การทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการด้านยา: การหาปริมาณตัวยาสำคัญด้วยเทคนิคไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

เมทินี นิ่มน้อย นันทนัช สีสุวรรณ์ ศศิดา อยู่สุข และศิริพร เหล่ามานะเจริญ
สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การทดสอบความชำนาญ เป็นองค์ประกอบสำคัญในการประเมินคุณภาพและการพัฒนาระบบคุณภาพของห้องปฏิบัติการ การเข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญสามารถสร้างความเชื่อมั่นและความน่าเชื่อถือต่อผลทดสอบ ซึ่งเป็นข้อกำหนดหนึ่งของระบบคุณภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 ในปี พ.ศ. 2559 สำนักยาและวัตถุเสพติด ได้รับการรับรองความสามารถในการเป็นผู้จัดโปรแกรมการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2010 ภายใต้ขอบข่ายการหาปริมาณตัวยาสำคัญด้วยไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) โดยใช้วัตถุดิบยา Gemfibrozil เป็นตัวอย่างทดสอบ มีห้องปฏิบัติการเข้าร่วมทดสอบ 95 ราย ให้ผลทดสอบ “น่าพอใจ” คิดเป็นร้อยละ 96 โปรแกรมนี้ได้ดำเนินการต่อเนื่องในปี พ.ศ. 2560 โดยใช้ยาเม็ด Hydrochlorothiazide เป็นตัวอย่างทดสอบ มีห้องปฏิบัติการเข้าร่วมทดสอบ 69 ราย ให้ผลทดสอบ “น่าพอใจ” คิดเป็นร้อยละ 97 การเข้าร่วมทดสอบความชำนาญทำให้ห้องปฏิบัติการสามารถนำไปใช้ประเมินความสามารถการตรวจวิเคราะห์และพัฒนาระบบคุณภาพของห้องปฏิบัติการให้เป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 ต่อไป

คำสำคัญ: การทดสอบความชำนาญ, การหาปริมาณตัวยาสำคัญ, ไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

Corresponding E-mail: methinee.s@dmsc.mail.go.th

Received: 5 November 2018 *Revised: 21 May 2019* *Accepted: 24 February 2020*

บทนำ

การทดสอบความชำนาญเป็นองค์ประกอบสำคัญของกระบวนการประเมินคุณภาพโดยองค์กรภายนอก และเป็นหลักเกณฑ์หรือเงื่อนไขหนึ่งของการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005[1] โดยเป็นการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการสมาชิกจากการใช้ตัวอย่างทดสอบชนิดเดียวกันเพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดการพัฒนาระบบคุณภาพของห้องปฏิบัติการ หน่วยงานที่จัดบริการทดสอบความชำนาญเป็นผู้รับผิดชอบในการดำเนินการต่าง ๆ และประสานงานกับห้องปฏิบัติการสมาชิก ตั้งแต่การจัดโปรแกรมการทดสอบความชำนาญ การเตรียมตัวอย่างทดสอบ การทดสอบความเหมาะสมและจัดส่งตัวอย่างทดสอบ การประเมินผลโดยใช้หลักสถิติที่เหมาะสมและการจัดทำรายงานผล

ปี พ.ศ. 2559 สำนักยาและวัตถุเสพติดได้รับการรับรองเป็นผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2010[2] จากกรมวิทยาศาสตร์บริการจำนวน 3 แผนงาน คือ การทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการด้านยา สารเสพติดในปัสสาวะและยาเสพติดในของกลาง รวม 5 โปรแกรม ได้แก่ การหาปริมาณตัวยาสำคัญด้วยเทคนิค HPLC (Pharmaceutical assay by high performance liquid chromatography) การทดสอบการละลายของตัวยา (Dissolution test) การตรวจยืนยันสารเสพติดในปัสสาวะ (Confirmatory test of narcotics in urine) การตรวจเบื้องต้นสารเสพติดในปัสสาวะ (Screening test of narcotics in urine) และการตรวจพิสูจน์ยาเสพติดในของกลาง (Analysis of narcotics/illicit drugs in seized materials) โดยจัดการทดสอบความชำนาญดังกล่าวเป็นประจำทุกปี

High performance liquid chromatography (HPLC) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพด้านยา ตำรายาสากล เช่น The United States Pharmacopeia (USP) และ British Pharmacopoeia (BP) เป็นต้น กำหนดให้ใช้เทคนิคนี้ในการหาปริมาณตัวยาสำคัญ[3] ห้องปฏิบัติการด้านยาต้องมีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าว เพื่อให้มั่นใจได้ว่าเภสัชภัณฑ์ที่ผลิตนั้นมีคุณภาพและได้มาตรฐาน บทความนี้นำเสนอเฉพาะโปรแกรมการหาปริมาณตัวยาสำคัญด้วยเทคนิค HPLC ในปี พ.ศ. 2559 และ 2560 โดยใช้ตัวอย่างทดสอบแตกต่างกันเพื่อให้สอดคล้องกับวัตถุดิบยาและเภสัชภัณฑ์ที่ห้องปฏิบัติการสมาชิกตรวจวิเคราะห์ในงานประจำ และใช้วิธีในมอโนกราฟของแต่ละตัวอย่างทดสอบตามตำรายาสากล ในปี พ.ศ. 2559 จัดโปรแกรมการทดสอบความชำนาญ รหัสแผน D5901R1 การหาปริมาณ Gemfibrozil ในวัตถุดิบ ใช้วิธีตาม USP38[4] และปี พ.ศ. 2560 รหัสแผน D6001R1 การหาปริมาณ Hydrochlorothiazide ในยาเม็ด ใช้วิธีตาม USP39[5]

