

การศึกษาความคงตัวของตำรับยามอร์ฟินชนิดฉีด ที่ไม่มีสารกันเสีย

Long-term Stability Study of Preservative-free Preparations of Morphine Injection

เดชพล ปรีชากุล¹, ขนิษฐา ตันติศิริ²

Detpon Preechagoon¹, Khanittha Tontisirin²

¹คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

²กองควบคุมวัตถุเสพติด สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000

Received: 27 February, 2007 Accepted: 28 June, 2007

Abstract

The objective of this study was to develop preservative-free morphine preparations for spinal injection to relieve pain for the patients who were not able to use the formulations with preservatives. From preliminary study of 14 formulations, it was found that preparations containing active ingredient, water, sodium chloride, and pH adjusted to approximately 4 were promising for long-term stability study. Therefore, four preparations of morphine sulphate injection at a concentration of 10 mg/ml were prepared. Each formulation was divided into 2 groups with and without flushing with nitrogen gas, prior to ampoule sealing. The prepared solution was filtered through 0.22 μ m membrane filter under laminar airflow hood using aseptic technique and filled into 1 ml amber glass ampoules. The samples were kept at 25°C/50%RH condition. Physical and chemical stability and sterility of the samples were tested periodically for 12 months. It was found that the most stable preparation was the formulation containing morphine and water for injection. Ninety eight percent of morphine was found during the storage period. However, color change in all samples was observed since 6 months of storage. Degraded product was observed in most of the samples since 6 months after storage according to the peak found in the HPLC chromatograms. Interestingly, all preparations with nitrogen flushing into the ampoules prior to sealing were more stable than those without flushing. All samples were still sterile as compared to the control samples during the study period.

Keywords: Morphine, injection, preservatives

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อพัฒนาการตั้งตำรับยาฉีดมอร์ฟินที่ไม่มีสารอนอม โดยใช้ฉีดเข้าไขสันหลัง เพื่อระงับปวดสำหรับผู้ป่วย กรณีที่ไม่สามารถใช้ยาฉีดที่มีสารอนอมได้ เริ่มต้นได้มีการทดสอบ เพื่อหาสารช่วยที่สามารถใช้ในตำรับจากการทดสอบและประเมินความคงตัวในระยะสั้นจำนวน 14 ตำรับ พบว่า ตำรับที่มีตัวยาสำคัญ น้ำ โซเดียมคลอไรด์ และปรับ pH ของตำรับให้ได้ประมาณ 4 มีความเป็นไปได้ที่จะนำมาเตรียมตำรับยาและศึกษาความคงตัวในระยะยาว จากนั้นจึงได้ตั้งตำรับยาฉีดมอร์ฟินซัลเฟตจากปัจจัยดังกล่าวที่ความเข้มข้น 10 mg/ml ทั้งหมด 4 สูตรตำรับ โดยที่แต่ละสูตรตำรับ แบ่งเป็น 2 ตำรับที่ใส่ก๊าซไนโตรเจนและไม่ใส่ก๊าซไนโตรเจนในขั้นตอนก่อนปิดผนึกในแอมพูล สารละลายยาฉีดถูกบรรจุในแอมพูลสีชาขนาด 1 ml ซึ่งกรองปราศจากเชื้อด้วย membrane filter ขนาด 0.22 μm ภายใต้ laminar airflow hood ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เก็บตัวอย่างไว้ที่ 25 °C ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 50 ทำการทดสอบความคงตัวทางกายภาพ เคมีและความปราศจากเชื้อเป็นช่วงๆ เป็นระยะเวลา 12 เดือน พบว่าตำรับที่คงตัวดีที่สุดคือตำรับที่มีเฉพาะมอร์ฟินและน้ำสำหรับเตรียมยาฉีด (Water for Injection) เป็นตัวทำละลาย โดยพบว่ามอร์ฟินมีความคงตัวร้อยละ 98 ตลอดระยะเวลาที่ศึกษา อย่างไรก็ตามเมื่อเก็บไว้ 6 เดือน พบว่าทุกตำรับมีการเปลี่ยนแปลงของสี และเกือบทุกตำรับมีการตรวจพบสารเสื่อมโดยเห็นได้จาก peak ของสารใน chromatogram ผลการทดลองที่น่าสนใจคือ ทุกตำรับที่เติมก๊าซไนโตรเจนลงในแอมพูลก่อนปิดผนึก มีความคงตัวดีกว่าตำรับที่ไม่ได้เติมก๊าซไนโตรเจน นอกจากนี้ยังพบว่า ตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมดมีความปราศจากเชื้อตลอดระยะเวลาที่ศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

คำสำคัญ: มอร์ฟิน ยาฉีด สารกันเสีย

บทนำ

มอร์ฟินเป็นยาที่ถูกเลือกใช้ (Drug of choice) จากองค์การอนามัยโลกสำหรับรักษาผู้ป่วยโรคเมเร็งที่มีความเจ็บปวดระดับปานกลางจนถึงรุนแรง เมื่อใช้ยาอื่นไม่ได้ผล (WHO, 1986) มอร์ฟินที่ให้ในรูปแบบยาฉีดนั้น ปัจจุบันมีใช้ที่ความแรง 10 mg/ml ขนาดบรรจุ 1 ml ซึ่งให้ได้หลายทาง เช่น การฉีดเข้าเส้น (intravenous injection) หรือฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular injection) อย่างไรก็ตามมอร์ฟินมีปัญหาความคงตัวเมื่ออยู่ในสารละลายคือสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้สารเสื่อม 2 ชนิดที่สำคัญคือ pseudomorphine และ morphine N-oxide นอกจากนี้ pH ของสารละลายก็มีผลต่อความคงตัวของยา โดยมอร์ฟินคงตัวดีที่ pH ประมาณ 4 หรือต่ำกว่า (Connors et al., 1986; Plotkowiak et al., 2004) อย่างไรก็ตามผู้ป่วยอาจมีอาการแพ้จากสารช่วยที่อยู่ในตำรับยาฉีด ที่อาจทำให้เกิดอันตรายแก่ผู้ป่วยได้หากแพทย์ต้องการฉีดมอร์ฟินเข้าไขสันหลัง สำหรับตำรับยาฉีดมอร์ฟินซัลเฟตที่ไม่ได้ใส่ออนอม เป็นที่ยอมรับว่ามีความปลอดภัยสำหรับการให้ยาแบบ intrathecal/

