หน่วยกิตการศึกษาต่อเนื่องสำหรับ
ผู้ประกอบวิชาชีพเภสัชกรรม

เรื่อง การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเภสัชกรรม

รหัส: 2006-1-000-001-09-2560

จำนวน: 2.5 หน่วยกิตการศึกษาต่อเนื่อง

วันที่รับรอง: 27 ตุลาคม 2560

วันที่หมดอายุ: 26 ตุลาคม 2561

เรียบเรียงโดย: ดร.ภก.นพวัฒน์ เพ็งคำศรี

บทคัดย่อ

กระบวนการวิเคราะห์สารหรือยาที่มีฤทธิ์รักษา ป้องกัน และฟื้นฟูโรค ในทางเภสัชกรรมเป็นสิ่งสำคัญมาก เนื่องจากกระบวนการวิเคราะห์ต้องเป็นที่ยอมรับอย่างมีมาตรฐานซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพของยาที่ดี ประสิทธิภาพในการรักษาโรค และลดความเสี่ยงจากการใช้ยาของผู้ป่วย ซึ่งหัวข้อและเกณฑ์การยอมรับที่เกี่ยวข้องในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) โดยยึดตามเภสัชตำรับ และ AOAC เพื่อพิสูจน์ว่าวิธีวิเคราะห์มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ทดสอบตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการใช้งานภายใต้เงื่อนไขความจำเพาะของวิธีทดสอบ ประกอบด้วย 1) ความถูกต้องหรือความแม่น 2) การทำซ้ำอย่างแม่นยำหรือความเที่ยง 3) ความเป็นเส้นตรงและช่วง 4) ขีดจำกัดในการตรวจพบและขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ 5) สภาพไว 6) ความจำเพาะ และ 7) ความคงทน การศึกษาทั้ง 7 หัวข้อนี้เป็นการยืนยันว่าวิธีที่นำมาใช้ในการตรวจสอบสารหรือตัวยาสำคัญในกระบวนการผลิต กระบวนการตรวจสอบคุณภาพ และกระบวนการตรวจสอบการเก็บรักษามีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ และสามารถทวนสอบได้ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เป็นสิ่งสำคัญในทางเภสัชกรรมเพื่อสร้างความเชื่อมั่นแก่ผู้ป่วยต่อการรักษา ป้องกัน และฟื้นฟูโรค

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสร้างหลักประกันคุณภาพต่อผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือตามข้อกำหนดในเภสัชตำรับและวิธีมาตรฐาน
2. เพื่อใช้เป็นแนวปฏิบัติในการเตรียมข้อมูลด้านการวิเคราะห์ต่อการขึ้นทะเบียนหรือตรวจสอบจากหน่วยงานทางเภสัชกรรม
3. เพื่อใช้เป็นแนวปฏิบัติในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเภสัชกรรม

คำสำคัญ: การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์, ความน่าเชื่อถือ, เภสัชตำรับ

Keywords: Method validation, Reliability, Pharmacopoeia

บทนำ

ปัจจุบันสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางยาหรือยาเคมีจำนวนมากถูกนำไปผลิตเป็นตำรับที่หลากหลายโดยใช้ความรู้ทางเภสัชกรรม ซึ่งตำรับเหล่านั้นจะตามมาด้วยกระบวนการทดสอบ วิเคราะห์ และประเมิน ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยอาศัยห้องปฏิบัติการทดสอบ สภาวะการทดสอบ และนักวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ตามวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามสิ่งที่เหมือนกันคือการยืนยันความถูกต้องและทวนสอบวิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐานที่ถูกยอมรับ เพื่อสร้างหลักประกันต่อผลการวิเคราะห์ว่ามีความถูกต้องน่าเชื่อถือ และสามารถแสดงหลักฐานที่เป็นรูปธรรมว่าผลการทดสอบมีความถูกต้องตามข้อกำหนดในทางเภสัชกรรมได้ ในกระบวนการวิเคราะห์นั้นถึงแม้ว่าวิธีทดสอบจะดีอย่างไร ผู้ทดสอบมีความชำนาญสูงแค่ไหน แต่หากวิธีทดสอบนั้นไม่เหมาะสมกับตัวอย่าง ผลการทดสอบจะคลาดเคลื่อนไปจากค่าที่ถูกต้องได้ แต่ในทางกลับกันหากวิธีทดสอบเหมาะสมกับตัวอย่างและตรงตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ กระบวนการวิเคราะห์โดยผู้ที่พอมีทักษะก็สามารถให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องแม่นยำได้ การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์จึงมีความจำเป็นก่อนนำวิธีทดสอบที่ไม่ใช่วิธีมาตรฐานมาใช้ทดสอบสารหรือตัวยาสำคัญเสียก่อน เพื่อแสดงความถูกต้องน่าเชื่อถือของวิธีทดสอบ โดยมีการสอบกลับได้ของผลการทดสอบไปยังหน่วยงานตามมาตรฐานและมีค่าของความไม่แน่นอนของผลการทดสอบ เพื่อให้ผู้ใช้ผลการทดสอบมีความมั่นใจและช่วยลดข้อผิดพลาดในการตัดสินใจ

ดังนั้น ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์สารหรือตัวยาสำคัญในทางเภสัชกรรม จำเป็นต้องตระหนักถึงความสำคัญดังกล่าว เนื่องจากผลการทดสอบต้องนำไปใช้เป็นข้อมูลในการขึ้นทะเบียนยาหรือรายงานผลประจำปี การดำเนินคดี และการตรวจสอบคุณภาพให้ได้ประโยชน์สูงสุด โดยผลการทดสอบต้องมีความน่าเชื่อถือตามหลักวิชาการและทางเภสัชกรรม เพื่อกำหนดเป็นแนวปฏิบัติในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ทำให้เกิดความเชื่อมั่นในผลการทดสอบ มีความโปร่งใส และเป็นธรรมทั้งต่อผลประโยชน์ของผู้ผลิต ผู้ตรวจสอบ และผู้บริโภคต่อไป

