สำนักงานทดสอบ

แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์: ตัวอย่างทางชีววัตถุโดยห้องปฏิบัติการเดียว

A Practical Guide for Single Laboratory: Validating Methods for Bioanalytical Samples

นิทรา เนื่องจำนงค์

สำนักวิทยบริการฯ
QH
321
น๕๑๒น
๒๕๕๑

ศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

กรกฎาคม 2559

คำนำ

เอกสารแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์: ตัวอย่างทางชีววัตถุโดยห้องปฏิบัติการเดียว (A Practical Guide for Single Laboratory: Validating Methods for Bioanalytical Samples) เขียนขึ้นมาเพื่อใช้เป็นแนวทางในการจัดทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในตัวอย่างชีววัตถุ เช่น ยา ในเลือด พลาสมา ปัสสาวะ หรือชีววัตถุอื่นๆ ให้ไปตามเกณฑ์มาตรฐานสากล ตามข้อกำหนดขององค์การอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา และข้อกำหนดของกลุ่มประเทศยุโรป ทั้งนี้เพื่อลดการผิดพลาด และครอบคลุมช่วงที่จะใช้งาน การทำอย่างรัดกุมและเคร่งครัดจะลดความผิดพลาดที่จะเกิดเมื่อปฏิบัติจริงเพราะตัวอย่างทางชีววัตถุเป็นตัวอย่างที่ต้องผ่านกระบวนการขอจริยธรรมการทดลองในมนุษย์หรือสัตว์ทดลอง ปริมาณตัวอย่างมีปริมาณน้อยบางครั้งไม่สามารถทำซ้ำได้อีก และข้อมูลที่ได้มีความสำคัญต่อการใช้ยาในคน หรือการขึ้นทะเบียนยาใหม่

เนื้อหาประกอบด้วยขั้นตอนการเตรียมก่อนเริ่มการทดสอบความถูกต้องของวิธี (pre-validation) การทดสอบความถูกต้องของวิธี (method validation) ประกอบด้วย หัวข้อที่ต้องทำและเกณฑ์ยอมรับ การจัดทำรายงาน การนำวิธีไปใช้ทดสอบจริง สำหรับหัวข้อที่ต้องทำและเกณฑ์ยอมรับ ได้จัดทำเป็นภาษาอังกฤษ เพื่อให้นิสิตต่างชาติระดับปริญญาโทและเอกของมหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ทำวิจัยเกี่ยวกับตรวจหาระดับยาหรือสารออกฤทธิ์ในชีววัตถุได้ใช้ โดยอยู่ในภาคผนวก ข เอกสารนี้ได้นำไปใช้แล้วกับโครงการวิจัย 2 เรื่อง ได้ผลงานวิทยานิพนธ์ 3 เล่ม ของนิสิตปริญญาเอก มหาวิทยาลัยนเรศวร 1 เรื่อง นิสิตปริญญาโท มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2 เรื่อง

แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์: ตัวอย่างทางชีววัตถุโดยห้องปฏิบัติการเดียว เป็นความรู้ที่ผู้เขียนได้เรียนรู้และใช้ปฏิบัติในการตรวจวิเคราะห์ระดับยาต้านมาลาเรียในตัวอย่างทางชีววัตถุ เช่น เลือด พลาสมา ปัสสาวะ และกระดาษซับเลือด ผลการวิเคราะห์ที่ได้เป็นข้อมูลที่องค์การอนามัยโลกนำไปใช้ในการควบคุมโรคมาลาเรีย ขณะที่ปฏิบัติงานวิจัยที่ หน่วยวิจัยโรคเขตร้อนมหิดล-อ็อกซ์ฟอร์ด ประโยชน์ของหนังสือเล่มนี้ขออุทิศให้ Dr. Niklas Lindegardh (1976 – 2012) หน่วยวิจัยโรคเขตร้อนมหิดล-อ็อกซ์ฟอร์ด สำหรับการได้ทำงานร่วมกัน

นิทรา เนื่องจำนงค์

บทสรุปผู้บริหาร

เอกสารแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์: ตัวอย่างทางชีววัตถุโดยห้องปฏิบัติการเดียว (A Practical Guide for Single Laboratory: Validating Methods for Bioanalytical Samples) ได้จัดทำขึ้นเพื่อให้ผู้ใช้สามารถปฏิบัติตาม ตามขั้นตอนที่ถูกต้องและครอบคลุมตามข้อกำหนดขององค์การอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา ในการทดสอบยาหรือสารออกฤทธิ์ในตัวอย่างชีววัตถุ สำหรับการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ หรือพิษจลนศาสตร์ โดยการหาปริมาณระดับยาหรือสารพิษ ในตัวอย่างของเหลวจากคนหรือสัตว์ทดลอง ได้นำข้อกำหนดมาจัดทำเป็นแนวทางในการเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ พารามิเตอร์ที่ต้องทำ เกณฑ์การยอมรับ และการแปลผล การวิเคราะห์ตัวอย่าง การบันทึกและจัดทำเอกสาร

นอกจากนี้ได้กล่าวถึงการพัฒนาวิธีทดสอบก่อนเริ่มกระบวนการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (pre-validation) เช่น การเตรียมตัวอย่าง การเลือก sorbent ที่เหมาะสมในการแยกสาร การเลือกใช้ internal standard เทคนิคการแยกสารและตรวจวัดโดยใช้มวลโมเลกุลของสาร (LC-MS) ที่เหมาะกับการหาสารปริมาณต่ำระดับนาโนกรัมหรือต่ำกว่า มีความจำเพาะต่อสารที่ทดสอบ

ในภาคผนวก ข ได้สรุปวิธีทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างทางชีววัตถุ และเกณฑ์กำหนดเป็นภาคภาษาอังกฤษ เพื่อให้นิสิตต่างชาติระดับปริญญาโทและปริญญาเอกได้ใช้เป็นคู่มือในการทำงานวิจัย

สารบัญ

บทที่		หน้า
คำนำ		ก
บทสรุปผู้บริหาร		ข
1	บทนำ	1
	หลักการและเหตุผล	1
	วัตถุประสงค์	2
	ขอบข่ายการดำเนินการ	2
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
3	กระบวนการเตรียมความพร้อมก่อนเริ่มการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	5
	ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง สารเคมีที่จะใช้ในการทดสอบ	5
	การปรับค่าพารามิเตอร์ของเครื่อง	6
	การพัฒนาวิธีทดสอบ	7
	การทดสอบการแทรกสอดสัญญาณจากสิ่งเจือปนในตัวอย่าง	10
	การศึกษาค่าพารามิเตอร์ของการทำการทดสอบวิธีเบื้องต้น	12
4	พารามิเตอร์ที่ตรวจวัด ความหมาย วิธีทำ เกณฑ์กำหนด	13
	พารามิเตอร์ที่ต้องตรวจวัด	13
	เกณฑ์ยอมรับ	16
5	การนำวิธีที่ทดสอบไปวิเคราะห์ตัวอย่างจริง	17

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
6	สรุปและวิจารณ์	21
	เอกสารอ้างอิง	22
	ภาคผนวก	24
	ประวัติผู้เขียน	36

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ส่วนประกอบของเครื่องวัดมวลโมเลกุล ก) ส่วนที่ทำให้โมเลกุลเกิดประจุชนิด electrospray และ ข) ส่วนวัดมวลโมเลกุลชนิด triple quadrupole tandem mass spectrometer (ภาพจากเอกสารการอบรม Basic Operation Training to LC-MS-MS API 4000; Applied Biosystems/MDS SCIEX, CA).....	9
2	การวิเคราะห์มวลโมเลกุลแบบ multiple reaction monitoring (MRM) ก) รูปแบบการแตกตัวของสารแบบ MRM ข) แสดงการแตกตัวของสารตั้งต้นเป็นไอออน และการทำเลือกคู่ไอออนมาทำ MRM ตัวอย่างยา famotidine *m/z* 338.3, MRM1 338.3 ⟶ 188.8, MRM2 338.3 ⟶ 259.2 amu (รูปที่ 2 ก ภาพจากเอกสารการอบรม Basic Operation Training to LC-MS-MS API 4000; Applied Biosystems/MDS SCIEX, CA).....	10
3	Schematic overview of the two commonly used methods to assess matrix effects in LC-MS/MS. (a) The post-column infusion method. The dashed line represents the signal of the analyte. The full line is obtained when injecting blank matrix. The arrow indicates the region of ion suppression; (b) the post-extraction spike method. The dashed peak represents the standard in neat solution. The full peak is obtained with standard spiked in matrix post-extraction. A clear reduction of the peak area is observed, which indicates ion suppression.....	11

บทที่ 1

บทนำ

หลักการและเหตุผล

การวิเคราะห์ตัวอย่างทางชีววัตถุเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณยาหรือสารที่เกิดจากการสลายตัวของยา เมื่อยาเข้าสู่ร่างกาย หรือสารออกฤทธิ์อื่นๆ ตัวอย่างทางชีววัตถุ จะหมายถึง ตัวอย่างเลือด พลาสมา ซีรั่ม ปัสสาวะ หรือน้ำจากไขสันหลัง จากคนหรือสัตว์ทดลอง การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เป็นกระบวนการที่แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ที่จะใช้ในการหาปริมาณตัวยานั้นมีความถูกต้อง ตรงตามวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัย และครอบคลุมในช่วงการตรวจวัดที่จะทำในตัวอย่างจริง และมีความสม่ำเสมอเมื่อทำซ้ำ มีความแม่นยำและความเที่ยงในทุกครั้งที่ทำการตรวจวัด การทดสอบความถูกต้องของวิธีอย่างเคร่งครัดและครบถ้วนตามเกณฑ์กำหนดจะลดความเสี่ยงจากความความผิดพลาดในการตรวจวัด และผลการวิเคราะห์ออกนอกช่วงการทดสอบเมื่อนำวิธีนั้นไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างจริง ซึ่งจะทำให้สูญเสียทรัพยากรจำนวนมหาศาล

การวิเคราะห์ตัวอย่างทางชีววัตถุจะไม่เหมือนการวิเคราะห์ในตัวอย่างเม็ดยาหรือสารอื่นๆที่เป็นงานควบคุมคุณภาพ เพราะตัวอย่างทางชีววัตถุจะมีสารอื่น (matrix) เช่น โปรตีนหรือฟอสโฟไลปิดที่ตัวยาไปเกาะติด ซึ่งจะมีผลต่อการสกัดแยกสารออกมา หรือบางครั้งพวก matrix เหล่านี้ก็แทรกสอดในช่วงการตรวจวัดทำให้วัดปริมาณได้น้อยลงหรือมากขึ้นจากความเป็นจริง และความแตกต่างอีกประการหนึ่งคือช่วงความเข้มข้นของสารที่หาจะห่างกันหลายเท่า ตั้งแต่ปริมาณน้อยจนปริมาณสูงมาก 10 – 1,000 เท่า เพราะการให้ยาจะตรวจติดตามปริมาณยาในเลือดที่ช่วงเวลาต่างๆ ตั้งแต่ให้ยาจนถึงการดูดซึมสูงสุด และการขับยาออกจากร่างกาย ตลอดจนการเปลี่ยนรูปของยา เมื่อเข้าสู่ร่างกาย

ข้อมูลที่ได้จะนำไปใช้ในการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) ชีวสมมูล (bioequivalence) หรือชีวประสิทธิผล (bioavailability) พิษจลนศาสตร์ (toxicokinetics) ซึ่งจะนำไปประกอบการพิจารณาขึ้นทะเบียนยาใหม่ หรือกำหนดการใช้ยาในผู้ป่วย