epidural injection (McQuay, 1990; Grouls et al., 1999; Gaudette and Weaver, 2003)

pH ของสารละลายเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความคงตัวของยา ซึ่งพบว่ามอร์ฟินมีความคงตัวดีในช่วง pH 3-5 หาก pH สูงเกินไปอาจมีปัญหาความคงตัว โดยเฉพาะเมื่อเก็บไว้นานๆ หรือในสภาวะเร่ง (Gleditsch and Waaler, 2001) ดังนั้นการตั้งตำรับที่ไม่มีสารอนอม แต่ควบคุม pH ของสารละลายให้อยู่ใน pH ที่มอร์ฟินมีความคงตัวจึงเป็นสิ่งจำเป็น (Connors et al., 1986; Gleditsch and Waaler, 2001; Preechagoon et al., 2005) โดยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ ที่เหมาะสมและเข้ากับร่างกายได้เช่น phosphate และ sodium chloride เพื่อปรับ tonicity ให้เหมาะสมกับการใช้ฉีดเข้าไขสันหลัง (Portenoy, 1993)

งานวิจัยของต่างประเทศที่มีการศึกษาการตั้งตำรับมอร์ฟินที่ไม่มีสารอนอมหรือสารอื่นที่อาจเป็นอันตราย โดยใช้ phosphate หรือ citrate buffers พบว่ามอร์ฟินมีความคงตัวดี ตำรับที่มีจำหน่ายแล้ว

ในต่างประเทศ เช่น Duramorph® (morphine sulphate injection USP มี pH ประมาณ 2.5-6.5) และ Infumorph® (Morphine sulphate sterile solution pH ประมาณ 2.5-6.5) โดยที่ Duramorph® มี sodium chloride และ water for injection ในตำรับเท่านั้น งานวิจัยนี้มีความแตกต่างจากงานวิจัยอื่นคือ มีการศึกษาการตั้งตำรับยาที่ pH 3-5 ซึ่งพบว่ามอร์ฟีนมีความคงตัวดี และใช้สารบัฟเฟอร์ที่เข้าได้กับร่างกายได้ การพัฒนาตำรับยานี้จึงต้องการตั้งตำรับยาที่มีความคงตัวและสามารถนำไปใช้ได้จริงหากนำไปผลิตในชั้นอุตสาหกรรม เพื่อเป็นทางเลือกให้ผู้ป่วยได้รับยาที่มีคุณภาพ ราคาถูกและลดความเสี่ยงของการแพ้ และเป็นการพึ่งพาตนเอง ลดการนำเข้าจากต่างประเทศ

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของตำรับยานีติมอร์ฟีนที่ปราศจากสารกันเสีย
2. พัฒนาตำรับยานีติมอร์ฟีนที่ปราศจากสารกันเสีย
3. ศึกษาความคงตัวทางกายภาพ เคมีและความปราศจากเชื้อของตำรับยาเป็นเวลา 1 ปี

วัสดุอุปกรณ์สารเคมี

Morphine sulphate (B.P/U.S.P) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Glaxo Wellcome, Australia, dibasic ammonium phosphate (HPLC grade), methanol (AR grade), monobasic potassium phosphate (HPLC grade) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท BDH, hydrochloric acid (AR grade), tryptic soy agar, soybean-casein digest media และ fluid thioglycolate media เป็นผลิตภัณฑ์ Himedia จากบริษัท Bank Trading, Co. Ltd. และ ก๊าซไนโตรเจนเป็นผลิตภัณฑ์จากบริษัทขอนแก่นออกซิเจน

เครื่องมือและอุปกรณ์

HPLC system ประกอบไปด้วย Pump [Perkin-Elmer series 200 LC S/N 291 N7031101, USA], UV-detector [Perkin-Elmer 785 A, US/VIS S/N 007N7030306], Integrator [Perkin-Elmer S/N 541 N 732905], Column [4.6x250 mm C₁₈ reversed-phase column (Zorbax, 5-μm, Agilent technology)] เครื่องมืออื่นที่สำคัญได้แก่ pH meter [Corning ION, analyzer 250, SN 5081234] Autoclave [Auto steam sterilizer, model H-88L4D, OMRON corporation, Japan] Incubator [WTC binder Type B 400, Germany], Laminar air flow [ISSCO Laminar flow model BV-123], และ Amber glass ampoules ขนาด 1 ml (ได้รับการสนับสนุนจากบริษัท ANB laboratory)

วิธีการทดลอง การศึกษาก่อนการตั้งตำรับยา

ก่อนที่จะมีตำรับยาเพื่อศึกษาความคงตัวในระยะยาว ได้มีการทดสอบเบื้องต้นเพื่อค้นหาสารที่เหมาะสมที่จะใช้ในตำรับ ซึ่งควรเข้ากับร่างกายได้ และมีผลต่อความคงตัว ดังนั้นตำรับยาจึงประกอบไปด้วยมอร์ฟีนความแรง 10 mg/ml และน้ำเป็นหลัก สารเติมแต่งที่ใช้คือไฮเดียมคลอไรด์เพื่อปรับ tonicity ของตำรับให้เหมาะสม และสารบัฟเฟอร์เพื่อควบคุม pH ของสารละลายเท่านั้น การเตรียมตำรับได้เตรียมที่ห้องควบคุมความสะอาด (clean room) ทดสอบความคงตัวเบื้องต้นในระยะสั้น โดยการเก็บยาเตรียม 14 ตำรับบรรจุในแอมพูลสีชาขนาด 1 ml เก็บไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น เช่น การตกตะกอน pH สีของตำรับยาที่เปลี่ยนแปลงไป และตรวจวัดปริมาณตัวยาสัญคัญที่เหลือ

