้ทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและสภาวะที่เป็นด่าง โดยใน สภาวะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างน้อยกว่า 5.5 เพรดนิโซโลนจะสลายตัวเป็น 17-deoxy-21-dehydroprednisolone และเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้น เพรดนิโซโลนจะสลายตัวได้สารหลายชนิด ได้แก่ 17-deoxy-21-dehydro-prednisolone, 17-dehydroprednisolone, 17-ketosteroid และ D-homosteriod⁽¹²⁾

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ พบว่ามีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.15 ถึง 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 ซึ่งค่ามากกว่าค่าที่ยอมรับได้ที่กำหนด ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995

การทดสอบความแม่นยำของวิธีที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือที่ 80, 100 และ 120% ของค่าความเข้มข้นที่ทดสอบ พบร้อยละของการคืนกลับอยู่ระหว่าง 98.9 ถึง 102.4 โดยมีค่าเฉลี่ยแต่ละระดับความเข้มข้นเท่ากับ 99.9, 100.8 และ 100.9 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยรวมเท่ากับ 100.5 และ % RSD เท่ากับ 1.0 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ ร้อยละ 97.0-103.0 และค่า % RSD ไม่มากกว่า 2.0 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความแม่นยำ

การทดสอบความเที่ยงของวิธี ผลการทดสอบความซ้ำได้พบว่ามีค่า % RSD เท่ากับ 0.7 เมื่อทดสอบ โดยเปลี่ยนวันที่วิเคราะห์จำนวน 3 วัน ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 6 ซ้ำ ได้ % RSD รวมเท่ากับ 0.6 และเมื่อทดสอบ โดยเปลี่ยนนักวิเคราะห์จำนวน 3 คน ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 6 ซ้ำ ได้ % RSD รวมเท่ากับ 0.7 จากค่า % RSD ที่ได้ พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ ไม่มากกว่า 2.0 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถทำซ้ำได้และความเที่ยง

การทดสอบความทนวิธีโดยเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของสารละลายตัวพา อัตราการไหลของสารละลายตัวพา คอลัมน์ และอุณหภูมิของคอลัมน์ พบว่ามีค่า % RSD ของผลการวิเคราะห์ไม่เกิน 2.0 เป็นการยืนยันได้ว่าเมื่อสภาวะ ของระบบโครมาโทกราฟีมีการเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย จะไม่มีผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์ แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้ มีความทนต่อสภาวะที่เปลี่ยนแปลง

การประเมินค่าความไม่แน่นอนในการวัดนั้นเป็นข้อกำหนดหนึ่งของระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการตาม มาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 ความไม่แน่นอนของการวัดเป็นค่ารวมของผลกระทบทั้งหมดที่มีต่อผลทดสอบที่ เป็นเชิงปริมาณ แหล่งที่มาของความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มาจากการชั่งสารมาตรฐานและตัวอย่าง ปริมาตรในการเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง พื้นที่ใต้พีคจากการฉีดซ้ำของสารละลายมาตรฐานและ สารละลายตัวอย่าง และความสามารถในการทำซ้ำได้ จากตัวอย่างการประเมินค่าความไม่แน่นอนของผลการวิเคราะห์ หาปริมาณเพรดนิโซโลนในตัวอย่างยาเม็ด พบค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เท่ากับ 0.8%

วิธีที่ถ่ายโอนเป็นวิธี UPLC นี้ มีข้อดีกว่าวิธีมาตรฐานเดิมซึ่งเป็นวิธี HPLC คือใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ สั้นกว่า และใช้สารเคมีน้อยกว่า ซึ่งจะมีประโยชน์ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณมาก เช่น การตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างยาเคี การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างยาในเลือด และการสุ่มตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างยาระหว่างการผลิต เป็นต้น ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้จึงสามารถใช้เป็นวิธีทางเลือกได้อย่างเหมาะสม