การจะได้มาซึ่งตัวอย่างจะต้องผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรม ตัวอย่างที่เก็บได้จากอาสาสมัครหรือสัตว์ทดลองจะมีปริมาณน้อยพอเพียงต่อการวิเคราะห์ครั้งเดียว ถ้าเกิดความผิดพลาดก็จะสูญเสียข้อมูลที่สำคัญ ดังนั้นการได้ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีอย่างเต็มรูปแบบจะลดความผิดพลาดที่จะเกิดขึ้น

วัตถุประสงค์

เพื่อใช้เป็นแนวทางในการทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในการวิเคราะห์ตัวอย่างทางชีววัตถุ สำหรับนิสิตระดับปริญญาโทและปริญญาเอกที่ทำวิจัย และผู้ที่ปฏิบัติงานการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทางชีววัตถุ

ขอบข่ายการดำเนินการ

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างทางชีววัตถุ ในที่นี้จะกล่าวถึงตั้งแต่การเตรียมการตรวจวิเคราะห์ (pre-validation) และขั้นตอนการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) เกณฑ์การยอมรับ และแบบรายงานผล โดยการตรวจวิเคราะห์จะใช้เทคนิคการแยกทาง chromatography และใช้การตรวจวัดมวลโมเลกุลของสาร (LC-MS) อ้างอิงมาตรฐานและเกณฑ์กำหนดจากองค์การอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา (US FDA) และกลุ่มประเทศยุโรป European Medicines Agency (EMA)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างทางชีววัตถุ จะเป็นขั้นตอนที่ใช้เวลาและค่าใช้จ่ายสูงมาก และต้องปฏิบัติตามข้อบังคับ หรือเกี่ยวข้องกับข้อกำหนดของแต่ละประเทศในการกีดกันทางการค้า ดังนั้นเมื่อมีการจัดทำวิธีการทดสอบความถูกต้องของวิธีและมีขั้นตอนการทำและบันทึกข้อมูลอย่างถูกต้องตามเกณฑ์มาตรฐานสากล จะเป็นข้อมูลหลักฐานแสดงให้ผู้เกี่ยวข้องทราบว่าระบบ การทดสอบ เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบ ควบคุมตามมาตรฐาน และอยู่ในขอบข่ายที่ใช้จริง และในระดับผู้ปฏิบัติงานมีความมั่นใจว่าผลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์มีความถูกต้องแม่นยำ นำไปใช้ต่อได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างทางชีววัตถุ มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินว่ากระบวนการวิเคราะห์ที่จัดทำขึ้น ก่อนที่จะนำไปทดสอบกับตัวอย่างจริง มีความถูกต้องและความแม่นเมื่อทำซ้ำ อยู่ในช่วงที่จะทดสอบจริง หัวข้อพื้นฐานที่ต้องทดสอบได้แก่ ความถูกต้อง (accuracy) ความแม่น (precision) ความจำเพาะต่อสารที่ทดสอบ (selectivity) ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีจะตรวจวัดได้ (sensitivity)ในระดับต่ำสุดที่สามารถตรวจพบ (limit of detection: LOD) ระดับต่ำสุดที่สามารถวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation: LOQ) ความแม่นของวิธีเมื่อวิเคราะห์ซ้ำกันในสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน (reproducibility) และความคงตัวของตัวอย่าง (sample stability) นอกจากนี้ ยังมี ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและช่วงความเข้มข้นที่จะวิเคราะห์ (linear range) การแทรกสอดของสารอื่นต่อสารที่จะวิเคราะห์ (matrix effect) [1] หัวข้อเหล่านี้ทุกห้องปฏิบัติการต้องจัดทำการทดสอบให้แป็นไปตามเกณฑ์กำหนดก่อนที่จะนำไปใช้ในการศึกษาทางคลินิก ขบวนการทำทุกอย่างต้องบันทึกและจัดทำเป็นเอกสารเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

การวิเคราะห์ทางชีววัตถุ จะเน้นไปที่การวิเคราะห์ปริมาณยา และยาที่เปลี่ยนรูปเมื่อเข้าสู่ร่างกาย(metabolite) ของมันที่อยู่ในพลาสมาหรือปัสสาวะ หรือชีววัตถุอื่นๆ ในปี ค.ศ. 2001 US FDA [1] ได้ออกข้อกำหนด (guideline) สำหรับเป็นแนวทางในการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างทางชีววัตถุ ต่อมาในปี ค.ศ. 2009 กลุ่มประเทศทางยุโรปได้ออกข้อกำหนดขึ้นมาโดยเพิ่มรายละเอียดเกี่ยวกับการเจือจางตัวอย่างที่ความเข้มข้นสูงที่ออกนอกช่วงกราฟมาตรฐาน (dilution integrity) การวิเคราะห์ซ้ำในตัวอย่างที่ได้วิเคราะห์ไปแล้วเพื่อตรวจสอบความทำซ้ำของวิธี (Incurred sample reanalysis) [2] ในปี ค.ศ. 2013 US FDA [3] ได้ออกข้อกำหนดฉบับร่างให้ผู้ใช้ได้เสนอแนะความคิดเห็น มีเนื้อหาที่เพิ่มจากฉบับปี ค.ศ. 2001 ในเรื่อง incurred sample reanalysis เพื่อดูความแม่นเมื่อทำซ้ำ (reproducibility) และเพิ่มการทดสอบความคงตัวขณะรอวิเคราะห์ (bench top stability)

หลังจาก US FDA ได้ออกข้อกำหนดในปี ค.ศ. 2001 ขึ้นมา ประเทศต่างๆ ก็จัดทำข้อกำหนดของตัวเอง ซึ่งมีข้อย่อยแตกต่างกัน จนมีผู้เสนอให้มีการรวบรวมและจัดทำให้เป็นมาตรฐานเดียวกันใหม่

ในข้อกำหนดของประเทศบราซิล ที่ต่างจาก US FDA ในการทดสอบความจำเพาะของวิธี (selectivity) จะใช้ตัวอย่างจาก 6 แหล่ง โดยที่ 4 ตัวอย่างมาจากคนปกติ 1 ตัวอย่างมีไขมัน อีก 1 ตัวอย่างเม็ดเลือดแดงแตก และสารมาตรฐาน internal standard ที่ใช้ต้องมีใบแสดงรายละเอียดแหล่งผลิต ความบริสุทธิ์ และเกณฑ์กำหนด ข้อกำหนดของประเทศแคนาดาให้ทดสอบ accuracy, precision, quality control และบันทึกผลในการทดสอบแต่ละครั้ง ก่อนเริ่มการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ประเทศจีน องค์การอาหารและยาของประเทศ (state food and drug administration (SFDA) ได้ออกข้อกำหนดการเป็นห้องปฏิบัติการที่ดี ใช้กับการทดสอบทางเภสัชจลนศาสตร์สำหรับตัวอย่างที่ไม่ใช่คน ในปี ค.ศ. 2005 ข้อแนะนำการทดสอบวิธีวิเคราะห์ทางชีววัตถุจะเหมือนกับของสหรัฐอเมริกาและยุโรป ไม่ได้กำหนดเกณฑ์การยอมรับ และทดสอบวิธีบางพารามิเตอร์สำหรับตัวอย่างมาจากสัตว์ต่างชนิดกัน เช่น หนู rat หรือ หนู mice

ในญี่ปุ่นมีข้อกำหนดทางการเป็นห้องปฏิบัติการที่ดี (Good Laboratory Practice; GLP) แต่ไม่มี GLP เฉพาะสำหรับการวิเคราะห์สารจากตัวอย่างชีววัตถุ [4] สำหรับประเทศไทย สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาให้ใช้ ASEAN Guidelines for the Conduct of Bioavailability and Bioequivalence Studies และคู่มือการศึกษาชีวประสิทธิผลและชีวสมมูลของผลิตภัณฑ์ยา เป็นคู่มือและแนวทางปฏิบัติในการศึกษาชีวประสิทธิผลและชีวสมมูลของผลิตภัณฑ์ยา [5]

บทที่ 3

กระบวนการเตรียมความพร้อมก่อนเริ่มการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Pre-Validation)

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์จะทำเมื่อวิธีที่จะใช้ทดสอบนั้นพัฒนาขึ้นมาใหม่ หรือวิธีที่มีอยู่เดิมแต่ทำการปรับปรุงหรือขยายขอบเขต หรือเมื่อผลจากการทำการควบคุมคุณภาพแสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นวิธีทดสอบนั้นๆ หรือการนำไปใช้ในแลปอื่นโดยนักวิเคราะห์คนอื่นหรือเครื่องมือที่ใช้แตกต่างออกไปจากเดิม หรือเพื่อแสดงให้เห็นถึงความเท่าเทียมกันของวิธีสองวิธี หรือมีการเปลี่ยนแปลงเครื่องมือหลัก หรือใช้สารมาตรฐานต่าง batch กัน หรือเมื่อนำวิธีทดสอบเก่าๆ ที่ได้รับการตรวจสอบความใช้ได้มาใช้อีกครั้ง

ก่อนที่จะเริ่มการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างทางชีววัตถุ จะประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง และสารเคมีที่จะใช้ในการทดสอบ

ตัวอย่างชีววัตถุที่เก็บมาแล้วต้องติดฉลากระบุรายละเอียด บันทึกลักษณะที่ต่างจากปกติ เช่นตัวอย่างพลาสมามีเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) หรือมีไขมัน (lipidemia) เก็บตัวอย่างในที่ที่เหมาะสม (-80 °C) บันทึกอุณหภูมิ ในส่วนการวิเคราะห์ต้องทราบมวลโมเลกุลของสารที่จะตรวจวัด คุณสมบัติในการละลาย เลือกสารที่ใช้ทำ internal standard (สารที่มีคุณสมบัติคล้ายกับสารที่จะวิเคราะห์หาเติมลงไปใน ตัวอย่างและเติมลงในสารมาตรฐานที่จะวิเคราะห์ในความเข้มข้นเดียวกัน ใช้เพื่อลดความผิดพลาดจากการเตรียมตัวอย่าง) ที่มีสมบัติสอดคล้องกับสารที่จะตรวจวัด โดยศึกษาจากค่าการละลาย (LogD) ทดสอบหาปริมาตรของตัวอย่างที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่าง เลือกวิธีการสกัดที่เหมาะสม เช่นการตกตะกอนโปรตีน หรือใช้สารอินทรีย์ในการสกัดสารออกจากตัวอย่าง หรือใช้เทคนิค solid phase extraction (SPE) ซึ่งมีหลายแบบขึ้นกับสารที่เราจะวิเคราะห์ นิยมใช้เพราะสามารถขจัดสารที่ไม่ต้องการออก และสามารถเพิ่มความเข้มข้นได้ นอกจากนี้จะมีการสกัดเฉพาะสารที่มีผลต่อการเพิ่มหรือลดสัญญาณการตรวจวัดของ mass spectrometer (MS) เช่น สารพวกฟอสโฟไลปิด การเลือกวิธีสกัดที่เหมาะกับสารของเราสามารถศึกษาจากงานวิจัยที่ตีพิมพ์ หรือบริษัทที่จำหน่ายผลิตภัณฑ์นั้นๆ

1. สารมาตรฐาน 1 (Reference Standard)