การเตรียมตำรับยาเพื่อศึกษาความคงตัวระยะยาว การเตรียมอุปกรณ์และการเตรียมตำรับยา

ในการเตรียมตำรับยาดังกล่าว เป็นการเตรียมยาปราศจากเชื้อ ดังนั้นอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมยาต้องผ่านการทำความสะอาดและทำการฆ่าเชื้อด้วย hot air oven หรือ autoclave แล้วแต่

ชนิดของอุปกรณ์ที่ใช้ และเตรียมในห้องควบคุมความสะอาด โดยเฉพาะในขั้นตอนการกรอง การบรรจุ และการปิดผนึกต้องเตรียมใน laminar airflow (Class 100) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

เตรียมตำรับโดยละลายผงยามอร์ฟีนด้วย water for injection ในบีกเกอร์ปริมาตรประมาณ 2 ใน 3 ของปริมาตรที่ต้องใช้ คนให้ละลายด้วยแท่งแก้วคน จากนั้นเติมสารที่มีน้ำตาลให้ครบในแต่ละตำรับ (ตารางที่ 1) และปรับ pH (ถ้ามี) นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วย membrane filter ขนาดรูเปิด $0.22\ \mu\text{m}$ เพื่อให้ตำรับปราศจากเชื้อ ทำการเติมก๊าซไนโตรเจนก่อนปิดผนึก (ถ้ามี) จากนั้นบรรจุใน amber glass

ampoule ขนาด 1 ml ก่อนปิดสนิทโดยใช้ pull sealing technique จากนั้นนำ ampoule ที่เตรียมได้ไปทดสอบการรั่ว ภายใต้สภาวะสุญญากาศ โดยการจุ่มแอมพูลลงใน beaker ที่บรรจุสารละลาย 1% methylene blue solution จากนั้นใส่ลงใน vacuum chamber ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อทดสอบการรั่ว ล้างแอมพูลให้สะอาด แอมพูลที่มีสีน้ำเงินให้ทิ้งไป จากนั้นตรวจอนุภาคด้วยฉากขาวดำทุกตัวอย่าง ตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบ นำไปศึกษาความคงตัวต่อไป แต่ละตำรับเตรียมประมาณ 300 แอมพูล ตำรับที่ 1-4 และตำรับที่ 5-8 เตรียมต่างกัน 1 สัปดาห์

ตารางที่ 1 ตำรับยาเตรียม morphine sulphate injection (10 mg/ml)

ตำรับ	Morphine sulphate (g)	Sodium chloride (g)	Na ₂ HPO ₄ (g)	Hydrochloric acid (0.1 N)	Water for injection (ml)	Nitrogen gas
1	5.0	-	-	-	to 500	No
2	5.0	-	-	-	to 500	Yes
3	5.0	3.8	-	-	to 500	No
4	5.0	3.8	-	--	to 500	Yes
5	5.0	1.65	5	-	to 500	No
6	5.0	1.65	5	-	to 500	Yes
7	5.0	3.8	-	ปรับ pH 4	to 500	No
8	5.0	3.8	-	ปรับ pH 4	to 500	Yes

การศึกษาความคงตัว การศึกษาความคงตัวทางเคมี

ได้นำ ระบบ HPLC มาใช้เพื่อหาปริมาณยาคงเหลือในตำรับ โดยมีระบบดังที่ได้กล่าวในหัวข้อเครื่องมือและอุปกรณ์ สำหรับ Mobile phase ที่ใช้คือ methanol : น้ำ : acetic acid = 22.5 : 77.5 : 1 (v/v) ปรับ pH ให้ได้ 4.0 ด้วย 0.1 N NaOH กรองด้วย membrane filter ขนาด $0.45\ \mu\text{m}$ แล้วเทลงในขวดแก้วที่ใช้บรรจุ mobile phase นำไปไล่อากาศด้วยเครื่อง sonicator ประมาณ 10 นาที ก่อนใช้ โดยมี Injection volume คือ $20\ \mu\text{l}$ ความเร็วในการขับ mobile phase คือ 1 ml/min ความยาวคลื่น

ของ UV detector ที่ใช้คือ 240 nm การเตรียมสารมาตรฐานและกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานมอร์ฟีนซัลเฟต ความเข้มข้น 50, 100, 200, 250 $\mu\text{g/ml}$ จาก morphine sulphate stock solution (1 mg/ml) โดยใช้ mobile phase เป็นตัวทำละลาย โดยการปิเปตสารละลาย stock solution จำนวน 1, 2, 4 และ 5 ml แล้วเจือจางด้วย mobile phase ใน volumetric flask ขนาด 20 ml กราฟมาตรฐานได้จากการพล็อตกราฟระหว่าง peak area กับความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$) ของมอร์ฟีน จากนั้นคำนวณหาสมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและ peak area คำนวณค่า r^2 ซึ่งมีค่า 0.999 และ

สมการถดถอยเส้นตรง (linear regression equation) เพื่อคำนวณปริมาณของยา ซึ่งได้ค่าสมการ $Y=8437.4X$, โดยที่ Y คือพื้นที่ใต้กราฟและ X คือ ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)

การศึกษาความคงตัวทางกายภาพ

การศึกษาความคงตัวทางกายภาพ ได้แก่การวัดค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงของตำรับที่เตรียมขึ้นตลอดระยะเวลาที่ศึกษา รวมทั้งลักษณะทางกายภาพว่าเปลี่ยนแปลงไปอย่างไร เช่น สังเกตลักษณะของสี และการตกตะกอน เป็นต้น

