



USP <232>/<233>

ICH Q3D METHOD VALIDATION USING
THE THERMOFISHER SCIENTIFIC ICP-MS



บทนำ



การประกันคุณภาพในผลิตภัณฑ์ยาจำเป็นต้องใช้วิธีการทดสอบที่มีความน่าเชื่อถือ ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องแม่นยำ ซึ่งวิธีการทดสอบดังกล่าวจะต้องดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการทดสอบ (Analytical Method Validation) โดยมีทั้งการทดสอบทางเคมี และทางชีวภาพ เช่น การทดสอบหาปริมาณตัวยาสำคัญ (Assay) การทดสอบการละลาย (Dissolution) การทดสอบสารปนเปื้อน (Impurities) ของสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ เช่น การหาปริมาณตัวทำละลายตกค้าง การหาปริมาณโลหะปนเปื้อน ในผลิตภัณฑ์ยา ดังนั้นการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการทดสอบมีความจำเป็นตั้งแต่ขั้นตอนการพัฒนาสูตรตำรับ ยารวมไปถึงการควบคุมคุณภาพระหว่างการผลิต ตลอดจนผลิตภัณฑ์ที่ผลิตออกสู่ท้องตลาด

สำหรับการควบคุมปริมาณโลหะปนเปื้อน(Elemental impurities)และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการทดสอบในผลิตภัณฑ์ยามีการกำหนดเกณฑ์ตามวิธีมาตรฐาน USP<232> และ USP<233> และตามมาตรฐานของ FDA ซึ่งได้กำหนดการทดสอบโลหะปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ยาเพื่อให้เป็นไปตามแนวทาง ICH Q3D แบ่งออกเป็น การระบุแหล่งความเป็นไปได้ของโลหะปนเปื้อน การหาปริมาณโลหะปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ การประเมินปริมาณโลหะปนเปื้อนหรือความเสี่ยงตามข้อกำหนด PDE ซึ่งกำหนดปริมาณของโลหะหนักที่ร่างกายสามารถรับได้ต่อวันแล้วไม่เกิดอาการไม่พึงประสงค์ (ตารางที่ 1) และการวางแผนควบคุมปริมาณโลหะปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานและปลอดภัยต่อผู้บริโภค





ตารางที่ 1 แสดง Permitted Daily Exposure (PDE) for Elemental Impurities

Element	Class	Oral PDE (ug/day)	Parenteral PDE (ug/day)	Inhalation PDE (ug/day)
Cadmium	1	5	2	2
Lead	1	5	5	5
Arsenic	1	15	15	2
Mercury	1	30	3	1
Cobalt	2A	50	5	3
Vanadium	2A	100	10	1
Nickel	2A	200	20	5
Thallium	2B	8	8	8
Gold	2B	100	100	1
Palladium	2B	100	10	1
Iridium	2B	100	10	1
Osmium	2B	100	10	1
Rhodium	2B	100	10	1
Ruthenium	2B	100	10	1
Selenium	2B	150	80	130
Silver	2B	150	10	7
Platinum	2B	100	10	1
Lithium	3	550	250	25
Antimony	3	1200	90	20
Barium	3	1400	700	300
Molybdenum	3	3000	1500	10
Copper	3	3000	300	30
Tin	3	6000	600	60
Chromium	3	11000	1100	3



USP<232> และ ICH Q3D กล่าวถึงขีดจำกัดปริมาณการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ยา ซึ่งแบ่งโลหะปนเปื้อนที่ต้องทดสอบออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่ม Class 1 คือโลหะที่เป็นพิษสูงต่อมนุษย์ ห้ามพบการปนเปื้อนในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ยา ได้แก่ As, Cd, Hg และ Pb

กลุ่ม Class 2 แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ Class 2A และ Class 2B

- Class 2A คือ โลหะที่มีโอกาสปนเปื้อนได้สูง ซึ่งอาจมาจากกระบวนการผลิต หรืออุปกรณ์ที่ใช้ เช่น Stainless steel ได้แก่ Co, V และ Ni
- Class 2B คือ โลหะที่มีโอกาสปนเปื้อนได้ต่ำในผลิตภัณฑ์ยา โลหะในกลุ่มนี้ไม่ต้องทำการประเมินความเสี่ยง ยกเว้นมีการเติมเข้าไปในระหว่างกระบวนการผลิต ได้แก่ Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag และ Pt