สารที่จะใช้เป็นสารมาตรฐานในการทำกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบปริมาณกับสารที่จะวิเคราะห์ (calibrator) ต้องเลือกสารที่มีความบริสุทธิ์สูง มีใบรับรอง (COA (certificate of analysis) ระบุวันหมดอายุหรือวันที่ retest การเตรียม ให้ชั่งน้ำหนักแน่นอน ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ ไม่ควรจะมีการเจือจางหลายขั้นตอนเพื่อลดการผิดพลาดของ pipette ที่ใช้ คำนึงถึงค่าการละลายของสารด้วย เลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ถ้าละลายในตัวทำละลาย เช่น methanol/ethanol ให้คำนึงถึงการระเหยของตัวทำละลายเมื่อเก็บไว้ การเตรียมทำกราฟมาตรฐานต้องเตรียมความเข้มข้น 6 – 8 ความเข้มข้นในตัวอย่างที่เหมือนกับตัวอย่างจริงที่เราจะวิเคราะห์ การเติม (spike) ลงในตัวอย่างปริมาตรไม่ควรเกิน 5% ของปริมาณทั้งหมดเพื่อป้องกันการตกตะกอนโปรตีนโดยเฉพาะสารที่เตรียมใน methanol หรือ acetonitrile [6]

2. สารมาตรฐาน 2 (Internal Standard: IS)

เป็นสารมาตรฐานอีกตัวหนึ่งที่เติมลงในตัวอย่างที่ทำกราฟมาตรฐานและตัวอย่างที่จะวิเคราะห์จริง เติมก่อนเริ่มการสกัด เพื่อใช้ควบคุมความผิดพลาดในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างหรือการตรวจวัด โดยทั่วไปจะต้องมีคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีเหมือนกับตัวอย่างที่เราจะหา วิธีทาง LC-MS จะใช้สาร isotope เช่น deuterium (^{2}H หรือ D), carbon-13 (^{13}C), nitrogen-15 (^{15}N) และ oxygen-18 (^{18}O) ของสารที่จะวิเคราะห์โดยมีมวลมากกว่า3หน่วยขึ้นไป ถ้าไม่สามารถหาได้ให้ใช้สารอื่นที่มีสมบัติใกล้เคียงกันโดยศึกษาจากค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวระหว่างชั้นน้ำกับชั้นอินทรีย์ (distribution coefficient: LogD) การเตรียมจะใช้ความเข้มข้นเดียวที่ให้สัญญาณประมาณ 10 – 50 เท่าของค่าต่ำสุดของสารที่จะวิเคราะห์ (LLOQ) การเตรียมทำเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน สารมาตรฐาน (IS) จะเติมลงในทุกตัวอย่างที่วิเคราะห์รวมทั้งสารมาตรฐาน calibrator และ QC การคำนวณจะใช้อัตราส่วนพื้นที่ของสารที่วิเคราะห์/พื้นที่ของ IS สารมาตรฐานความเข้มข้นต่างกันที่เตรียมกราฟมาตรฐานจะถูกวิเคราะห์ก่อนตามด้วย QC ชุดที่1 และตัวอย่าง กราฟมาตรฐานที่ได้ใช้สมการเส้นตรง 1^{st} degree polynomial; $y = mx + b$ ในกรณีที่มีความเข้มข้นต่ำถึงสูงจะใช้การ weighted least square $1/x$, $1/x^2$ %back calculated อยู่ในช่วงร้อยละ 80 – 120 ที่ความเข้มข้นที่ LLOQ ร้อยละ 85 – 115 ที่ความเข้มข้นอื่นๆ และสัมประสิทธิ์เชิงเส้น r^2 ใกล้ 1

การปรับค่าพารามิเตอร์ของเครื่อง

ให้สามารถตรวจวัดได้ในระดับต่ำสุด หรือในช่วงการทดสอบที่ต้องการ และไม่มีการแทรกสอดของสารอื่นที่ออกมาจากตัวอย่าง การแยกและการตรวจวัดในที่นี้จะกล่าวถึงเทคนิคทางโครมาโตกราฟฟีที่ทำการแยกและตรวจวัดด้วยมวลโมเลกุลของสาร (LC-MS) ก่อนที่จะเริ่มการทดสอบวิธี เครื่องมือจะต้องมีการตรวจเช็คและ calibrate ก่อน

เมื่อทราบว่าเราต้องการวิเคราะห์สารตัวใด อยู่ในตัวกลางอะไร เช่น เลือด พลาสมา ซีรั่ม ต้องเตรียมสารที่จะใช้เป็น internal standard (สารที่มีคุณสมบัติคล้ายกับสารที่จะวิเคราะห์หาเติมลงไปในตัวอย่างและเติมลงในสารมาตรฐานที่จะวิเคราะห์ในความเข้มข้นเดียวกัน) ช่วงความเข้มข้นที่จะหา พัฒนาวิธีการสกัด การแยก ทดสอบการแทรกสอดจากสารอื่นในตัวอย่างนั้น และทำการทดสอบเบื้องต้น

ตัวอย่างที่ต้องการจะวิเคราะห์ exogenous compounds (ยา) หรือ endogenous compounds (lipid steroids) ช่วงเวลาการเก็บ ประเภทตัวอย่างที่เก็บ การเกาะติดของยากับโปรตีนในเลือด ไขมันจะมีผลต่อการเกิดประจุของสารที่จะวัด ต้องศึกษาผลกระทบจากโปรตีนและไขมันที่มีต่อสารที่จะวิเคราะห์ หรือมีสารอื่นที่มีการแตกตัวแล้วให้ daughter ion เหมือนกัน (isotopomers)

การพัฒนาวิธีทดสอบ (Method Development)

ในการวิเคราะห์ทาง LC-MS ที่มี mass analyzer แบบ triple quadrupole จะเลือกมวลโมเลกุลตัวตั้งต้น (parent ion) และตัวที่ fragment ที่ให้ intensity สูง daughter ion จับคู่กัน ปรับสภาวะการแยกสารโดยใช้คอลัมน์ที่เหมาะสม (C18, C8, HILIC) ในการแยกสารต้องเลือกใช้คอลัมน์ให้เหมาะสม ส่วนใหญ่จะใช้ C18 นอกจากนี้ C4, C8, phenyl, phenyl-hexyl, HILIC ฯลฯ ความยาว และขนาดของคอลัมน์และขนาดของสารที่บรรจุในคอลัมน์ ควรใช้ guard column ป้องกันการอุดตัน หรือสิ่งสกปรกเข้าคอลัมน์ จะเลือกใช้ชนิดไหนควรมีการศึกษาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้หรือปรึกษากับผู้ขายคอลัมน์

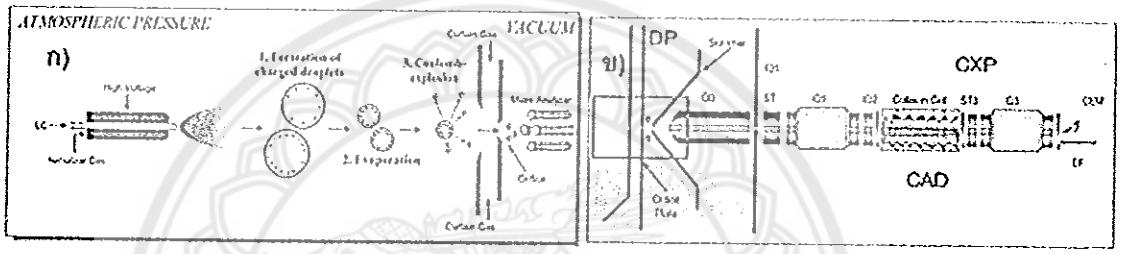
การแยกสารจะขึ้นกับสารและตัวชะสารออกจากคอลัมน์ ถ้าวิเคราะห์สารตัวเดียวก็ใช้การชะแบบอัตราส่วนคงที่ (isocratic) ถ้ามีสารที่วิเคราะห์หลายตัวก็ใช้แบบอัตราส่วนเปลี่ยนแปลงตามเวลา (gradient) โดยเพิ่มส่วนของสารอินทรีย์ให้มากขึ้น การแยกแบบ reverse phase สารที่มีขั้วจะออกมาก่อน การแยกแบบหลังนี้จะลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ ไม่มีการแทรกสอดของสารอื่น ณ จุดที่สารของเราออกมา เลือกและปรับสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ให้เหมาะสม สารละลายที่ใช้ต้องระเหยได้ เช่น น้ำ acetonitrile, methanol, ethanol ควรจะเป็นสารที่มีความบริสุทธิ์สูง เช่น LC-MS grade อาจมีการเติม formic acid หรือ acetic acid (0.01 – 1.0%) เพื่อเพิ่มการเกิดประจุ สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ ได้แก่ แอมโมเนียม ฟอร์เมท (ammonium formate) แอมโมเนียม อะซิเตต (ammounium acetate) และแอมโมเนียม ไฮดรอกไซด์ (ammonium hydroxide, 10 – 20 mM with ESI) ช่วยในการแยกสาร ในระบบ LC ความเป็นกรด-เบสของ mobile phase มีค่าเป็น ± 2 ยูนิต ของค่า pK_a ของสารที่จะแยก

การเกิดประจุแบบ positive หรือ negative ที่จะให้สัญญาณสูงสุด เริ่มแรกจะทดลองในสารละลาย neat solution ก่อน แล้วค่อยศึกษาในตัวอย่างจริงเพื่อดูการแทรกสอดของสารอื่นในตัวอย่างที่วิเคราะห์ เช่น โปรตีน ฟอสโฟไลปิด ถ้ามีให้ปรับสภาวะการแยกใหม่ หรือเตรียมตัวอย่างให้สามารถขจัดสารพวกที่กระทบต่อการวัดสารเราออก เช่น วิธีการตกตะกอนโปรตีน อาจจะไม่ดีเปลี่ยนมาใช้ solid phase extraction หรือวิธีอื่นที่ต้องดูปัจจัยอื่นๆ ประกอบ การเลือก ionization สามารถดูจากโครงสร้างของสารถ้ามี –OH, acidic compounds จะชอบให้โปรตอนออกไปจะทำใน negative mode (deprotonated) ถ้าชอบที่จะรับโปรตอน เช่นสารที่มี N จะทำ positive mode basic compounds (protonnated) แต่สามารถทดสอบโดยเลือกแต่ละ mode ดูแล้วค่อยเลือกใช้ mode ไหน ปรับค่าต่างๆ ที่ ion source เพื่อให้สารเกิดประจุได้มากที่สุด สัญญาณการตรวจวัดจะได้สูง เช่น ค่า declustering potential (DP) entrance potential (EP) ซึ่งจะมีผลต่อสัญญาณของ precursor ion (analyte and IS), collision energy (CE) และ exit potential (CXP) ซึ่งจะมีผลต่อสัญญาณของ product ion การปรับค่าที่ ion source ตั้งอุณหภูมิที่จะทำให้สารละลายตัวพา (mobile phase) ระเหย และความสูงของ probe และอัตราการไหล ของสารจาก LC เข้าสู่ ion source การไหลของแก๊สที่ช่วยให้ mobile phase ระเหย ตั้งค่าการเก็บข้อมูล Dwell time (points across a peak 10 – 20) วิเคราะห์สารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ พร้อมกับ internal standard ในสารละลายก่อน แล้วประเมินดูว่าได้กราฟเป็นเส้นตรงหรือไม่ มีการปนเปื้อนของสารอื่น มีความไวในการตรวจวัดแค่ไหน สาร internal standard ที่ใช้มีความเหมาะสมหรือไม่ และควรจะใช้ความเข้มข้นเท่าไร ควรทำซ้ำหลายๆ ครั้งเพื่อเช็คความแม่นยำ