การทดสอบความปราศจากเชื้อ

การทดสอบนี้เพื่อทราบความปราศจากเชื้อของตำรับยา โดยอาศัย sterility test ตามมาตรฐาน USP 24 ด้วยวิธี direct inoculation ใน laminar airflow hood โดยใช้ soybean casein broth และ fluid thioglycollate broth เป็นสารอาหารเลี้ยงเชื้อ นำตัวอย่างที่เตรียมได้ ($n=2$) ไป incubate ที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C ตามลำดับ เป็นเวลา 7-14 วัน โดยเปรียบเทียบกับ negative และ positive control เชื้อที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Clostridium perfringens* สังเกตความขุ่นของตัวอย่าง และเปรียบเทียบกับ positive, negative และ main control โดย positive control เป็นอาหารควบคุมที่ไม่ได้ใส่ตัวอย่างแต่เพาะเชื้อดังกล่าวข้างต้นลงไป ทั้งนี้เพื่อให้มั่นใจว่าอาหารสนับสนุนการเติบโตของเชื้อ negative control คือการนำอาหารเลี้ยงเชื้อไป incubate เพื่อทดสอบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากเชื้อหรือไม่ ส่วน main control คือการใส่เชื้อและตัวอย่างลงไปในการอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำไป incubate เพื่อทดสอบว่าตัวอย่างมีสารที่จะไปยับยั้งการเติบโตของเชื้อหรือไม่

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

การพัฒนาการตั้งตำรับยา

ได้ทดลองใช้ Na_2HPO_4 และ HCl เพื่อใช้ในการปรับ pH ของสารละลาย และใช้บัฟเฟอร์ที่เข้ากันได้กับร่างกายเพื่อควบคุม pH ของสารละลายได้แก่

NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 และ sodium acetate (Gaudette and Weaver, 2003) รวมทั้งการทดลองใช้ sodium chloride เพื่อการปรับ tonicity ของสารละลาย จากการพัฒนาสูตรตำรับทั้งสิ้น 14 สูตร พบว่า pH ของตำรับมีความแตกต่างกัน แต่อยู่ในช่วง 3-7 ปริมาณยาเริ่มต้นอยู่ที่ 98-101% ตำรับที่มี Na_2HPO_4 , sodium chloride และปรับ pH ด้วย HCl หรือตำรับที่มีเฉพาะยากับน้ำ ยังคงตัวดีทั้งทางกายภาพและเคมีในช่วงเวลาที่ทดสอบและยังมีปริมาณของยาคงเดิม ส่วนตำรับที่ใช้ NaH_2PO_4 หรือ NaH_2PO_4 ร่วมกับ Na_2HPO_4 หรือ Sodium acetate หรือ H_2PO_4 เกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองอ่อนๆ หรือมีการตกตะกอนในช่วงเวลาที่ทดสอบ

การตั้งตำรับยา ความคงตัวทางกายภาพ

จากการตั้งตำรับยาได้ใช้เทคนิคการปิดผนึกด้วยวิธี pull sealing ซึ่งสามารถปิดผนึกได้ค่อนข้างสมบูรณ์ โดยเมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี vacuum test พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ของการรั่วต่ำกว่า 5% และตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบก็ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ ซึ่งสัมพันธ์กับการตรวจไม่พบเชื้อในตัวอย่างตลอดระยะเวลาที่ศึกษา

ผลการทดสอบความคงตัวของตำรับยาเป็นเวลาประมาณ 12 เดือน พบว่าตำรับยาทั้ง 8 ตำรับที่ศึกษานั้นไม่มีการตกตะกอนเกิดขึ้นในทุกตำรับตลอดระยะเวลาที่ศึกษา (ตารางที่ 2 และ 3) ตำรับที่ 1 และ 2 ซึ่งมีเฉพาะมอร์ฟีนและน้ำเป็นส่วนประกอบ มีความคงตัวดีทางกายภาพดีที่สุด แต่มีการเปลี่ยนแปลงของสีของตำรับจากใสไม่มีสีเป็นสีเหลืองอ่อนๆ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 26 สำหรับปริมาณยาคงเหลือพบว่ามากกว่า 96 และ 98% ตามลำดับ ตำรับที่ 3 และ 4 พบว่าแม้ไม่มีการตกตะกอน แต่มีการเปลี่ยนแปลงของสีตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 และเป็นสีเหลืองเข้มจนเป็นน้ำตาลอ่อนตั้งแต่สัปดาห์ที่ 26 การเปลี่ยนแปลงเป็นสีเหลืองที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับผลการศึกษาความคงตัวทางเคมี ซึ่งพบว่ามี peak ของสารเสื่อมเกิดขึ้นเมื่อตรวจพบสีในสารละลาย สารเสื่อมมี retention time ก่อน morphine คาดว่าเป็น oxidized product แม้ว่ามีในปริมาณน้อย แต่ก็ทำให้บอกได้ว่าตำรับยาเหล่านี้มีการเสื่อมเกิดขึ้น (รูปที่ 1) ตำรับที่ 5

และ 6 มีผลการศึกษาคล้ายๆ กับตำรับที่ 1 และ 2 ซึ่งมีสีเปลี่ยนไปในสัปดาห์ที่ 22 ส่วนตำรับที่ 7 และ 8 สารละลายเปลี่ยนสีตั้งแต่สัปดาห์ที่ 13 โดยตำรับที่ 8 ที่ใส่ก๊าซไนโตรเจนจะมีสีเหลืองช้ากว่าตำรับที่ไม่มีก๊าซไนโตรเจน นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อตัวอย่างที่มีการเปลี่ยนสีจากสีเหลืองอ่อนๆ เป็นสีเหลืองเข้ม พบ peak ของสารสีอมที่สูงขึ้นด้วย กล่าวโดยรวมสรุปได้ว่าตำรับที่ 1, 2, 5 และ 6 มีการเปลี่ยนแปลงของสีของสารละลายยาน้อยกว่าตำรับอื่นๆ

