

การพัฒนาวิธีและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ N-nitrosodimethylamine ในผลิตภัณฑ์ยาเม็ด Metformin

ศศิดา อยู่สุข และ ปิยะมาศ กิจชนะพานิชย์

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ nitrosamines ถูกตรวจพบปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ยาหลายชนิด ได้แก่ angiotensin II receptor blocker (ARB) ranitidine และ metformin มีเพียง N-nitrosodimethylamine (NDMA) ชนิดเดียวเท่านั้นที่เป็นสารปนเปื้อน nitrosamines ที่พบในยา metformin สาเหตุของการเกิดการปนเปื้อน nitrosamines ในผลิตภัณฑ์ยาอาจมาจากวัตถุดิบ สารช่วยในตำรับ น้ำ ตัวทำละลาย กระบวนการผลิต และวัสดุบรรจุภัณฑ์ เนื่องจาก nitrosamines เป็นสารที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมปริมาณ nitrosamines ให้ไม่เกินค่า acceptance daily intake (ADI) สำหรับ ADI ของ NDMA เท่ากับ 96 นาโนกรัมต่อวัน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วย gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ที่มีความไวในการตรวจวัดปริมาณสาร NDMA ซึ่งมีปริมาณน้อยมากในผลิตภัณฑ์ยาเม็ด metformin โดยพัฒนาจากวิธีที่หน่วยงานกำกับดูแลด้านยาของต่างประเทศเผยแพร่ การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เป็นไปตาม International Council for Harmonisation (ICH) guideline พบว่าพีคของ NDMA และ NDMA-d6 ไม่ถูกรบกวนจาก N-nitrosodiethylamine (NDEA) metformin สารช่วยในตำรับ และตัวทำละลาย ชีตจำกัดของการตรวจพบเป็น 0.8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์ของ NDMA ที่ยอมให้มีได้ในผลิตภัณฑ์ยาเม็ด metformin วิธีนี้มีความเป็นเส้นตรง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) มากกว่า 0.999 ความแม่นยำแสดงด้วยค่า %recovery อยู่ในช่วง 87.4–103.4% ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของ repeatability และ intermediate precision น้อยกว่า 8% และ 11% ตามลำดับ ดังนั้นวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นนี้เหมาะสมสำหรับใช้ควบคุมปริมาณ NDMA ในผลิตภัณฑ์ยาเม็ด metformin

คำสำคัญ: การปนเปื้อนไนโตรซามีน, N-nitrosodimethylamine, Metformin, NDMA, GC-MS

Corresponding author E-mail: sasida.y@dmsc.mail.go.th

Received: 21 September 2023

Revised: 6 March 2024

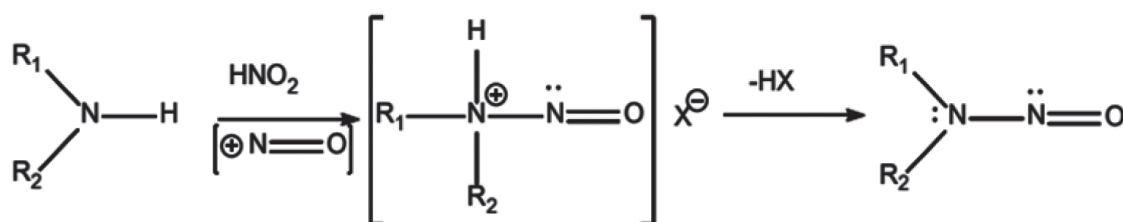
Accepted: 25 April 2024

บทนำ

สถานการณ์การปนเปื้อน nitrosamine ในผลิตภัณฑ์ยาเริ่มเมื่อปี ค.ศ. 2018 มีรายงานพบการปนเปื้อน N-nitrosodimethylamine (NDMA) ในวัตถุดิบตัวยาสำคัญของยา valsartan ของบริษัท Zhejiang Huahai Pharmaceuticals สาธารณรัฐประชาชนจีน โดย valsartan เป็นยาในกลุ่ม angiotensin receptor blockers (ARB) ใช้รักษาโรคความดันโลหิตสูง ต่อมาในเดือนกันยายน ค.ศ. 2019 มีการรายงานพบการปนเปื้อนของ NDMA ในยา ranitidine ที่ใช้เป็นยารักษาโรคแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้น ในเดือนธันวาคม ค.ศ. 2019 มีรายงานการพบ NDMA ในผลิตภัณฑ์ยา metformin ที่ใช้รักษาเบาหวาน ทำให้หน่วยงานกำกับดูแลในประเทศต่างๆ อาทิ องค์การอาหารและยาสหรัฐ (U.S. Food and Drug Administration; USFDA) หน่วยงานกำกับดูแลด้านยาของสหภาพยุโรป (European Medicines

Agency; EMA) มีการดำเนินการเพื่อควบคุมปริมาณ nitrosamine ที่พบปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ยา เรียกเก็บคืนยาจากท้องตลาด กำหนดแนวทางให้กับผู้ผลิตวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ยาสำเร็จรูปประเมินความเสี่ยงของการปนเปื้อนของสารกลุ่ม nitrosamine ตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยันปริมาณที่ตรวจพบและกำหนดแนวทางการป้องกันหรือลดการปนเปื้อน nitrosamines⁽¹⁻³⁾ โดยการปนเปื้อน nitrosamines อาจมีสาเหตุจากวัตถุดิบตัวยาสำคัญ สารช่วยในตำรับ (excipient) น้ำและตัวทำละลายที่ใช้ กระบวนการผลิต และวัสดุบรรจุ^(4,5)

nitrosamines มีโครงสร้างทางเคมีเป็น nitroso group จับกับ amine ดังนั้นปัจจัยที่ทำให้เกิด nitrosamine ต้องมี amines ได้แก่ secondary, tertiary หรือ quaternary amines และ nitrite salts ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ซึ่งในสภาวะดังกล่าวทำให้ nitrite salts เปลี่ยนเป็น nitrous acid และทำปฏิกิริยากับ amines ได้เป็น nitrosamines ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาแสดงการเกิด nitrosamines⁽¹⁾

จากปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้เกิด nitrosamine impurities 7 ชนิด ได้แก่ NDMA, N-nitrosodiethylamine (NDEA), N-nitroso-N-methyl-4-amino-butyric acid (NMBA), N-nitrosoisopropylethylamine (NIPEA), N-nitrosodiisopropylamine (NDIPA), N-nitrosodibutylamine (NDBA) และ N-nitrosomethylphenylamine (NMPA)^(1,5) แต่ชนิดที่พบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ยา metformin และ ranitidine คือ NDMA เท่านั้น ขณะที่ยาในกลุ่ม ARB พบการปนเปื้อนของ NDMA, NDEA และ NMBA⁽¹⁾ โดย nitrosamines เป็นพิษต่อพันธุกรรม (genotoxic agent) ในสัตว์หลายชนิด International

Agency for Research on Cancer (IARC) จัดให้ nitrosamines อยู่ในกลุ่มของสารที่อาจก่อมะเร็ง (carcinogen) ในมนุษย์ ซึ่งต้องควบคุมให้มีปริมาณต่ำกว่าระดับที่อาจเกิดความเสี่ยงก่อมะเร็งหากได้รับเข้าไป^(2,6) ดังนั้นจึงกำหนดค่า acceptance daily intake (ADI) ของสาร nitrosamine โดยใช้หลักการของ Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogen Risk ICH M7(R1) คือ ปริมาณที่ทำให้เกิดความเสี่ยงก่อมะเร็งในมนุษย์ประมาณ 1: 100,000 คน เมื่อได้รับสารต่อเนื่องทุกวัน เป็นระยะเวลา 70 ปี ซึ่งค่า ADI ของ NDMA เป็น

96 นาโนกรัมต่อวัน^(1,2) คนทั่วไปหากได้รับ NDMA ในปริมาณที่เท่ากับหรือต่ำกว่า 96 นาโนกรัม ทุกวันเป็นเวลา 70 ปี คาดว่ายังไม่มีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง⁽⁷⁾