กลุ่ม Class 3 คือ โลหะที่มีความเป็นพิษต่ำ โดยความเป็นพิษขึ้นกับช่องทางที่ร่างกายได้รับ ได้แก่ Li, Sb, Ba, Mo, Cu, Sn และ Cr

กลุ่ม Class 4 คือ โลหะอื่นๆ ที่ไม่ได้กำหนดไว้ในข้อกำหนด PDE ซึ่งมีโอกาสพบการปนเปื้อนแต่มีความเป็นพิษต่ำ ได้แก่ Al, B, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, W และ Zn

USP <233> กล่าวถึงเทคนิคการทดสอบและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี โดยแนะนำให้ใช้เทคนิค Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES) หรือ Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) ในการทดสอบโลหะปนเปื้อน

การทดสอบ

ในงานนี้จะทำการทดสอบการโลหะปนเปื้อนกลุ่มยาเบาหวาน ใน Class 1 และ 2A เนื่องจากทั้งสองกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีความเป็นพิษและพบโอกาสการปนเปื้อนได้สูง ได้แก่ธาตุ Cd, As, Hg, Pb, Co, V และ Ni ด้วยเครื่อง ICP-MS รุ่น iCAP RQ ผลิตภัณฑ์จาก ThermoFisher Scientific

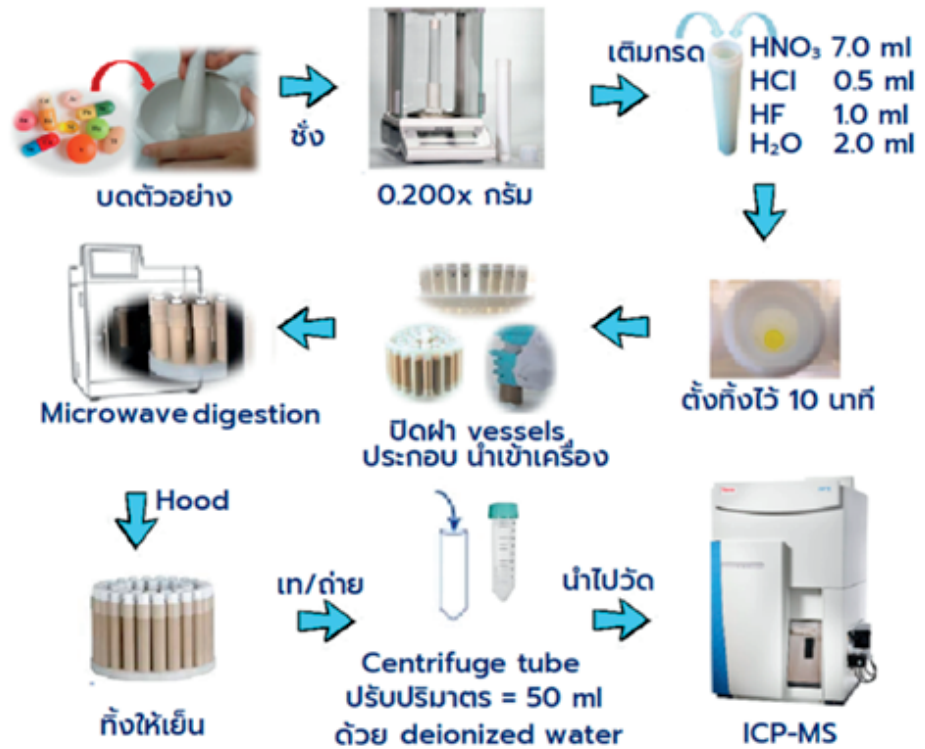
การเตรียมกราฟมาตรฐาน

ทำการเจือจางสารมาตรฐานผสม USP<232>/ICH Q3D) Class 1 Oral และ USP<232>/ICH Q3D Class 2A Oral ด้วยกรด 3 % HNO₃ และ 0.5 % HCl ที่ระดับความเข้มข้น 0.5J, 1.0J และ 1.5J โดยสร้างช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมและสามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ที่เลือกใช้ (ค่า J คือค่าความเข้มข้นของโลหะที่สนใจในการทดสอบ หรือค่าขีดจำกัดเป้าหมาย, Target Limit)





วิธีการเตรียมตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Microwave digestion



