



Analytical Method Validation

การตรวจสอบความถูกต้องของ
วิธีวิเคราะห์

เป็นกระบวนการศึกษาใน
ห้องปฏิบัติการ เพื่อยืนยันว่าวิธี
ทดสอบนั้นมีคุณลักษณะเฉพาะ
เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ในการ
นำไปประยุกต์ใช้สำหรับการ
วิเคราะห์นั้น



ICH Q2A (R1)

PART I:

TEXT ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES

ICH Harmonised Tripartite Guideline

Having reached Step 4 of the ICH Process at the ICH Steering Committee meeting on 27 October 1994, this guideline is recommended for adoption to the three regulatory parties to ICH

1. Introduction

This document presents a discussion of the characteristics for consideration during the validation of the analytical procedures included as part of registration applications submitted within the EC, Japan and USA. This document does not necessarily seek to cover the testing that may be required for registration in, or export to, other areas of the world. Furthermore, this text presentation serves as a collection of terms, and their definitions, and is not intended to provide direction on how to accomplish validation. These terms and definitions are meant to bridge the differences that often exist between various compendia and regulators of the EC, Japan and USA.

The objective of validation of an analytical procedure is to demonstrate that it is suitable for its intended purpose. A tabular summation of the characteristics applicable to identification, control of impurities and assay procedures is included. Other analytical procedures may be considered in future additions to this document.



2

PE009-15



Chapter 6 Quality Control

Testing

- 6.15 Testing methods should be validated. A laboratory that is using a testing method and which did not perform the original validation, should verify the appropriateness of the testing method. All testing operations described in the Marketing Authorisation or technical dossier should be carried out according to the approved methods.
- 6.16 The results obtained should be recorded. Results of parameters identified as critical quality attributes should be trended and checked to make sure that they are consistent with each other. Any calculations should be critically examined.
- 6.17 The tests performed should be recorded and the records should include at least the following data:

PE 009-15 (Part I)

- 40 -

1 May 2021

3

PE009-15



Annex 15 Qualification and Validation

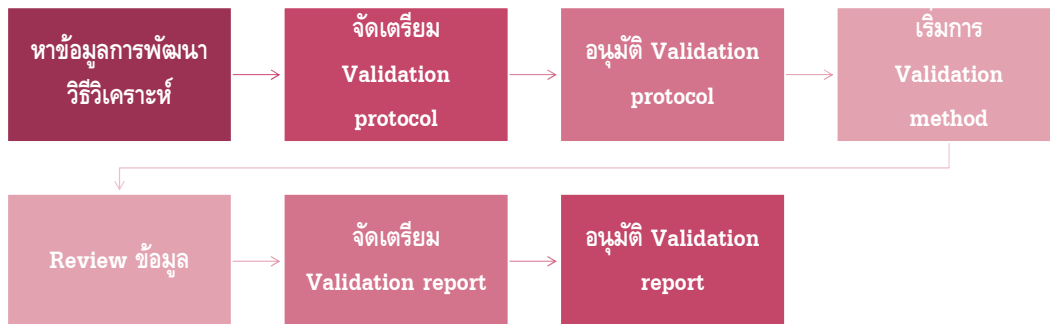
9. VALIDATION OF TEST METHODS

- 9.1 All analytical test methods used in qualification, validation or cleaning exercises should be validated with an appropriate detection and quantification limit, where necessary, as defined in Chapter 6 of the PIC/S GMP guide Part I.
- 9.2 Where microbial testing of product is carried out, the method should be validated to confirm that the product does not influence the recovery of microorganisms.
- 9.3 Where microbial testing of surfaces in clean rooms is carried out, validation should be performed on the test method to confirm that sanitising agents do not influence the recovery of microorganisms.

4



Flow การทำ Analytical Method Validation



5



กรณีที่ไม่ต้องทำ AMV

วิธีวิเคราะห์และทดสอบมาตรฐานที่ระบุในตำรายาต่างๆ ที่เป็นที่ยอมรับ
การกฎหมายหรือรัฐมนตรีรับรอง (Official pharmacopoeia)

แต่ต้อง ทวนสอบ (Verification) ตามหัวข้อที่ระบุในตำรายาเล่มนั้นๆ
หรืออย่างน้อยในหัวข้อ Accuracy, Precision, และ Linearity

ถ้าเป็นเทคนิคทางโครมาโทกราฟีต้องทำการทดสอบความเหมาะสมของ
ระบบด้วย (system suitability)

6



กรณีที่ไม่ต้องทำ AMV

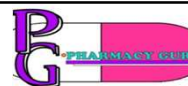
ใช้วิธีวิเคราะห์ตามตำราฯ ที่ระบุใน monograph โดยไม่เปลี่ยน

- ค่า system suitability และ Criteria
- ชนิดของคอลัมน์หรือวัฏภาคคงที่ (stationary phase)
- ชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราส่วนของตัวทำละลายที่ผสม
- ความยาวคลื่น