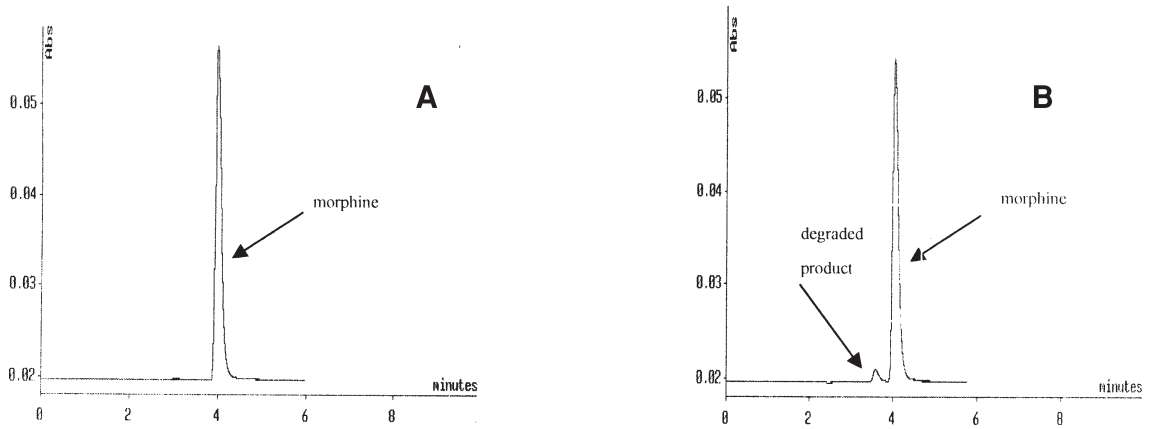
สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ pH พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงน้อยในทุกตำรับ (รูปที่ 2 และ 3) โดยตำรับที่ 1 และ 2 มี pH อยู่ในช่วง 5.2-5.6 และมีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาที่ศึกษา ส่วนตำรับที่ 3 และ 4 พบว่า pH ของสารละลายลดลง คือจาก 5.3 เป็น 4.3 (ตำรับที่ 3) และจาก 5.2 เป็น 4.4 (ตำรับที่ 4) สำหรับตำรับที่ 5 และ 6 pH ค่อนข้างคงที่เช่นเดียวกับตำรับที่ 1 และ 2 ซึ่งสอดคล้องกันกับผลของการเปลี่ยนแปลงของสี

ตารางที่ 2 ลักษณะทางกายภาพของตำรับยาที่ 1-4 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ปี

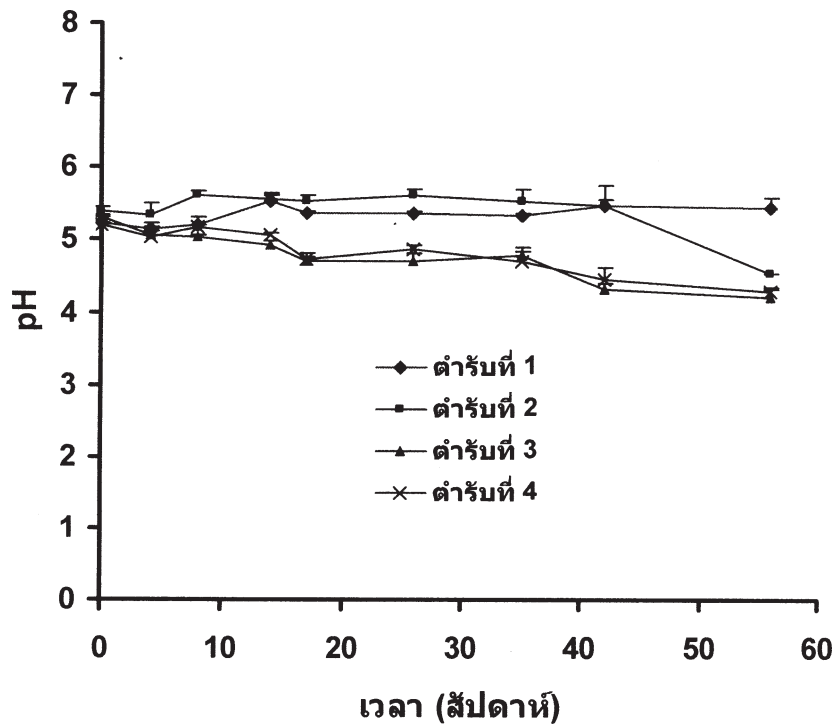
ตำรับที่	ลักษณะทางกายภาพ (สัปดาห์ที่)								
	0	4	8	14	17	26	35	42	56
1	ใส ไม่มีสี	ใส ไม่มีสี	ใส ไม่มีสี	ใส ไม่มีสี	ใส ไม่มีสี	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ
2	ใส ไม่มีสี	ใส ไม่มีสี	ใส ไม่มีสี	ใส ไม่มีสี	ใส ไม่มีสี	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ
3	ใส ไม่มีสี	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ	ใส มีสี เหลือง	ใส มีสี เหลือง เข้ม	ใส มีสี เหลือง เข้ม	ใส มีสี เหลือง เข้ม	ใส มีสี เหลือง เข้ม	ใส มีสี เหลือง เข้ม
4	ใส ไม่มีสี	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ	ใส มีสี เหลือง	ใส มีสี เหลือง เข้ม	ใส มีสี เหลือง เข้ม	ใส มีสี เหลือง เข้ม	ใส มีสี เหลือง เข้ม	ใส มีสี เหลือง เข้ม

ตารางที่ 3 ลักษณะทางกายภาพของตำรับยาที่ 5-8 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ปี