ในประเทศไทยยา metformin เป็นยารักษาโรคเบาหวานอันดับแรกที่สูงจ่ายให้ผู้ป่วยและบรรจุอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2565⁽⁸⁾ จากข้อมูลการขึ้นทะเบียนตำรับยากับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาพบว่ามีการขึ้นทะเบียนตำรับยา metformin จำนวน 100 ตำรับ แบ่งเป็นยาผลิตในประเทศจำนวน 75 ตำรับ และนำเข้าจำนวน 25 ตำรับ⁽⁹⁾ เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคจึงจำเป็นต้องมีการสำรวจการปนเปื้อนของ NDMA ในยาเม็ด metformin ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย แต่เนื่องจากค่า ADI ของสาร NDMA มีปริมาณต่ำมากวิธีตรวจวิเคราะห์ที่ใช้ต้องมีความไวสูง จากการสืบค้นพบว่าวิธีวิเคราะห์ในตำราฟาร์มาโคเปียของสหรัฐอเมริกา (The United States Pharmacopoeia; USP) เป็นการวิเคราะห์ nitrosamine impurities ในวัตถุดิบของยากลุ่ม ARB โดยใช้เทคนิค LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS และ GC-MS/MS ซึ่งมีการใช้ NDMA-d6 เป็น internal standard และใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย⁽⁵⁾ ส่วนตำรายุโรปเฟีย (The European Pharmacopoeia) เป็นวิธีวิเคราะห์ nitrosamine impurities ในวัตถุดิบของยากลุ่ม ARB ด้วยเทคนิค GC-MS/MS และใช้ N-nitrosoethyl-methylamine (NEMA) เป็น internal standard⁽¹⁰⁾ ดังนั้นจึงยังไม่มีวิธีวิเคราะห์ nitrosamine impurities สำหรับผลิตภัณฑ์ยา metformin ในตำรายาใดๆ ส่วนหน่วยงานกำกับดูแลทางด้านยาของประเทศต่างๆ เผยแพร่วิธีการตรวจวิเคราะห์ nitrosamines ในผลิตภัณฑ์ยาดังนี้ USFDA วิเคราะห์ NDMA ในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ยา metformin ด้วยเทคนิค LC-MS มีขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เป็น 0.01 ppm และ 0.03 ppm ตามลำดับ⁽¹¹⁾ หน่วยงาน Health Sciences Authority ของสิงคโปร์ได้เผยแพร่วิธีวิเคราะห์ 2 วิธี ได้แก่ การวิเคราะห์ NDMA ในผลิตภัณฑ์ยา metformin และ ranitidine ด้วยเทคนิค LC-MS/MS และใช้ NDMA-d6 เป็น internal standard โดยมีวัตถุประสงค์ให้เป็น

ทางเลือกและใช้แนวทางในการตรวจวิเคราะห์ พร้อมระบุให้มีการตรวจสอบความถูกต้องก่อนนำไปใช้⁽¹²⁾ และการวิเคราะห์ NDMA ในผลิตภัณฑ์ยา metformin ด้วย GC-MS เตรียมตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย dichloromethane และสกัดด้วย 0.1 N hydrochloric acid ก่อนนำสารละลายชั้น dichloromethane มาวิเคราะห์ด้วย GC-MS⁽¹³⁾ ส่วนหน่วยงาน Swissmedic ของสวิตเซอร์แลนด์ได้เผยแพร่การวิเคราะห์ nitrosamines ในผลิตภัณฑ์ยากลุ่ม ARB ด้วย GC-MS/MS⁽¹⁴⁾ จากการสืบค้นดังกล่าว พบว่าวิธีวิเคราะห์ NDMA ในผลิตภัณฑ์ยา metformin มีทั้งเทคนิค LC และ GC ชนิดของตัวทำละลายและ internal standard และขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ใช้มีความหลากหลาย ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ NDMA ในผลิตภัณฑ์ยาเม็ด metformin ด้วย GC-MS โดยพัฒนาจากวิธีที่หน่วยงานกำกับดูแลด้านยาของต่างประเทศเผยแพร่ เพื่อใช้ในการสำรวจการปนเปื้อนของ nitrosamine impurities ในยาเม็ด metformin ที่มีการขึ้นทะเบียนยาในประเทศไทย และทำให้ทราบสถานการณ์การปนเปื้อน NDMA ในผลิตภัณฑ์ยา metformin ในประเทศไทย

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐาน: N-nitrosodimethylamine (NDMA) (Chem Service Inc., USA, สารละลายใน methanol ความเข้มข้น (certified concentration) 104.0 ug/ml $\pm$ 2.0% (k = 2) Lot No. 7979000), nitrosodimethylamine-d6 solution (NDMA-d6) (Chem Service Inc., USA, สารละลายใน dichloromethane ความเข้มข้น (certified concentration) 1,010.9 ug/ml $\pm$ 2.0% (k = 2) Lot No. 12628700) และ N-nitrosodiethylamine (NDEA) (Chem Service Inc., USA, สารละลายใน methanol ความเข้มข้น (certified concentration) 100.9 ug/ml $\pm$ 2.0% (k = 2) Lot No. 14609000)

สารเคมี: methanol (HPLC grade: Merck, Germany), dichloromethane (HPLC grade:

Carlo Erba, Germany), povidone K30 (Pharmaceutical grade, Ashland, USA), magnesium stearate (Pharmaceutical grade, Italmatch Chemicals, Spain), hydroxypropyl methylcellulose E15 (Pharmaceutical grade, Lotte Fine Chemical Co., Ltd., Korea) และ polyethylene glycol 6000 (Pharmaceutical grade, Liaoning Oxiranphex Inc., China)

เครื่องมือและอุปกรณ์

gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (Thermo Scientific™ TRACE 1310 Gas Chromatograph, Thermo Fisher Scientific Inc., USA), detector (ISQ™ 7000 single quadrupole mass spectrometer, Thermo Fisher Scientific Inc, USA), เครื่องชั่งความละเอียด 0.0001 กรัม รุ่น XPE204 (Mettler Toledo, Switzerland), เครื่องชั่ง ความละเอียด 0.01 มิลลิกรัม รุ่น XP205 (Mettler Toledo, Switzerland), เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 มิลลิกรัม รุ่น XP6 (Mettler Toledo, Switzerland) volumetric flask ขนาด 1, 10, 25 และ 500 มิลลิลิตร, ปิเปต ขนาด 10 มิลลิลิตร, micropipette ขนาด 25, 100 และ 250 ไมโครลิตร (Microman, Gilson S.A.S., France), eppendorf tube ขนาด 2.0 มิลลิลิตร, centrifuge (Hermle® Z306, Hermle, Germany) และ shaker (Gerhardt® Laboshake, Germany)

ตัวอย่างยาเม็ด metformin

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบความถูกต้องของวิธี Glucophage XR ชนิด extended release 1,000 mg ผลิตโดย Merck Sante S.A.S. รุ่นผลิต Y07802 วันผลิต 01/2020 วันหมดอายุ 12/2022

ตัวอย่างที่ใช้ในการสำรวจปริมาณ NDMA ในยาเม็ด metformin ตั้งแต่ตุลาคม พ.ศ. 2563 ถึงกันยายน พ.ศ. 2565 รวมทั้งสิ้น 794 ตัวอย่าง แบ่งเป็น ตัวอย่างจากผู้ผลิตในประเทศ 40 ราย 62 ทะเบียนตำรับยา ตัวอย่าง

จากผู้นำเข้า 11 ราย 22 ทะเบียนตำรับยา โดยทั้งหมดเป็นตัวอย่างที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) เก็บจากผู้ผลิตและผู้นำเข้า

วัตถุดิบ metformin ผลิตโดย Merck Sante S.A.S. รุ่นผลิต M11601

placebo (matrix blank)

ในยาเม็ด metformin ขนาด 500 มิลลิกรัม ประกอบด้วย povidone K30 27 มิลลิกรัม magnesium stearate 5 มิลลิกรัม hydroxypropyl methylcellulose E15 9.76 มิลลิกรัม และ polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) 0.24 มิลลิกรัม ใช้ทั้งหมด 50 เม็ด

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน NDMA ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน NDMA 104.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 20 ไมโครลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย internal standard (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน NDMA ความเข้มข้น 1, 3, 5, 10, 30, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน NDMA ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 5, 15, 25, 50, 150, 250 และ 500 ไมโครลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย internal standard (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

การเตรียมสารละลาย internal standard ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรใน dichloromethane

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน NDMA-d6 1,010.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 25 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย dichloromethane ให้ครบ 500 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