<621> Chromatography - USP



7



เมื่อใดต้องทำ AMV

1. วิธีมาตรฐานใช้นอกขอบข่ายที่กำหนด เช่น นำไปใช้กับยารูปแบบอื่น
2. วิธีมาตรฐานที่มีการขยายหรือดัดแปลง ปรับปรุง แก้ไข เช่น เปลี่ยนวิธีสกัด วิธีเตรียมตัวอย่าง เปลี่ยนความยาวคลื่น เปลี่ยนวัฏภาคเคลื่อนที่ คอลัมน์ เปลี่ยน Titrant เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ
3. วิธีที่ไม่ใช่มาตรฐาน ได้แก่ ตำราฯที่ไม่ใช่ที่รัฐมนตรีประกาศรับรอง หรือวารสารทางวิทยาศาสตร์ เป็นต้น
4. วิธีใหม่ที่คิดค้นขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ



8



เมื่อใดต้อง revalidation

กรณีที่ทำ AMV เสร็จเรียบร้อยแล้ว แต่ภายหลังมีการเปลี่ยนแปลง เช่น

เปลี่ยนแปลงวิธีการสังเคราะห์ยา

เปลี่ยนแปลงองค์ประกอบในสูตรตำรับ เช่น สารกันเสีย แบ่ง

เปลี่ยนแปลงวิธีการทดสอบ

เปลี่ยนเครื่องมือ



9



ประเภทของวิธีวิเคราะห์

วิธีที่ต้องตรวจสอบความถูกต้อง โดย USP41 ในส่วนของ General Chapter <1225> แบ่งการวิเคราะห์ออกเป็น 4 ประเภท คือ

1. การวิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญ (Assay)
2. การทดสอบสารปนเปื้อน (Testing for impurities) ซึ่งหมายความรวมถึงการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative assays) และเชิงคุณภาพ (Limit tests)
3. การทดสอบหาคุณสมบัติของยา (Performance Characteristic) เช่น Dissolution เป็นต้น
4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ (Identification tests)



10

Parameter ในการทำ AMV



1. ความแม่นยำ (Accuracy)

2. ความเที่ยง (Precision) มี 3 ระดับ คือ

Repeatability คือ การตรวจโดยนักวิเคราะห์คนเดียว เครื่องมือและสภาวะการวิเคราะห์เดียวกันและวิเคราะห์ซ้ำ ๆ ในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกัน หรือวันเดียวกัน

Intermediate precision การวิเคราะห์ซ้ำ โดยมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยในการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เช่น เปลี่ยนเครื่องมือ เปลี่ยนนักวิเคราะห์ เปลี่ยนวัน

Reproducibility การวิเคราะห์ซ้ำในห้องปฏิบัติการต่างกัน

3. ความจำเพาะ (Specificity)

4. ขีดจำกัดการตรวจพบ (Detection limit)

5. ขีดจำกัดการหาเชิงปริมาณ (Quantitation limit)

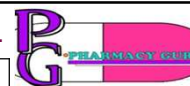
6. ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

7. พิสัย (Range)

8. ความคงทน (Robustness)

11

ตารางแสดงพารามิเตอร์ที่ต้องมีการทำ Validation ในแต่ละประเภทของวิธีวิเคราะห์ อ้างอิงตาม USP 41



พารามิเตอร์	ประเภทของวิธีวิเคราะห์				
	ประเภทที่ 1	ประเภทที่ 2		ประเภทที่ 3	ประเภทที่ 4
		Quantitative	Limit tests		
Accuracy	+	+	*	*	-
Precision	+	+	-	+	-
Specificity	+	+	+	*	+
Detection limit	-	-	+	*	-
Quantitation limit	-	+	-	*	-
Linearity	+	+	-	*	-
Range	+	+	*	*	-

หมายเหตุ: + พารามิเตอร์ที่ต้องทดสอบ, - พารามิเตอร์ที่ไม่ต้องทดสอบ, * อาจจะต้องทำการทดสอบขึ้นกับเครื่องมือและวิธีทดสอบ

12

ความแม่นยำ (Accuracy)



ความหมาย

ความใกล้เคียงกันของผลการวัด (ผลการวิเคราะห์) กับค่าจริงที่ยอมรับได้
วิเคราะห์หาปริมาณตัวยาลำคัญที่เติมลงไป ใน placebo หรือเภสัชภัณฑ์อื่นๆ

หลักปฏิบัติ

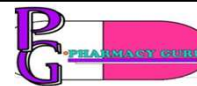
ทดสอบโดยการเตรียมตัวอย่าง 3 ความเข้มข้น ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่ต้องการวิเคราะห์ โดยทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

การรายงานผล: % recovery (ค่าเฉลี่ย) $\pm$ RSD

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ความเข้มข้นที่เติมลงไป}} \times 100$$

13

ความแม่นยำ (Accuracy)



Drug substance

1. วิเคราะห์สารที่ทราบความบริสุทธิ์ที่แน่นอน เช่น สารอ้างอิงมาตรฐาน
2. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีที่กำลังทำ Validate กับวิธีที่เป็นมาตรฐาน (อาจเป็นวิธีจากเภสัชตำรับหรือวิธีอื่นที่มีการประเมินไว้)