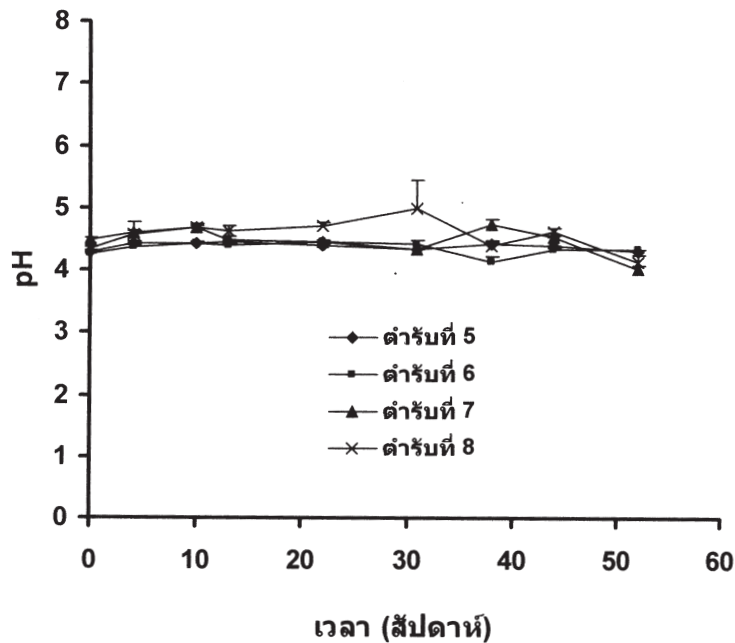
ตำรับที่	ลักษณะทางกายภาพ (สัปดาห์ที่)								
	0	4	10	13	22	31	37	44	58
5	ใส ไม่มีสี	ใส ไม่มีสี	ใส ไม่มีสี	ใส ไม่มีสี	ใส เหลือง อ่อนๆ	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ
6	ใส ไม่มีสี	ใส ไม่มีสี	ใส ไม่มีสี	ใส ไม่มีสี	ใส เหลือง อ่อนๆ	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ
7	ใส ไม่มีสี	ใส มีสี ไม่มีสี	ใส มีสี เหลือง	ใส มีสี เหลือง	ใส มีสี เหลือง เข้ม	ใส มีสี เหลือง เข้ม	ใส มีสี เหลือง เข้ม	ใส มีสี เหลือง เข้ม	ใส มีสี เหลือง เข้ม
8	ใส ไม่มีสี	ใส ไม่มีสี	ใส ไม่มีสี	ใส ไม่มีสี	ใส มีสี เหลือง อ่อนๆ	ใส มีสี เหลือง เข้ม	ใส มีสี เหลือง เข้ม	ใส มีสี เหลือง เข้ม	ใส มีสี เหลือง เข้ม



รูปที่ 1 โครมาโตแกรมของ a: สารมาตรฐาน morphine ที่ความเข้มข้น 200 ug/ml;
b: ตัวอย่างตำรับยาสูตรที่ 3 เมื่อเก็บไว้ 56 สัปดาห์



รูปที่ 2 pH ของตำรับมอร์ฟีนเมื่อเก็บไว้ 1 ปี (ตำรับที่ 1-4, mean±S.D., n=3)



รูปที่ 3 pH ของตำรับมอร์ฟีนเมื่อเก็บไว้ 1 ปี (ตำรับที่ 5-8, mean±S.D., n=3)

ความคงตัวทางเคมี

เมื่อทำการทดสอบปริมาณตัวยาสำคัญคงเหลือ แล้วพบว่าตลอดระยะเวลาการศึกษาทุกตำรับมีปริมาณตัวยาสำคัญคงเหลือมากกว่าร้อยละ 90 โดยตำรับที่ 2 มีปริมาณตัวยาสำคัญคงเหลืออยู่มากที่สุดถึงร้อยละ 98 และไม่พบว่ามี peak อื่นใดยกเว้น peak ของยา ขณะที่ตำรับที่ 1 มีปริมาณยาคงเหลือประมาณร้อยละ 96 ตำรับที่ 3 และ 4 มีปริมาณตัวยาคงเหลือต่ำสุดที่ประมาณร้อยละ 92 ทั้ง 2 ตำรับ ขณะที่ตำรับที่ 5-8 มีปริมาณตัวยาสำคัญคงเหลือมากกว่าร้อยละ 96 (รูปที่ 4 และ 5) แม้ว่าทุกตำรับจะมีปริมาณตัวยาสำคัญมากกว่าร้อยละ 90 ในช่วงระยะเวลาที่เก็บรักษา แต่พบว่าสีของตำรับมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีเหลือง

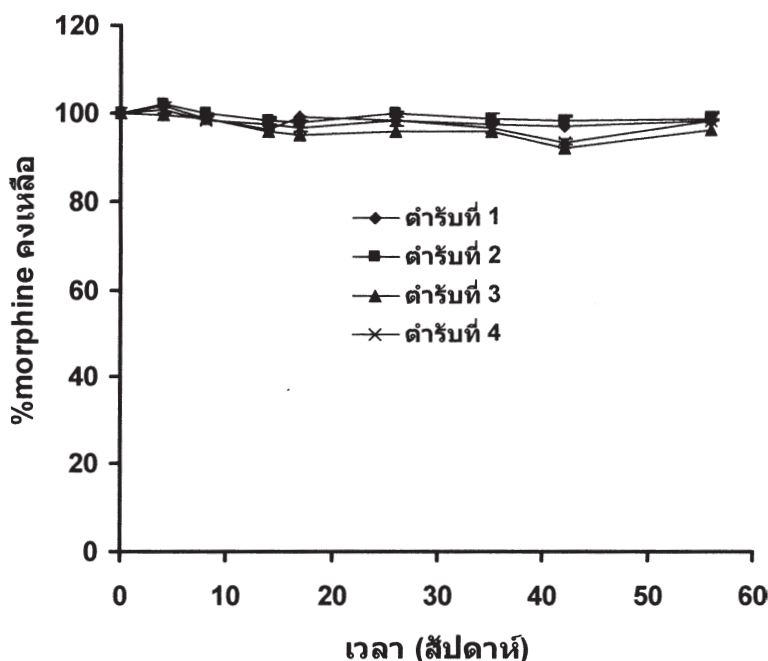
เป็นที่น่าสนใจว่าตำรับที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายอย่างเดียว (ตำรับที่ 1 และ 2) มีความคงตัวดีกว่าตำรับอื่นๆ เล็กน้อย (ตำรับที่ 5-8) เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลาทดสอบที่ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้จะมีปัญหาความคงตัวมากกว่า เนื่องจาก pH ของสารละลายยามีค่าประมาณ 5.3-5.5 ขณะที่ตำรับที่ 5-8 มี pH ที่