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การตรวจสอบความถูกต้องหรือความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เป็นกระบวนการยืนยันความถูกต้องและความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ ช่วยให้ทราบถึงคุณสมบัติ เงื่อนไข หรือข้อจำกัดของวิธีการวิเคราะห์นั้นๆ ก่อนที่จะนำวิธีการวิเคราะห์นั้นๆ มาใช้วิเคราะห์ตัวอย่าง การพิจารณาทำสามารถจำแนกได้ 2 แบบ คือ

1. การทวนสอบวิธีการ (Method verification)

เป็นกระบวนการที่จะทำในกรณีที่เป็นวิธีอ้างอิง (Reference method) หรือ วิธีมาตรฐาน (Standard method) ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ เพื่อเป็นการทวนสอบว่าวิธีการวิเคราะห์ที่นำมาใช้มีคุณสมบัติเป็นไปตามข้อกำหนดต่างๆ ตามรายงานของวิธีอ้างอิง (Reference method) หรือ วิธีมาตรฐาน (Standard method) นั้นๆ หรือไม่

2. การตรวจสอบวิธีการ (Method validation)

เป็นกระบวนการที่จะทำในกรณีที่จะใช้ยืนยันความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่ผู้วิเคราะห์พัฒนาขึ้น หรือดัดแปลงมาจาก Reference method เพื่อให้เหมาะสมกับความต้องการของห้องปฏิบัติการ เป็นการยืนยันว่าวิธีวิเคราะห์ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และยอมรับได้ หากมีการเปลี่ยนแปลงวิธีการวิเคราะห์ที่ผ่านการ ทวนสอบแล้ว (validated) แล้ว จำเป็นต้องมีการทบทวน แก้ไข และ ทำการตรวจสอบวิธีการ (Method validation) ใหม่

หัวข้อในการตรวจสอบความถูกต้องหรือความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ประกอบด้วยตัวชี้วัด ดังนี้

1. ความถูกต้องหรือความแม่น (Accuracy)
2. การทำซ้ำอย่างแม่นยำหรือความเที่ยง (Precision)
3. ความเป็นเส้นตรงและช่วง (Linearity and Range)
4. ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และ ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)
5. สภาพไว (Sensitivity)
6. ความจำเพาะ (Selectivity หรือ Specificity)
7. ความคงทน (Robustness และ Ruggedness)

1. ความถูกต้องหรือความแม่น (Accuracy)

ความถูกต้องหรือความแม่น (Accuracy) หมายถึง ความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่วัดได้ค่าใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากที่สุดแสดงว่าการวิเคราะห์นั้นมีความถูกต้องสูง (high accuracy) แต่ถ้าค่าที่วัดได้ห่างไกลจากค่าที่แท้จริงแสดงว่าการทดสอบนั้นมีความถูกต้องน้อย (low accuracy)

ทำได้โดยการวิเคราะห์ สารอ้างอิงที่ผ่านการรับรอง (Certified reference material – CRM) อย่างน้อย 7 ซ้ำ แสดงค่า

$$\text{ความถูกต้องหรือความแม่นสัมพัทธ์ (Relative accuracy)} = \frac{\text{ค่าที่วิเคราะห์ได้ x 100}}{\text{ค่าที่แท้จริง}}$$

หรือการหาค่าร้อยละการคืนกลับ (% recovery) โดยใช้ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (spiked sample) ซึ่งจะมีข้อจำกัดว่า ความถูกต้องหรือความแม่น (Accuracy) ที่ได้นั้นครอบคลุมเฉพาะขั้นตอนที่วิเคราะห์ สารมาตรฐาน (Spiked sample) เท่านั้น การทำการกลับคืน (Recovery) จะทำ 3 ระดับความ

เข้มข้น และอย่างน้อยความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ เกณฑ์การยอมรับร้อยละการกลับคืน (% recovery) ดังแสดงในตารางที่ 1

ค่าร้อยละการกลับคืน (% Recovery) = [(ค่าจากตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน) - (ค่าจากตัวอย่างที่ไม่เติม)] x 100
ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม

ตารางที่ 1 เกณฑ์การยอมรับร้อยละการกลับคืน (% recovery) (AOAC, 2002)

ความเข้มข้น	ร้อยละการกลับคืน
100%	98-101
10%	95-102
1%	92-105
0.1%	90-108
0.01%	85-110
10 ppm	80-115
1 ppm	75-120

หมายเหตุ: ppm คือ μg/g

การประเมินความถูกต้องหรือความแม่นในทางเภสัชกรรม ถือได้ว่าเป็นสิ่งสำคัญที่สุดเนื่องจากการวิเคราะห์ที่ถูกต้องส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพของยา ประสิทธิภาพในการรักษา และความเสี่ยงจากการใช้ยา ซึ่งการประเมินทำได้ 2 วิธี ได้แก่