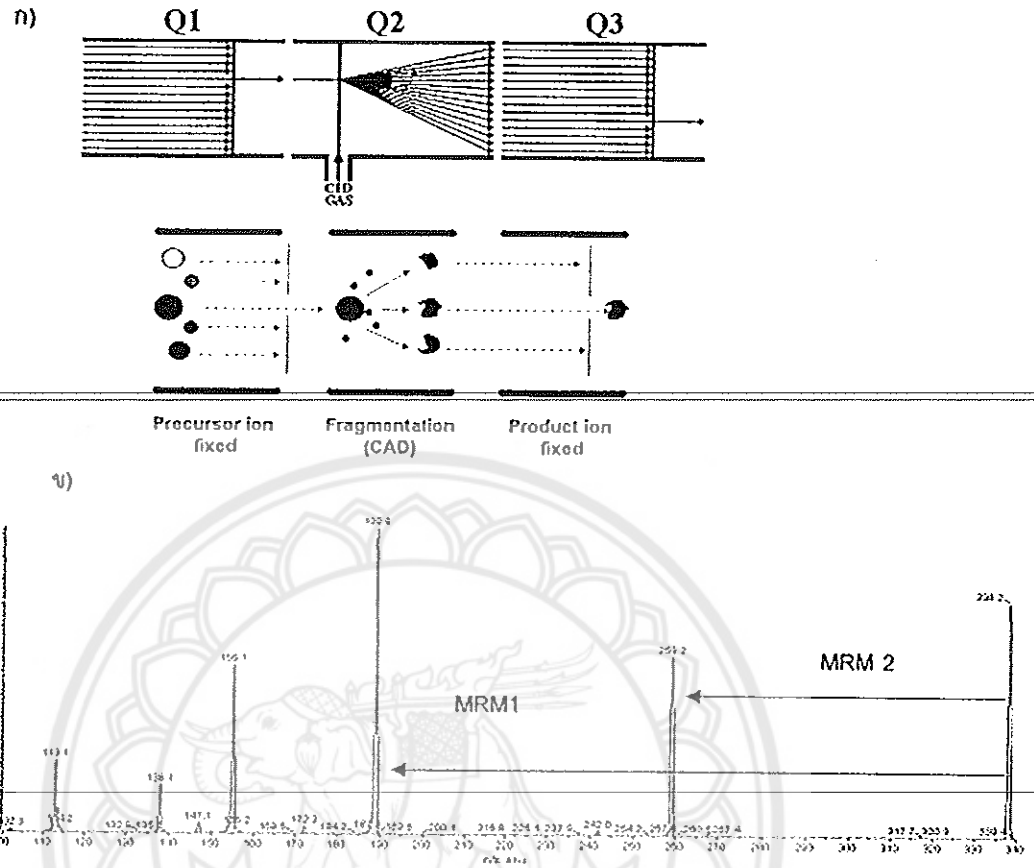
การวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยใช้เทคนิค LC-MS/MS จะนิยมใช้ mass analyzer แบบ triple quadrupole เพราะสามารถวิเคราะห์โดยใช้คู่มวลของสารตั้งต้น precursor Q1 และ product ion Q3 ปรับค่าให้ได้ความสูงของสัญญาณสูงสุด ทำให้สามารถวัดสารได้ในระดับต่ำ เช่น ยา famotidine 338.3 ⟶ 188.8 (precursor *m/z* 338.3 แตกตัวได้ product ion *m/z* 188.8) เช็คว่ามี adduct NH_4^+, Na^+, K^+ หรือ $HCOO^-$, Cl^- การเลือกคู่ ion product ion ไม่ควรเลือก ion ที่เกิดจากการ loss น้ำ (-18) หรือ adduct ถ้าทำ derivatize ไม่ควรเลือกมวลที่เกิดจากการ loss of derivative เป็นไปได้ให้เลือกคู่ 2 คู่ เพื่อใช้ยืนยันผลว่าเป็นสารตัวที่วิเคราะห์จริง

ส่วนประกอบของเครื่องวัดมวลโมเลกุล ประกอบด้วยส่วนที่ทำให้โมเลกุลเกิดประจุและส่วนวัดมวลโมเลกุล (รูปที่ 1) การตรวจวัดสารใช้การตรวจวัดมวลโมเลกุล และแบบการแตกตัวเป็นไอออนของโมเลกุล จำนวน 2 คู่ (Multiple reaction monitoring, MRM) (รูปที่ 2) การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจยาแต่ละชนิดทำโดยนำสารมาตรฐานตัวยาจากสารมาตรฐานตั้งต้น หรือ

สารละลายจากเม็ดยา เตรียมให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บรรจุในกระบอกฉีดขนาด 1 มิลลิลิตร และติดตั้งในปั๊ม (syringe pump) ปรับอัตราการไหล 5 ไมโครลิตร/นาที ต่อเข้ากับระบบของเครื่องตรวจวัดมวลโมเลกุล ปรับค่าพลังงานและความต่างศักย์ที่ใช้ในการแตกเป็นไอออนสำหรับสารแต่ละตัวเพื่อให้มีความเข้มของสัญญาณสูงสุด เมื่อได้ค่าที่เหมาะสมของการตรวจวัดตัวยาแต่ละชนิดแล้วนำค่าที่ได้มาสร้างวิธีวิเคราะห์ให้เชื่อมกับระบบการแยกตัวยาแต่ละชนิด สภาวะที่เหมาะสมของเครื่องวัดมวลโมเลกุล ซึ่งเครื่องแต่ละรุ่นจะมีความแตกต่างกัน และค่าที่เหมาะสมในการแยกและตรวจวัดของสารมาตรฐานยาแต่ละตัว [7]



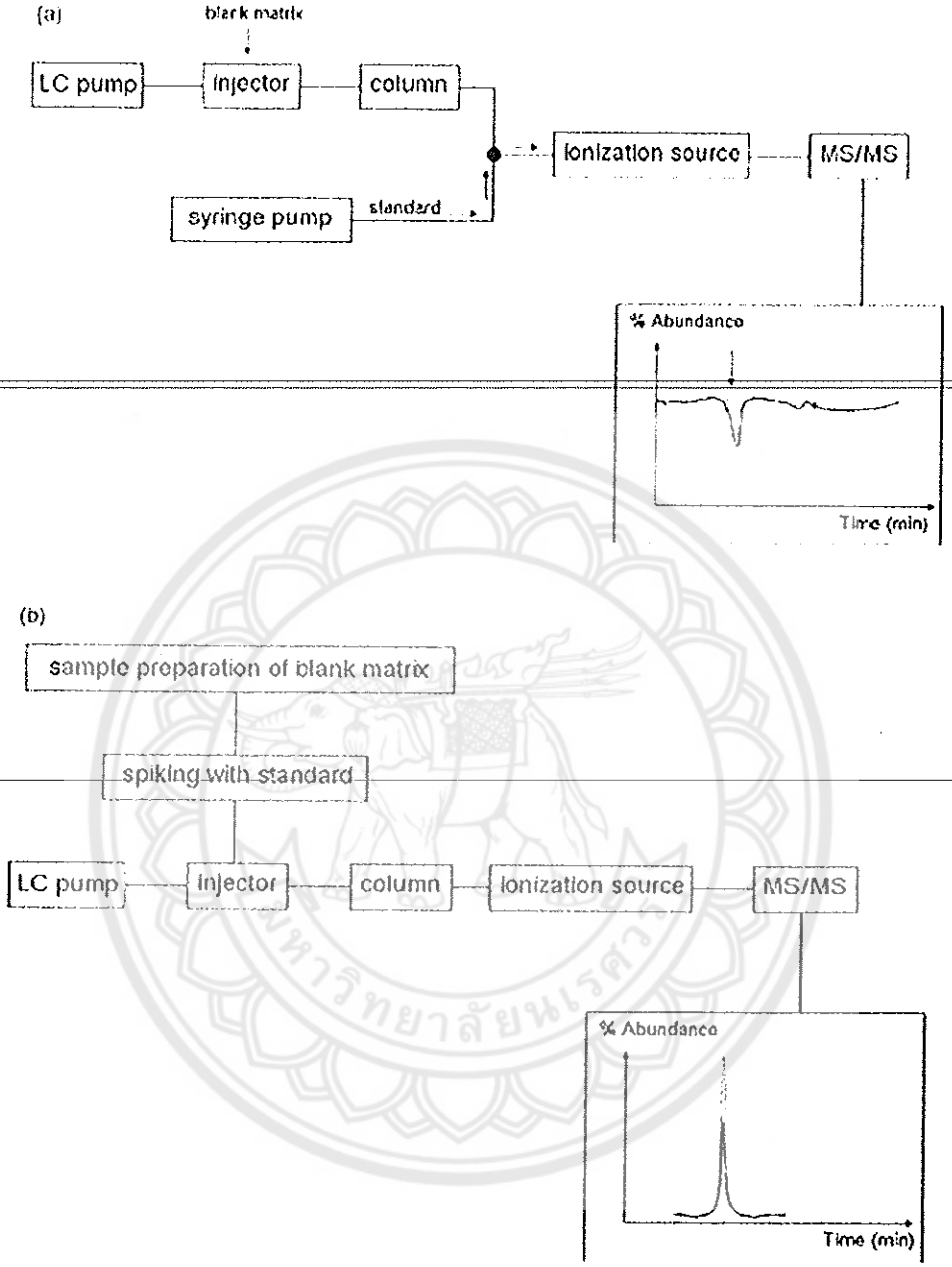
รูปที่ 1 ส่วนประกอบของเครื่องวัดมวลโมเลกุล ก) ส่วนที่ทำให้โมเลกุลเกิดประจุชนิด electrospray และ ข) ส่วนวัดมวล โมเลกุลชนิด triple quadrupole tandem mass spectrometer (ภาพจากเอกสารการอบรม Basic Operation Training to LC-MS-MS API 4000; Applied Biosystems/MDS SCIEX, CA)



รูปที่ 2 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลแบบ multiple reaction monitoring (MRM) ก) รูปแบบการแตกตัวของสารแบบ MRM ข) แสดงการแตกตัวของสารตั้งต้นเป็นไอออนและการทำเลือกคู่ไอออนมาทำ MRM ตัวอย่างยา famotidine *m/z* 338.3, MRM1 338.3 ⟶ 188.8, MRM2 338.3 ⟶ 259.2 amu (รูปที่ 2 ก ภาพจากเอกสารการอบรม Basic Operation Training to LC-MS-MS API 4000; Applied Biosystems/ MDS SCIEX, CA)

การทดสอบการแทรกสอดสัญญาณจากสิ่งเจือปนในตัวอย่าง (Matrix Effect Evaluation)

การทดสอบการแทรกสอดสัญญาณจากสิ่งเจือปนในตัวอย่างเป็นสิ่งสำคัญในการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS จะมีการทำได้ 2 แบบ ได้แก่ แบบเชิงคุณภาพ และแบบเชิงปริมาณ ในแบบเชิงคุณภาพจะใช้การฉีดสารที่จะวิเคราะห์เข้าไปในระบบในขณะที่ระบบทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ไม่มีสารที่จะวิเคราะห์อยู่(plasma blank) สังเกตสัญญาณที่เกิดขึ้น