Drug product

1. เติมวัตถุเจือปนที่ทราบปริมาณที่แน่นอนลงไป ใน Excipient ตามสูตรตำรับของผลิตภัณฑ์ แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่กำลัง Validate
2. กรณีที่ไม่ทราบส่วนผสมหรือสูตรตำรับของผลิตภัณฑ์ ให้เติมวัตถุเจือปนที่ทราบปริมาณที่แน่นอนลงไป ในผลิตภัณฑ์ และทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่กำลังคิดว่าจะ Validate
3. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีที่กำลังประเมิน กับอีกวิธีหนึ่งที่เป็นวิธีที่มีการประเมินไว้แล้ว

14

ความแม่นยำ (Accuracy)



เกณฑ์การยอมรับ

ตารางแสดง เกณฑ์การยอมรับค่าร้อยละการคืนกลับตามเกณฑ์ของ AOAC

Table A5. Expected recovery as a function of analyte concentration*

Analyte, %	Mass fraction (C)	Unit	Mean recovery, %
100	1	100%	98–102
10	10 ⁻¹	10%	
1	10 ⁻²	1%	97–103
0.1	10 ⁻³	0.1%	95–105
0.01	10 ⁻⁴	100 ppm (mg/kg)	90–107
0.001	10 ⁻⁵	10 ppm (mg/kg)	80–110
0.0001	10 ⁻⁶	1 ppm (mg/kg)	
0.00001	10 ⁻⁷	100 ppb (µg/kg)	60–115
0.000001	10 ⁻⁸	10 ppb (µg/kg)	
0.0000001	10 ⁻⁹	1 ppb (µg/kg)	40–120

* Table excerpted from AOAC Peer-Verified Methods Program, *Manual on Policies and Procedures* (1998) AOAC INTERNATIONAL, Rockville, MD, USA.

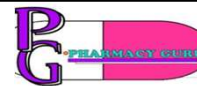
Recovery is defined as the ratio of the observed mean test result to the true value. The range of the acceptable mean recovery expands as the concentration of the analyte decreases. This table provides target mean recovery ranges for analyte concentrations from 100% to 1 ppb.

http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf

15

นิพนธ์ตันฉับ

ว กรมวิทย์ พ 2558 ฉบับพิเศษ 1 : 1-19



การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ อะซิโทรัมัยซิน ในรูปแบบยาแคปซูลและยาผง สำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน

วิภาพรณ ไสยสมบัติ สุภาณี ดวงธีรปรีชา สุภาวดี สุรางค์กุล และประสิทธิ์ โอภาส
สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

16

ตัวอย่าง

ตัวอย่างยาอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลประกอบด้วยปริมาณตัวยาอะซิโทรัมัยซิน 250 มิลลิกรัมต่อแคปซูล

ตัวอย่างยาอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนประกอบด้วยปริมาณตัวยาอะซิโทรัมัยซิน 200 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร

Placebo (ส่วนประกอบของยาที่ไม่มีตัวยาสำคัญ) ของยาอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูลและในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนได้จากผู้ผลิต

วิธีการทดสอบ

สภาวะของระบบโครมาโทกราฟี (HPLC)

คอลัมน์ :	HPLC Column XTerra C18, 5 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm, Lot No. 0211311851
อุณหภูมิของคอลัมน์ :	50 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล :	1.5 ml/min
สารละลายตัวพา :	Acetonitrile, Methanol, Solution A (21:40:39) (Solution A = A solution containing 4.4 mg/ml of dibasic potassium phosphate and 0.5 mg/ml of sodium 1-octanesulfonate, and adjust with phosphoric acid to a pH of 8.20 $\pm$ 0.05)
เครื่องตรวจวัด :	PDA 210 nm
ปริมาตรที่ฉีด :	50 μ l

Ref วิภาพรณ ไสยสมบัติและคณะ. การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์อะซิโทรัมัยซิน ในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน. สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

17

3. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ Placebo ที่เติมสารมาตรฐานอะซิโทรัมัยซิน (Spiked placebo) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.12, 0.4 และ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 30, 100 และ 140 ของระดับความเข้มข้นที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณอะซิโทรัมัยซินในตัวอย่าง ตามลำดับ สำหรับยาอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูล เตรียมโดยการชั่งสารมาตรฐานอะซิโทรัมัยซินประมาณ 3, 10 และ 14 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน)

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ฉบับพิเศษ 1 กรกฎาคม - กันยายน 2558

Development and Validation Method for Determination of Azithromycin

Wipapan Saiyasombat et al.

ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร และชั่ง placebo ประมาณ 8 มิลลิกรัม ลงในแต่ละ volumetric flask สำหรับยาอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอนเตรียมโดยการชั่งสารมาตรฐานอะซิโทรัมัยซินประมาณ 3.10 และ 14 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร และชั่ง placebo ประมาณ 270 มิลลิกรัม ลงในแต่ละ volumetric flask ทำการทดสอบความเข้มข้น 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณอะซิโทรัมัยซินทั้งหมดที่มีในสารละลายเพื่อคำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) ของแต่ละระดับความเข้มข้น หาค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ (% mean recovery) และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%Relative Standard Deviation, %RSD) โดยที่ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับของอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาแคปซูล ต้องอยู่ในช่วง 98.0-102.0 และค่า %RSD ไม่เกิน 2.0 ส่วนค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับของอะซิโทรัมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน ต้องอยู่ในช่วง 97.0-103.0 และค่า %RSD ไม่เกิน 2.0

Ref วิภาพรณ ไสยสมบัติและคณะ. การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์อะซิโทรัมัยซิน ในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน. สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

18



ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีของอะซีไทรมัยซินในรูปแบบยาแคปซูล

ระดับความเข้มข้น (ร้อยละของความเข้มข้น ที่ทดสอบ)	ปริมาณสารมาตรฐาน ที่ตรวจพบ (มิลลิกรัม)	ปริมาณสารมาตรฐาน ที่เติม (มิลลิกรัม)	ร้อยละ ของการคืนกลับ	ค่าเฉลี่ย	%RSD
30	2.8008	2.8218	99.26	99.25	0.18
	2.8223	2.8387	99.42		
	2.7733	2.7994	99.07		
100	9.4026	9.4248	99.76	99.79	0.19
	9.3559	9.3921	99.62		
	9.3691	9.3696	99.99		
140	13.1196	13.2490	99.02	99.44	0.22
	13.1122	13.1122	100.00		
	13.1122	13.1122	100.00		

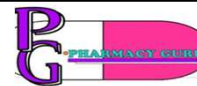
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีของอะซีไทรมัยซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน

ระดับความเข้มข้น (ร้อยละของความเข้มข้น ที่ทดสอบ)	ปริมาณสารมาตรฐาน ที่ตรวจพบ (มิลลิกรัม)	ปริมาณสารมาตรฐาน ที่เติม (มิลลิกรัม)	ร้อยละ ของการคืนกลับ	ค่าเฉลี่ย	%RSD
30	2.7360	2.7583	99.19	98.63	0.78
	2.7997	2.8639	97.76		
	2.7452	2.7741	98.95		
100	9.3179	9.3154	100.03	99.13	1.44
	9.2385	9.4772	97.48		
	9.4294	9.4407	99.88		
140	13.2607	13.2620	99.99	99.84	0.13
	13.1771	13.2097	99.75		
	13.2068	13.2340	99.79		
ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ			99.20	99.20	0.61

Ref วิชาพรณ ไสยสมบัติและคณะ.
การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้อง
ของวิธีวิเคราะห์อะซีไทรมัยซิน ใน
รูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับ
เตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน. สำนัก
ยาและวัตถุเสพติด
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

19

ความเที่ยง (Precision)



ความใกล้เคียงกันของค่าที่วัดหรือวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันหลายๆ ครั้ง ตามเงื่อนไขหรือสภาวะที่กำหนด

สภาวะการทดสอบ

1. **Repeatability** เป็นสภาวะการวิเคราะห์ที่ประกอบด้วยตัวอย่าง เครื่องมือ สารเคมี นักวิเคราะห์เหมือนเดิม และวัดซ้ำในช่วงเวลาสั้นๆ หรือทำซ้ำติดต่อกันให้เสร็จ >> 100 %LA ทำซ้ำ 6 ครั้ง, 9 ตัวอย่าง 3 x 3 ความเข้มข้น

2. **Intermediate precision** เป็นสภาวะการวัดซ้ำทำในห้องปฏิบัติการเดิม แต่สภาวะการวัดหรือวิเคราะห์ต่างๆ เปลี่ยน เช่น วิเคราะห์ต่างวัน หรือต่างผู้วิเคราะห์ เป็นต้น

3. **Reproducibility** เป็นสภาวะการวัดตัวอย่างเหมือนเดิม ต่างห้องปฏิบัติการ (ซึ่งหมายถึงสภาวะการวัดหรือวิเคราะห์ต่างๆ เปลี่ยนไปหมด)

การรายงานผล: %RSD

20

ความเที่ยง (Precision)

Table A4. Expected precision (repeatability) as a function of analyte concentration*

Analyte, %	Mass fraction (C)	Unit	RSD, %
100	1	100%	1.3
10	10 ⁻¹	10%	1.9
1	10 ⁻²	1%	2.7
0.1	10 ⁻³	0.1%	3.7
0.01	10 ⁻⁴	100 ppm (mg/kg)	5.3
0.001	10 ⁻⁵	10 ppm (mg/kg)	7.3
0.0001	10 ⁻⁶	1 ppm (mg/kg)	11
0.00001	10 ⁻⁷	100 ppb (µg/kg)	15
0.000001	10 ⁻⁸	10 ppb (µg/kg)	21
0.0000001	10 ⁻⁹	1 ppb (µg/kg)	30

* Table excerpted from AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures (1998) AOAC INTERNATIONAL, Rockville, MD, USA.