1. การประเมินความแม่นของระบบวิเคราะห์

ระบบวิเคราะห์ ประกอบด้วย อุปกรณ์และเครื่องมือทั้งหมดที่เกี่ยวข้องสำหรับการวิเคราะห์สารหรือยาตัวอย่างที่สนใจ ซึ่งรวมไปถึงสภาวะและสารเคมีในการวิเคราะห์ด้วย วิธีการทำได้โดยการเตรียมตัวอย่างสารหรือยามาตรฐานในความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยทั่วไปมักใช้ความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกับความเข้มข้นของตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ ซึ่งแบ่งเป็น 3 ระดับ คือ ต่ำ กลาง และสูง จากนั้นนำไปวิเคราะห์อย่างน้อยระดับละ 7 ซ้ำ และทำการหาค่า % recovery กล่าวคือ เป็นการประเมินส่วนที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ทั้งหมดนั่นเอง

2. การประเมินความแม่นของกระบวนการวิเคราะห์

ในที่นี้หมายถึง ความแม่นของกระบวนการสกัดและการเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์ วิธีการทำได้โดยการเตรียมตัวอย่างสารหรือยาที่สนใจผสมลงไปในระบบที่มีส่วนผสมทั้งหมด (อัตราส่วนเป็นไปตามตำรับนั้นๆ) จากนั้นทำการสกัดตัวอย่างที่สนใจ และเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการตามมาตรฐานหรือ

วิธีที่ถูกพัฒนาขึ้น นำไปวิเคราะห์อย่างน้อย 7 ซ้ำ และทำการหาค่า ร้อยละการกลับคืน (% Recovery) นอกจากนี้สามารถแบ่งการหาความแม่นของกระบวนการสกัดหรือการเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์อย่างใดอย่างหนึ่งก็ได้ โดยการแบ่งวิธีย่อยเป็น 2 แบบ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การแบ่งวิเคราะห์ความแม่นของกระบวนการวิเคราะห์

แบบที่ 1	กำหนดกระบวนการสกัด	เปลี่ยนแปลงวิธีเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์
แบบที่ 2	เปลี่ยนแปลงวิธีการสกัด	กำหนดการเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์

2. การทำซ้ำอย่างแม่นยำหรือความเที่ยง (Precision)

การทำซ้ำอย่างแม่นยำหรือความเที่ยง (Precision) หมายถึง ความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำๆ กันหลายครั้ง ความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำๆ นี้มักจะแสดงเป็นค่าร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) เกณฑ์การยอมรับ ดังแสดงในตารางที่ 3

$$\%RSD = \frac{\text{ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้งหมด}}$$

การทำซ้ำอย่างแม่นยำหรือความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์มี 2 ลักษณะ คือ

1. ความเที่ยงจากการวิเคราะห์ซ้ำโดยปัจจัยเดียวกัน (Repeatability)

Repeatability หมายถึง ความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำๆ ในสภาวะเดียวกันโดยใช้วิธีเดียวกันในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน และผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน เพื่อให้มีความน่าเชื่อถือจะทำการวิเคราะห์ในช่วงสั้นๆ ประมาณ 2 ถึง 3 วัน เป็นต้น

2. ความเที่ยงจากการวิเคราะห์ซ้ำโดยปัจจัยต่างกัน (Reproducibility)

Reproducibility หมายถึง ความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำๆ โดยใช้วิธีเดียวกัน แต่ผู้วิเคราะห์ต่างกัน เครื่องมือคนละเครื่องกัน และทำในห้องปฏิบัติการคนละแห่งกัน ซึ่งมักจะวิเคราะห์ซ้ำโดยใช้ช่วงเวลายาวพอสมควร ระดับของความแม่นยำขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่วิเคราะห์

ตารางที่ 3 เกณฑ์การยอมรับร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) (AOAC, 2002)

ความเข้มข้น	Repeatability	Reproducibility
100%	1%	2%
10%	1.5%	3%
1%	2%	4%
0.1%	3%	6%
0.01%	4%	8%
10 ppm	6%	11%
1 ppm	8%	16%
10 ppb	15%	32%

หมายเหตุ: ppm คือ μg/g, ppb คือ μg/Kg

ลักษณะการความสัมพันธ์ระหว่างความแม่นและความเที่ยงแบ่งได้ 4 แบบ ดังแสดงในรูปที่ 1

แบบที่ 1 การทดลองมีความแม่นและความเที่ยง

เป็นลักษณะการทดลองที่ดีที่สุดและเป็นที่ต้องการของนักวิเคราะห์ เพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง ทำซ้ำได้ และน่าเชื่อถือ

แบบที่ 2 การทดลองไม่มีความแม่นแต่มีความเที่ยง

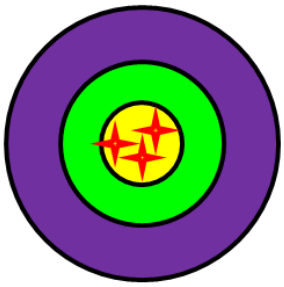
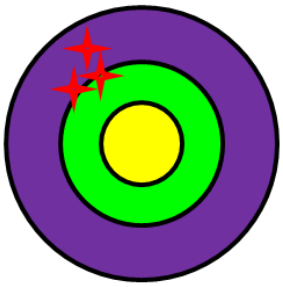
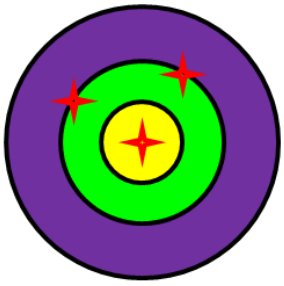
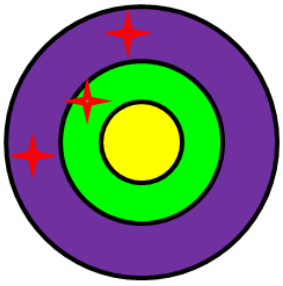
เป็นลักษณะการทดลองที่เชื่อถือไม่ได้ แม้ผลการวิเคราะห์สามารถทำซ้ำได้ สาเหตุเกิดจากความผิดพลาดของระบบการวิเคราะห์ (Systemic error) ดังนั้น การแก้ไขจึงทำได้โดยการตรวจสอบความถูกต้องของระบบการวิเคราะห์ก่อน