ภาพที่ 1 วิธีการเตรียมตัวอย่าง

ตารางที่ 2 แสดงโปรแกรมอุณหภูมิการย่อยตัวอย่างด้วยเครื่อง Microwave

Temperature program			
Step	Temp (C)	Heat time (min)	Hold time (min)
1	120	3	2
2	170	3	8
3	190	3	15
4	210	3	20





ตารางที่ 3 แสดงพารามิเตอร์ของ ICP-MS สำหรับการทดสอบตัวอย่างยา

Parameter	Setting
Plasma power (W)	1550
Coolant Gas Flow (L/min)	14
Auxiliary Gas Flow (L/min)	0.8
Nebulizer Gas Flow (L/min)	1.028
He cell gas flow (mL/min)	4.3
Kinetic energy discrimination (KED)	He
Sampling depth (mm)	5
Nebulizer	PFA-ST Nebulizer
Sample Cone	Nickel
Skimmer Cone	Nickel
Sample pump tubing	PVC, ID .508 mm
Internal standard pump tubing	PVC, ID 0.254 mm
Drain pump tubing	Silicon tube, ID 1.295 mm

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method Validation) ตาม USP<233> ได้แก่

1. Accuracy
2. Precision และ Robustness
3. Specificity
4. Detectability
5. LOD และ LOQ
6. Linearity และ Range
7. System Suitability





ผลการทดสอบ

1. การทดสอบ Accuracy

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบความถูกต้อง หรือ Accuracy โดยเติมสารมาตรฐาน (Spiked) ลงในตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.5J, 1.0J และ 1.5J โดยทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เกณฑ์การยอมรับ %Recovery อยู่ในช่วง 70-150%

Element	Drug + spike 0.5J (N=3)	Drug + spike 1.0J (N=3)	Drug + spike 1.5J (N=3)
	% Recovery	% Recovery	% Recovery
Cd-111	99.88	100.04	100.04
P-208	103.65	102.31	100.68
As-75	99.22	97.99	97.14
Hg-202	99.97	100.19	97.57
Co-59	100.34	100.96	99.86
V-51	100.19	98.92	98.77
Ni-60	100.61	100.44	100.18



2. การทดสอบ Precision และ Ruggedness

ตารางที่ 5 แสดงผล Repeatability และ Ruggedness ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการทำซ้ำและความทนทานของวิธี โดยเติมสารมาตรฐาน (Spiked) ความเข้มข้น 1.0J ลงในตัวอย่าง 6 ตัวอย่าง (N=6) และทดสอบซ้ำเป็นเวลา 2 วัน

เกณฑ์การยอมรับ ค่า % RSD < 20 % เมื่อ N=6 และ %RSD < 25 % เมื่อ N=12

Element	Repeatability Drug + spike 1J Day 1, (N=6)	Repeatability Drug + spike 1J Day 2, (N=12)
	% RSD	% RSD
Cd-111	1.81	5.57
P-208	1.17	4.64
As-75	2.87	4.66
Hg-202	3.16	6.36
Co-59	2.78	5.30
V-51	3.41	4.82
Ni-60	2.17	2.28





3. การทดสอบ Specificity

ตารางที่ 6 แสดงค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐาน (Spiked) ที่ความเข้มข้น 1.0J และ วัดความเข้มข้นของแต่ละองค์ประกอบที่ไอโซโทปต่างกัน โดยองค์ประกอบนั้นๆ ต้องไม่ส่งผลกระทบต่อ ธาตุที่ต้องการทดสอบ

เกณฑ์การยอมรับ % Recovery อยู่ในช่วง 70-150 % และ % RSD < 20%

Mass	Element	Drug + spike 1.0J (N=3)	Accuracy Drug + spike 1.0J (N=3)	Repeatability Drug + spike 1J (N=3)
		µg / L	% Recovery	% RSD
111	Cd	499.48	100.20	2.37
114	Cd	514.87	103.036	1.59
206	Pb	563.76	112.78	5.21
207	Pb	559.70	112.02	4.53
208	Pb	562.20	112.52	6.24
75	As	1499.26	100.09	1.82
200	Hg	3382.51	115.42	6.10
202	Hg	3383.47	115.44	6.31
59	Co	4958.63	99.22	1.41
51	V	9940.66	99.46	1.24
60	Ni	20208.72	101.09	1.25





