

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและ Related Proteins ในยาฟิลแกรสติม โดยโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูงแบบผันกลับ

สุรินทรา หลานวงศ์ สายวรุฬ จตุรภิตตินันท์ และสุภาพร ภูมิอมร
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ยาฟิลแกรสติมใช้รักษาผู้ป่วยที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ ซึ่งปริมาณโปรตีนและ related proteins ในยามีผลต่อประสิทธิภาพของยาและอาจก่ออาการที่ไม่พึงประสงค์ ดังนั้นการตรวจปริมาณโปรตีนและ related proteins ในยาจึงมีความสำคัญ วัตถุประสงค์การศึกษานี้เพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธีตรวจปริมาณโปรตีนและ related proteins ที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์และรีดิวซ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูงแบบผันกลับตามวิธีของตำรายาสากลของยุโรป โดยผลการศึกษาพบว่าวิธีมีความจำเพาะต่อการวิเคราะห์ยาฟิลแกรสติม มีความเป็นเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของยาในช่วง 0.1 ถึง 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสนใจเท่ากับ 0.9998 ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการทำซ้ำในครั้งเดียวกันและต่างครั้งกันเท่ากับ 0.92 และ 0.65 ตามลำดับ มีค่าร้อยละการคืนกลับเท่ากับ 102.45 สามารถตรวจวัดเชิงปริมาณได้ถึง 0.0250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีขีดจำกัดของการตรวจพบยาฟิลแกรสติมที่ 0.0125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวิธีมีความคงทนเมื่อเปลี่ยนเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์สรุปได้ว่าวิธีที่ศึกษานี้มีความถูกต้องเชื่อถือได้และเหมาะสมนำมาใช้ในการตรวจปริมาณโปรตีนและ related proteins เพื่อควบคุมคุณภาพของยาฟิลแกรสติม

คำสำคัญ : ยาฟิลแกรสติม, ปริมาณโปรตีน, โครมาโตกราฟีเหลวความดันสูงแบบผันกลับ

Corresponding author E-mail: surintra.l@dmasc.mail.go.th

Received: 30 April 2020

Revised: 15 October 2020

Accepted: 7 January 2021

บทนำ

ยาฟิลแกรสติม (filgrastim) มีชื่อสามัญ คือ granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) เป็นไซโตไคน์ (cytokine) ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการอยู่รอดของเซลล์ (survival) การเพิ่มจำนวน (proliferation) การเปลี่ยนสภาพ (differentiation) และการเจริญเต็มวัย (maturation) ของเซลล์ต้นกำเนิดนิวโทรฟิล (neutrophil progenitor cells) นอกจากนี้ยังส่งเสริมการรอดชีวิตและกระตุ้นการทำงานของนิวโทรฟิลที่เจริญเต็มที่อีกด้วย⁽¹⁾ โดยยาฟิลแกรสติมใช้รักษาผู้ป่วยที่ใช้เคมีบำบัดและพบปัญหาเม็ดเลือดขาวต่ำกว่าปกติ

ยาฟิลแกรสติมถูกผลิตด้วยเทคนิคการตัดต่อทางพันธุกรรม (recombinant methionyl human G-CSF หรือ rhG-CSF)⁽²⁾ โปรตีนที่เป็นสารสำคัญในยาฟิลแกรสติมต้องมีปริมาณตามเกณฑ์ที่กำหนด⁽³⁾ เพื่อประสิทธิภาพในการรักษาโรคตามที่ระบุไว้ นอกจากนี้ยังมี related proteins ซึ่งเป็น product-related impurity ที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายและอาจก่อให้เกิดอาการที่ไม่พึงประสงค์ จึงจำเป็นต้องตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ related proteins⁽⁴⁾ โดยตำรายาสากลของยุโรป (European Pharmacopoeia, Ph. Eur. (2018)) ระบุว่า related proteins ที่ตรวจพบในยาฟิลแกรสติม ได้แก่ oxidised filgrastim form 1, oxidised filgrastim form 2 และ reduced filgrastim แต่ละชนิดต้องมีปริมาณไม่เกิน 1% และต้องมีปริมาณสารปนเปื้อนรวมทั้งหมด (total impurities) ไม่เกิน 2%⁽⁵⁾