แบบที่ 3 การทดลองมีความแม่นแต่ไม่มีความเที่ยง

เป็นลักษณะการทดลองที่เชื่อถือไม่ได้ แม้ผลการวิเคราะห์จะมีข้อมูลบางส่วนถูกต้อง สาเหตุเกิดจากความผิดพลาดของการวิเคราะห์ซ้ำ (Reproducibility error) ดังนั้น การแก้ไขจึงทำได้โดยการใช้ผู้วิเคราะห์เป็นคนเดิม ระบบเดิม และสภาวะเดิม

แบบที่ 4 การทดลองไม่มีความแม่นและไม่มีความเที่ยง

เป็นลักษณะการทดลองที่เชื่อถือไม่ได้ เนื่องจากผลการวิเคราะห์ไม่มีความถูกต้องและไม่สามารถทำซ้ำได้ ดังนั้น การแก้ไขจึงทำได้โดยการเปลี่ยนระบบใหม่และ/หรือเปลี่ยนสภาวะการวิเคราะห์ใหม่

	แม่น (Accurate)	ไม่แม่น (Inaccurate) systemic error
เที่ยง (Precise)		
ไม่เที่ยง (Imprecise) reproducibility error		

รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างความแม่นและความเที่ยงในการวิเคราะห์

3. ความเป็นเส้นตรงและช่วง (Linearity and Range)

ความเป็นเส้นตรง (Linearity) หมายถึง ความสามารถของวิธีการวิเคราะห์ที่จะทำให้ผลการวิเคราะห์เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารตัวอย่างในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด ส่วน range หมายถึงช่วงความเข้มข้นของสารที่จะวัดตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำสุดถึงความเข้มข้นสูงสุดที่วัดแล้วมีความแม่น (accuracy) ความเที่ยง (precision) และความเป็นเส้นตรง (linearity) อยู่ในระดับที่มีความถูกต้องยอมรับได้ตามข้อกำหนด ซึ่งทำโดยการวิเคราะห์สารมาตรฐานในความเข้มข้นต่างๆ อย่างน้อย 5 ระดับ เนื่องจาก 3 ระดับแรก คือ ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ส่วนอีก 2 ระดับ คือ ความเข้มข้นระหว่างต่ำและสูง แต่ละระดับความเข้มข้นทำอย่างน้อย 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟเส้นแสดงความสัมพันธ์และคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เกณฑ์การยอมรับได้โดยทั่วไปค่า r จะต้องมีค่าอยู่ระหว่าง 0.995 – 1.000 ส่วนช่วง(range) ทำโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณสารในช่วงความเข้มข้นต่างๆ กัน และคำนวณค่าความเข้มข้นในช่วงที่ให้ ความแม่น (accuracy) และ ความเที่ยง (precision) ที่ยอมรับได้

4. ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และ ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

LOD หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้

LOQ หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณได้

วิธีการทำได้โดยการวัดค่าเปล่า (Blank) ของตัวอย่าง (Sample blank) อย่างน้อย 7 ซ้ำ และนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่า SD

LOD = ค่าเฉลี่ยของ sample blank + 3xSD

LOQ = ค่าเฉลี่ยของ sample blank + 10xSD

กรณี Sample blank หาค่าไม่ได้ ให้เติมสารมาตรฐานที่ค่าความเข้มข้นต่ำๆ ลงใน sample blank ทำอย่างน้อย 7 ซ้ำ หาค่า SD

LOD = 3xSD

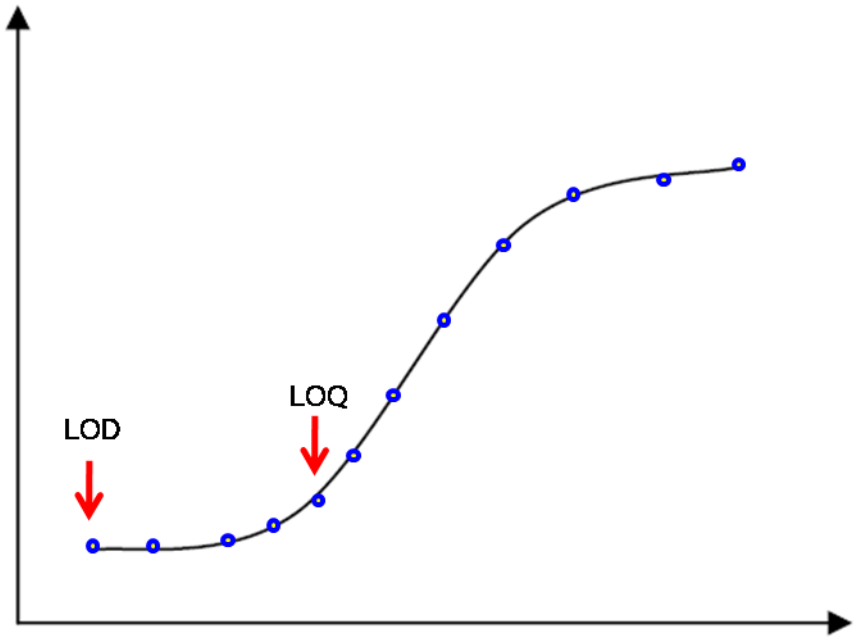
LOQ = 10xSD

กรณีไม่สามารถหา Sample blank ได้ ให้นำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำๆ มาวิเคราะห์ ทำอย่างน้อย 7 ซ้ำ หาค่า SD