บดเม็ดยา metformin จำนวน 20 เม็ด ซึ่งผงยาให้มีปริมาณ metformin 1,000 มิลลิกรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย internal standard (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) 10.0 มิลลิลิตร เขย่าด้วย shaker เป็นเวลา

50 นาที เทสารละลายตัวอย่างลงใน eppendorf tube ขนาด 2.0 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปิเปตเฉพาะส่วนใสไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS

สภาวะของระบบโครมาโตกราฟ (chromatographic condition) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะของระบบโครมาโตกราฟของ GC-MS

สภาวะของ GC	
injection volume	2 μ l
inlet temperature	250°C
carrier gas (ml/min)	Helium (1 ml/min)
injection mode	Splitless Splitless time: 1 min Splitless flow: 50 ml/min
GC column	DB-WAX ขนาด 30 m length $\times$ 0.25 mm ID $\times$ 0.25 μ m film thickness
oven temperature program	45°C (hold 1 min), 15°C/min to 180°C, 20°C/min to 250°C, 250°C (hold 1 min)
retention time	NDMA: 6.20 min NDMA-d6: 6.19 min
สภาวะของ mass spectrometry detector	
transfer line	250°C
ion source	300°C
acquisition mode	SIM
target SIM	NDMA: quantified ion เป็น m/z 74 qualifier ions เป็น m/z 43 42 NDMA-d6: quantified ion เป็น m/z 80

การตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability)

สัมประสิทธิ์การตัดลิไน (R²) ของ calibration curve ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995 ร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ของสารละลาย QC (สารละลายมาตรฐาน NDMA ที่ความเข้มข้น 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ต้องอยู่ระหว่าง 80–120%

การทดสอบความถูกต้องของวิธี^(15,16)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานใน placebo (matrix blank) สำหรับความจำเพาะเจาะจงของวิธี (specificity) ดังนี้

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน NDMA

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน NDMA 104.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 250 ไมโครลิตร ใส่ใน

volumetric flask ขนาด 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย dichloromethane จากนั้นปิเปตสารละลายที่ได้ 40 ไมโครลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย placebo ให้ได้ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน NDMA-d6

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน NDMA-d6 1010.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 50 ไมโครลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย dichloromethane จากนั้นปิเปตสารละลายที่ได้ 40 ไมโครลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย placebo ให้ได้ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน NDEA

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน NDEA 100.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 250 ไมโครลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย dichloromethane จากนั้นปิเปตสารละลายที่ได้ 40 ไมโครลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย placebo ให้ได้ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย metformin

ชั่งวัตถุดิบ metformin 2 กรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปิเปต dichloromethane 20 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask และเขย่าด้วย shaker เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ก่อนปิเปตเฉพาะส่วนใส และวิเคราะห์ด้วย GC/MS

การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง NDMA, NDMA-d6 และ NDEA

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม NDMA, NDMA-d6 และ NDEA ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรต่อชนิดสาร ตามขั้นตอนข้างต้น แต่ให้เจือจางในชั้นสุดท้ายใน volumetric flask

เดียวกัน ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลาย placebo

การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง NDMA, NDMA-d6, NDEA และ metformin

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม NDMA, NDMA-d6 และ NDEA ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรต่อชนิดสาร ตามขั้นตอนข้างต้น แต่ให้เจือจางในชั้นสุดท้ายใน volumetric flask เดียวกัน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลาย metformin ใน placebo

การเตรียมสารละลาย internal standard ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ใน dichloromethane สำหรับความเป็นเส้นตรง (linearity), LOD และ LOQ

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน NDMA-d6 1,010.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 25 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย dichloromethane ให้ครบ 500 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย internal standard ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย placebo สำหรับ linearity, LOD และ LOQ

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน NDMA-d6 1,010.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 25 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย placebo ให้ครบ 500 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย placebo (matrix blank solution)

ผสม povidone K30 1,350 มิลลิกรัม magnesium stearate 250 มิลลิกรัม hydroxypropyl methylcellulose E15 488 มิลลิกรัม polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) 12 มิลลิกรัม ให้เข้ากัน ละลายใน dichloromethane 250 มิลลิลิตร และเขย่าด้วย shaker เป็นเวลา 50 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 3 (LOQ), 10, 50 และ 90 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และการทดสอบความเที่ยง (precision)

ซึ่งผงยาให้มีปริมาณ metformin 1,000 มิลลิกรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 4 ขวด เติมสารละลายมาตรฐาน NDMA ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการปิเปต 0.15, 0.5, 2.5, 4.5 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ตามลำดับ เติมสารละลาย internal standard (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ให้ได้ปริมาตรรวม 10.0 มิลลิลิตร โดยการปิเปต 9.85, 9.5, 7.5 และ 5.5 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ตามลำดับ เขย่าด้วย shaker เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นเทสารละลายตัวอย่างใส่ใน eppendorf tube ขนาด 2.0 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ก่อนปิเปตเฉพาะส่วนใสและวิเคราะห์ด้วย GC-MS

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (specificity)

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน NDMA ใน placebo สารละลายมาตรฐาน NDMA-d6 ใน placebo สารละลายมาตรฐาน NDEA ใน placebo สารละลาย metformin ใน placebo สารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง NDMA, NDMA-d6 และ NDEA ใน placebo สารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง NDMA, NDMA-d6, NDEA และ metformin ใน placebo วิเคราะห์ด้วย GC-MS เกณฑ์ยอมรับต้องไม่พบสัญญาณที่มีค่า retention time และ m/z ที่ตรงกับ NDMA และ NDMA-d6

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity)

ศึกษาความเป็นเส้นตรงในสภาวะที่มีและไม่มี placebo effect ดังนี้

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน NDMA ความเข้มข้น 1, 3, 5, 10, 30, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย internal standard (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน dichloromethane

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน NDMA ในสารละลาย placebo เตรียมเช่นเดียวกับใน dichloro-

methane โดยเตรียมความเข้มข้นละ 3 ขั้ว นำไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ซึ่งต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995⁽¹⁵⁾

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

วิเคราะห์สารมาตรฐาน NDMA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 0.8, 1.0 และ 3.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนความเข้มข้นละ 10 ขั้ว คำนวณหา signal to noise (S/N) ซึ่ง LOD ต้องมี S/N เท่ากับ 3 ส่วน LOQ ต้องมี S/N เท่ากับ 10⁽¹⁵⁾ โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน NDMA ใน dichloromethane และใน dichloromethane ที่มีการ spike placebo นอกจากนี้ยังหาค่า LOD และ LOQ จากการคำนวณด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; s) จากสูตร LOD = 3s และ LOQ = 10s

การทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน NDMA ที่ 4 ระดับความเข้มข้น คือ 3 (LOQ), 10, 50 และ 90 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ระดับละ 6 ขั้ว จากนั้นหาค่าร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ที่แต่ละระดับความเข้มข้น โดยเกณฑ์ยอมรับความแม่นยำ %recovery 80–120%⁽¹⁷⁾

การทดสอบความเที่ยง (precision)

การทดสอบ repeatability วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน NDMA ที่ 4 ระดับความเข้มข้น คือ 3 (LOQ), 10, 50 และ 90 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ระดับละ 6 ขั้ว

การทดสอบ intermediate precision วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน NDMA ที่ความเข้มข้น 3 (LOQ) นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 6 ขั้ว ต่างวันและต่างนักวิเคราะห์

เกณฑ์ยอมรับความเที่ยง: ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบน
มาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation;
%RSD) ไม่เกิน 20⁽¹⁷⁾

การศึกษาความคงสภาพของสารละลายตัวอย่าง

วิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่อยู่ภายใต้สภาวะ
การเก็บใน autosampler แบ่งสารละลายตัวอย่างใส่ใน
vial จำนวน 30 ขวด โดยฉีดสารละลายตัวอย่างในแต่ละ
ขวดทุก ๆ 20 นาที (ขวดละ 1 เข็ม) จากนั้นคำนวณปริมาณ
NDMA ในแต่ละช่วงเวลา

เกณฑ์ยอมรับ: ค่าร้อยละของความแตกต่างของ
ปริมาณ NDMA ที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับเวลาที่ 0
ต้องไม่เกิน 20

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Uncertainty)