4. การทดสอบ Detectability

ตารางที่ 7 แสดงผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐาน (Spiked) ที่ความเข้มข้น 0.8J กับมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1.0J โดยทดสอบ 3 ซ้ำ
เกณฑ์การยอมรับ

4.1 ตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 1.0J ต้องมี % Recovery อยู่ภายใน ± 15 % ของค่าเฉลี่ยสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1.0J

4.2 ตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.8J ต้องมีค่าน้อยกว่า Standard 1.0J

Element	Drug (N=3)	Drug + spike 1.0J (N=3)	Recovery	Drug + spike 0.8 J (N=3)	Recovery
	($\mu\text{g} / \text{L}$)	($\mu\text{g} / \text{L}$)	%	($\mu\text{g} / \text{L}$)	%
Cd-111	2.55	501.70	100.34	405.45	100.73
P-208	14.95	517.03	103.41	460.45	111.38
As-75	6.675	1483.73	98.92	1211.8	100.43
Hg-202	11.325	3099.95	103.33	2352.3	97.54
Co-59	6.425	4937.40	98.75	3899.125	97.32
V-51	23.675	9733.10	97.33	7786.85	97.04
Ni-60	158.05	19541.08	97.71	16030	99.20





5. การทดสอบ LOD และ LOQ

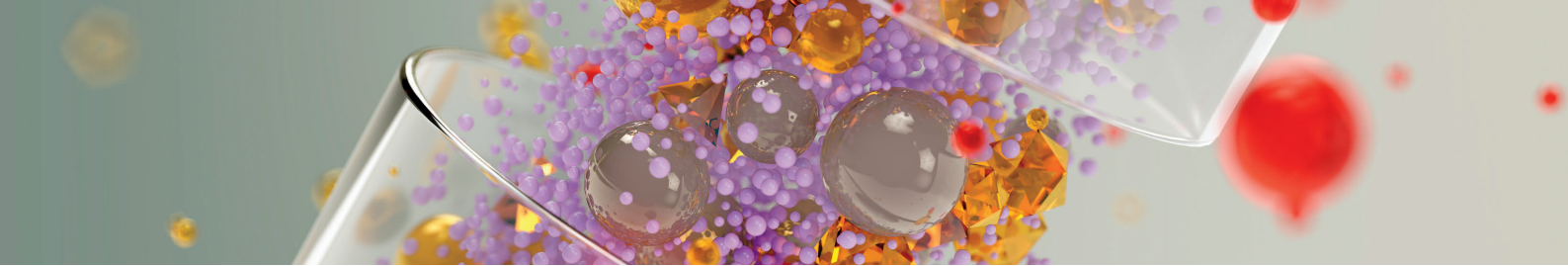
ตารางที่ 8 แสดงผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจวัด หรือ LOD โดยคำนวณจาก 3.3 SD /S เมื่อ SD คือ the standard deviation of the response ของตัวอย่างยา (N=10 การทำซ้ำภายนอก) และควบคุมคุณภาพของการตรวจวัดที่ความเข้มข้น 1.0J

Blank	Elemental Impurity (Intensity)						
	Cd	Pb	As	Hg	Co	V	Ni
Blank Average	84.40	53237.20	62.40	1508.30	247.80	2206.10	5961.50
Slope	11971.92	110,045.870	2772.499	22,104.693	24200.53	9,731.069	6,365.557
SD	4.72	188.18	2.91	303.58	15.59	249.15	104.06
LOD = 3.3SD /s	0.0013	0.0056	0.0035	0.0453	0.0021	0.0845	0.0539
LOQ = 10SD /s	0.0039	0.0171	0.0105	0.1373	0.0064	0.2560	0.1635