LOD = 3.14xSD

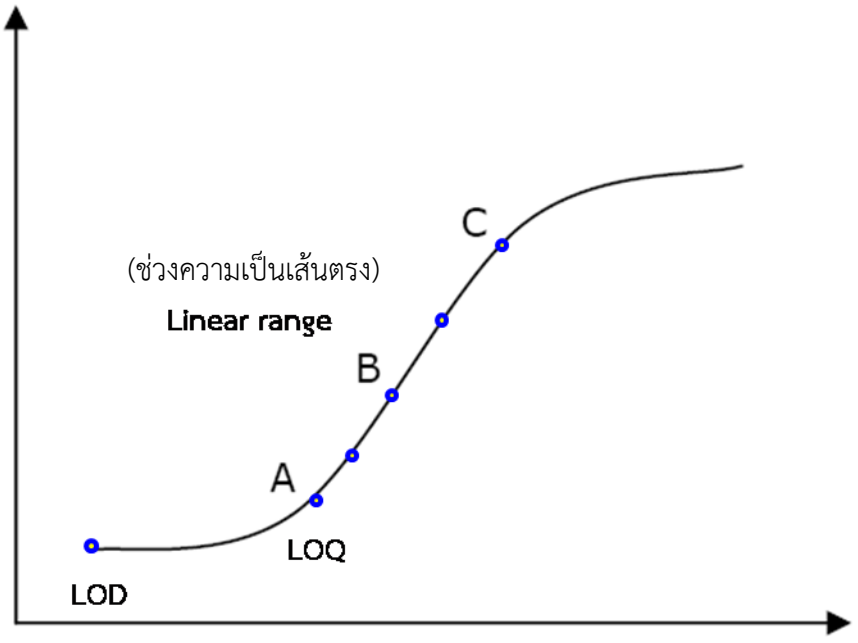
LOQ = 10xSD

อีกวิธีหนึ่งสามารถหา LOD และ LOQ ได้จากการเตรียมความเข้มข้นของสารหรือยาตัวอย่าง ที่จะทำการวิเคราะห์โดยการเจือจางหลายความเข้มข้นภายใต้สภาวะการวิเคราะห์ที่กำหนด ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า LOD เป็นความเข้มข้นแรกต่ำสุดที่เครื่องสามารถตรวจวัดได้ หากสารหรือยาตัวอย่างมีปริมาณหรือความเข้มข้นต่ำกว่านี้จะไม่สามารถตรวจพบได้ ส่วน LOQ เป็นความเข้มข้นแรกต่ำสุดที่อยู่ในช่วงที่เป็นเส้นตรง (Linear range) ซึ่งสามารถนำไปคาดการณ์ปริมาณหรือความเข้มข้นของสารหรือยาตัวอย่างได้ ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 การหาค่า LOD และ LOQ โดยการเจือจางหลายความเข้มข้น

ความสัมพันธ์ระหว่างช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range) ปริมาณที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบภายใต้สภาวะที่กำหนดได้ (LOD) และปริมาณที่ต่ำที่สุดที่สามารถนำไปใช้คาดการณ์ปริมาณสารตัวอย่างภายใต้สภาวะที่กำหนดได้ (LOQ) ดังแสดงในรูปที่ 3 ในทางปฏิบัติการวิเคราะห์ยาชนิดเดิมเป็นประจำไม่จำเป็นต้องทำโค้งมาตรฐาน (standard curve) ก่อนทำการวิเคราะห์ก็ได้ แต่ต้องมั่นใจว่าสภาวะการวิเคราะห์นั้นคงที่และทวนสอบได้ กล่าวคือ ครั้งแรกที่เริ่มวิเคราะห์ยาชนิดใหม่จะต้องมีการหาช่วงความเป็นเส้นตรงด้วยตัวยามาตรฐานอ้างอิง (standard reference) อย่างน้อย 5 ระดับ ซึ่งเป็นช่วงที่ครอบคลุมปริมาณหรือความเข้มข้นตัวอย่างยาที่ทำการวิเคราะห์ โดยมีการทำซ้ำอย่างน้อยระดับละ 3 ซ้ำ (r^2 = 0.990-1.000) จากนั้นสามารถทำการทวนสอบด้วยตัวยามาตรฐานสำหรับผลิต (standard raw material) หลังจากนั้นควรมีการทำซ้ำทุก 3 เดือน หรือ 6 เดือน ตามเกณฑ์มาตรฐานกำหนด ส่วนในงานวิเคราะห์ยาชนิดเดิมประจำวันสามารถวิเคราะห์ยามาตรฐานเทียบ (standard comparison) เพียง 1 ระดับ (เลือกปริมาณหรือความเข้มข้นของยาในระดับกลางของช่วงความเป็นเส้นตรง) และเตรียมปริมาณหรือความเข้มข้นของยาที่จะทำการวิเคราะห์ให้เทียบเคียงกับยามาตรฐานเทียบ เช่น เลือกเทียบเคียงยามาตรฐานเทียบที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะต้องทำการสกัดและเตรียมตัวอย่างยาที่ผ่านการสุ่มให้มีความเข้มข้นประมาณ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเทียบบัญญัติไตรยางศ์ผลตอบสนองของการวิเคราะห์เพื่อคำนวณปริมาณยาต่อไป กล่าวคือ ยามาตรฐานเทียบ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ผลตอบสนองของการวิเคราะห์ 20 หน่วย เมื่อทำการวิเคราะห์ยาที่ผ่านการสุ่มให้ผลตอบสนองของการวิเคราะห์ 18 หน่วย แสดงว่ายาที่ผ่านการสุ่มมีความเข้มข้นเทียบเท่า [18x10/20] = 9 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นต้น