การวิเคราะห์ปริมาณ related proteins ในยาฟิลแกรสติมตามสภาวะการทดสอบของ Ph. Eur. (2018) ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูงแบบผันกลับ หรือเป็นที่รู้จักในชื่อ Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) เป็นเทคนิคโครมาโตกราฟีที่อาศัยคุณสมบัติการกระจายตัวของสารใน 2 เฟส (phases) คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้มักเป็นชนิดสารละลายอินทรีย์ (organic solvent)⁽⁶⁾ สารที่มีการกระจายตัวในเฟสเคลื่อนที่ได้ดีจะเคลื่อนที่ไปกับเฟสเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ส่วนสารที่กระจายตัวได้ดีในเฟสอยู่กับที่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า การหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างสามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของตัวอย่างกับพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณโปรตีนที่แน่นอนแล้ว สำหรับการหาปริมาณ related proteins สามารถคำนวณได้โดยตรงจากค่าร้อยละของพื้นที่ใต้พีค (%area) ของโครมาโตแกรมที่วิเคราะห์ได้

สถาบันชีววัตถุ มีวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพของยาฟิลแกรสติม ซึ่งเดิมอ้างอิงวิธีวิเคราะห์จาก Ph. Eur. (2009)⁽⁴⁾ ปัจจุบันวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวใน Ph. Eur. (2018) ได้มีการปรับเปลี่ยนสภาวะการทดสอบและเพิ่มเติมในส่วนของการเตรียมสารมาตรฐานเพื่อทดสอบ system suitability โดยนำสารมาตรฐานมาทำปฏิกิริยา methionine oxidation และปฏิกิริยา reduction ด้วย dithiothreitol⁽⁵⁾ โดยวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ คือ เพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและ related proteins ของยาฟิลแกรสติม โดยวิธี RP-HPLC ด้วยสภาวะการทดสอบของวิธีวิเคราะห์ตาม Ph. Eur. (2018) ดำเนินการทดสอบความถูกต้องของวิธีตามข้อกำหนดของ ICH guideline⁽⁷⁾ และแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียวของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽⁸⁾ เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพของยาฟิลแกรสติมต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

ยาฟิลแกรสติมจำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ยาฟิลแกรสติม 1, 2 และ 3

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบเป็น HPLC grade ได้แก่ น้ำ (Ligand Scientific CO., LTD.) และ acetonitrile (J.T. Baker) และสารเคมี AR grade (Sigma-Aldrich) ได้แก่ hydrogen peroxide, trifluoroacetic acid (TFA), methionine, และ dithiothreitol (DTT)

สารมาตรฐานฟิลแกรสตีม (CRS Filgrastim, Ph. Eur. Reference Standard, Catalogue Code Y0001173)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง HPLC Shimadzu รุ่น Prominence ที่มีเครื่องตรวจวัดสารแบบไดโอดอะเรย์ (Photo Diode Array, PDA) วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม LabSolutions คอลัมน์ชนิด reversed-phase VertiSep™ BIO C4 (4.6 × 150 mm ขนาด 5 ไมโครเมตร) ตู้บ่มอุณหภูมิ 20 – 25 องศาเซลเซียส ตู้บ่มอุณหภูมิ 30 – 35 องศาเซลเซียส เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง และแผ่นกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร

การเตรียมเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

เฟสเคลื่อนที่ A เจือจาง TFA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในน้ำปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยแผ่นกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร

เฟสเคลื่อนที่ B เจือจาง TFA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติม acetonitrile ปริมาตร 900 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองด้วยแผ่นกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร

การเตรียมสารมาตรฐานสำหรับการทดสอบ System Suitability

การเตรียมสารมาตรฐานฟิลแกรสตีมสำหรับการวิเคราะห์ **oxidised filgrastim form 1** และ **oxidised filgrastim form 2**

เติมสารละลาย hydrogen peroxide ความเข้มข้น 4.5 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ลงในสารมาตรฐานฟิลแกรสตีมความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 20 – 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม methionine 1.9 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากัน กรองด้วยแผ่นกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร

การเตรียมสารมาตรฐานฟิลแกรสตีมสำหรับการวิเคราะห์ reduced filgrastim

เติม DTT ปริมาตร 3.25 ไมโครลิตร ลงในสารมาตรฐานฟิลแกรสตีมความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 – 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กรองด้วยแผ่นกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร

การเตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์

เจือจางตัวอย่างฟิลแกรสตีมและสารมาตรฐานฟิลแกรสตีมด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้นที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองด้วยแผ่นกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร

วิธีวิเคราะห์

นำ blank, สารมาตรฐานฟิลแกรสตีมสำหรับ system suitability, สารมาตรฐานฟิลแกรสตีมความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และตัวอย่างฟิลแกรสตีมนี้นำเข้าเครื่อง HPLC ตามลำดับ โดยตั้งค่าอัตราการไหล

0.8 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตรการฉีด 50 ไมโครลิตร ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดสารที่ 215 นาโนเมตร เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อการฉีดสาร 1 ครั้ง เท่ากับ 45 นาที โหมด gradient elution มีสภาวะการชะของ LC ดังนี้

เวลา (นาที)	เฟสเคลื่อนที่ A (%)	เฟสเคลื่อนที่ B (%)
0	60	40
30	20	80
35	20	80
45	60	40

นำผลการวิเคราะห์มาคำนวณปริมาณโปรตีนในตัวอย่างฟิลเกรสติมได้โดยการเทียบพื้นที่ใต้พีคของตัวอย่างเทียบกับพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานฟิลเกรสติม สำหรับการหาปริมาณ related proteins สามารถคำนวณได้จากค่าร้อยละของพื้นที่ใต้พีคจากโครมาโตแกรมที่วิเคราะห์ได้

การทดสอบ System Suitability

การวิเคราะห์ **oxidised filgrastim form 1** และ **oxidised filgrastim form 2** โดยวิเคราะห์ 8 ซ้ำ ผลวิเคราะห์ที่ได้ คือ พีคของ oxidised filgrastim form 1 และพีคของ oxidised filgrastim form 2 ต้องมีค่า relative retention time (RRT) เมื่อเทียบกับพีคหลักประมาณ 0.84 และ 0.98 ตามลำดับ เมื่อคำนวณค่า symmetry factor ของพีคหลักต้องมีค่าไม่เกิน 1.8 และค่า peak-to-valley ratio ระหว่างพีคหลักและพีคของ oxidised filgrastim form 2 ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 2.0

การวิเคราะห์ **reduced filgrastim** โดยวิเคราะห์ 8 ซ้ำ ผลวิเคราะห์ที่ได้ คือ พีคของ reduced filgrastim ต้องมีค่า RRT เมื่อเทียบกับพีคหลักประมาณ 1.04 และค่า symmetry factor ของพีคหลักต้องมีค่าไม่เกิน 1.8 และค่า resolution ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 1.5

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ความจำเพาะของวิธี (specificity) วิเคราะห์สารมาตรฐานฟิลเกรสติมความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, ยาฟิลเกรสติมจำนวน 3 ตัวอย่าง, formulation buffer ของยาฟิลเกรสติม, ตัวอย่าง monoclonal antibody, ตัวอย่าง interferon และ blank (น้ำ) ผลวิเคราะห์ของสารมาตรฐานและตัวอย่างฟิลเกรสติมที่ได้ต้องให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน คือ chromatographic profile ที่คล้ายคลึงกัน โดยไม่มีการรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง

ความเป็นเส้นตรงของวิธี (linearity) วิเคราะห์สารมาตรฐานฟิลเกรสติมความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ นำผลวิเคราะห์ที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีคหลัก ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) ที่ได้ควรมีค่าใกล้เคียง 1

ความเที่ยงของวิธี (precision) วิเคราะห์ตัวอย่างฟิลเกรสติมจำนวน 6 ซ้ำ ในวันเดียวกัน (repeatability) และวิเคราะห์ตัวอย่างฟิลเกรสติมซ้ำ 3 วัน (intermediate precision) ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation, %RSD) ของพื้นที่ใต้พีคหลักต้องไม่เกิน 2

ความถูกต้องของวิธี (accuracy) เติมสารมาตรฐานฟิลเกรสติมความเข้มข้น 0.25, 0.50 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในตัวอย่างฟิลเกรสติม วิเคราะห์ 3 ซ้ำ คำนวณหาค่าร้อยละของการกลับคืน (%recovery) ซึ่งควรมีค่าอยู่ในช่วง 90 - 110%

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) เจือจางสารมาตรฐานฟิลเกรสติมแล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ค่า LOD คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ทำให้สัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio, S/N) เท่ากับ 3:1 และ LOQ คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ให้ค่า S/N เท่ากับ 10:1