The precision of a method is the closeness of agreement between independent test results obtained under stipulated conditions. Precision is usually expressed in terms of imprecision and computed as a relative standard deviation of the test results. The imprecision of a method increases as the concentration of the analyte decreases. This table provides targets RSDs for a range of analyte concentrations.

http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf

21

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความซ้ำได้ของอะซีโพราม็อกซินในรูปแบบยาแคปซูล

ตัวอย่างที่	ปริมาณอะซีโพราม็อกซิน (มิลลิกรัมต่อแคปซูล)
1	239.9909
2	243.1560
3	240.6924
4	239.6765
5	248.3456
6	241.4700
เฉลี่ย	242.2219
%RSD	1.3

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความซ้ำได้ของอะซีโพราม็อกซินในรูปแบบยาผงสำหรับเตรียม

ตัวอย่างที่	ปริมาณอะซีโพราม็อกซิน (มิลลิกรัมต่อ)
1	194.8427
2	197.9665
3	197.8479
4	192.4077
5	195.4342
6	196.2096
เฉลี่ย	195.7848
%RSD	1.1

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบ Intermediate precision ของอะซีโพราม็อกซินในรูปแบบยาแคปซูล

รายการที่ทดสอบ	ปริมาณอะซีโพราม็อกซิน (มิลลิกรัมต่อแคปซูล)						เฉลี่ย	%RSD	เฉลี่ย	%RSD
นักวิเคราะห์ที่ 1*	239.9909	243.1560	240.6924	239.6765	248.3456	241.4700	242.2219	1.3	244.8319	1.4
นักวิเคราะห์ที่ 2 เปลี่ยนวันและเครื่องมือ**	248.0496	247.8729	247.8406	247.1409	247.2343	246.5128	247.4418	0.2		

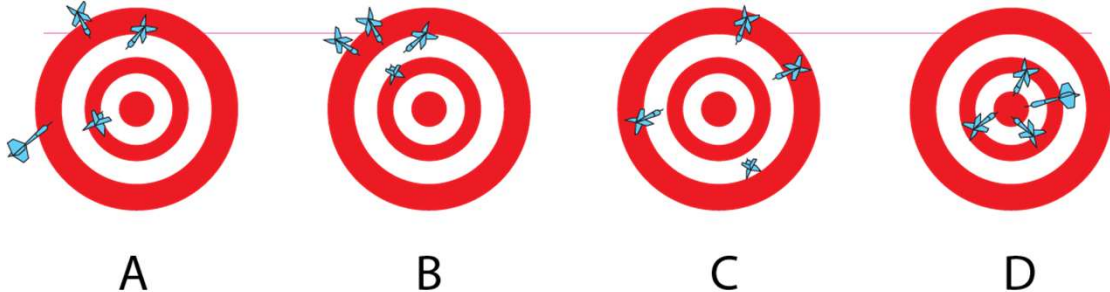
* นักวิเคราะห์ที่ 1 ตรวจวิเคราะห์วันที่ 20 มิ.ย. 56 โดยเครื่อง HPLC ผลิตภัณฑ์ของ Waters Model Waters 2695-1996-Empower

** นักวิเคราะห์ที่ 2 ตรวจวิเคราะห์วันที่ 27 มิ.ย. 56 โดยเครื่อง HPLC ผลิตภัณฑ์ของ Agilent Model Agilent 1100 Series

12 วารสารงานวิทยาศาสตร์การแพทย์
ฉบับพิเศษ 1 กรกฎาคม - กันยายน 2558

Ref วิภาพรณ ไสยสมบัติและคณะ.
การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้อง
ของวิธีวิเคราะห์อะซีโพราม็อกซิน ใน
รูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับ
เตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน. สำนัก
ยาและวัตถุเสพติด
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

22



A B C D

<https://manoa.hawaii.edu/exploringourfluidearth/physical/world-ocean/map-distortion/practices-science-precision-vs-accuracy>

23

ความจำเพาะ (Specificity)

Selectivity or Specificity	
Selectivity	Specificity
ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจวัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ในตัวอย่าง โดยสารอื่นๆในตำรับ สารเจือปน (Impurities) และสารสลายตัว (Degradation product) สารสูตรโครงสร้างคล้ายไม่รบกวน	ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจวัดเฉพาะสารที่ต้องการวิเคราะห์ในตัวอย่าง (ตอบสนองหรือให้ response เฉพาะสารที่สนใจ โดยไม่ต้องตอบสนองสารอื่นๆ ในตัวอย่างหรือตำรับ รวมทั้งสารเจือปนและสารสลายตัว)

24

ความจำเพาะ (Specificity)



วิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่าง Standard, Sample, Placebo, หรือเติมสารบกพร่อง
ต่างๆ และตรวจสอบว่าสารต่างๆ มีผลกระทบต่อการใช้วิเคราะห์หรือไม่ อย่างไร