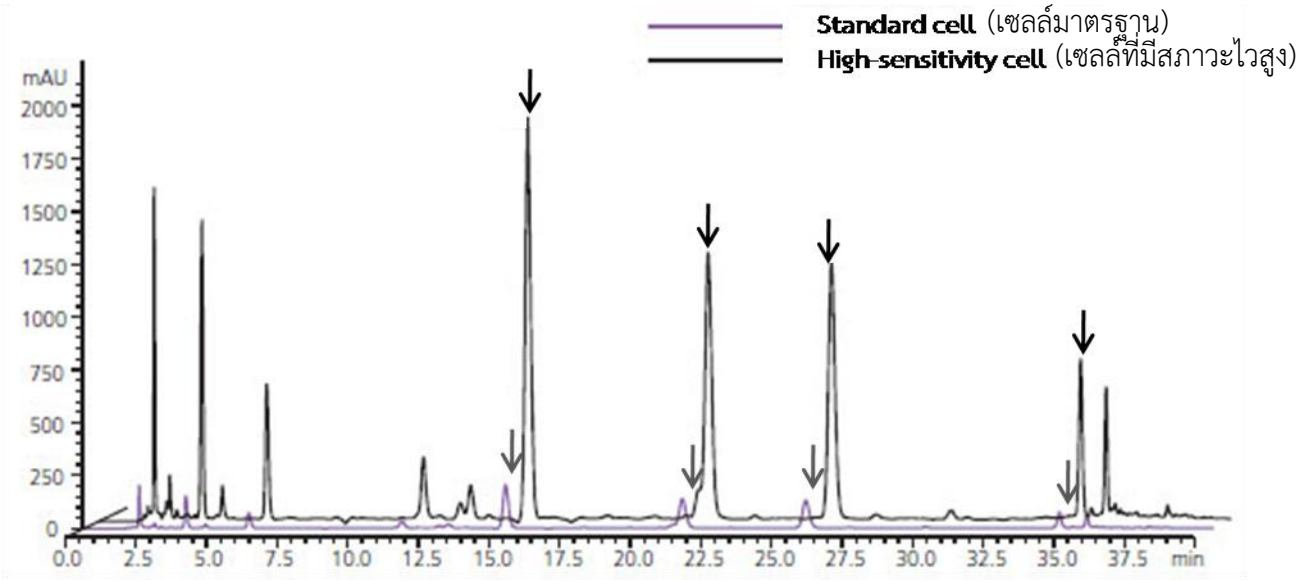


รูปที่ 3 ช่วงความเป็นเส้นตรง, LOD และ LOQ

5. สภาพไว (Sensitivity)

Sensitivity หมายถึง ความสามารถในการวัดความเข้มข้นที่แตกต่างกันน้อยที่สุด วิธีการวิเคราะห์ที่มีความไวสูงจะสามารถตรวจวิเคราะห์สารในปริมาณน้อยมากหรือเป็นวิธีที่สามารถแยกความเข้มข้นของสารที่แตกต่างกันน้อยมากได้ถูกต้อง

ตัวอย่างการวิเคราะห์สารหรือยาตัวอย่างในระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography: HPLC) ที่มีความไวในการตรวจวัดที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นผลมาจากชนิดของตัวตรวจวัด (Detector) แตกต่างกัน จึงทำให้ผลการตอบสนองของสัญญาณแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 4 ดังนั้น นักวิเคราะห์สามารถเพิ่มความไวของการตรวจวัดสารหรือยาตัวอย่างได้โดยการใช้ชนิดของตัวตรวจวัดที่เหมาะสมกับตัวอย่าง เช่น ใช้ตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซ็นต์กับสารที่มีคุณสมบัติเรืองแสงได้ หรือ การเปลี่ยนตัวอย่างให้เป็นอนุพันธ์ที่ไวต่อการวิเคราะห์ขึ้น เป็นต้น



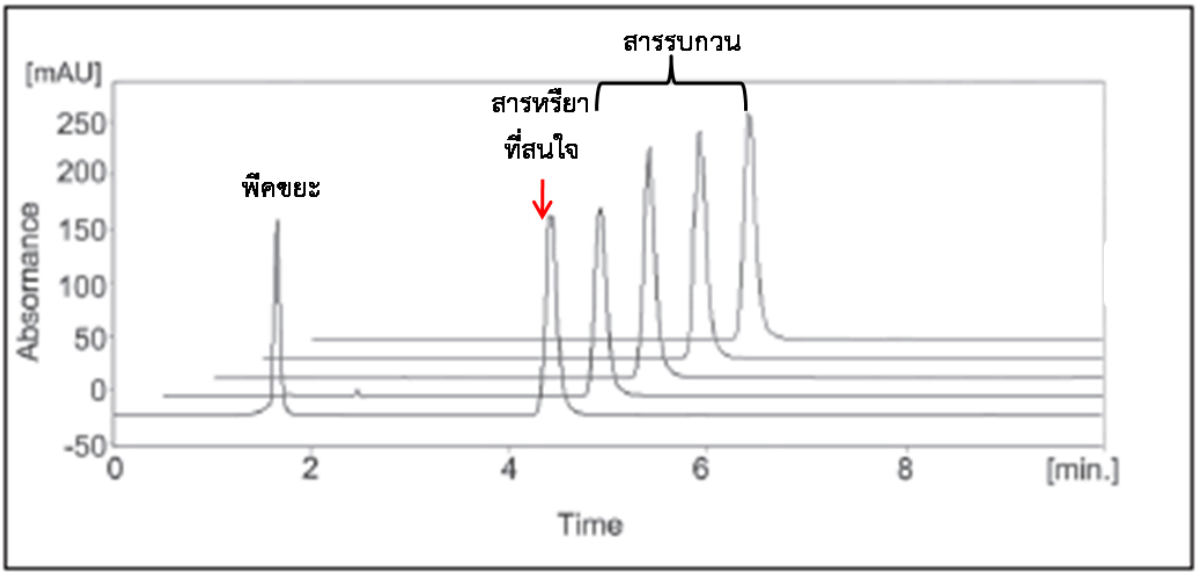
รูปที่ 4 โครมาโทแกรมที่มีสภาพความไวต่างกันในชนิดตัวตรวจวัดที่ต่างกัน