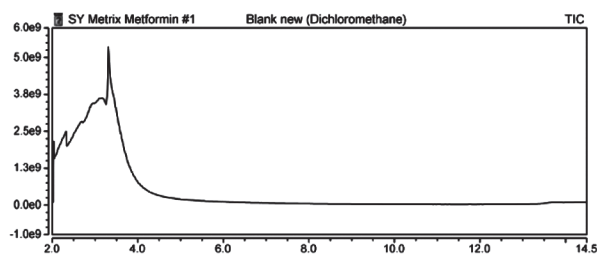
คำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัดตามแนวทาง
ของ EURACHEM⁽¹⁸⁾ โดยคำนึงถึงแหล่งความ
ไม่แน่นอนทุกแหล่ง รวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด

จากนั้นคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความ
เชื่อมั่น 95% ($k = 2$)

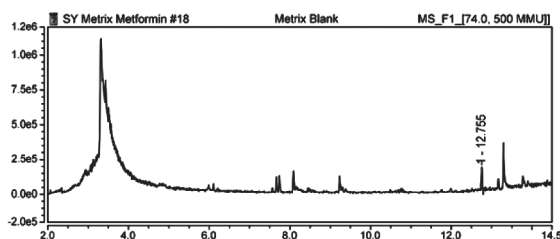
ผล

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี

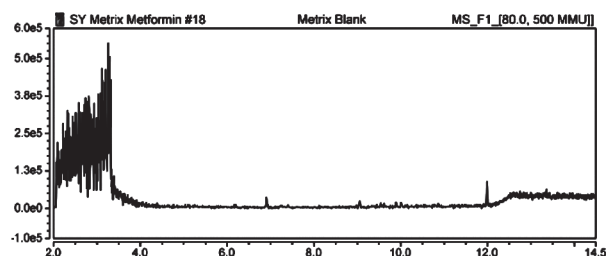
จากการฉีดสารมาตรฐานผสมในสารละลาย
placebo และในสารละลาย placebo กับ metformin
พบว่าไม่มี peak รบกวนจาก NDEA metformin
สารอื่นๆ ในตัวรับ และ solvent ที่ใช้ ที่ตำแหน่ง
retention time, m/z ของ NDMA และ NDMA-d6
นอกจากนี้ไม่พบ m/z 129 ของ metformin ดังแสดง
ในภาพที่ 2-5 สำหรับ retention time ของ NDMA,
NDMA-d6 และ NDEA ที่เวลา 6.20, 6.19 และ 7.0
ตามลำดับ การแตก mass ของ NDMA มีค่า m/z 74.0,
43.1 และ 42.1 NDMA-d6 มีค่า m/z 80.1, 48.1
และ 46.1 NDEA มีค่า m/z 102.1, 56.1 และ 42.1
ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 6 ดังนั้นวิธีนี้สามารถแยก
NDMA และ NDMA-d6 ออกจาก NDEA metformin
สารอื่นๆ ในตัวรับ และ solvent ที่ใช้ได้



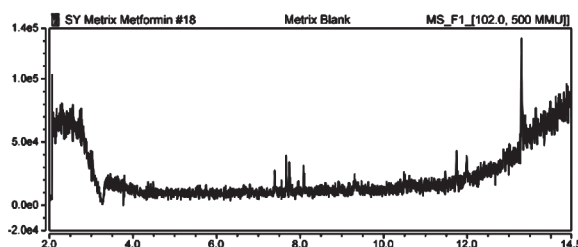
dichloromethane



สารละลาย placebo ที่ m/z 74

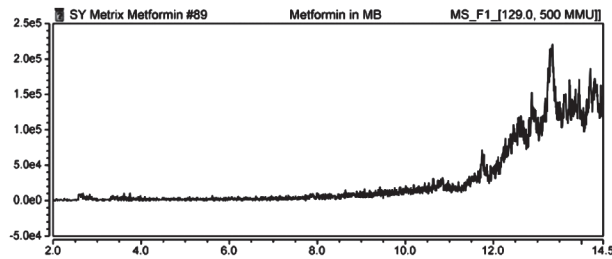


สารละลาย placebo ที่ m/z 80

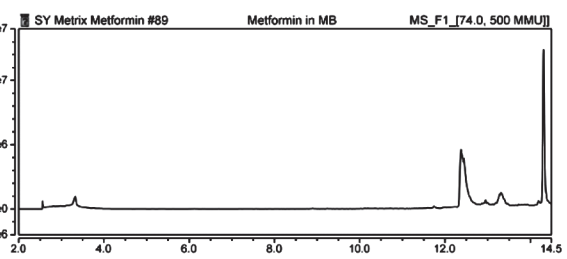


สารละลาย placebo ที่ m/z 102

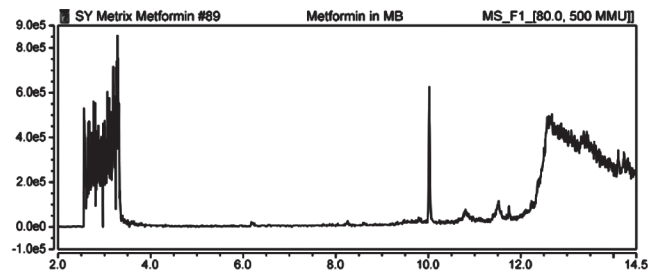
ภาพที่ 2 chromatogram ของ dichloromethane และสารละลาย placebo



สารละลาย metformin ใน placebo ที่ m/z 129

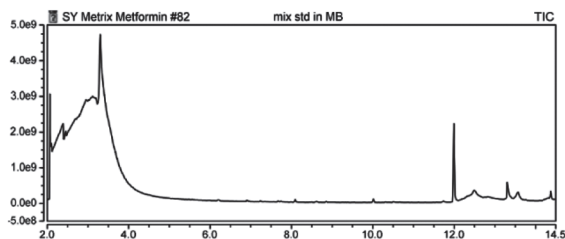


สารละลาย metformin ใน placebo ที่ m/z 74

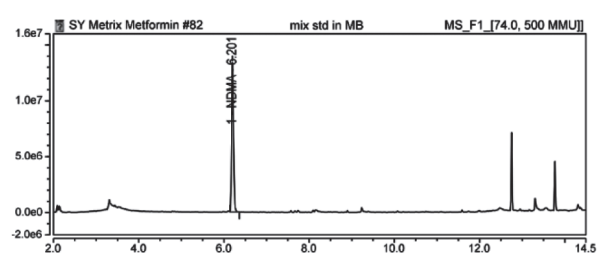


สารละลาย metformin ใน placebo ที่ m/z 80

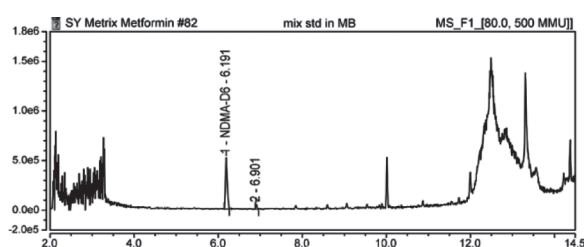
ภาพที่ 3 chromatogram ของสารละลาย metformin ใน placebo