รูปที่ 3 Schematic overview of the two commonly used methods to assess matrix effects in LC-MS/MS. (a) The post-column infusion method. The dashed line represents the signal of the analyte. The full line is obtained when injecting blank matrix. The arrow indicates the region of ion suppression; (b) the post-extraction spike method. The dashed peak represents the standard in neat solution. The full peak is obtained with standard spiked in matrix post-extraction. A clear reduction of the peak area is observed, which indicates ion suppression [8]

การทดสอบการแทรกสอดสัญญาณจากสิ่งเจือปนในตัวอย่างเชิงปริมาณ ใช้วิธีเติมสารที่จะวิเคราะห์ลงในตัวอย่างที่ผ่านการสกัดแล้ว (post-spike) เทียบกับสารในสารละลาย (neat solution) วิธีทำแสดงในรูปที่ 3

สำหรับการวิเคราะห์ LC-MS/MS ที่มี mass analyzer เป็นชนิดอื่น เช่น Q-TOF การปรับค่าพารามิเตอร์ของเครื่องให้สัญญาณสูงสุดให้ศึกษาจากคู่มือของเครื่องและตัวแทนผู้จำหน่าย

การศึกษาค่าพารามิเตอร์ของการทำการทดสอบวิธีเบื้องต้น

ทำการทดสอบพารามิเตอร์ ความถูกต้อง (accuracy) ความแม่น (precision) ความจำเพาะต่อสารที่ทดสอบ (selectivity) ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีจะตรวจวัดได้ (sensitivity) ในระดับต่ำสุด (limit of detection: LOD) ระดับต่ำสุดที่สามารถวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation: LOQ) ความแม่นของวิธีเมื่อวิเคราะห์ซ้ำกันในสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน (reproducibility) 5 วัน ใช้ความเข้มข้น 3 ระดับ ทดสอบอย่างน้อย 3 ซ้ำในแต่ละวัน ดูค่าความแม่น ความถูกต้อง carry over ถ้าผลไม่ผ่าน เช่น พีคกว้างให้ปรับค่า เช่น การเกิดประจุ เพิ่มปริมาตรตัวอย่าง ทั้งการฉีดและการเตรียมตัวอย่าง ปรับการเตรียมตัวอย่าง ดู matrix effect ถ้าได้พีคสมบูรณ์ เลือกคู่ mass ที่เสถียร (stable) และเริ่มการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ได้

บทที่ 4

พารามิเตอร์ที่ตรวจวัด ความหมาย วิธีทำ เกณฑ์กำหนด
(Method Validation)

วิธีทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างทางชีววัตถุ ปฏิบัติตามข้อกำหนดขององค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา [1] และนำข้อกำหนดมาจัดทำเป็นขั้นตอนในการวิเคราะห์ [6] ในที่นี้จะเป็นการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์มีพารามิเตอร์ที่ต้องปฏิบัติดังนี้

พารามิเตอร์ที่ต้องตรวจวัด

1. **ความจำเพาะเจาะจง** (Selectivity)

เป็นการวิเคราะห์เพื่อแสดงว่าองค์ประกอบอื่นที่อยู่ในสารที่เราจะวิเคราะห์หา เช่น ยาตัวอื่นๆ สารอื่นที่จากการสลายตัว โปรตีน ฟอสโฟไลปิด (phospholipids) จะไม่ส่งผลกระทบต่อสารที่จะวิเคราะห์หา

วิธีทำใช้ตัวอย่างจากคนปกติที่ไม่ได้รับยา (blank human biological) จำนวน 6 คน มาวิเคราะห์ตามวิธีที่ระบุแล้วตรวจดูว่าต้องไม่มีสัญญาณขึ้น ณ ตำแหน่งที่สารหรือ internal standard ถ้ามีสัญญาณต้องไม่มากกว่า 20% ของสัญญาณของความเข้มข้นต่ำสุดของวิธีที่ตรวจวัดได้ (20% LLOQ) หรือ 5% ของ IS ในเทคนิค LC-MS/MS จะต้องทำ matrix effect เพื่อดูว่าไม่มีสัญญาณแทรกสอด ณ ตำแหน่งที่สารจะวิเคราะห์

2. **การศึกษาผลกระทบจากการวิเคราะห์ครั้งก่อน** (Internal Standard and Analyte Carryover)

วิเคราะห์ความเข้มข้นสูงสุดแล้วตามด้วยตัวอย่างที่ไม่มียา (blank) peak area ของIS ต้องน้อยกว่า 0.1% สำหรับสารที่วิเคราะห์ (analyte) peak area น้อยกว่า 20% ของค่า LLOQ

3. **ความไว** (Sensitivity)

ขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of Detection and Quantitation)

3.1 **ขีดจำกัดการตรวจวัด** (Limit of Detection: LOD)

ขีดจำกัดการตรวจวัดคือระดับความเข้มข้นที่ให้สัญญาณเป็น 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Signal-to-noise > 3) เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่มียา (blank biological matrix) เป็นความเข้มข้นที่พบแต่ไม่สามารถหาปริมาณได้ถูกต้อง

3.2 **ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้วิเคราะห์เชิงปริมาณ** (Lower Limit of Quantitation: LLOQ)

ความเข้มข้นต่ำสุดที่จะสามารถตรวจวัดได้มีโดยความแม่น และถูกต้อง เตรียมความเข้มข้นต่ำสุด (LLOQ) วิเคราะห์ 5 ซ้ำในวันเดียวกัน ต้องเป็นความเข้มข้นที่เตรียมแยกจากความเข้มข้นที่ใช้เตรียมกราฟมาตรฐานแม้ว่าจะเป็นความเข้มข้นเดียวกัน คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ผิดพลาด (%relative error) ไม่เกิน 20% และ CV (coefficient of variation) คือ สัมประสิทธิ์ของความผันแปร น้อยกว่า 20%

3.3 ความเข้มข้นสูงสุดของวิธีที่จะวิเคราะห์ (Upper Limit of Quantitation: ULOQ)

ความเข้มข้นสูงสุดของการทำกราฟมาตรฐาน วิเคราะห์ 5 ซ้ำ คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ผิดพลาด ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ 15% ของค่าจริง (≤ 15% deviation from nominal value) น้อยกว่าหรือเท่ากับ 15% ในการวิเคราะห์ซ้ำ (≤ 15% variation between replicates: RSD)

4.ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ตรวจวัดจากการทำกราฟมาตรฐาน (calibration curves) โดยเตรียมสารให้มีความเข้มข้นต่างๆ ในช่วงที่จะทำกราฟมาตรฐาน ประกอบด้วย blank, blank + IS และความเข้มข้นต่างๆ 5 – 7 ความเข้มข้น เตรียมสารใหม่ทุกครั้งที่ทำ วิเคราะห์ 2 ซ้ำ เป็นเวลา 3 วัน คำนวณค่าสัดส่วนของสารกับ internal standard ใช้สมการเส้นตรงดูความเป็นเส้นตรงเลือกใช้ค่า weighting ที่ให้ค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้นใกล้ 1 (correlation coefficient ไม่ควรน้อยกว่า 0.995) คำนวณค่าความเข้มข้นของความเข้มข้นแต่ละค่าจากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้น back calculate ทุกความเข้มข้นมีค่าเบี่ยงเบนได้ 15% (%RE) ยกเว้นที่ความเข้มข้นต่ำสุดให้เบี่ยงเบนได้ 20%

5. **ความแม่นและความเที่ยง** (Accuracy and Precision)

ความแม่นและความเที่ยง ประเมินจากใช้สารมาตรฐานที่จะวิเคราะห์หาเติมลงในตัวอย่าง เช่น พลาสมา 4 ความเข้มข้น ที่ระดับ LLOQ QC1 (3LLOQ), QC2 (mid range), QC3 (75-80% ULOQ) วิเคราะห์ 5 ซ้ำ เป็นเวลา 3 วัน ความแตกต่างในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (intraday) และความแตกต่างระหว่างวัน (interday) ของความแม่น ใช้ %RE และความเที่ยงใช้ %CV ต้องไม่เกิน 15% ยกเว้น LLOQ ไม่เกิน 20%

6. **ตัวอย่างความเข้มข้นสูง** (Over Curve Samples)

เตรียมตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูงกว่ากราฟมาตรฐาน 2 – 10 เท่าของความเข้มข้นสูงสุด ทำการเจือจาง 5 – 20 เท่า ด้วยตัวอย่างที่ไม่มีสาร (blank biological matrix) วิเคราะห์ 5 ซ้ำ

ค่าแตกต่างต้องน้อยกว่า 15% เมื่อเทียบกับค่าจริง และน้อยกว่า 15% เมื่อเทียบกับการทำซ้ำ (dilution integrity)

7. **ค่าที่ได้จากการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่าง** (Recovery)

ประเมินจากใช้ QC sample QC1, QC2, QC3 หาความเข้มข้นเมื่ออยู่ในตัวอย่างที่เติมก่อนสกัด (pre spiked) และเติมหลังสกัด (post spiked) กับที่อยู่ในสารละลาย neat solution (100%) วิเคราะห์ 5 ซ้ำ ค่าไม่จำเป็นต้องได้ 100% แต่ต้องมีความแม่นในการทำซ้ำ

8. **ผลกระทบของสารอื่นต่อสารที่วิเคราะห์** (Matrix Effects)

8.1 **ปริมาณวิเคราะห์** (Quantitative)

เตรียมตัวอย่างความเข้มข้นต่ำ QC1 และ QC3 ที่เติม IS ลงในตัวอย่างที่สกัดจาก blank matrix sample จากอาสาสมัครที่ไม่ใช้ยา 6 คน (post spiked) เตรียมตัวอย่างความเข้มข้นต่ำ QC1 และ QC3 ที่เติม IS ลงในสารละลาย neat solution เปรียบเทียบค่าที่ได้

8.2 **คุณภาพวิเคราะห์** (Qualitative)

เตรียมตัวอย่างจากอาสาสมัครที่ไม่ได้รับยา 6 คน เตรียมสารมาตรฐานที่เติม IS ที่ความเข้มข้น ประมาณ 10 เท่าของความเข้มข้นต่ำสุด (10 LLOQ) นำสารมาตรฐานที่เติม IS เข้าเครื่อง MS ด้วนวิธี infuse โดยใช้ syringe pump ในขณะที่ตัวอย่าง blank matrix ที่ผ่านการสกัดถูกนำเข้าเครื่องผ่านทาง injection ของเครื่อง ดูสัญญาณที่เกิดขึ้นว่าเพิ่มขึ้น (enhancing) หรือลดลง (suppression)

9. **ความคงตัวของสารทดสอบ** (Stability)

9.1 **สารละลายมาตรฐาน** (Stock Solution Stability at Ambient Temperature)

เก็บสารละลายมาตรฐานไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. วิเคราะห์เทียบกับที่เตรียมใหม่ วิธีทำให้เตรียมความเข้มข้น ในช่วงที่เหมาะสม แล้วเตรียมที่ 80 และ 120% ของความเข้มข้นแรก ทำ 3 ซ้ำ ค่าที่ได้มีความแตกต่างไม่เกิน 15% ของค่าจริง

9.2 **สารละลายมาตรฐานเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C หรือ -80 °C** (Stock Solution Stability at Cold Storage)

เก็บสารละลายมาตรฐานไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C หรือ -80 °C ในเวลาที่กำหนด เช่น 1 วัน นำมาวิเคราะห์เทียบกับที่เตรียมใหม่ เตรียมความเข้มข้นในช่วงที่เหมาะสม แล้วเตรียมที่ 80 และ 120% ของความเข้มข้นแรก ทำ 3 ซ้ำ ค่าที่ได้มีความแตกต่างไม่เกิน 15% ของค่าจริง