มีสารปนเปื้อนมาตรฐาน

ไม่มีสารปนเปื้อนมาตรฐาน

เกณฑ์การยอมรับ: วิเคราะห์นั้นสามารถแสดงข้อมูลสนับสนุนว่า ผลวิเคราะห์ไม่มีการรบกวนจาก reagents, impurities และ sample matrix ซึ่งในด้านยา ก็คือ ไม่มี placebo effects สำหรับวิธีที่เป็น Stability Indicating Method ต้องปราศจากการรบกวนจาก Degradation products

25

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

1. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Selectivity/Specificity)

ซึ่งสารมาตรฐานอะซิโทรัมัยซิน ประมาณ 4 มิลลิกรัม (ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร นำมาทำให้ละลายในตัวในสภาวะต่าง ๆ หลังจากนั้นเติมตัวทำละลายประมาณ 7 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายหมด ปรับ pH ของสารละลายเฉพาะสภาวะที่ 1 และ 2 เจือจางด้วยตัวทำละลายจนครบปริมาตร กรองสารละลายผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

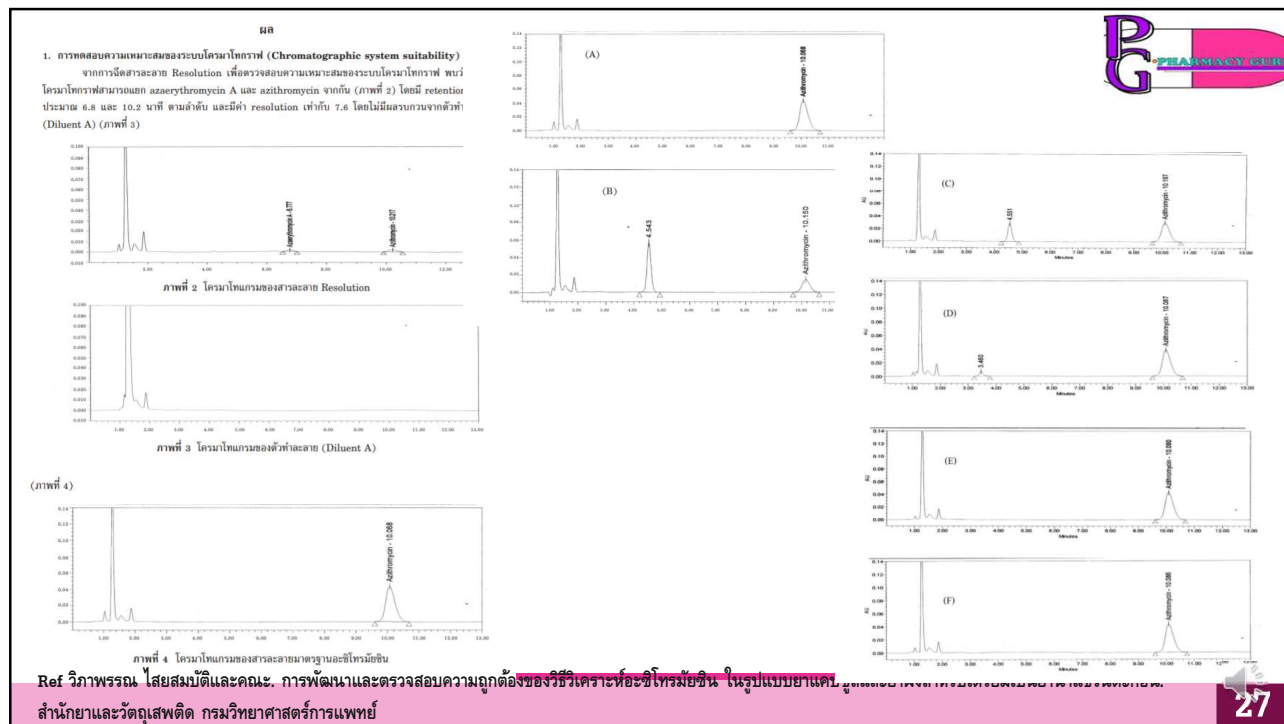
สภาวะต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดการสลายตัว

- 1) เติม 10 N Sodium hydroxide จำนวน 1 หยด แล้วนำไปต้มที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง
- 2) เติม 0.5 N Hydrochloric acid จำนวน 1 หยด
- 3) เติม 0.1% Hydrogen peroxide จำนวน 1 หยด
- 4) เติมน้ำจำนวน 1 หยดแล้วนำไปต้มที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง
- 5) นำไปผึ่งแดดนาน 6 ชั่วโมง^(9, 10)

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานที่ทำให้เกิดการสลายตัวที่สภาวะต่าง ๆ ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อศึกษาการรบกวนจากสารละลายตัว คำนวณร้อยละของการสลายตัวโดยเปรียบเทียบกับค่าพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานที่สภาวะปกติ ซึ่งสภาวะต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดการสลายตัวได้จากการทดลองทำการศึกษาก่อน สำหรับสภาวะที่ 2 และ 3 ไม่ต้องนำไปต้มต่อ เนื่องจากเมื่อเติมสารที่เร่งให้เกิดการสลายตัวแล้วพบว่าสารที่ทำการศึกษาก่อให้เกิดการสลายตัวแล้ว