ความคงทนของวิธี (robustness) เปลี่ยนเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างฟิลแกรสติม 2 ระหว่างเครื่อง HPLC 1 (Thermo, AS3000) และเครื่อง HPLC 2 (Shimadzu, Prominence) แล้วนำพื้นที่ใต้พีคหลักที่ได้ไปคำนวณเปรียบเทียบโดยใช้สถิติ t-Test

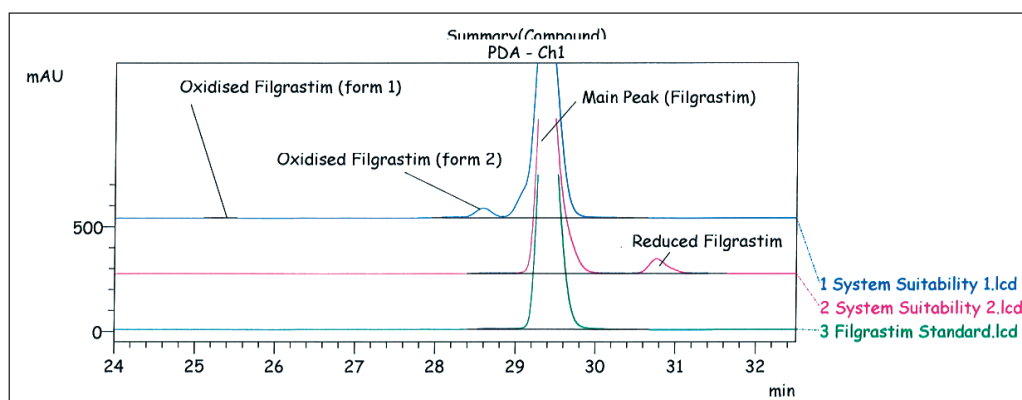
ความไม่แน่นอนของการวัด (measurement uncertainty) แหล่งที่มาของความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและ related protein โดยวิธี RP-HPLC ได้แก่ ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานฟิลแกรสติม ความไม่แน่นอนที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานฟิลแกรสติม ปีเปตที่ใช้ในการเตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่างฟิลแกรสติม ความเที่ยงของวิธี (intermediate precision) จากการทดสอบความถูกต้องของวิธี นำมาหาค่าความไม่แน่นอนรวม (combined uncertainty, uc) และค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty: U) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า coverage factor (k) เท่ากับ 2

ผล

ผลการทดสอบ system suitability

ผลวิเคราะห์ oxidised filgrastim พบว่าโครมาโตแกรมที่ได้ประกอบด้วยพีคหลักและพีคของ oxidised filgrastim form 1 และ oxidised filgrastim form 2 ซึ่งถูกชะออกมาก่อนพีคหลัก มีค่า RRT เท่ากับ 0.86 และ 0.98 ตามลำดับ โดยพีคของ oxidised filgrastim form 2 ไม่สามารถแยกออกจากพีคหลักได้อย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 1 ผลวิเคราะห์ค่า symmetry factor ของพีคหลักเท่ากับ 0.87 ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด คือ มีค่าไม่เกิน 1.8 และค่า peak-to-valley ratio ระหว่างพีคหลักและพีคของ oxidised filgrastim form 2 มีค่าเท่ากับ 7.74 ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด คือ มีค่าไม่น้อยกว่า 2.0

ผลวิเคราะห์ reduced filgrastim พบว่าโครมาโตแกรมที่ได้ประกอบด้วยพีคหลักและพีคของ reduced filgrastim ซึ่งถูกชะออกมาทีหลังพีคหลัก โดยมีค่า RRT เท่ากับ 1.05 ดังแสดงในภาพที่ 1 ผลการคำนวณค่า symmetry factor ของพีคหลักได้เท่ากับ 1.71 และค่า resolution ที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 2.86 ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด คือ มีค่าไม่เกิน 1.8 และมีค่าไม่น้อยกว่า 1.5 ตามลำดับ