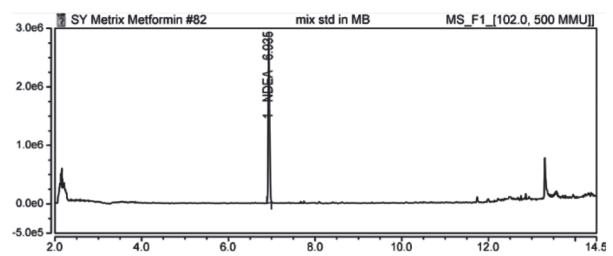
NDMA, NDMA-d6 และ NDEA



NDMA ที่ m/z 74

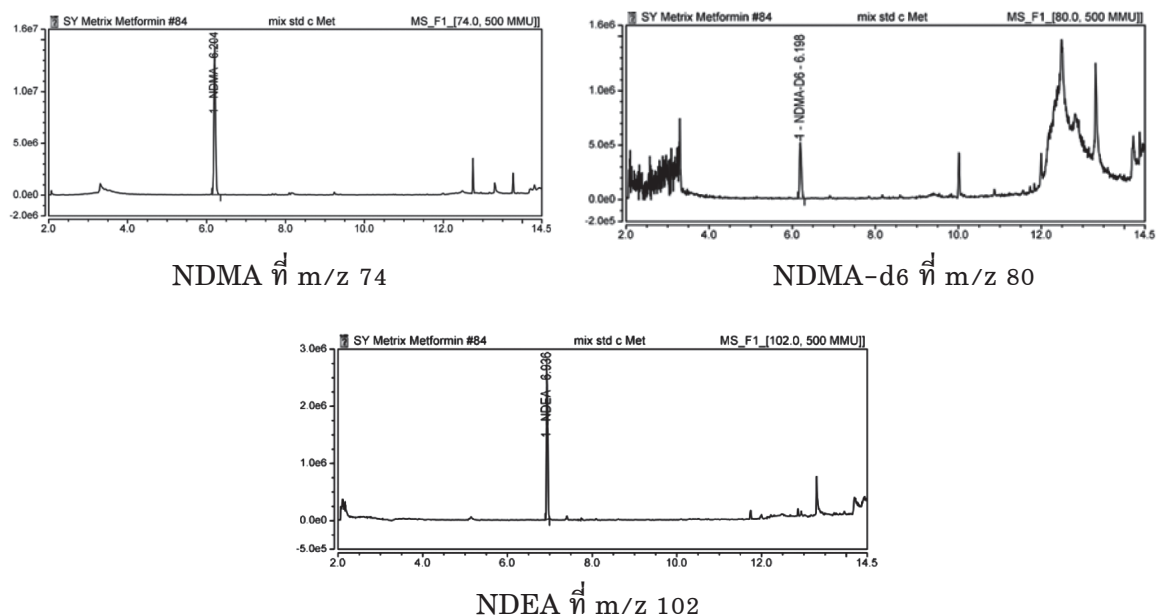


NDMA-d6 ที่ m/z 80

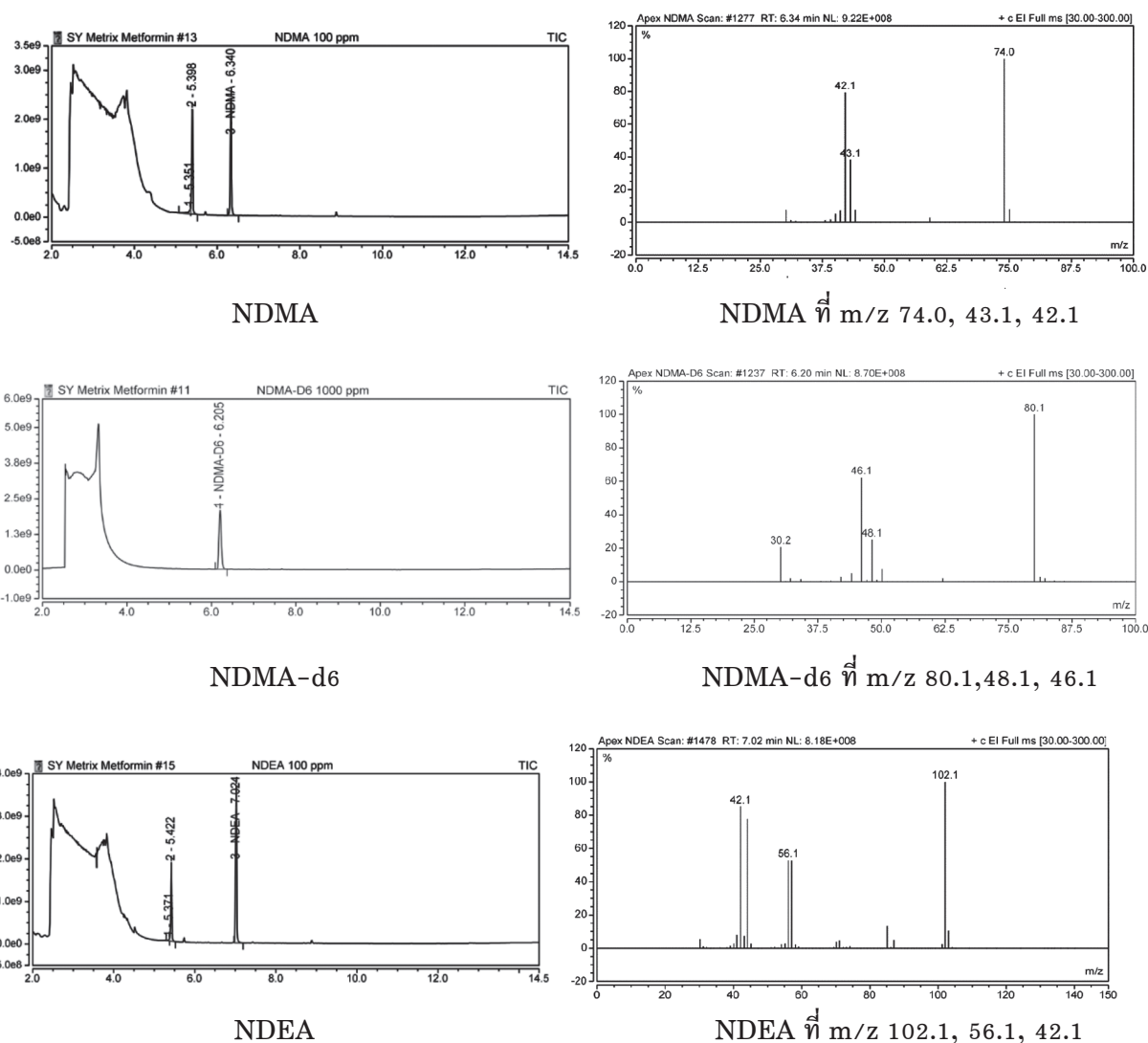


NDEA ที่ m/z 102

ภาพที่ 4 chromatogram ของสารละลายผสมระหว่าง NDMA, NDMA-d6 และ NDEA ใน placebo



ภาพที่ 5 chromatogram ของสารละลายผสมระหว่าง NDMA, NDMA-d6 และ NDEA ใน placebo + metformin

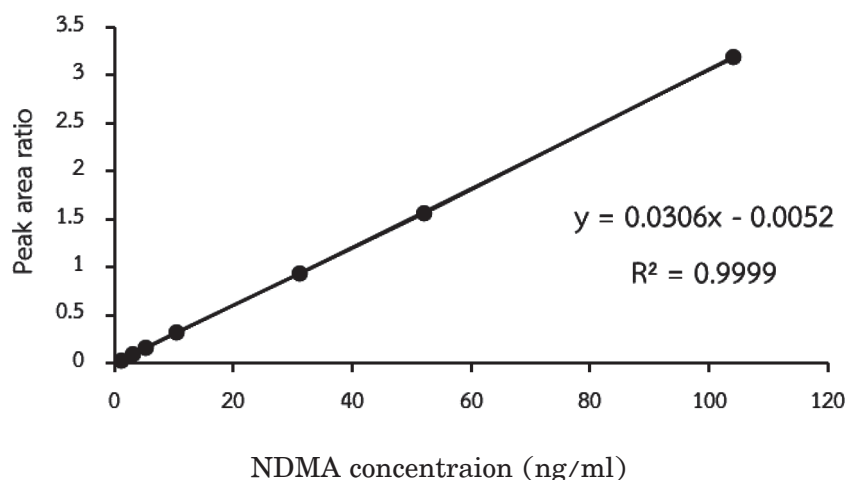


ภาพที่ 6 chromatogram และ mass spectrum ของ NDMA, NDMA-d6 และ NDEA ใน dichloromethane

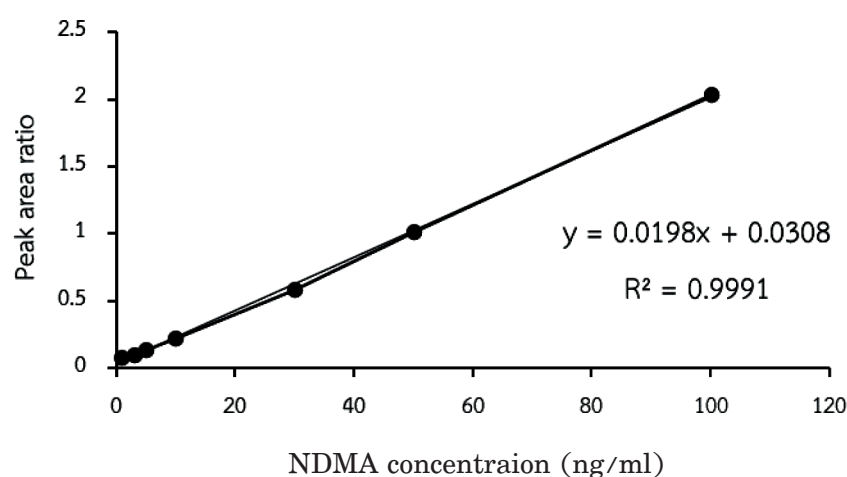
การทดสอบความเป็นเส้นตรง

ผลการฉีดสารละลายมาตรฐาน NDMA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 1–100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับความเข้มข้นละ 3 ขั้ว สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า peak area ratio ของ NDMA และ NDMA-d₆ (แกน Y) กับความเข้มข้นของ NDMA (แกน X) ซึ่งทำการศึกษาความเป็นเส้นตรง 2 แบบ คือ การเตรียม