Ref: วิชาการเภสัช-สายสมบัติและคณะ. การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์อะซิโทรัมัยซิน ในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน. สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

26



27

ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

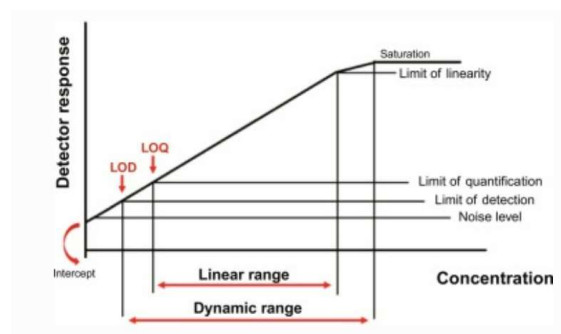
ค่าเส้นตรงของการวิเคราะห์ เป็นความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ

การรายงานผล: regression analysis, r^2

Y-intercept,

slope of the regression line,

residual sum of square



28



พิสัย (Range)

ช่วงระดับความเข้มข้นต่ำสุดและสูงสุดที่วิธีวิเคราะห์นั้นมีค่า Linearity, accuracy, และ Precision ที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์ที่กำหนด

ตัวอย่างการกำหนดช่วงความเข้มข้น (Range) สำหรับงานวิเคราะห์

วิธี assay = 80 – 120% ของ test concentration

วิธี content uniformity = 70 – 130 % ของ test concentration

วิธี dissolution = ± 20 % over the specified range

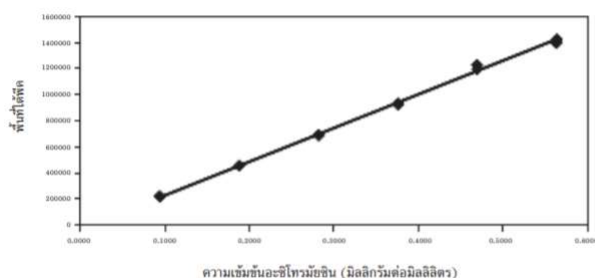
วิธีหาปริมาณ impurity = กำหนด range ตั้งแต่ระดับสารปนเปื้อนที่รายงาน (Reporting threshold) ถึง 120 % ของ specification

29

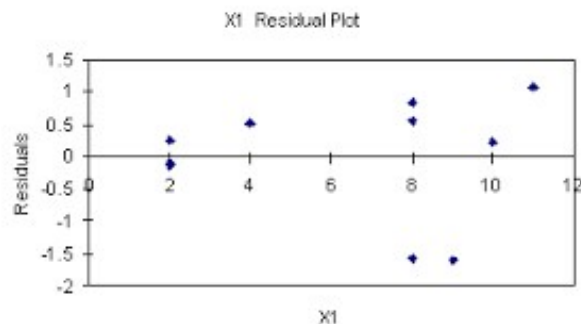


3. การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐาน 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีคมีลักษณะเป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient) เท่ากับ 0.9979 (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีคของอะซิโพรมัยซิน



Ref วิชาการรณ โสยสมบัติและคณะ. การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์อะซิโพรมัยซิน ในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน. สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

30



ขีดจำกัดการตรวจพบ (Detection limit)

ปริมาณสารที่ต่ำที่สุดในตัวอย่าง (analyst) ที่สามารถตรวจวัดได้ แต่ไม่จำเป็นต้องหาปริมาณที่แน่นอนได้

การรายงานผล: ระดับความเข้มข้นในหน่วยต่างๆ

31



ขีดจำกัดการหาเชิงปริมาณ (Quantitation limit)

ความเข้มข้นที่ต่ำสุดของสารที่ตรวจวิเคราะห์ (analyst) ได้อย่างมีความเที่ยงและความแม่นยำ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ที่ต้องการ

เป็นพารามิเตอร์ที่ใช้ต้องตรวจสอบสำหรับวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสำหรับสารที่มีปริมาณต่ำในสูตรตำรับ การหาปริมาณสารปนเปื้อนและสารสลายตัว

การรายงานผล: ระดับความเข้มข้นในหน่วยต่างๆ

32

ตัวอย่างการหา LOD และ LOQ



1. ตรวจสอบด้วยการประเมินทางสายตา (Based on visual evaluation)

สำหรับวิธีที่ไม่ใช้เครื่องมือวัด เช่น TLC

เตรียมสารละลายที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (ความเข้มข้นต่ำ)



ตรวจวัดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น



LOD ความเข้มข้นสุดท้ายที่ให้จุดหรือ spot ที่มองเห็นได้



LOQ ความเข้มข้นที่ให้จุดหรือ spot ที่มองเห็นได้ ตรวจวัดและคำนวณหาปริมาณได้อย่างมีความแม่นยำและความเที่ยงตามเกณฑ์ที่กำหนดหรือเหมาะสม

33

ตัวอย่างการหา LOD และ LOQ



2. Based on Signal-to Noise-ratio (S/N)

วัดปริมาณสารที่ให้สัญญาณ (signal) เทียบกับสัญญาณรบกวน (noise)