9.3 Freeze/Thaw in Biological Matrix, 3 Cycles

ใช้ QC1 และ QC3 ที่เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 °C ละลายแล้ววิเคราะห์ เป็น 1 cycle เอาตัวอย่างที่ละลายแล้วไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 °C แล้วนำมาทำให้ละลาย แล้วนำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 °C แล้วนำมาละลาย ครั้งที่ 3 วิคราะห์ ทำ 3 ซ้ำ ค่าที่ได้มีความแตกต่างไม่เกิน 15% ของค่าครั้งที่ 1

9.4 Short Term Stability in Biological Matrix

ใช้ QC1 และ QC3 ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C, อุณหภูมิห้อง, 23 °C และ 60 °C (ฆ่าไวรัส) วิเคราะห์ทันที และทิ้งไว้ตามเวลา (1 – 24 ชม.) เทียบผลที่ได้ มีความแตกต่างไม่เกิน 15%

9.5 Short Term Stability for Biological Sample Ready for Extraction (If Applicable)

ใช้ QC1 และ QC3 เตรียมตัวอย่างแล้ววัดทันที เทียบกับตั้งทิ้งไว้ที่เวลาต่างๆ เช่น 4 – 24 ชม. เทียบค่า ต่างกันไม่เกิน 15%

9.6 Short Term Stability in Extracted Samples (If Applicable)

ใช้ QC1 และ QC3 เตรียมตัวอย่าง ระเหยแห้ง ละลายกลับมาใหม่วิเคราะห์ทันที กับทิ้งไว้ที่เวลาที่กำหนด 4 – 24 ชม. ละลายกลับมาใหม่ วัดเทียบค่า แตกต่างไม่เกิน 15%

9.7 Short Term Stability for Samples Ready to Be Injected Into the LC

ใช้ QC1 และ QC3 เตรียมตัวอย่างแล้ววิเคราะห์ทันที กับรอวิเคราะห์ที่เวลาที่กำหนด 4 – 24 ชม. วัดเทียบค่า แตกต่างไม่เกิน 15%

9.8 Long Term Stability in Biological Matrix

ใช้ QC1 และ QC3 เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิต่างกันที่ -80, -20, +4 °C เตรียมและวิเคราะห์เทียบผล และเก็บไว้ที่เวลาที่กำหนด 1 – 6 เดือน วัดค่า เทียบผล แตกต่างไม่เกิน 15%

เกณฑ์ยอมรับ (Acceptance Criteria During Routine Drug Analysis)

เกณฑ์ที่จะยอมรับหรือปฏิเสธผลที่ได้จากการวิเคราะห์ เป็นไปตามข้อกำหนดของ FDA Biological Method Validation [1, 6]

1. **สภาวะก่อนการเริ่มการทดลอง** (System Suitability Test)

ก่อนตัวอย่างจะถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS การเตรียมเครื่องให้พร้อมใช้งานก่อนโดยการฉีดสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นหนึ่ง ประมาณ 5 ซ้ำ ค่าความแตกต่างของเวลาและพื้นที่ต่างกันไม่เกิน 5% หรือน้อยกว่าขึ้นกับชนิดของสารที่ทดสอบที่ระบุใน SOP นั้น

2. กราฟมาตรฐาน (Calibration Curve)

ในการวิเคราะห์ กราฟมาตรฐานจะประกอบด้วย blank และ double blank (blank + IS) และความเข้มข้นต่างๆ อีก 6 จุด จะเริ่มวิเคราะห์สารมาตรฐานที่จะทำกราฟมาตรฐานก่อน และต่อด้วยตัวอย่างที่ใช้ควบคุมระบบ QC 3 ความเข้มข้น และต่อด้วยตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ ปิดท้ายด้วย QC 3 ความเข้มข้น ถ้าตัวอย่างมีมากให้ใช้ QC คั่นกลางเพิ่มอีก 1 ชุด การประเมินกราฟมาตรฐาน อย่างน้อย 75% ต้องอยู่ในเกณฑ์ LLOQ 20% ค่าอื่นๆ 15% 2/3 ของ QC sample ไม่เกิน 15% QC 1/3 ออกนอก 15% ได้ แต่ไม่ใช่ความเข้มข้นเดียวกัน

3. การวิเคราะห์ซ้ำ (Repeat Analysis)

ตัวอย่าง QC จะใช้เป็นตัวยอมรับหรือปฏิเสธผลการทดสอบทั้งชุดการทดลอง ถ้า QC ไม่เป็นไปตามเกณฑ์ต้องวิเคราะห์ใหม่ทั้งหมด พร้อมกับหาสาเหตุ และบันทึก

4. ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูงกว่ากราฟมาตรฐาน (Outside Calibration Range)

ถ้าตัวอย่างมีความเข้มข้นสูงกว่าค่าสูงสุด 15% ให้ทำการเจือจางและวิเคราะห์ใหม่ โดยใช้ตัวอย่าง blank matrix เป็นตัวเจือจางตัวอย่าง การเจือจางแบบ 10 เท่า ใช้ผลจากค่าที่เจือจาง ถ้าตัวอย่างน้อยกว่า 20 ไมโครลิตร จะไม่วิเคราะห์ใหม่ เวลารายงานให้รายงานมากกว่า ULOQ + 15%

5. ค่าแปลก (Strange Values)

ในบางครั้งผลที่ได้จากการวิเคราะห์ไม่เป็นไปตามแบบแผนที่คาดไว้ทางเภสัช-จลนศาสตร์ ให้วิเคราะห์ซ้ำ 2 ซ้ำ ใช้ค่าเฉลี่ย หรือค่า median ของค่าเก่าและค่าใหม่

6. ค่าของ IS ต่ำ (Low Internal Standard)

ถ้าค่า IS ต่ำหรือสูงเกินปกติ 30% ต้องวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งหมดใหม่ ตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ใหม่ให้วิเคราะห์แบบไม่เจือจาง และเจือจาง 5 เท่าด้วย blank plasma ถ้าตัวอย่างมีน้อยกว่า 50 ไมโครลิตร จะไม่วิเคราะห์

7. การวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำ (Incurred Sample Reanalysis)

เป็นการยืนยันว่าวิธีที่ทดสอบมีความแม่นในการทำซ้ำ สุ่มตัวอย่างจากช่วงใกล้ระดับยาสูงสุด (C_{max}) และช่วงที่ร่างกายขจัดยา ประมาณ 20 ตัวอย่าง หรือ 10% ของทั้งหมด ทดสอบครั้งแรกที่เริ่มใช้วิธี ผล 2/3 ต้องไม่เกิน 20% ของค่าเดิม การรายงานผลใช้ค่าแรก ถ้าผลไม่ดีให้ดูว่าตัวอย่างมาจากคนคนเดียวหรือไม่ เม็ดเลือดแดงแตกหรือไม่ หาสาเหตุ

บทที่ 5

การนำวิธีที่ทดสอบไปวิเคราะห์ตัวอย่างจริง
(Analysis of Study Samples)

ตัวอย่างทางชีววัตถุที่จะตรวจวิเคราะห์ ต้องทำตามวิธีที่ผ่านการทดสอบความถูกต้องมาแล้ว ในเรื่องการเก็บรักษาตัวอย่างขณะรอการวิเคราะห์ การเตรียมตัวอย่าง ช่วงเวลาทดสอบตัวอย่างที่ใช้เป็น blank, zero sample การทำเตรียมตัวอย่างเพื่อทำกราฟมาตรฐาน และตัวอย่าง QC ประเมินว่าเป็นไปตามเกณฑ์หรือไม่ [6]

การทำกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve)

กราฟมาตรฐานต้องทำทุกครั้งที่วิเคราะห์ โดยเติมยาที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในตัวอย่างเลือด หรือพลาสมา ให้สภาพเหมือนตัวอย่างจริงที่จะทดสอบ สร้างกราฟมาตรฐานที่เป็นอัตราส่วนของตัวยา (reference standard) และ internal standard สมการเส้นตรงที่ใช้ต้องเหมือนกับตอนทดสอบวิธี ความถูกต้องเมื่อคำนวณกลับ แต่ละช่วงไม่เกิน 15% สำหรับความเข้มข้นที่จุดต่างๆ และไม่เกิน 20% ที่ระดับ LLOQ และ 75%ของข้อมูลทั้งหมดต้องผ่านเกณฑ์ข้างต้น กรณีที่ความเข้มข้นที่ LLOQ หรือ ULOQ ไม่เข้าเกณฑ์ ความเข้มข้นถัดไปจะถูกนำมาใช้เป็น LLOQ หรือ ULOQ และตัวอย่าง QC ยังอยู่ในเส้นตรงนี้ ถ้าไม่ได้ต้องปรับค่า QC ควรทำการทดสอบวิธีเพิ่ม ไม่จำเป็นต้องวิเคราะห์ตัวอย่างใหม่

ตัวอย่างใช้คุมระบบ QC samples

ตัวอย่าง QC จะใช้ประเมินวิธีวิเคราะห์ ดูความแม่นของกราฟมาตรฐานและตัวอย่างระหว่างทดสอบ ตัวอย่าง QC ต้องมี 3 ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง QC1 ค่าต่ำความเข้มข้น 3 เท่าของ LLOQ, QC2 ค่ากลาง เป็นความเข้มข้นจุดกลางกราฟมาตรฐาน และ QC3 ค่าสูง 80% ของความเข้มข้นสูงสุด (ULOQ) ทำระดับละ 2 ซ้ำ วาง ณ ตำแหน่งก่อนเริ่มวิเคราะห์ตัวอย่าง และปิดท้ายตัวอย่าง ถ้ามีจำนวนตัวอย่างมากให้เพิ่มช่วงกลางของการวิเคราะห์อีก 1 ชุด ค่าที่ได้ไม่เกิน 15% ของค่าจริง และอย่างน้อย 67% (4/6) ต้องผ่านเกณฑ์ ไม่ผ่านได้ 1 ค่าที่ความเข้มข้นเดียว ถ้าไม่ผ่านทั้ง 2 ค่า ต้องวิเคราะห์ซ้ำใหม่ทั้งหมด

การวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำ (Incurred Samples Reanalysis: ISR)

ในการวิเคราะห์ตัวอย่างทางชีววัตถุ บางครั้งการทำซ้ำจะให้ผลแตกต่าง แม้ว่าขณะทดสอบวิธีเป็นไปตามข้อกำหนดแล้ว ความแตกต่างเกิดจากตัวอย่างไม่เป็นเนื้อเดียวกัน หรือมีการปนเปื้อน ขั้นตอนการทำไม่ถูกต้อง หรือยาเปลี่ยนรูปมี metabolite หรือยาจับกับโปรตีน การ

วิเคราะห์ซ้ำจะทำแยกต่างหากหลังจากวิเคราะห์ตัวอย่างเสร็จแล้ว เพื่อเช็คว่ามีความต่างจากค่าแรกที่ทำหรือไม่ ใช้ตัวอย่าง 10% เมื่อการทดลองมีตัวอย่างไม่เกิน 1,000 ตัวอย่าง หรือ 5% เมื่อมีตัวอย่างมากกว่า 1,000 เวลารายงานผลใช้ผลการวิเคราะห์ที่ได้ครั้งแรก

การวิเคราะห์ซ้ำใหม่ (Reanalysis)