สารละลายมาตรฐาน NDMA ใน dichloromethane และใน dichloromethane ที่มีการ spike placebo พบว่ากราฟมาตรฐานที่สร้างจากสารละลายมาตรฐาน NDMA ใน dichloromethane และใน dichloromethane ที่มีการ spike placebo เป็นเส้นตรงตลอดช่วงการทดสอบ และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9999 และ 0.9991 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 7 และ 8



ภาพที่ 7 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน NDMA ใน dichloromethane



ภาพที่ 8 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน NDMA ใน dichloromethane ที่ spike placebo

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ

ผลวิเคราะห์สารมาตรฐาน NDMA ที่ความเข้มข้น 0.8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามี S/N มากกว่า 3 ทั้ง 10 ครั้ง ซึ่งเป็นขีดจำกัดของการตรวจพบ ส่วนขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มี S/N มากกว่า 10 ทั้ง 10 ครั้ง โดยให้ผลเหมือนกัน แม้ว่าจะเตรียมสารละลายมาตรฐาน NDMA ใน dichloromethane หรือใน dichloromethane ที่มีการ spike placebo

จากการวิเคราะห์สารมาตรฐาน NDMA เตรียมใน dichloromethane โดยการ spike placebo ที่ระดับความเข้มข้น 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณค่า s ได้ 0.166 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า LOD เท่ากับ 0.50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ LOQ 1.66 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้มี LOQ เท่ากับ 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งที่ความเข้มข้นนี้มีความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ส่วน LOD เท่ากับ 0.8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง

ผลการฉีดสารละลายตัวอย่างยาเม็ดที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน NDMA ที่ 4 ระดับความเข้มข้น คือ 3, 10, 50 และ 90 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ พบความแม่นยำที่ประเมินจาก %recovery ทั้ง 4 ระดับผ่านเกณฑ์ %recovery 80–120 และความเที่ยง (repeatability) ซึ่งมีค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 2.9, 7.2, 2.1 และ 2.5 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การทดสอบความแม่นยำ (%recovery) และความเที่ยง (repeatability; %RSD) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ NDMA ในยาเม็ด metformin

	ระดับความเข้มข้น (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	3	10	50	90
1	98.1	94.2	91.1	91.8
2	106.9	86.0	86.4	91.6
3	104.8	88.9	87.0	86.8
4	102.7	102.3	87.0	92.6
5	103.9	84.3	86.8	91.9
6	103.9	90.5	86.2	92.9
%recovery	103.4	91.0	87.4	91.3
%RSD เฉลี่ย	2.9	7.2	2.1	2.5

ผลการทดสอบ intermediate precision โดยทำการวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างยาเม็ดที่มีการเติม

สารละลายมาตรฐาน NDMA ที่ความเข้มข้น 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร วันละ 6 ซ้ำ 3 วัน โดยวิเคราะห์ต่างวันและต่างนักวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 3

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณ NDMA (ng)} = \frac{\text{ความเข้มข้นที่อ่านจากกราฟมาตรฐาน (ng/ml)} \times 10 \text{ ml} \times \text{น้ำหนักเม็ดยาเฉลี่ย (g)}}{\text{น้ำหนักผงยา (g)}}$$

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบ intermediate precision (%RSD) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ NDMA ในยาเม็ด metformin

	ปริมาณ NDMA (นาโนกรัม)		
	Day 1 Analyst 1	Day 2 Analyst 1	Day 3 Analyst 2
1	30.5964	29.2171	31.9915
2	33.3469	26.4462	28.1155
3	32.7019	24.7714	29.2640
4	32.0559	26.4845	29.7587
5	32.4250	28.6440	28.1716
6	32.4252	23.0087	27.2074
ปริมาณ NDMA เฉลี่ย (n = 18)	29.2573		
%RSD	10.08		

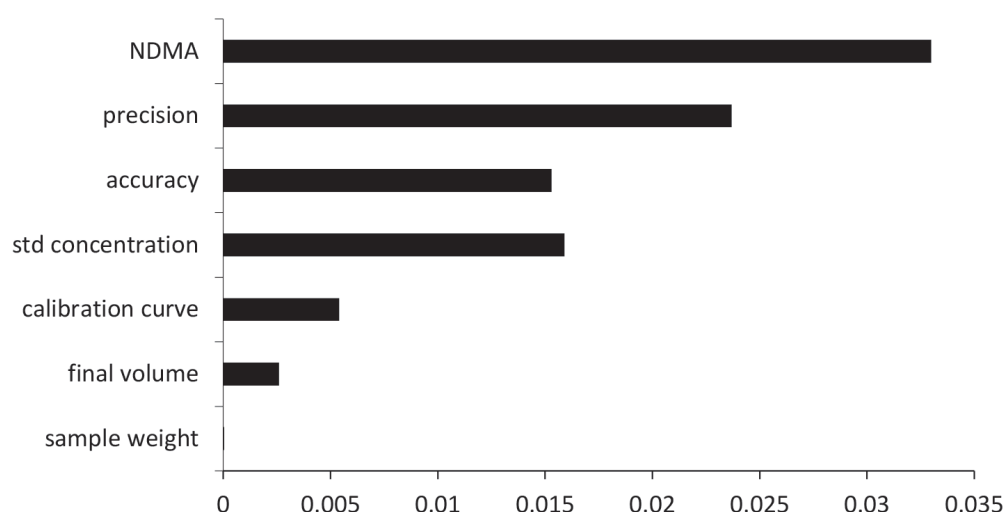
การศึกษาคงสภาพของสารละลายตัวอย่าง

ผลการศึกษาพบว่าสารละลายตัวอย่างที่อยู่ภายใต้สภาวะการเก็บใน autosampler มีความคงสภาพ 3 ชั่วโมง ดังนั้นต้องฉีดวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างภายหลังจากการเตรียมเสร็จภายใน 3 ชั่วโมง

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด

โดยคำนวณค่าความไม่แน่นอนที่เกิดขึ้นจากแต่ละแหล่ง คำนวณความไม่แน่นอนรวม (combined standard

uncertainty) และคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($k = 2$) ค่าความไม่แน่นอนขยายของการวิเคราะห์ NDMA ในยาเม็ด metformin มีค่า 0.0330 ± 0.0022 ppm เมื่อคำนวณสัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ NDMA ในยาเม็ด metformin ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ NDMA ในยาเม็ด metformin

นำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีมาตรฐานวิเคราะห์ตัวอย่างในการสำรวจปริมาณการปนเปื้อน NDMA ในยาเม็ด metformin รวม 794 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างของผู้ผลิตในประเทศ 40 ราย 62 ทะเบียนตำรับยา และตัวอย่างจากผู้นำเข้า 11 ราย 22 ทะเบียนตำรับยา พบว่าตรวจไม่พบ NDMA จำนวน 108 ตัวอย่าง ตรวจพบ NDMA น้อยกว่า 0.03 ppm จำนวน 523 ตัวอย่าง พบ NDMA เกิน 0.03 ppm แต่ไม่เกิน 0.048 ppm จำนวน 113 ตัวอย่าง และมีเพียง 50 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบ NDMA เกิน 0.048 ppm ซึ่งเป็นตัวอย่างจาก 6 บริษัท 8 ทะเบียนตำรับยา