6. ความจำเพาะ (Selectivity หรือ Specificity)

ความจำเพาะ (Selectivity) หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่จะวิเคราะห์เฉพาะสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ โดยไม่ถูกรบกวนจากระบบ blank หรือวิธีการวิเคราะห์ที่มีความสามารถในการเลือกวัดเฉพาะสารที่ต้องการจะวัด

ความจำเพาะ (Specificity) หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่จะวิเคราะห์เฉพาะสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ โดยไม่ถูกรบกวนจากสารอื่นในระบบการวิเคราะห์ ทำได้โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีหรือเติมสารรบกวนอื่น แล้วตรวจสอบดูว่าสารรบกวนเหล่านั้นมีผลกระทบต่อการวิเคราะห์หรือไม่

ตัวอย่างการวิเคราะห์สารหรือยาตัวอย่างในระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่มีความจำเพาะ โดยสารที่สนใจไม่ถูกรบกวนจากสารอื่นในระบบ เช่น ยอดของสารขยะ หรือ ยอดของสารรบกวนอื่น เป็นต้น เนื่องจากระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์สามารถแยกสารแต่ละชนิดออกจากกันได้ภายใต้สภาวะการวิเคราะห์เดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 5 ดังนั้น จึงเหมาะสมในการวิเคราะห์สารที่สนใจออกจากสารผสมอื่นที่ปนเปื้อนมา เช่น ตัวยาสำคัญกับสารอื่นในตำรับยาเม็ด เป็นต้น

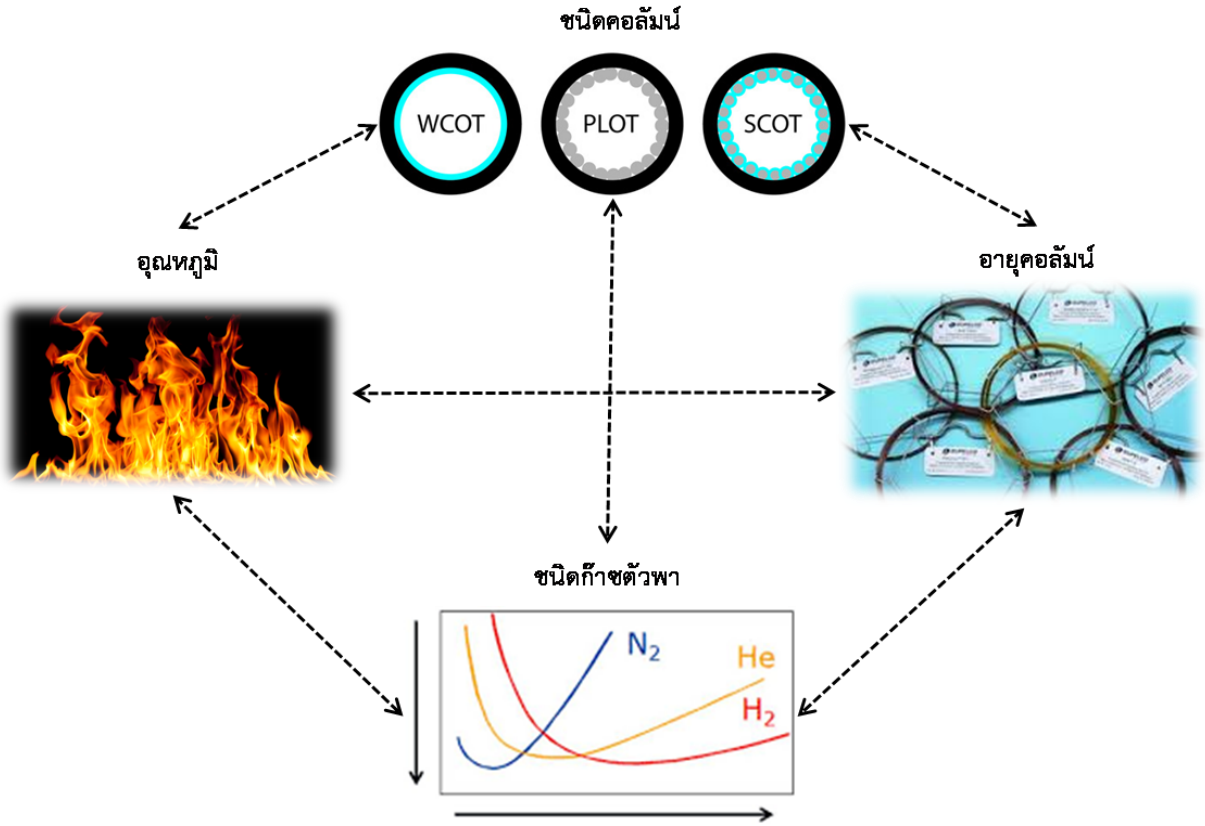


รูปที่ 5 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์สารตัวอย่างในระบบ HPLC