การวิเคราะห์ซ้ำต้องมีเหตุผลสนับสนุน และกำหนดไว้ในคู่มือการวิเคราะห์ (SOP) การวิเคราะห์ที่ต้องทำซ้ำใหม่ เช่น กราฟมาตรฐานและหรือตัวอย่าง QC ไม่เข้าเกณฑ์กำหนด ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน ตรวจพบตัวยาในตัวอย่างที่ไม่ได้ให้ยา การวิเคราะห์ผิดพลาด เครื่องมือขัดข้องระหว่างวิเคราะห์ โครมาโตแกรมไม่ได้สัดส่วน ค่าที่ดูผิดปกติไม่สอดคล้องกับค่าที่คาดไว้ ต้องบอกเหตุผลของการวิเคราะห์ใหม่ด้วย รายงานค่าที่ได้ใหม่

การปรับพื้นที่ใต้พีคใหม่ (Chromatogram Integration)

การกำหนดพื้นที่ใต้กราฟเพื่อนำไปใช้ในการคำนวณความเข้มข้น ถ้ามีการปรับแก้ต้องระบุ

สภาวะก่อนการเริ่มการทดลอง (System Suitability)

เครื่องมือที่ใช้ในงานวิเคราะห์ต้องมีการบำรุงรักษาและปรับค่าให้ใช้งานได้ดีที่สุดอย่างสม่ำเสมอ ในการวิเคราะห์ควรมีการทำให้ระบบนิ่งก่อนเริ่มวิเคราะห์ โดยใช้สารมาตรฐานที่ความเข้มข้นหนึ่ง วิเคราะห์ซ้ำ 3 – 5 ครั้ง คำนวณความแตกต่างของพื้นที่ใต้พีคแต่ละครั้ง และเวลาที่สารออกจากคอลัมน์ต้องไม่ต่างกัน เช่น 2-5% ขึ้นกับสารนั้นๆ ต้องระบุไว้ใน SOP

เอกสารและการเก็บ (Documentation and Archives)

เอกสารที่เกี่ยวกับการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ต้องเก็บรักษา เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดสอบที่มีความแม่นเมื่อทำซ้ำ ข้อมูลการทดสอบวิธี ผลการทดสอบต้องจัดทำเป็นเอกสารเก็บรักษาไว้ และมีช่วงเวลาการเก็บ รวมทั้งข้อมูลดิบ บันทึกของตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์ การวิเคราะห์ซ้ำ บันทึกเครื่องมือ ต้องจัดทำรายงาน โดยในรายงานต้องมีข้อมูลดังต่อไปนี้

1. รายงานการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

รายงานการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ต้องมีบทสรุปของการทดสอบ ข้อมูลสารมาตรฐาน ข้อมูลตัวอย่างที่ใช้เป็น blank matrices วิธีวิเคราะห์ พารามิเตอร์ที่ทดสอบและเกณฑ์กำหนด ผลและวิจารณ์ การปฏิเสธผลและเหตุผลที่ปฏิเสธ ข้อมูลการวิเคราะห์ซ้ำ ข้อเบี่ยงเบนที่เกิดขึ้นที่ต่างจากข้อเสนอที่จัดทำและผลกระทบ และโครมาโตแกรมของผลการทดลอง

2. **รายงานผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง**

ในรายงานประกอบด้วย สรุปผลการศึกษา ข้อมูลสารมาตรฐาน ข้อมูลตัวอย่างที่ใช้เป็น blank matrices ข้อมูลการได้ตัวอย่างมาและการเก็บรักษาตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ วิธีวิเคราะห์ พารามิเตอร์ที่ทดสอบและเกณฑ์กำหนด ผลและวิจารณ์ การปฏิเสธผลที่ได้และเหตุผลที่ปฏิเสธ ข้อมูลการวิเคราะห์ซ้ำ ข้อเบี่ยงเบนที่เกิดขึ้นที่ต่างจากข้อเสนอที่จัดทำ และผลกระทบและโครมาโตแกรมของผลการทดลอง

บทที่ 6

สรุปและวิจารณ์

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างทางชีววัตถุ มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินว่ากระบวนการวิเคราะห์ที่จัดทำขึ้นก่อนที่จะนำไปทดสอบกับตัวอย่างจริง มีความถูกต้อง เชื่อถือได้ และอยู่ในช่วงที่จะทดสอบจริง หัวข้อพื้นฐานที่ต้องทดสอบ ได้แก่ ความจำเพาะต่อสารที่ทดสอบ (selectivity) ความถูกต้อง (accuracy) ความแม่น (precision) การกลับคืน (recovery) ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและช่วงความเข้มข้นที่จะวิเคราะห์ (calibration cure and linear range) ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีจะตรวจวัดได้ (sensitivity) ในระดับต่ำสุดที่สามารถตรวจพบ (limit of detection: LOD) ระดับต่ำสุดที่สามารถวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation: LOQ) ความแม่นของวิธีเมื่อวิเคราะห์ซ้ำกันในสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน (reproducibility) และความคงตัวของตัวอย่างที่สภาวะต่าง (sample stability) หัวข้อเหล่านี้ทุกห้องปฏิบัติการต้องจัดทำการทดสอบให้เป็นไปตามเกณฑ์กำหนดก่อนที่จะนำไปใช้ในการศึกษาทางคลินิก ขบวนการทำทุกอย่างต้องบันทึกและจัดทำเป็นเอกสารเมื่อสิ้นสุดการทดลอง นอกจากนี้ยังมีพารามิเตอร์อื่นอีก เช่น การแทรกสอดของสารอื่นต่อสารที่จะวิเคราะห์ (matrix effect) โดยเฉพาะห้องปฏิบัติการที่ใช้เทคนิค LC-MS การวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำ (incurred sample reanalysis) หรือรายการอื่น ซึ่งต้องศึกษาตามข้อกำหนดของแต่ละประเทศ การจะเลือกทดสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบมากแค่ไหนขึ้นกับปัจจัยของแต่ละห้องปฏิบัติการ ซึ่งอย่างน้อยต้องมีพารามิเตอร์พื้นฐาน การทดสอบที่ครอบคลุมมากที่สุดจะลดปัญหาการวิเคราะห์ซ้ำทั้งชุดการทดลอง ซึ่งจะลดความสูญเสีย

เอกสารอ้างอิง

[1] Food and Drug Administration. (2001). Guidance for industry: Bioanalytical method validation. Rockville, MA: US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research.

[2] European Medicines Agency. (July 21, 2011). Guideline on bioanalytical method validation. London: EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Committee for Medicinal Products for Human Use, from http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.

[3] Food and Drug Administration. (2013). Draft guidance for industry: Bioanalytical method validation. Rockville, MA: US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research.

[4] Whitmire, M., Ammerman, J., Lisio, P.d., Killmer, J., Kyle, D., Mainstone, E., et al. (2011). LC-MS/MS bioanalysis method development, validation, and sample analysis: Points to consider when conducting nonclinical and clinical studies in accordance with current regulatory guidances. Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques, S4, 1-10.

[5] ASEAN guidelines for the conduct of bioavailability and bioequivalence studies. From http://www.hsa.gov.sg/content/dam/HSA/HPRG/Western_Medicine/Overview_Framework_Policies/Guidelines_on_Drug_Registration/ACTR_GuidelinesforConductofBioavailabilityandBioequivalenceStudies_Nov05.pdf.

[6] Lindegardh, N., Edstein, M.D., Fleckenstein, L. and Ward, S. (2011). Validation strategies. In L. K. Basco (Ed.), Methods and techniques for assessing exposure to antimalarial drugs in clinical field studies (pp. 95-116). Geneva: World Health Organization.

[7] Nuengchamnong, N., Suwannakij, N. and Phrompittayarat, W. (2008). Determination of illegal adulterant in herbal medicines and dietary supplements by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Isan Journal of Pharmaceutical Sciences, 4(2), 93-103.

[8] Van Eeckhaut, A., Lanckmans, K., Sarre, S., Smolders, I. and Michotte, Y. (2009). Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. Journal of Chromatography B, 877(23), 2198-2207.

ภาคผนวก

ว QH
321
ม๑๙ม
๒๕๕๑

สำนักหอสมุด

ภาคผนวก ก อภิธานศัพท์ (Glossary)

ม. ๗๑๑๑๕๘๑

Accuracy: The degree of closeness of a concentration determined by the method to the nominal (theoretical) concentration of the analyte. Accuracy is expressed as a percentage relative to the theoretical concentration.

Accuracy (%) = (Measured concentration/Theoretical concentration) × 100.

Analysis: A series of analytical procedures from sample processing to measurement on an analytical instrument.

Analyte: A specific compound being analyzed. It can be a drug, biomolecule or its derivative, metabolite, and/or degradation product in a sample.

Analytical run: A set of samples comprising calibration standards, QC samples, and study samples. A set of subsequently processed samples, called a batch, is usually analyzed as a single run without interruption in time and by the same analyst with the same reagents under the same conditions.

Assay variability: The degree of difference between the duplicate concentrations determined for a single sample. The difference is expressed as a percentage relative to the mean of the two.

Assay variability (%) = [(Concentration in analysis to be compared - Concentration in reference analysis)/Mean of the two] × 100.

Blank sample: A matrix sample processed without adding an analyte or internal standard.

Calibration curve: The relationship between the theoretical concentration and the response of the analyte. A calibration curve is generated from a blank sample, a zero sample, and at least 6 concentration levels of calibration standards, including an LLOQ sample.

Calibration standard: A sample spiked with the analyte of interest to a known concentration, which is used to generate calibration curves. Calibration standards are used to generate a calibration curve, from which the concentrations of the analyte in QC samples and study samples are determined.

Carry-over: An alteration of the measured concentration due to a leftover analyte in the analytical instrument used.

Cross validation: A validation performed when two or more analytical methods are used within the same study or when comparing analytical methods used in different studies after full or partial validation.

Dilution integrity: Assessment of the sample dilution procedure, when required, to confirm that the procedure does not impact the measured concentration of the analyte.

Full validation: Demonstration of all the validation items i.e., selectivity, lower limit of quantification (LLOQ), calibration curve, accuracy, precision, matrix effects, carry-over, dilution integrity, and stability. Full validation is usually performed when establishing a new analytical method.

Incurred sample: A study sample that is obtained from a subject or animal that was dosed with an active study drug.

Incurred sample reanalysis (ISR): Reanalysis of a portion of the incurred samples in separate analytical runs on different days to check whether the original analytical results are reproducible.

Internal standard (IS): A compound added to samples for normalization of the recovery of an analyte during sample processing and the response obtained by the analytical instrument. A structurally similar analogue or a stable isotope-labeled compound is used.

Lower limit of quantification (LLOQ): The lowest concentration of an analyte at which the analyte can be quantified with reliable accuracy and precision.

Matrix: Whole blood, plasma, serum, urine, or other biological fluid or tissue selected for analysis. A matrix not containing exogenous chemicals (except anticoagulant) and their metabolites is called blank matrix.

Matrix effect: An alteration of the analyte response due to matrix component(s) in the sample.

Matrix factor (MF): The ratio of the analyte response in the presence of matrix to the response in the absence of matrix.

MF = Analyte response in the presence of matrix/Analyte response in the absence of matrix.

Partial validation: A validation performed when minor changes are made to an analytical method that has already been fully validated. The items in a partial validation should be determined according to the extent and nature of the changes made to the method. It can range from as little as within-run accuracy and precision evaluation to a nearly full validation.