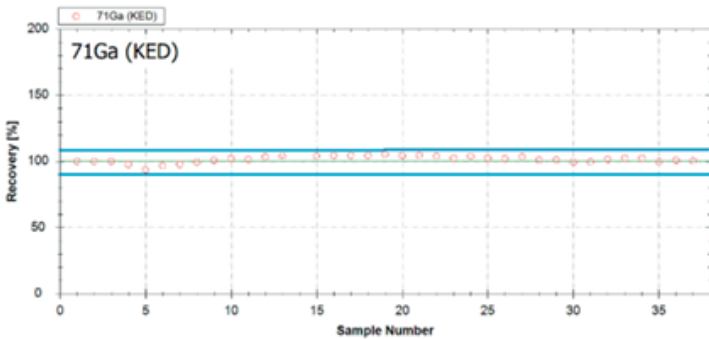
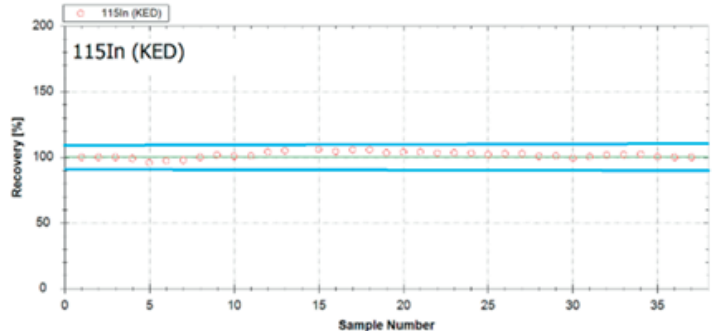
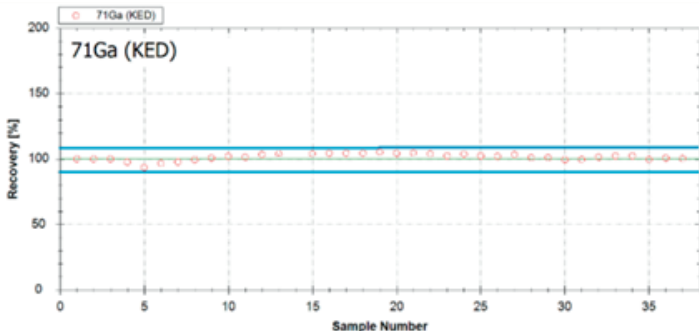
ตารางที่ 9 แสดงค่า LOQ ที่ตรวจสอบกลับได้ โดยใช้ Std. 1.0J ก่อนทำการทดสอบ LOQ และหาค่า % Recovery

Element	1J value	CCV (1.0J) (N=3)	LOQ (จากการเตรียม)	LOQ (จากการวัด)	% Recovery
Cd-111	2	2.02	0.01	0.01	118.1
P-208	2	2.01	0.48	0.48	81.09
As-75	6	6.07	0.02	0.02	96.03
Hg-202	12	12.08	0.14	0.14	119.06
Co-59	20	20.55	0.01	0.01	77.67
V-51	40	41.18	0.26	0.2600	148.77
Ni-60	80	81.76	0.93	0.9300	110.45

การยืนยันได้ว่าวิธีการเตรียมตัวอย่างที่นำมาใช้เป็นวิธีเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ สามารถแสดงได้จากค่า Internal Standard ของ 71Ga, 115In, 205Tl และ 209Bi ซึ่งพบว่าไม่มีการรบกวนจากตัวทำละลายหรือเมทริกซ์



เกณฑ์การยอมรับ ค่า % Recovery ในช่วง 90-110%



ภาพที่ 2 แสดงกราฟของสารละลายมาตรฐานภายใน (Internal Standard) ธาตุ 71Ga, 115In, 205Tl และ 209Bi