วิจารณ์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ NDMA ในยาเม็ด metformin โดยเลือกเทคนิคการวิเคราะห์เป็น gas chromatography และ detector เป็น mass spectrometry เนื่องจาก NDMA เป็นสารปนเปื้อนที่มีปริมาณน้อยมากในระดับ ppb และมีการใช้ internal standard เพื่อเป็นการควบคุมและลดความผิดพลาดในขั้นตอนการวิเคราะห์ การเลือก internal standard สำหรับเทคนิค mass spectrometry ควรใช้สารที่มีโครงสร้างเหมือนสารที่ตรวจวิเคราะห์ แต่มีมวลโมเลกุลมากกว่าโดยการแทนที่บางอะตอมด้วยสาร isotope⁽²⁾ ดังนั้นจึงเลือกใช้ NDMA-d6 เป็น internal standard เนื่องจากเป็น isotope ของ NDMA ที่สามารถแยกได้ด้วย m/z และมีคุณสมบัติทางด้านเคมีและฟิสิกส์เหมือนกับ NDMA นอกจากนี้มีการใช้เทคนิค selected ion monitoring (SIM) เป็นการเลือกวัดเฉพาะไอออนของสารที่สนใจ โดย mass analyzer จะคัดเลือกเฉพาะ precursor ion ของสารที่สนใจผ่านเข้าสู่ detector เพื่อลดปริมาณประจุที่ไม่ต้องการเข้าสู่ mass detector ทำให้ตัวรับกวนลดลงมาก วิธีนี้จึงเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารปริมาณน้อย (trace analysis) เนื่องจากมีความไวในการวิเคราะห์ที่ค่อนข้างสูง วิธีนี้เลือก precursor ion เป็น m/z 74 และ 80 สำหรับ NDMA และ NDMA-d6 ตามลำดับ ส่วนคอลัมน์เลือกใช้ DB-Wax มี stationary phase เป็น polyethylene glycol มีคุณสมบัติ polarity สูง

เหมาะสำหรับใช้แยกสารที่ polar ซึ่ง NDMA มีหมู่ amine จึงจัดเป็นสาร polar การเลือกตัวทำละลายพิจารณาจากค่าการละลายของ NDMA พบว่ามีการละลายใน alcohol และ ether ได้ดี และละลายใน organic solvent รวมถึง dichloromethane⁽¹⁹⁾ สารมาตรฐาน NDMA-d6 มีอยู่ในรูปสารละลายใน dichloromethane ดังนั้นจึงเลือกใช้ dichloromethane เป็นสารสกัด เนื่องจากทั้ง NDMA และ NDMA-d6 ละลายได้ใน dichloromethane ในขณะที่ metformin ซึ่งอยู่รูปเกลือ hydrochloride จะไม่ละลายใน dichloromethane (practically insoluble)⁽²⁰⁾ นอกจากนี้วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นนี้มีการเตรียมตัวอย่างด้วยการละลายใน dichloromethane แล้วฉีดวิเคราะห์ ซึ่งเป็นวิธีที่มีขั้นตอนการเตรียมการตัวอย่างที่ไม่ยุ่งยากและลดความผิดพลาดในขั้นตอนการดูดซับสารละลาย dichloromethane ซึ่งอยู่ชั้นล่างออกมาวิเคราะห์ เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีเป็นจำนวนมาก เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีในตำรายา USP ที่เป็นวิธี GC/MS เหมือนกันแต่เป็นชนิด headspace มีตัวทำละลายเป็น methanol และการเตรียมตัวอย่างมีขั้นตอนที่ยุ่งยากกว่า โดยมีการเติม imidazole acetronitrile นอกเหนือจากสารละลาย internal standard ในขณะที่วิธีที่พัฒนานี้เป็นการฉีดสารละลายเข้าสู่เครื่อง GC/MS โดยตรง จะมีความเที่ยงในการวิเคราะห์มากกว่า การเลือกใช้ dichloromethane เป็นตัวทำละลายเนื่องจากตัวอย่างยา metformin บางตำรับโดยเฉพาะที่เป็นชนิด extended release เมื่อใช้ตัวทำละลายเป็น methanol จะกลายเป็นเจลไม่ได้เป็นสารละลาย ดังนั้น methanol จึงไม่เหมาะใช้เป็นตัวทำละลาย ซึ่งสอดคล้องกับวิธีตำรายา USP ที่ระบุไว้สำหรับการหาปริมาณ NDMA ในวัตถุดิบเท่านั้นไม่ครอบคลุมถึงในผลิตภัณฑ์ ดังนั้นวิธีที่พัฒนานี้จึงดีกว่าวิธีในตำรายา USP ในการใช้วิเคราะห์ปริมาณ NDMA ในผลิตภัณฑ์ยาเม็ด metformin

การทดสอบความถูกต้องของวิธีดำเนินการตาม ICH Guideline^(15,16) พบว่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 1–100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ขีดจำกัดของการตรวจพบเท่ากับ 0.8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ความแม่นยำในเกณฑ์โดยมี %recovery อยู่ในช่วง 87.4–103.4% สำหรับความเที่ยงทำการศึกษาทั้งแบบ repeatability และ intermediate precision พบว่า %RSD น้อยกว่า 8% และ 11% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ เนื่องจากเป็นการวิเคราะห์สารปนเปื้อนในปริมาณน้อยมากระดับ ppb ดังนั้นการวิเคราะห์ในงานประจำจะต้องเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างใหม่ทุกวัน จึงศึกษาความคงสภาพของสารละลายตัวอย่างที่อยู่ใน autosampler เท่านั้น โดยพบว่าจะต้องฉีดตัวอย่างภายหลังจากการเตรียมเสร็จภายใน 3 ชั่วโมง ดังนั้นวิธีที่พัฒนาผ่านการทดสอบความถูกต้องมีความเหมาะสมกับการนำไปใช้ในการหาปริมาณ NDMA ในยาเม็ด metformin ที่มีการกำหนดเกณฑ์การยอมรับปริมาณ NDMA ในยา metformin ไม่เกิน 0.048 ppm โดยคำนวณจากค่า maximum daily dose ของ metformin มีค่าเท่ากับ 2,000 มิลลิกรัม และ ADI ของ NDMA ไม่เกิน 96 ng/day(1,2) ผลการวิเคราะห์ NDMA ในยาเม็ด metformin ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย พบว่ามี 50 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบ NDMA เกิน 0.048 ppm จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 794 ตัวอย่าง สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยามีการเรียกเก็บคืนยาในรุ่นผลิตที่มีปริมาณ NDMA เกิน 0.048 ppm และมีมาตรการให้ผู้ผลิตยาหาสาเหตุของการปนเปื้อน NDMA และควบคุมปริมาณ NDMA ไม่ให้เกินเกณฑ์ นอกจากนี้การวิเคราะห์ปริมาณ NDMA ต้องใช้ detector เป็น mass spectrometry ผู้ผลิตยาในประเทศส่วนใหญ่ยังไม่มีเครื่องมือชนิดนี้เนื่องจากมีราคาค่อนข้างสูงและค่าบำรุงรักษาสูง ดังนั้นวิธีนี้จึงใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ NDMA ที่ส่งตรวจโดยผู้ผลิตยาในประเทศ

การปนเปื้อน NDMA ในผลิตภัณฑ์ยาเม็ด metformin อาจมีสาเหตุจากวัตถุดิบ excipient และ ภาชนะบรรจุ⁽²⁾ เมื่อพิจารณาขั้นตอนการสังเคราะห์ metformin มีการใช้สารตั้งต้นเป็น dimethylamine ซึ่งเป็น secondary amine เมื่อมี dimethylamine ตกค้างอยู่ในวัตถุดิบจะสามารถทำปฏิกิริยากับ nitrosating

agent ที่ปนเปื้อนอยู่ทำให้เกิด NDMA ได้ ในตำรา British Pharmacopoeia มีการควบคุมปริมาณ dimethylamine ในวัตถุดิบไม่ให้เกิน 0.05%⁽²¹⁾ ขณะที่ nitrosating agent อาจปนเปื้อนมาจาก excipient ได้แก่ hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), polyvinylcholoride (PVP) หรือจากภาชนะบรรจุ ซึ่งมี nitrocellulose เป็นส่วนประกอบของหมึกพิมพ์⁽²²⁾ ดังนั้นการควบคุมปริมาณ NDMA ในยาเม็ด metformin ผู้ผลิตจำเป็นต้องมีการประเมินความเสี่ยงถึงปัจจัยที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน NDMA ในผลิตภัณฑ์และต้องมีการดำเนินการกำจัดหรือลดความเสี่ยงนั้น เพื่อเป็นการควบคุมปริมาณการปนเปื้อนของ NDMA ที่มีประสิทธิภาพ