7. ความคงทน (Robustness และ Ruggedness)

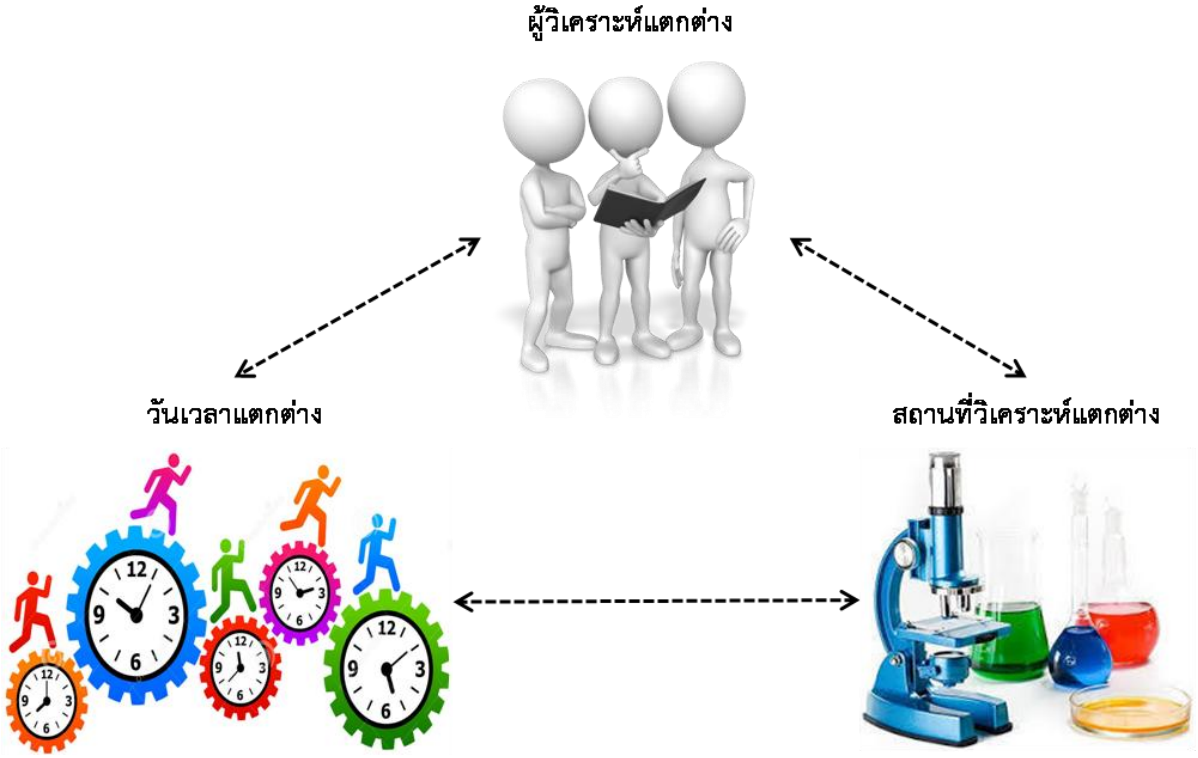
ความคงทน (Robustness) หมายถึง ความคงทนของวิธีการทดสอบที่แม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงระบบเพียงเล็กน้อย ซึ่งจะทำในห้องปฏิบัติการเดิมก็ให้ผลการทดสอบที่มีความคลาดเคลื่อนเพียงเล็กน้อย หรืออาจจะไม่มีผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์อย่างมีนัยสำคัญ

ตัวอย่างการวิเคราะห์สารหรือยาตัวอย่างด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี โดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ การเปลี่ยนชนิดคอลัมน์ การใช้คอลัมน์เก่าหรือใหม่ และการเปลี่ยนชนิดก๊าซตัวพา ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 ความคงทนของวิธีการทดสอบ ความคงทน (Robustness) ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

ความคงทน (Ruggedness) หมายถึง ความคงทนของวิธีการทดสอบที่แม้ว่าจะทำในห้องปฏิบัติการที่ต่างกัน ก็ให้ผลการทดสอบที่มีความคลาดเคลื่อนเพียงเล็กน้อย หรืออาจจะไม่มีผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์อย่างมีนัยสำคัญ เช่น การเปลี่ยนแปลงผู้วิเคราะห์ การวิเคราะห์วันและเวลาที่ต่างกัน หรือการวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการต่างที่กัน เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 7 โดยการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจะประเมินจากค่าความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (precision)



รูปที่ 7 ความคงทนของวิธีการทดสอบความคงทน (Ruggedness)

เอกสารอ้างอิง

1. นันทนา กันยานุวัฒน์ และนุชนาท นาคา, *แนวทางการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี*, กรุงเทพฯ : สานักอุตสาหกรรมพื้นฐาน กรมอุตสาหกรรมพื้นฐานและการเหมืองแร่, 2555.
2. แม้น อมรสิทธิ์, *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ*, กรุงเทพฯ : ชวนพิมพ์, 2539.
3. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. (2015). *Guidance for Industry*. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration.
4. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of chemical Method for Dietary Supplements and Botanicals, 2002.
5. Harvey, D. (2000). *Modern analytical chemistry* (Vol. 1). New York: McGraw-Hill.
6. Huber, L. (2010). *Validation of Analytical Methods*. Following USP, ICH, PIC/S, ISO17025 standards. Agilent Technologies, Germany.
7. Rouessac, F., & Rouessac, A. (2013). *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. John Wiley & Sons. 2nd ed.