6. การทดสอบ Linearity และ Range

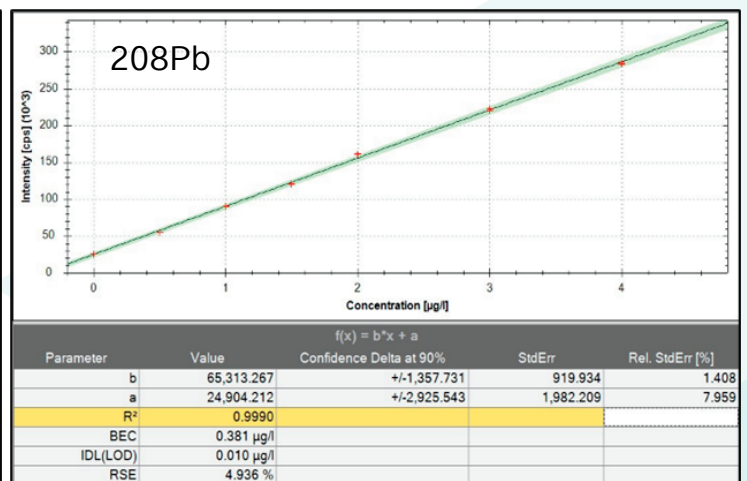
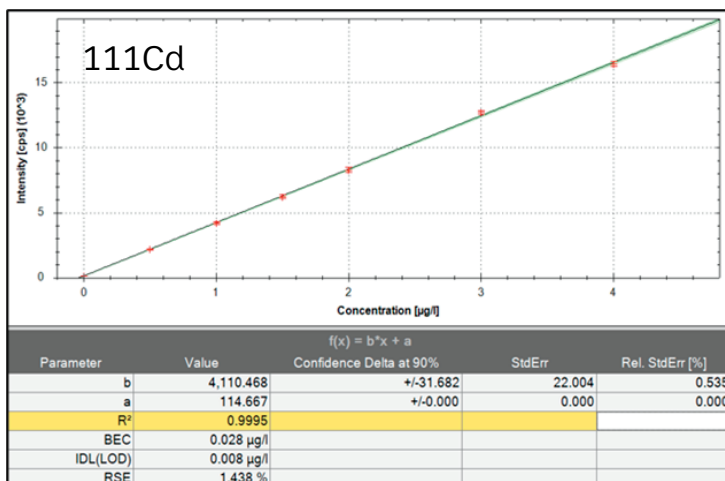
โดยสร้างกราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้นจาก Blank, 0.5J 0.8J 1.0J 1.2J และ 1.5J ของทั้ง 7 ธาตุ ได้แก่ Cd, Pb, As, Hg, Co, V และ Ni และทำการเติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.8J และ 1.2J ลงในตัวอย่าง

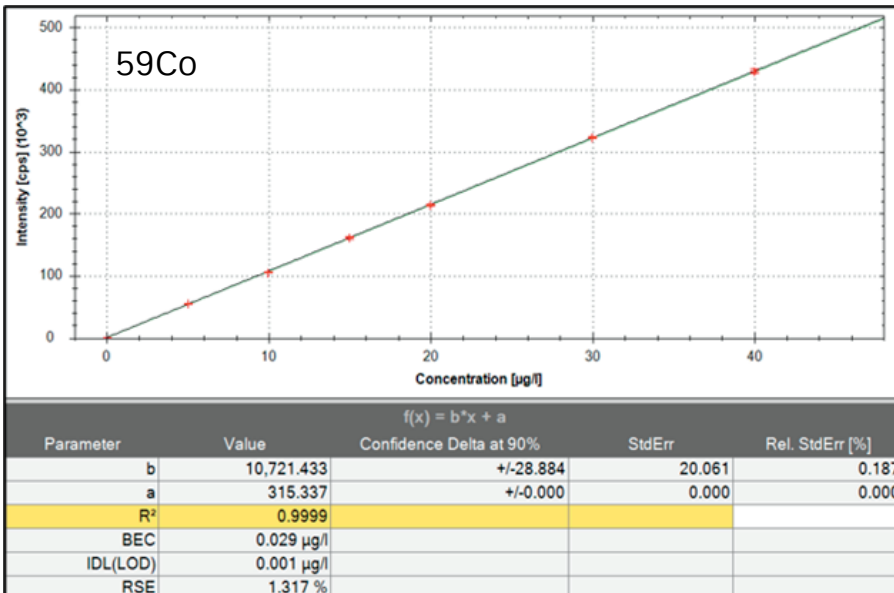
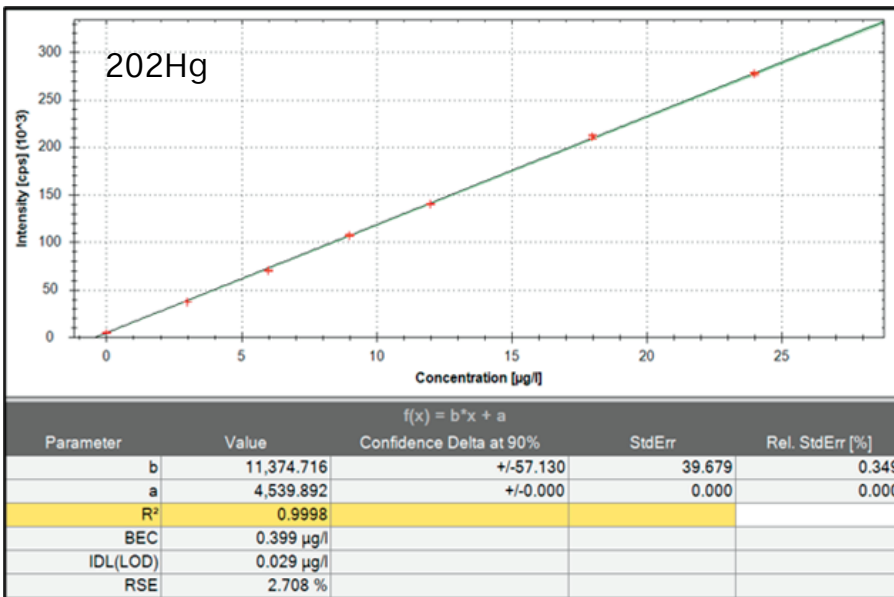
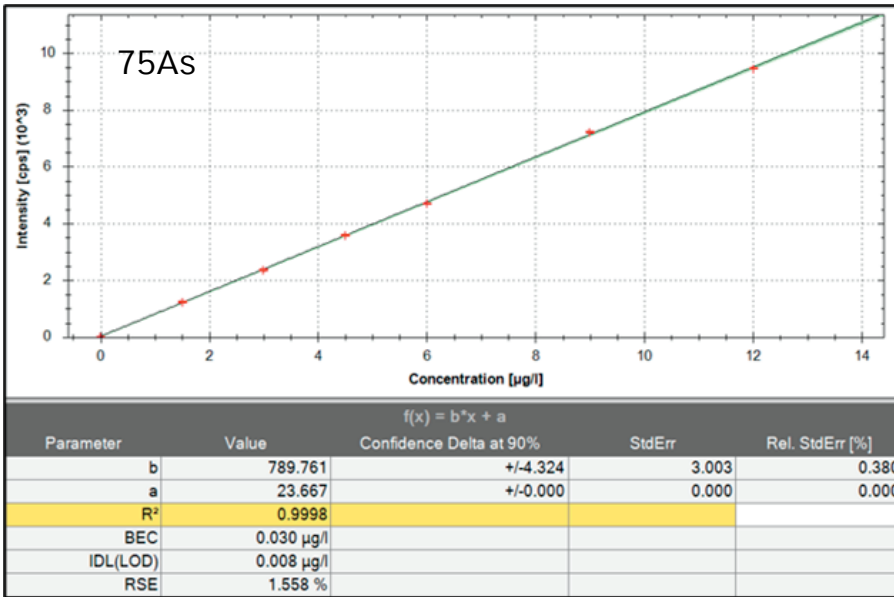
เกณฑ์การยอมรับ