เป็นกรดมากกว่า (ประมาณ 4.2-4.4) ซึ่งจาก pH-rate profile ของมอร์ฟีนพบว่ายาที่มีความคงตัวดีที่ pH ต่ำกว่า 4 และคงตัวดีในกรดมากกว่าเป็นกลางและด่าง (Connors et al., 1986) และจากผลการศึกษาความคงตัวของมอร์ฟีนในตำรับยาน้ำเพื่อรับประทาน ก็พบว่าตำรับที่มี pH 4 มีความคงตัวดีกว่าตำรับที่มี pH 6 (Preechagoon et al., 2005) แต่ในการศึกษานี้พบว่าการใช้บัฟเฟอร์ควบคุม pH และการใช้ HCl เพื่อปรับ pH ของสารละลายยาให้ได้ 4 กลับมีความคงตัวน้อยกว่าการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายอย่างเดียวยิ่งในตำรับ การเสื่อมของมอร์ฟีนที่มากกว่าดังกล่าว อาจเกิดจากการที่มอร์ฟีนมีปฏิกิริยากับสารนี้ในสารละลาย กรณีนี้ต้องทำการศึกษาเชิงลึกต่อไป ซึ่งผลการทดลองนี้อาจแตกต่างจากผลการศึกษาในตำรับยาน้ำเพื่อรับประทานที่มีสารช่วยและตัวทำละลายร่วมอื่นอีกหลายชนิดในตำรับ และ pH ไม่ใช่ปัจจัยเดียวที่ส่งผลต่อความคงตัวของมอร์ฟีน อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ได้มีการศึกษามาแล้ว (Grom and Bander, 1995) ซึ่งพบว่าตำรับมอร์ฟีน

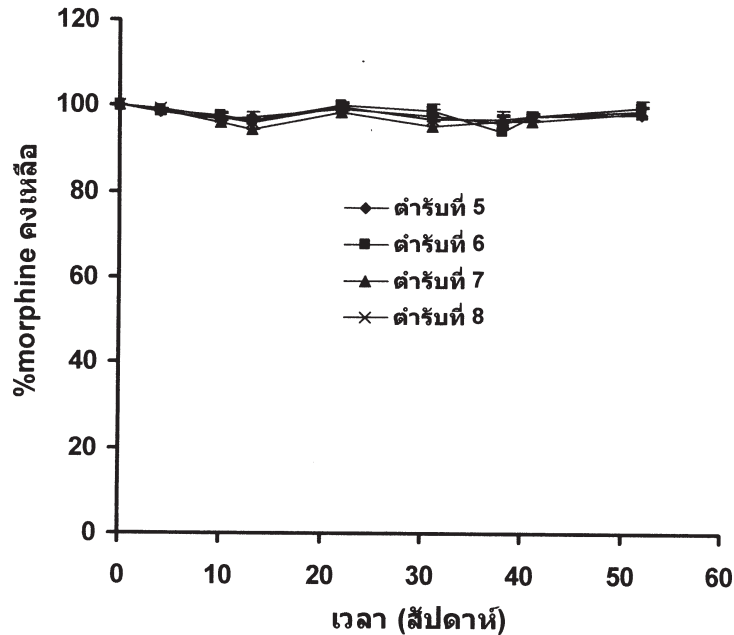
(ความเข้มข้นสูงที่ 50 mg/ml) ที่เตรียมขึ้นที่มีน้ำสำหรับเตรียมยาฉีดเป็นตัวทำละลายมีอายุสูงสุดที่เวลา 6 เดือน เท่ากันกับตำรับที่ศึกษาในครั้งนี้

ส่วนตำรับที่มี sodium chloride (ตำรับ 3 และ 4) ที่ใช้เพื่อปรับ tonicity ของสารละลาย กลับพบว่ามีความคงตัวน้อยกว่าตำรับอื่นๆ ทั้งๆ ที่ pH มีค่าที่ใกล้เคียงกันเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ อย่างไรก็ตามก็เห็นได้อย่างชัดเจนว่าตำรับที่มี sodium chloride มี pH ที่ลดลงมากกว่าตำรับอื่นๆ เมื่อเก็บไว้นานๆ เช่นเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับที่ 1 และ 2 (ที่ไม่มี sodium chloride) โดย pH จากเริ่มต้นที่ 5.3 ลดลงเป็น 4.3 ที่เวลา 56 สัปดาห์ (รูปที่ 3 และ 4) ทั้งที่จาก pH-rate profile พบว่ามอร์ฟีนมีความคงตัวดีขึ้นเรื่อยๆ เมื่อ pH เป็นกรดเพิ่มขึ้น ซึ่งกรณีนี้เป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปว่า sodium chloride และปริมาณที่ใช้ในตำรับ มีผลต่อความคงตัวของมอร์ฟีนเพียงใด อย่างไรก็ตาม ตำรับมีเฉพาะมอร์ฟีนและน้ำที่ไม่ได้ปรับ pH หรือ tonicity ก็ไม่เป็นปัญหาที่จะนำไปใช้ฉีดเข้าไขสันหลัง เนื่องจากปริมาณที่ฉีดน้อยมาก (Intraspinial injection : 1-10 mg (bolus dose) และ intrathecal (subarachnoid) : 0.1-1.5 mg (Anderson et al., 2002)

การเติมหรือไม่เติมก๊าซไนโตรเจนลงไปในตำรับที่มีสูตรเดียวกัน ทำให้มอร์ฟีนมีความคงตัวที่ความแตกต่างกัน เช่นระหว่างตำรับที่ 1 และ 2 โดยตำรับที่ 1 ที่ไม่ได้มีการเติมก๊าซไนโตรเจน พบว่ายาที่มีความคงตัวน้อยกว่าตำรับที่ 2 ที่ได้มีการเติมก๊าซไนโตรเจนลงไป กล่าวคือมีอายุคงเหลือร้อยละ 96 และ 98 ตามลำดับที่เวลา 42 สัปดาห์ และผลการใส่ก๊าซไนโตรเจนนี้ ก็เป็นไปในแนวทางเดียวกันในทุกตำรับที่ศึกษา แสดงให้เห็นว่า ก๊าซไนโตรเจนที่เติมลงไปใลอภาคนั้น ทำให้ปริมาณก๊าซออกซิเจนในตำรับและบริเวณ head space ของแอมพูลลดลง ส่งผลให้การเสื่อมของมอร์ฟีนจากปฏิกิริยาออกซิเดชันลดลงไปด้วย (Connors et al., 1986) นอกจากนี้ยังสังเกตได้จากการที่ตำรับที่ใส่ก๊าซไนโตรเจน มีการเปลี่ยนแปลงของสีของตำรับเป็นสีเหลืองอ่อนช้ำกว่าตำรับที่ไม่ได้ใส่ ผลการทดลองนี้เป็นประโยชน์มาก ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับการตั้งตำรับยาที่มีปัญหาการเสื่อมด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน



รูปที่ 4 เปอร์เซนต์มอร์ฟีนคงเหลือเมื่อเก็บไว้ 1 ปี (ตำรับที่ 1-4, mean±S.D., n=4)



รูปที่ 5 เปอร์เซนต์มอร์ฟีนคงเหลือเมื่อเก็บไว้ 1 ปี (ตำรับที่ 5-8, mean±S.D., n=4)

การทดสอบความปราศจากเชื้อ

จากการทดสอบทุกตำรับเป็นเวลา 12 เดือน พบว่าทุกตำรับมีความคงตัวตั้งแต่เริ่มต้น โดยเมื่อทำการทดสอบความปราศจากเชื้อ ไม่พบว่ามีตำรับใดหรือตัวอย่างใดมีเชื้อขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบกับสารอาหารควบคุมทั้ง 3 ประเภท ไม่พบว่ามีเชื้อขึ้นที่ negative control พบว่าเชื้อเติบโตได้ใน positive control ส่วน main control พบว่ามีเชื้อขึ้นได้ ผลการทดลองที่ได้จากสารอาหารที่เตรียมในตัวอย่างควบคุมดังกล่าว ทำให้มั่นใจว่าผลการศึกษาในตัวอย่างทุกตำรับมีความถูกต้อง และเชื่อถือได้ว่าการที่ไม่มีเชื้อขึ้นในตัวอย่างนั้น เนื่องจากไม่มีเชื้อในตัวอย่างจริง ไม่ใช่เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เหมาะสมหรือตัวอย่างมีการยับยั้งการเติบโตของเชื้อ

สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองพอสรุบได้ว่า ยาฉีดมอร์ฟีนที่ไม่มีสารอนอม ตำรับที่มีความคงตัวดีที่สุดที่สภาวะการเก็บที่ 25 °C ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 50 คือตำรับที่ใช้น้ำสำหรับเตรียมยาฉีดเป็นตัวทำละลาย ซึ่งสามารถเก็บได้นาน 1 ปี แม้จะพบว่ามีเปลี่ยนแปลงสีเล็กน้อยแต่มอร์ฟีนคงเหลือในตำรับมีมากกว่าร้อยละ 98 และตรวจไม่พบสารเสื่อม การเติมก๊าซไนโตรเจนในแอมพูลสีชาสามารถลดการเสื่อมของยาได้ เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับที่มีสูตรเหมือนกันแต่ไม่เติมก๊าซไนโตรเจน ซึ่งคาดว่าจะลดการเสื่อมจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ผลการศึกษานี้มีคุณค่าเพียงพอที่จะนำไปทดสอบในขั้นการเตรียมตำรับที่มีปริมาณมากได้ ข้อเสนอแนะคือ การทดสอบเพื่อหาชนิดและปริมาณสารเสื่อมที่เกิดขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณอุดหนุนจาก
ทุนอุดหนุนทั่วไปมหาวิทยาลัยขอนแก่น
ประจำปีงบประมาณ 2548 ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่
และอุปกรณ์ในการดำเนินงานวิจัย ขอขอบคุณ
ภก. เกษม กาญจนวงศ์ บริษัท ANB laboratory

ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์แอมพูลที่ใช้ในงานวิจัย
และขอขอบคุณนักศึกษาเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย
ขอนแก่นที่มีส่วนช่วยในงานวิจัย ได้แก่ นศ.ภ.ฐิติพร
อินสร นศ.ภ.บัณฑิต ชระวีระคุปต์ และนศ.ภ.จารี
ลิมพันธ์

เอกสารอ้างอิง

- Anderson PO, Knoben JE, Troutman WG. 2002. Handbook of clinical drug data. 10th ed., McGraw-Hill Medical Publishing Division.
- Connors KA, Amidon GL, Stella VJ. 1986. Chemical stability of pharmaceuticals, 2nd ed., Wiley-Interscience, New York. pp. 374.
- Gaudette KE, Weaver SJ. 2003. Intraspinal use of morphine. *Ann. Pharmacother.* 37: 1132-1135.
- Gleditsch E, Waaler PJ. 2001. Accelerated stability studies of morphine injections in plastic ampoules. *Int. J. Pharm.* 212: 257-287.
- Grom JA, Bander LC. 1995. Compounding of preservative-free high-concentration morphine sulfate injection. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 52: 2125-2127.
- Grouls RJE, Korsten EHM, Yaksh TL. 1999. Spinal drug delivery. In TL Yaksh, *General considerations in the formulation of drug for spinal delivery.* Elsevier, Netherlands. pp 371-394.
- McQuay HJ. 1990. The logic of alternative routes. *J. Pain and Symptom Manage.* 5: 75-77.
- Plotkowiak Z, Popielarz-Brzezinska M, Luczak J, et al. 2004. Quality assessment of morphine hydrochloride solutions. *Acta. Pol. Pharm.* 61: 103-106.
- Portenoy RK. Adjuvant analgesics in pain management. 1993. In: Doyle D, Hanks GWC, MacDonald N. *Oxford textbook of palliative medicine.* Oxford: Oxford University Press. pp 187-203.
- Preechagoon D, Sumyai V, Tontisirin K, et al. 2005. Formulation development and stability testing of oral morphine solution utilizing preformulation approach. *J. Pharm. Sci.* 18: 362-369.
- World Health Organization. Cancer pain relief, WHO, Geneva. 1986.