Precision: The degree of closeness between individual concentrations determined in repeated measurements. Precision is expressed as the coefficient of variation (CV) or the relative standard deviation (RSD) in percentage.

Precision (%) = (Standard deviation/Mean) × 100.

Processed sample: A sample after processing of a biological specimen, ready for measurement on an analytical instrument.

Quality control (QC) sample: A sample spiked with the analyte of interest to a known concentration used to assess the performance and reliability of an analytical method. In analytical runs, QC samples are analyzed to assess the validity of the analytical method used for calibration curve and study sample analysis.

Quantification range: The range of concentration of an analyte in which the analyte can be quantified with reliable accuracy and precision. Quantification range of a bioanalytical method is ensured by the range of calibration curve (calibration range) and the dilution integrity.

Reanalysis: Repetition of a series of analytical procedures from the processing step on samples that have been analyzed once.

Recovery: The efficiency at which an analytical method recovers the analyte through the sample-processing step.

Recovery (%) = (Response in a biological sample that was spiked with the analyte and processed/Response in a biological blank sample that was processed and then spiked with the analyte) × 100.

Reference material (Reference standard): A compound used as the standard in quantifying an analyte; mainly used to prepare calibration standards and QC samples.

Response (Response variable): A response obtained by the detector on an analytical instrument, usually refers to a peak area (or a peak height) obtained from the chromatogram generated by conversion of instrument responses into electric signals.

Selectivity: The ability of an analytical method to measure and differentiate the analyte and the internal standard in the presence of other components in samples. Selectivity is often used interchangeably with specificity, but some point out that these two terms should be distinguished, as specificity is an ultimate form of selectivity. Based on this idea, specificity is generally the ability to detect a single component, while selectivity is defined as the ability to detect a series of substances which share certain characteristics. In other words, selectivity is the ability to differentiate the analyte and the internal standard from other components, which could also be detected.

Specificity: See the definition of "Selectivity."

Stability: The chemical or biological stability of an analyte in a given solvent or matrix under specific conditions over given time intervals. Analyte stability is evaluated to ensure that the analyte concentration is not affected as the samples move through each step of the process from collection to final analysis.

Stock solution: A non-matrix solution of reference material at the highest concentration prepared in an appropriate solvent.

Study sample: A biological specimen that is obtained from a toxicokinetic study or clinical trial for bioanalysis.

Surrogate matrix: A matrix used as an alternative to a matrix of limited availability (e.g., tissue, cerebrospinal fluid, bile).

System suitability: Confirmation of optimum instrument performance using a reference standard solution of the analyte prior to an analytical run.

Tiered approach: A strategy to initially limit the characterization of analytical method and to gradually expand parameters to be characterized and the extent toward a full validation as the development process proceeds. (see Annex)

Validation: Demonstration of adequate reproducibility and reliability of an analytical method through various evaluations.

Working solution: A non-matrix solution prepared by diluting the stock solution in an appropriate solvent. It is mainly added to matrix to prepare calibration standards and QC samples.

Zero sample: A blank sample spiked with an internal standard.

Reference

Guideline on bioanalytical method validation in pharmaceutical development. (2013), from https://www.pmda.go.jp/files/000206209.pdf.

ภาคผนวก ข Method Validation: Parameters and Acceptance Criteria

Parameter to test

Accuracy, Precision, Limit of detection, Limit of quantitation, Selectivity, Linearity and range, Recovery and matrix effect, Stability

1. Accuracy & Precision Criteria

1.1 Minimum 3 Quality Control (QC) levels

- Low QC (about 3x lower limit of quantification LLOQ)
- Middle QC (in middle of calibration curve)
- High QC (about 75 – 80% of the highest calibration point)

1.2 Quantify at least 5 × QC level × 4 days

- ≤ 15% deviation from nominal value at each QC-level
- ≤ 15% between-day variation at each QC-level
- ≤ 15% within-day variation at each QC-level

2. Limit of Detection Criteria

Limit of Detection (LOD)

- Peak should be clearly visible and distinguishable from noise
- Noise level is determined in blank biological matrix
- Signal-to-noise > 3

3. Lower Limit of Quantification Criteria

Lower Limit of Quantification (LLOQ)

- ≤ 20% deviation from nominal value at each QC-level
- ≤ 20% between-day variation at each QC-level
- ≤ 20% within-day variation at each QC-level
- Noise level is determined in blank biological matrix
- Signal-to-noise > 10

LLOQ is often selected as lowest point in a calibration curve.

4. Upper Limit of Quantification Criteria

Upper Limit of Quantification (ULOQ)

- ≤ 15% deviation from nominal value at each QC-level
- ≤ 15% between-day variation at each QC-level
- ≤ 15% within-day variation at each QC-level

ULOQ is selected as highest point in a calibration curve.

5. Selectivity

0-matrix from six different donors

- Evaluate possible interfering endogenous compounds. Appropriate separation from analytes must be achieved.
- All should produce a response ≤ 20% of a standard at LLOQ

6. Possible Interfering Drugs

- Potentially co-administered drug substances? Separation from analytes should be achieved if possible.
- For LC-MS methods, perform post-column infusion experiments to verify that the drug of interest is unaffected by the presence of co-administered drugs in the sample.

7. Internal Standard and Analyte Interference

- Evaluate working concentration of internal standard and highest concentration of analytes
- IS should produce a response ≤ 20% of a standard at LLOQ for the analytes
- Analytes should produce a response ≤ 10% of IS at working concentration

8. Internal Standard and Analyte Carry-Over

- Use working concentration of internal standard and highest concentration of analytes
- Inject the samples followed by injection of blank injection solvent
- IS carry-over should produce peak area ≤ 1% of the concentration used

- Analyte carry-over should produce peak area ≤ 20% of a standard at LLOQ
- 0-matrix (Blank) human plasma from six different sources (donors).
- Produced signals should contribute less than 20% of a standard at LLOQ
- Internal standard and analyte carry-over test
- ≤ 20% of LLOQ

9. Linearity and Range

The concentration range of the curve is based on the expected range of the study, should consist of:

- Double blank sample (without internal standard)
- Blank sample (with internal standard)
- Six to eight non-zero samples covering the expected range, including LLOQ.

10. Recovery

Recovery: The extraction efficiency of an analytical process, reported as a percentage of the known amount of an analyte carried through the sample extraction and processing steps of the method.

Recovery is determined for both Analyte and Internal standard. What you need:

- References (analyte + IS) in pure solution
- References (analyte + IS) in extracted blank biological matrix i.e. "post-spiked".
- Spiked biological matrix

Recovery & matrix effects:

- References (analyte + IS) in pure solution
- References (analyte + IS) in extracted blank biological matrix i.e. "post-spiked".
- Spiked biological matrix (Quality Control sample "QC")
- Recovery 1: QC/Pure ref = % recovery

Recovery 2: QC/Post spiked= % recovery

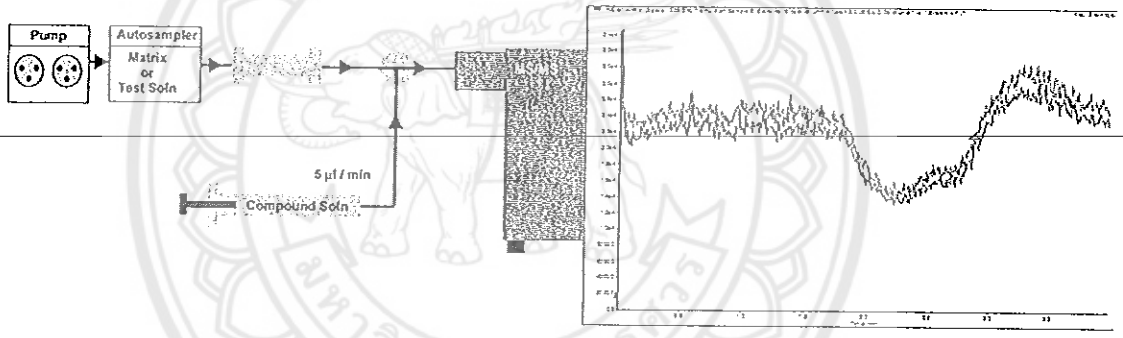
Matrix effect: Post spiked/Pure ref

11. Quantitative Matrix Evaluation

Quantitative – matrix factor (QC level high and low)

- Use References (analyte + IS) in extracted blank biological matrix i.e. post-spiked (Set 1). (blank matrix from at least six different donors = 6 samples)
- Use references (analyte + IS) in injection solvent (Set 2)
- Compare the response between Set 1 and Set 2 to calculate the matrix factor.
- Calculate the relative matrix factor as analyte matrix factor/IS matrix factor.

12. Qualitative Matrix Evaluation



Qualitative

- Use blank matrix from at least six different donors
- Prepare blank injection solvent
- Prepare reference (analyte + internal standard) in injection solvent

Post-column infusion experiment:

- Infuse the reference solution post-column and inject the blank injection solvent and the extracted blank biological matrix samples
- Monitor the signal and evaluate suppression

13. Stability

Triplicate samples at each QC level (high & low) are analysed at each occasion during all stability evaluations.

13.1 Freeze/thaw in biological matrix, 3 cycles

- ≤ 15% deviation between the mean values

13.2 Short term stability in biological matrix

- Samples in biological matrix. Store at about 4 °C, ambient temperature (i.e. about 23 °C) and about 60 °C (deactivation of viruses, if applicable). Process immediately and after an appropriate time (i.e. 1 – 24 hours). Compare responses.

- ≤ 15% deviation between the mean values

13.3 Short term stability for samples ready to be injected into the LC

- Prepare and extract samples. Analyse immediately, after 12 hours and after 24 hours. Compare responses

- ≤ 15% deviation between the mean values

13.4 Long term stability in biological matrix

- Store at intended temperature (e.g. -86 °C, -20 °C and +4 °C)

- Quantify at preparation and on at least two more occasions. Analyse and compare responses.

- ≤ 15% deviation between the mean values

14. Stability (Test If Needed)

14.1 Stock solution stability at ambient temperature

- Store stock solution at about 23 °C (ambient temperature) and analyse after an appropriate time (i.e. 1 – 24 hours). Quantify with standards prepared from a freshly prepared stock solution.

- Use an appropriate dilution and prepare triplicate of standards at 80, 100 and 120% of the nominal concentration after dilution

- ≤ 15% deviation from the nominal concentration

14.2 Stock solution stability during cold storage e.g. 4 °C or -80 °C (if applicable)

- Store stock solution at intended temperature and analyse as appropriate (at least 4 hours at room temperature or wet ice should be evaluated). Quantify with standards prepared from a freshly prepared stock solution.

- Use an appropriate dilution and prepare triplicates of standards at 80, 100 and 120% of the nominal concentration after dilution

- ≤ 15% deviation from the nominal concentration

14.3 Short term stability for biological samples ready for extraction (if applicable)

- Use QC level high and QC level low
- Prepare aliquots of samples, extract immediately and after an appropriate time (i.e. 4 – 24 hours). Compare responses
- ≤ 15% deviation between the mean values

14.4 Short term stability in extracted samples (if applicable)

- Use QC level high and QC level low
- Prepare aliquots and evaporate immediately and after an appropriate time (i.e. 4 – 24 hours). Analyse together on LC and compare responses
- ≤ 15% deviation between the mean values

Reference

Lindegardh, N., Edstein, M.D., Fleckenstein, L. and Ward, S. (2011). Validation strategies. In L. K. Basco (Ed.), Methods and techniques for assessing exposure to antimalarial drugs in clinical field studies (pp. 95-116). Geneva: World Health Organization.