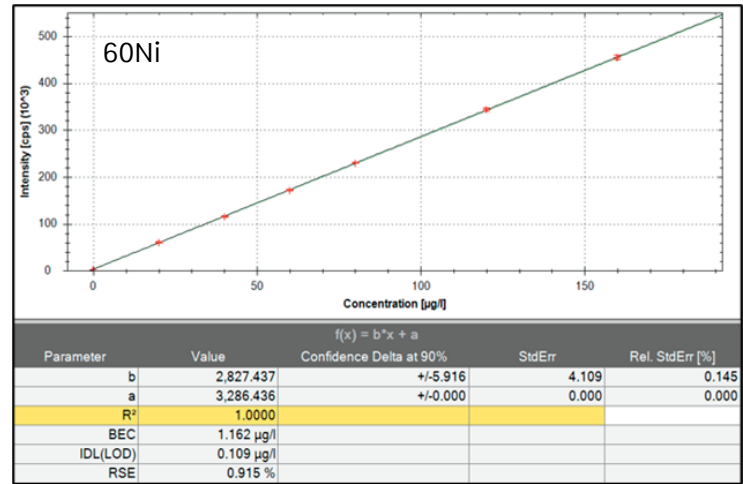
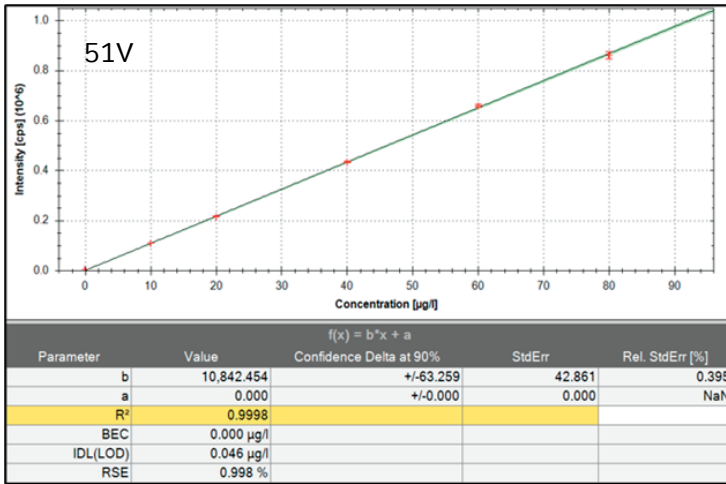
6.1 $R^2 > 0.999$