เตรียมสารละลาย จีดีวิเคราะห์ วัดความสูงของพีคเทียบกับความสูงของ noise ลดความเข้มข้นของสารลงเรื่อยๆ จนได้ signal to noise ตามที่ต้องการ



LOD ปริมาณสารที่ให้สัญญาณเป็น 3 เท่า ของสัญญาณรบกวน หรือ $S/N = 3$



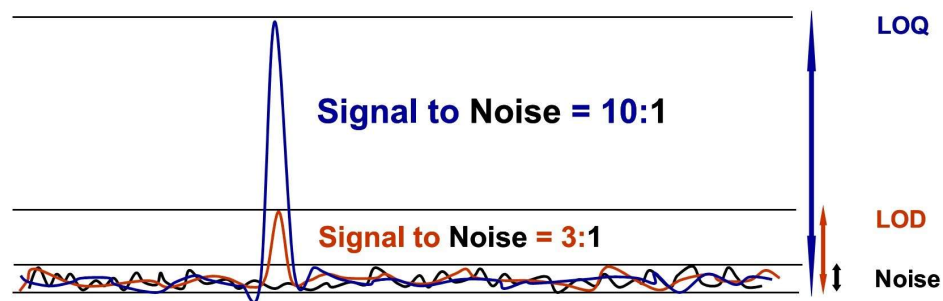
LOQ ปริมาณสารที่ให้สัญญาณเป็น 10 เท่า ของสัญญาณรบกวน หรือ $S/N = 10$

34

Analytical Method Development



LOD, LOQ and Signal to Noise Ratio (SNR)



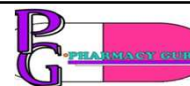
34 | Birgit Schmauser | April 2008



World Health Organization

35

ตัวอย่างการหา LOD หรือ LOQ



3. Based on the standard deviation of the response of the slope

S = slope of calibration curve

σ = standard deviation (SD) of blank readings or the residual standard deviation of a regression line or the SD of y-intercept

$$DL = \frac{3.3 \sigma}{S}$$

$$QL = \frac{10 \sigma}{S}$$

36

ความคงทน (Robustness)



ความทนของวิธีวิเคราะห์ในการวัดตัวอย่างภายใต้สภาวะการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ในการวัดไปเล็กๆ น้อยๆ เช่น ค่าความเป็นกรดต่าง อัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราการไหล อุณหภูมิ เพื่อแสดงถึงความสามารถของวิธีที่ยังสามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว

เป็นการศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะและสิ่งแวดล้อมของวิธี ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ในสภาวะปกติ

การประเมิน: คำนวณค่าพารามิเตอร์ของ system suitability test

37

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบความทนของวิธี

สภาวะของระบบโครมาโทกราฟี	ผลการทดสอบความทนของวิธี							
	Resolution	Retention time	Theoretical plates	Tailing factor	ปริมาณอะซีโทรมิซิน (มิลลิกรัม/หน่วย)			
					ค่าเฉลี่ย (n=3)	%RSD	ค่าเฉลี่ย	%RSD
HPLC column	No.1*	8.8	12.0	7330.5	1.09	245.2151	0.5	
	No.2	7.8	13.7	3587.9	0.92	249.2540	1.9	247.2346 1.16
pH ของ buffer	8.15	8.4	12.5	7397.8	1.02	246.0023	1.6	
	8.20*	8.8	12.0	7330.5	1.09	245.2151	0.5	247.0882 1.05
	8.25	8.2	11.8	5825.1	1.17	250.0471	0.6	
อุณหภูมิของ column	45	10.6	12.7	7981.7	1.05	246.2101	1.5	-
	50*	8.8	12.0	7330.5	1.09	245.2151	0.5	246.3080 0.46
	55	8.1	11.2	6695.5	1.05	247.4988	0.6	-
Flow rate (ml/minute)	1.4	9.8	12.8	10267.9	1.05	249.4342	0.0	-
	1.5*	8.8	12.0	7330.5	1.09	245.2151	0.5	247.8088 0.92
	1.6	9.9	11.3	7556.0	0.99	248.7771	0.2	-
ACN/MeOH/Sol.A	19:40:41	10.2	15.6	8590.0	0.94	247.1461	0.7	-
	21:40:39*	8.8	12.0	7330.5	1.09	245.2151	0.5	246.3427 0.41
	23:40:37	8.0	10.0	6284.1	1.05	246.6668	0.6	-

* หมายถึง สภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่ทำการตรวจสอบความถูกต้อง

Ref วิภาพรรณ ไสยสมบัติและคณะ. การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์อะซีโทรมิซิน ในรูปแบบยาแคปซูลและยาผงสำหรับเตรียมเป็นยาน้ำแขวนตะกอน. สำนัทยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

38



Ref. ศึกษาเพิ่มเติม

1. USP
2. ICH Q2A (R1)
3. AOAC
4. Eurachem Guide the fitness for purpose of analytical methods
5. ASEAN Harmonization of Standards and Technical Requirements for Pharmaceutical