สรุป

วิธีวิเคราะห์เพรดนิโซโลนในยาเม็ดด้วยวิธี Ultra Performance Liquid Chromatography ที่ถูกถ่ายโอนสามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในยาเม็ดได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และมีความจำเพาะเจาะจงต่อตัวยาสำคัญ เป็นวิธีที่รวดเร็ว ประหยัดเวลา และสารเคมี สามารถนำไปใช้เป็นวิธีทางเลือกอีกวิธีหนึ่งในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเพรดนิโซโลนในยาเม็ดได้

เอกสารอ้างอิง

1. Elaine KS, Gerald KE, Jan M, Linda K, Kathy L, Olin HW, et al. AHFS drug information. Maryland: The American Society of Health-System Pharmacists; 2008.
2. Prednisolone. [online]. 2014; [cited 2014 Sep 4]; [2 screens]. Available from: URL: <http://www.mims.com/THAILAND/Home/GatewaySubscription/?generic=prednisolone>.
3. พระราชบัญญัติยา พ.ศ.2510 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ยาควบคุมพิเศษ (พ.ศ. 2521). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 95 ตอน 68 (วันที่ 4 กรกฎาคม 2521).
4. งานบริการข้อมูลผลิตภัณฑ์สุขภาพผ่านอินเทอร์เน็ต. ผลิตภัณฑ์ยา. [ออนไลน์]. [สืบค้น 9 ก.ย. 2557]; เข้าถึงได้จาก : URL: <http://fdaolap.fda.moph.go.th/logistics/drgdrug/DSerch.asp>.
5. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Galichet LY, editors. Clarke's analysis of drugs and poisons. 3rd ed. London: Pharmaceutical Press; 2004.
6. Prednisolone tablets. In: United States Pharmacopeia 36 – National Formulary 31. 36th ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2013. p. 4880-4881.
7. Prednisolone tablets. In: British Pharmacopeia 2013. London: The stationary Office; 2012. p. 3329-3331.
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.
10. สุวรรณ จารุณขุ, และคณะ. แนวปฏิบัติการประมาณค่าความไม่แน่นอนในการวัดทางเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : บริษัทวี พลัส กรุ๊ป (ไทยแลนด์) จำกัด; 2554. หน้า 22-31.
11. ยุพดี พยัคพันธ์, ھرรษา ไซยวานิช, นวพร อนันตสินกุล, บรรณาธิการ. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2549. หน้า 77-86.
12. Dekker D, Beunen JH. Stability of corticosteroids under anaerobic conditions VI. Kinetics of the decomposition of prednisolone and the appearance of some decomposition products in aqueous solution under anaerobic conditions. Pharmaceutisch Weekblad 1980; 2(1): 1116-20.

UPLC Transfer and Method Validation of the Determination of Prednisolone Tablets

Supawadee Surangkul Sirilak Sailo and Somsak Sunthornphanich

Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT The method transfer and validation for the determination of Prednisolone in tablets was established using Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). The separation was achieved on a ZORBAX Eclipse Plus C18 (1.8 μm , 2.1×100 mm) at 35 degree Celsius. The mobile phase was the mixture of methanol and water (55:45, v/v) at the flow rate of 0.3 ml per minute with UV detection at 254 nm. Specificity test showed that prednisolone peak was not interfered by its degradation product peaks under stress conditions: acid, base, heat, hydrolysis, oxidation and light. The linearity test showed linear relationship between the area under the peak and the concentration levels in the range of 0.15–0.25 mg per ml with correlation coefficient, r , 0.9999. The percentage mean recovery from three concentration levels was 100.5 (% RSD = 1.17%). The precision test was performed by the assay of six samples within the same day, and different days and analysts gave % RSD of 0.7, 0.6 and 0.7, respectively. The robustness test indicated that the described method was robust when the chromatographic conditions were changed such as column batch, column temperature, composition and flow rate of mobile phase with no effect on the system suitability and the test result. This method takes less analytical time than the method specified in the United States Pharmacopoeia and British Pharmacopoeia. Therefore, the proposed method was suitable for the quantification of prednisolone in tablets and could be used as an alternative method.

Key word: prednisolone tablets, UPLC, method validation