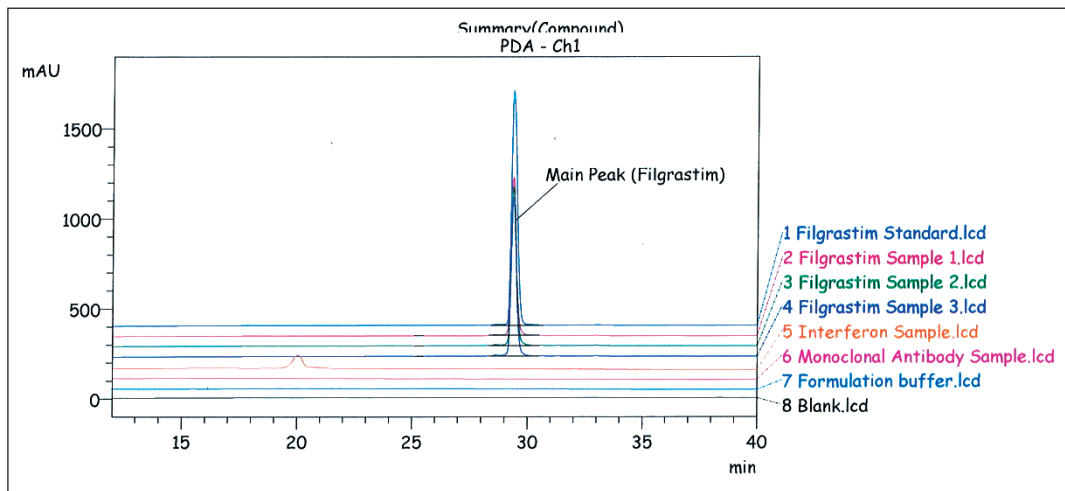
ภาพที่ 1 โครมาโตแกรมแสดงผลการทดสอบ system suitability

ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี

ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและ related proteins ในยาฟิลแกรสติม โดยวิธี RP-HPLC รายละเอียดดังนี้

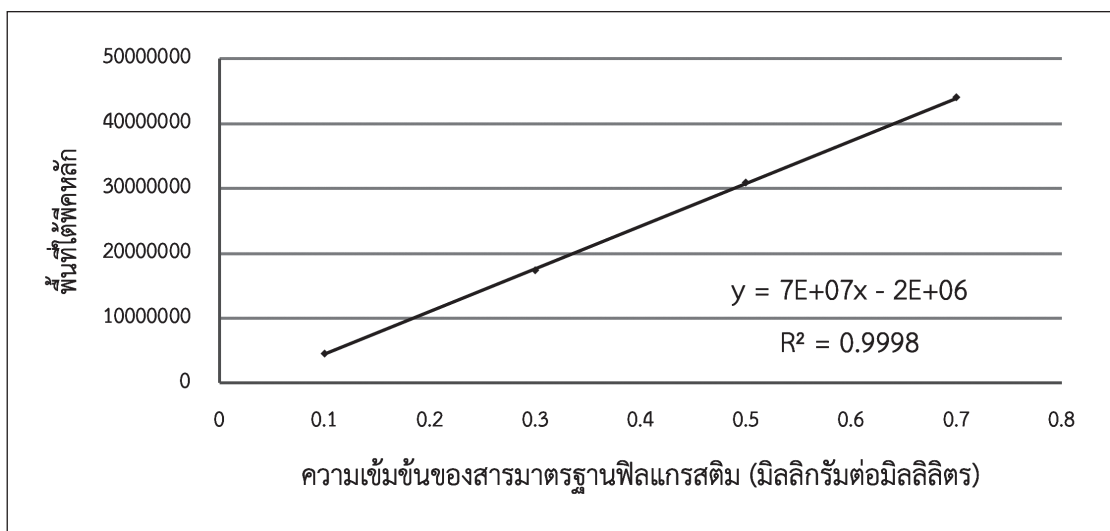
ความจำเพาะของวิธี ผลวิเคราะห์สารมาตรฐานฟิลแกรสติมและตัวอย่างฟิลแกรสติมทั้ง 3 ตัวอย่าง โครมาโตแกรมที่ได้ปรากฏพีคหลักที่ค่า RT ใกล้เคียงกันที่ประมาณ 29.37 นาที ในขณะที่ตัวอย่าง monoclonal

antibody และตัวอย่าง interferon ไม่มีพิกปรากฏที่ค่า RT เดียวกันกับพิกหลักของสารมาตรฐานและตัวอย่างฟิลเกรสติม เช่นเดียวกับ formulation buffer ของตัวอย่างฟิลเกรสติมและ blank ที่ไม่พบพิกครบถ้วน พิกของตัวอย่างฟิลเกรสติม ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมแสดงผลการทดสอบ Specificity

ความเป็นเส้นตรง กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟิลเกรสติมที่ 0.1 – 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพื้นที่ใต้พิกหลัก แสดงกราฟเส้นตรงดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟิลเกรสติมและพื้นที่ใต้พิกหลัก