6.2 % RSD < 20

6.3 % Spiked recovery อยู่ในช่วง 70-150







ภาพที่ 3 แสดงกราฟมาตรฐาน ของทั้ง 7 ธาตุ ได้แก่ Cd, Pb, As, Hg, Co, V และ Ni

ตารางที่ 10 แสดงค่า % Recovery of Spike sample 0.8J และ 1.2J รวมไปถึงค่า % RSD

Element	Drug + spike 0.8J (N=3)	RSD	Recovery	Drug + spike 1.2 J (N=3)	RSD	Recovery
	(µg / L)	%	%	(µg / L)	%	%
Cd-111	425.53	1.04	104.88	632.43	1.05	104.41
P-208	474.80	0.54	112.25	706.50	0.71	113.46
As-75	1217.50	1.24	98.41	1851.68	0.44	100.84
Hg-202	2744.60	0.07	113.7	4003.78	0.20	110.78
Co-59	4143.73	2.15	103.01	6263.75	0.10	104.01
V-51	8256.85	1.93	102.34	12553.40	0.19	104.03
Ni-60	16684.40	1.90	103.59	25164.48	1.08	104.39





7. System suitability

ตารางที่ 11 แสดงผล % Diff และ % RSD ของตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐาน (Spiked) ที่ความเข้มข้น 1.5J โดยทดสอบ 3 ซ้ำ เป็นเวลา 3 วัน

เกณฑ์การยอมรับ

7.1 %Diff < 20

7.2 %RSD ต้องอยู่ในช่วง 0.1 – 4 %

Elements	1.5J	Day 1		Day 2		Day 2	
		%Diff	%RSD	%Diff	%RSD	%Diff	%RSD
Cd-111	3	0.11	0.08	0.002	0.002	1.0	0.71
P-208	3	1.76	1.23	1.31	0.94	1.21	0.80
As-75	9	0.03	0.02	0.40	0.28	0.46	0.33
Hg-202	18	1.40	0.99	1.39	0.94	2.21	1.50
Co-59	30	0.08	0.06	0.76	0.54	0.92	0.65
V-51	60	0.67	0.48	1.83	0.80	1.10	0.78
Ni-60	120	0.38	0.28	0.70	0.50	0.81	0.58

สรุปผลทดสอบ

จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีของโลหะปนเปื้อน Class 1 และ 2A ได้แก่ As Cd Hg Pb Co V และ Ni ในตัวอย่างยาเบาหวานด้วยเครื่อง iCAP RQ ICP-MS ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง ค่า R2 ≥ 0.9995 มีค่า %Recovery ระหว่าง 70-150% และมีค่า %RSD < 20 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ตามมาตรฐาน USP<233> แสดงให้เห็นว่าวิธีการเตรียมตัวอย่างและการทดสอบด้วยเครื่อง ICPMS นั้น มีประสิทธิภาพ ให้ผลการทดสอบที่มีความถูกต้อง และน่าเชื่อถือ

เอกสารอ้างอิง

1. Elemental Impurities — Limits, (Pharm. Forum, 2011) 37(3), Chapter <232>.
2. Elemental Impurities — Procedures, (Pharm. Forum, 2011) 37(3), Chapter <233>.
3. A. Liba and E. McCurdy, Proposed new USP general chapters <232> and <233> for elemental impurities

สอบถามรายละเอียดและติดตามกิจกรรมของทางบริษัทได้ที่



บริษัท ชายนี สเปค จำกัด
 เลขที่ 10 ซอยกาญจนาภิเษก 0010 แยกสอง
 แขวงบางแค เขตบางแค กรุงเทพฯ 10160
 TEL : (66) 2 454-8533



WWW.SCISPEC.CO.TH



/SCISPEC



CRM@SCISPEC.CO.TH



@SCISPEC