สรุป

การตรวจวิเคราะห์ NDMA ในผลิตภัณฑ์ยาเม็ด โดยใช้วิธี GC/MS ที่พัฒนาดีกว่าวิธีในตำราฯที่ระบุใช้วิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็นวัตถุดิบเท่านั้นไม่สามารถนำมาใช้วิเคราะห์กับผลิตภัณฑ์ยา metformin ได้ เนื่องจากเตรียมตัวอย่างที่ไม่เหมาะสม วิธีที่ได้พัฒนามีข้อดีคือ มีการเตรียมตัวอย่างที่ไม่ยุ่งยากและมีความไวในการวิเคราะห์ สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณ NDMA ได้ในระดับที่ต่ำกว่าเกณฑ์ที่ยอมรับ คือ 0.048 ppm โดยมีความถูกต้อง แม่นยำ และความจำเพาะต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ เหมาะกับการตรวจวิเคราะห์ในงานประจำ รวมทั้งกรณีที่มีปริมาณตัวอย่างจำนวนมาก ดังนั้นวิธีนี้สามารถนำไปใช้สำหรับการปนเปื้อนของ NDMA ในผลิตภัณฑ์ยา metformin ที่มีจำหน่ายในประเทศ เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายเคมี-ฟิสิกส์ 2 และ ฝ่ายวัตถุดิบ 1 สำนักยาและวัตถุดิบ ที่อนุเคราะห์ วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ รวมทั้งให้คำแนะนำทำให้ การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Control of nitrosamine impurities in human drugs; Guidance for industry. [online]. 2021; [cited 2023 Apr 1]: [24 screens]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/media/141720/download>.
2. European Medicines Agency. Nitrosamine impurities in human medicinal products. [online]. 2020; [cited 2023 Dec 1]: [90 screens]. Available from: URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-assessment-report_en.pdf.
3. European Medicines Agency. Nitrosamine impurities. [online]. [cited 2023 Dec 1]: [20 screens]. Available from: URL: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/post-authorisation/pharmacovigilance-post-authorisation/referral-procedures-human-medicines/nitrosamine-impurities#ema-inpage-item-13203>.
4. Sedlo I, Kolonić T, Tomić S. Presence of nitrosamine impurities in medicinal products. Arh Hig Rada Toksikol 2021; 72(1): 1-5.
5. General chapter <1469> Nitrosamines impurities. In: The United States Pharmacopeia - National Formulary. Rockville, MD: United States Pharmacopeia; 2021.
6. European Medicines Agency. Lessons learnt from presence of N-nitrosamine impurities in sartan medicines. [online]. 2020; [cited 2023 Dec 1]: [98 screens]. Available from: URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/lessons-learnt-presence-n-nitrosamine-impurities-sartan-medicines_en.pdf.
7. European Medicines Agency. ICHM7(R2) Guideline on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk. [online]. 2023; [cited 2023 Dec 1]: [31 screens]. Available from: URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-m7r2-guideline-assessment-and-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit-potential-carcinogenic-risk-step-5_en.pdf.
8. ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2565. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 139 ตอนพิเศษ 182 ง (วันที่ 5 สิงหาคม 2565). หน้า 11.
9. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. ระบบค้นหาข้อมูลผลิตภัณฑ์ยา. [ออนไลน์]. [สืบค้น 1 เม.ย. 2566]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://pertento.fda.moph.go.th/FDA_SEARCH_DRUG/SEARCH_DRUG/FRM_SEARCH_DRUG.aspx.
10. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare. 2.5.42. N-Nitrosamines in active substances. [online]. 2020; [cited 2023 Dec 1]: [8 screens]. Available from: URL: <https://www.edqm.eu/documents/52006/66284/european-pharmacopoeia-n-nitrosamines-active-substances.pdf>.
11. U.S. Food and Drug Administration. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) method for the determination of NDMA in metformin drug substance and drug product. [online]. 2020; [cited 2023 Apr 1]: [7 screens]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/media/134914/download>.
12. Health Sciences Authority. Determination of NDMA in metformin and ranitidine products by LC-MS/MS. [online]. 2021; [cited 2023 Apr 1]: [7 screens]. Available from: URL: https://www.hsa.gov.sg/docs/default-source/announcements/safety-alerts/determination-of-ndma-in-metformin-and-ranitidine-by-lcmsms_pl_hsa_2021mar01.pdf.

13. Health Sciences Authority. Determination of NDMA in metformin products by HRAM-GCMS. [online]. 2021; [cited 2023 Apr 1]: [6 screens]. Available from: URL: https://www.hsa.gov.sg/docs/default-source/announcements/safety-alerts/determination-of-ndma-in-metformin-by-hram-gcms_pl_hsa_2021mar01.pdf.
14. Swissmedic. Nitrosamines by GC-MS/MS. [online]. 2021; [cited 2023 Apr 1]: [7 screens]. Available from: URL: <https://www.edqm.eu/documents/52006/71923/Ad-hoc-projects-OMCL-Network-Swissmedic.pdf/76853d6b-4c19-c054-5bb7-ee4e77232cdf?t=1628667616159>.
15. European Medicines Agency. ICH Q2(R2) Guideline on validation of analytical procedures. [online]. 2023; [cited 2024 Jan 3]. Available from: URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical-procedures-step-5-revision-1_en.pdf.
16. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
17. U.S. Food and Drug Administration. Guidance for industry bioanalytical method validation. [online]. 2021; [cited 2023 Dec 1]: [25 screens]. Available from: URL: https://www.moh.gov.bw/Publications/drug_regulation/Bioanalytical%20Method%20Validation%20FDA%202001.pdf.
18. EURACHEM / CITAC Guide CG 4. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. EURACHEM; 2012.
19. PubChem. Compound N-nitrosodimethylamine. [online]. [cited 2023 Apr 1]: [54 screens]. Available from: URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Nitrosodimethylamine#section=Clinical-Laboratory-Methods>.
20. PubChem. Compound metformin. [online]. [cited 2023 Apr 1]: [44 screens]. Available from: URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metformin#section=Other-Experimental-Properties>.
21. British Pharmacopoeia Commission. British pharmacopoeia 2023. Vol. 2. London: The Stationery Office; 2022. p. 249-251.
22. Schlingemann J, Boucley C, Hickert S, Bourasseau L, Walker M, Celdran C, et al. Avoiding N-nitrosodimethylamine formation in metformin pharmaceuticals by limiting dimethylamine and nitrite. Int J Pharm 2022; 620: 121740. (15 pages).

Method Development and Validation for Determination of N-nitrosodimethylamine in Metformin Tablets

Sasida Yoosook and Piyamas Kitchanapanich

Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Nitrosamines have been detected in several drug products such as angiotensin II receptor blockers (ARB), ranitidine and metformin. However, N-nitrosodimethylamine (NDMA) is the only nitrosamine impurity found in metformin. Nitrosamines impurities in drug products may be occurred by raw materials, excipients, water, solvents, manufacturing process, and packaging materials. Since Nitrosamines are probably human carcinogen, quantity of nitrosamines impurity must be controlled to not exceeded the acceptance daily intake (ADI). The ADI of NDMA is 95 nanogram per day. The objective of this study was to develop an analytical method using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for the determination of low-level NDMA in metformin tablets. This method was developed from the method available from oversea drug regulation authorities. The method validation was performed according to International Council for Harmonisation (ICH) guideline which found that NDMA and NDMA-d6 peaks were not interfered by N-nitrosodiethylamine (NDEA) metformin excipient and solvent. The limit of detection was 0.8 ng/mL and the limit of quantification was 3 ng/mL which was less than the NDMA acceptance limit for metformin tablets. The method showed linearity with a coefficient of determination (R^2) greater than 0.999. The accuracy as expressed by %recovery was between 87.4 to 103.4%. The relative standard deviation values of repeatability and intermediate precision were less than 8% and 11%, respectively. Therefore, the developed method was suitable for monitoring NDMA quantity in metformin tablets.

Keywords: Nitrosamine impurity, N-nitrosodimethylamine, Metformin, NDMA, GC-MS