ความเที่ยงของวิธี ผลวิเคราะห์ตัวอย่างฟิลเกรสติม 1 ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 6 ซ้ำ ในวันเดียวกัน (repeatability) ได้ค่า %RSD เท่ากับ 0.92 และผลการทดสอบความเที่ยงระหว่างวัน (intermediate precision) โดยทดสอบซ้ำ 3 วัน ได้ค่า %RSD เท่ากับ 0.41 ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ผลวิเคราะห์ตัวอย่างฟิลแกรสติม 1 จำนวน 6 ซ้ำ ในวันเดียวกัน

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีคหลัก
1	27368324
2	27516930
3	27479649
4	27512770
5	27943015
6	27959771
%RSD	0.92

ตารางที่ 2 ผลวิเคราะห์ตัวอย่างฟิลแกรสติม 1 เมื่อทดสอบซ้ำ 3 วัน

วันที่	พื้นที่ใต้พีคของพีคหลัก			%RSD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
1	34196436	34550036	34867978	0.65
2	31804264	31949238	31635829	
3	33780542	33583345	33916357	

ความถูกต้องของวิธี ผลวิเคราะห์ %recovery ที่ได้อยู่ในช่วง 90 – 110% เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด
ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่า %recovery ที่ได้จากการทดสอบความถูกต้องของวิธี

ทดสอบครั้งที่	%Recovery		
	Spiked by 0.25 mg/ml Filgrastim Standard	Spiked by 0.50 mg/ml Filgrastim Standard	Spiked by 0.75 mg/ml Filgrastim Standard
1	95.65	96.20	97.73
2	101.45	103.80	106.82
3	107.25	106.33	106.82
Mean	101.45	102.11	103.79
Overall Mean	102.45		

LOD และ LOQ ผลการทดสอบที่ได้ พบว่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟิลแกรสติมที่น้อยที่สุดที่ยังคงปรากฏพีคหลักและให้ค่า S/N รบกวนใกล้เคียง 3 คือ 0.0125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ค่า S/N เท่ากับ 8.14 โดยมี %RSD เท่ากับ 3.26) และความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟิลแกรสติมที่ให้ค่า S/N ใกล้เคียง 10 คือ 0.0250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ค่า S/N เท่ากับ 23.72 โดยมี %RSD เท่ากับ 0.20) ดังนั้นค่า LOD เท่ากับ 0.0125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า LOQ เท่ากับ 0.0250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ความคงทนของวิธี เมื่อเปลี่ยนเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างฟิลแกรสตีม 2 ที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พื้นที่ใต้พีคที่ได้แสดงในตารางที่ 4 เมื่อคำนวณเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคหลักโดยใช้สถิติ t-Test พบว่า ค่า t Stat เท่ากับ -1.31 มีค่าน้อยกว่า t Critical two-tail ซึ่งเท่ากับ 4.30 ดังนั้นผลวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเครื่อง HPLC ทั้ง 2 เครื่อง มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4 พื้นที่ใต้พีคหลักของตัวอย่างฟิลแกรสตีม 2 ที่วิเคราะห์ได้เมื่อเปลี่ยนเครื่อง HPLC

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีคหลัก	
	HPLC 1	HPLC 2
1	15487548	15405350
2	15674064	15532550
3	15362500	15533461
Mean	15508037	15490454
%RSD	1.01	0.48

ความไม่แน่นอนของการวัด ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($k = 2$) ค่าความไม่แน่นอนรวมและค่าความไม่แน่นอนขยายของการหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างฟิลแกรสตีมเท่ากับ 0.012 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าความไม่แน่นอนรวมและค่าความไม่แน่นอนขยายของการหาปริมาณ related proteins ในตัวอย่างฟิลแกรสตีมเท่ากับ 0.007 และ 0.01% ตามลำดับ

วิจารณ์

การวิเคราะห์ related proteins โดยวิธี RP-HPLC ใน Ph. Eur. (2009) เน้นเฉพาะการหา oxidised filgrastim เท่านั้น ต่อมาใน Ph. Eur. (2018) ได้มีการพัฒนาความสามารถของวิธีโดยการปรับสภาวะการทดสอบเพื่อให้สามารถวิเคราะห์ related proteins ชนิด oxidised filgrastim form 1, oxidised filgrastim form 2 และ reduced filgrastim ในสารมาตรฐานฟิลแกรสตีมได้ ดังที่เห็นได้จากการทดสอบ system suitability เมื่อต้องการวิเคราะห์ related proteins ในตัวอย่างฟิลแกรสตีมจะทราบได้จากการเปรียบเทียบค่า RT ของพีคของ related proteins ในสารมาตรฐานฟิลแกรสตีมที่ทดสอบใน system suitability นั้นเอง โดยเกณฑ์การตัดสินของ Ph. Eur. (2018) ระบุว่า related proteins แต่ละชนิดต้องมีปริมาณไม่เกิน 1% และต้องมีปริมาณสารปนเปื้อนรวมทั้งหมด (total impurities) ไม่เกิน 2%⁽⁶⁾ ต่อมาใน Ph. Eur. ซึ่งมีการปรับปรุงล่าสุดในปี ค.ศ. 2019 ได้มีการปรับเกณฑ์การตัดสินเป็นต้องมีปริมาณ related proteins แต่ละชนิดไม่เกิน 3% และปริมาณสารปนเปื้อนรวมทั้งหมดไม่เกิน 6.5%⁽⁹⁾ โดยไม่ได้มีการปรับเปลี่ยนสภาวะในการทดสอบแต่อย่างใด อย่างไรก็ตามการหาปริมาณ related proteins ในยาฟิลแกรสตีมควรพิจารณาตาม Ph. Eur. และเกณฑ์การตัดสินของผู้ผลิตร่วมด้วย

จากการศึกษาความจำเพาะของวิธีแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างฟิลแกรสตีมทั้ง 3 ตัวอย่าง ให้ผลไปในทางเดียวกันกับสารมาตรฐานฟิลแกรสตีม โดยมี chromatographic profile ที่คล้ายคลึงกัน และค่า RT ของพีคหลักปรากฏที่เวลาใกล้เคียงกันโดยไม่มีการรบกวนของสารอื่น ๆ ในตัวอย่าง (formulation buffer) และ blank ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ของตัวอย่าง monoclonal antibody และตัวอย่าง interferon พบว่าไม่มีพีคปรากฏที่ค่า RT เดียวกันกับพีคหลักของสารมาตรฐานและตัวอย่างฟิลแกรสตีม การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีโดยการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคหลักและความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟิลแกรสตีม แสดงให้เห็นว่าเป็นวิธีที่มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟิลแกรสตีม 0.1 ถึง 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9998

ผลวิเคราะห์ที่ได้เมื่อทดสอบตัวอย่างฟิลแกรสติม 6 ซ้ำ ในวันเดียวกันและทดสอบต่างวันกันจำนวน 3 ซ้ำ แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้มีความเที่ยง ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี พบว่า %recovery ที่ได้เท่ากับ 102.45% ซึ่งอยู่ในช่วง 90 – 110% เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด สำหรับค่า LOD และ LOQ ที่วิเคราะห์ได้มีค่าน้อยกว่าความเข้มข้นของตัวอย่างฟิลแกรสติมซึ่งวิเคราะห์ที่ 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร แสดงให้เห็นว่าปริมาณโปรตีนและ related proteins ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีนี้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ นอกจากนี้เมื่อศึกษาความคงทนของวิธีเมื่อเปลี่ยนเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างฟิลแกรสติม ระหว่างเครื่อง HPLC 1 (Thermo, AS3000) ที่มีเครื่องตรวจวัดสารแบบดูดกลืนแสงชนิดยูวี วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Chromquest และเครื่อง HPLC 2 (Shimadzu, Prominence) ที่มีเครื่องตรวจวัดสารแบบไดโอดอะเรย์ (Photo Diode Array, PDA) วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม LabSolutions โดยใช้คอลัมน์เดียวกันในการวิเคราะห์เปรียบเทียบ ถึงแม้ว่าเครื่องตรวจวัดสารของทั้งสองเครื่องเป็นคนละชนิดกัน แต่ทั้งสองเครื่องมีความสามารถในการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร ได้เช่นเดียวกัน เมื่อนำพื้นที่ใต้พีคหลักของตัวอย่างฟิลแกรสติมที่วิเคราะห์ได้จากแต่ละเครื่องมาคำนวณเปรียบเทียบโดยใช้สถิติ t-Test จึงสรุปได้ว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างฟิลแกรสติมโดยเครื่อง HPLC ทั้งสองเครื่องดังกล่าวมีค่าไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับความไม่แน่นอนของการวัดที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($k = 2$) พบว่าค่าความไม่แน่นอนรวมและค่าความไม่แน่นอนขยายของการหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างฟิลแกรสติมเท่ากับ 0.012 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ ค่าความไม่แน่นอนรวมและค่าความไม่แน่นอนขยายของการหาปริมาณ related proteins ในตัวอย่างฟิลแกรสติมเท่ากับ 0.007 และ 0.01% ตามลำดับ

สรุป

จากผลการทดสอบความถูกต้องทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและ related proteins ในยาฟิลแกรสติม โดยวิธี RP-HPLC ตาม Ph. Eur. (2018) เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ ความถูกต้อง ความเที่ยง และมีความคงทน เหมาะสมสำหรับนำมาเป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการเพื่อควบคุมคุณภาพยาฟิลแกรสติมที่จำหน่ายในประเทศและสนับสนุนส่งเสริมอุตสาหกรรมการผลิตยาฟิลแกรสติมในประเทศตามแผนพัฒนาประเทศไทย 4.0

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางสาวรุฬ จตุรจิตตินันท์ หัวหน้ากลุ่มผลิตภัณฑ์เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการรักษาที่ให้คำแนะนำ และตรวจทานความถูกต้องของการทดสอบความถูกต้องของวิธี และ ดร. สุภาพร ภูมิอมร ผู้อำนวยการสถาบันชีววัตถุที่ปรึกษาในการดำเนินการทดสอบความถูกต้องของวิธี

เอกสารอ้างอิง

1. Yao HM, Ottery FD, Borema T, Harris S, Levy J, May TB, et al. PF-06881893 (Nivestym™), a filgrastim biosimilar, versus US-licensed filgrastim reference product (US-Neupogen®): pharmacokinetics, pharmacodynamics, immunogenicity, and safety of single or multiple subcutaneous doses in healthy volunteers. *BioDrugs* 2019; 33(2): 207–20.
2. NEUPOGEN® (filgrastim) injection, for subcutaneous or intravenous use. Initial U.S. Approval. [online]. 2018; [cited 2020 Feb 13]; [46 screens]. Available from: URL: http://pi.amgen.com/united_states/neupogen/neupogen_pi_hcp_english.pdf.
3. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products (Q6B). London: European Medicines Agency; 2006.

4. สายวรุฬ จตุรจิตตินันท์, วิชชุดา จริยะพันธุ์. การทวนสอบวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารปนเปื้อนชนิด Related Proteins ในตัวอย่างยาชีววัตถุ Filgrastim โดยเทคนิค Reversed-Phase Chromatography. ว กรมวิทย์ พ 2555; 54(3-4): 155-65.
5. Filgrastim concentrated solution. In: European pharmacopoeia 9.3. 9th ed. Strasbourg: EDQM Council of Europe; 2018. p. 4899-4901.
6. Liquid chromatography. In: European pharmacopoeia 9.6. 9th ed. Strasbourg: EDQM Council of Europe; 2019. p. 5822-5823.
7. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology (Q2(R1)). London: European Medicines Agency; 2005.
8. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
9. Filgrastim concentrated solution. In: European pharmacopoeia 9.8. 9th ed. Strasbourg: EDQM Council of Europe; 2019. p. 6908-6909.

Analytical Method Validation for Determination of Protein and Related Protein Content in Filgrastim by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

Surintra Lahnwong Saiwarul Jadoonkittinan and Supaporn Phumiamorn

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Filgrastim is used for a treatment of patients with low leukopenia. A content of protein is important for an efficacy of product and related proteins may cause side effects. The objective of this study was to validate an analysis of protein and related protein content in both oxidised and reduced forms by reversed-phase high performance liquid chromatography using European Pharmacopoeia condition. The result showed that this method was specific to filgrastims. The linearity was found between the peak area and the filgrastim concentration of 0.1 – 0.7 mg/ml ($R^2 = 0.9998$). The percent of relative standard deviation of repeatability and intermediate precision were 0.92 and 0.65, respectively. The percent recovery of accuracy was 102.45. Moreover, the limit of quantitation and the limit of detection were 0.0250 and 0.0125 mg/ml, respectively. This method also showed good robustness. In conclusion, this method is precise and suitable to measure the content of protein and related protein in filgrastims for the quality control of the products.

Keywords: Filgrastim, Protein content, Reversed-phase liquid chromatography