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างทดสอบ

- วัตถุดิบยา Gemfibrozil ผลิตโดย Combi-Blocks, Inc., สหรัฐอเมริกา บรรจุในขวดแก้วสีน้ำตาล ปิดด้วยฝาพลาสติกชั้นในและฝาเกลียวชั้นนอก ขนาดบรรจุขวดละ 200 มิลลิกรัม จำนวน 200 ขวด
- ยาเม็ด Hydrochlorothiazide ขนาด 50 มิลลิกรัม ผลิตโดยองค์การเภสัชกรรม ประเทศไทย บรรจุในแผงอะลูมิเนียมทั้งสองด้าน แผงละ 10 เม็ด นำมาบรรจุซองพลาสติกใส ปิดสนิท ซองละ 3 แผง จำนวน 200 ซอง

สารมาตรฐานและสารเคมี

Gemfibrozil USP Reference Standard, Lot no. H1F285, USA, วัตถุดิบยา Gemfibrozil ความบริสุทธิ์มากกว่า 98.0% ผลิตโดย Glentham Life Sciences Ltd., UK, Hydrochlorothiazide USP Reference

Standard, Lot no. J1F070, USA, Chlorothiazide USP Reference Standard, Lot no. H1E231, USA, Benzothiadiazine related compound A USP Reference Standard, Lot no. I0F027, USA, วัตถุดิบยา Hydrochlorothiazide ความบริสุทธิ์มากกว่า 99.0% ผลิตโดย SIGMA-ALDRICH, USA, Methanol (HPLC grade) และ Acetonitrile (HPLC grade) ผลิตภัณฑ์ของ Avantor Performance Materials, USA, Acetic acid, glacial (AR grade) และ Monobasic sodium phosphate (AR grade) ผลิตภัณฑ์ของ Carlo Erba, Spain, Phosphoric acid (AR grade) และ Formic acid (AR grade) ผลิตภัณฑ์ของ Merck KGaA, Germany, 2,5-Dimethylphenol (AR grade) และ Chlorothiazide (AR grade) ผลิตโดย SIGMA-ALDRICH, USA

เครื่องมือ

HPLC รุ่น Alliance e2695 และ UV detector รุ่น 2489 ผลิตภัณฑ์ของ Waters, USA, คอลัมน์ชนิด Octadecyl silane (C18), เครื่องชั่ง รุ่น AT200 ความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม, รุ่น XP 205 ความละเอียด 0.01 มิลลิกรัม และ รุ่น MX5 ความละเอียด 0.001 มิลลิกรัม ผลิตภัณฑ์ของ Mettler Toledo, Switzerland, อ่างส่งคลื่นความถี่สูง (Sonicator bath) รุ่น POWERSONIC ผลิตภัณฑ์ของ Crest Ultrasonics, USA, เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น pH Lab 827 ผลิตภัณฑ์ของ Metrohm, Switzerland, เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น LS500, ผลิตภัณฑ์ของ Gerhardt, Germany

สภาวะของเครื่อง HPLC

รหัสแผน D5901R1[4]:

เครื่องตรวจวัด: UV, 276 นาโนเมตร

คอลัมน์: 3.9 มิลลิเมตร × 30 เซนติเมตร; วัสดุบรรจุ L1

อัตราการไหล: 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที

ปริมาตรการฉีด: 10 ไมโครลิตร

รหัสแผน D6001R1[5]:

เครื่องตรวจวัด: UV, 254 นาโนเมตร

คอลัมน์: 4.6 มิลลิเมตร × 25 เซนติเมตร; วัสดุบรรจุ L1

อัตราการไหล: 2 มิลลิลิตรต่อนาที

ปริมาตรการฉีด: 20 ไมโครลิตร

วิธีดำเนินการ

การประเมินความเหมาะสมของวัตถุดิบยาที่ใช้เป็นสารมาตรฐานทดสอบความชำนาญ

สุ่มวัตถุดิบยา Gemfibrozil และ Hydrochlorothiazide ชนิดละ 20 ขวด หาปริมาณตัวยาสำคัญขวดละ 2 ซ้ำตามวิธีในมอโนกราฟเทียบกับสารมาตรฐานของ USP Reference Standard ประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันโดยทดสอบความเบี่ยงเบนภายในตัวอย่าง (within sample variation) ด้วย Cochran's test[6] และทดสอบความเบี่ยงเบนระหว่างตัวอย่าง (between sample variation) ด้วย one way ANOVA หาค่ากำหนด (assigned value) โดยทดสอบ outlier ด้วย Grubbs's test[6] นำค่าที่เหลือจากการตัด outlier มาคำนวณค่าเฉลี่ยและใช้เป็นค่ากำหนดของสารมาตรฐาน

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างทดสอบ (Homogeneity test)

สุ่มตัวอย่างทดสอบวัตถุดิบยา Gemfibrozil จำนวน 10 ขวด และยาเม็ด Hydrochlorothiazide จำนวน 10 ซอง (แต่ละซองนำมาไม่น้อยกว่า 20 เม็ด ชั่งน้ำหนักรวมเพื่อคำนวณน้ำหนักต่อเม็ดและบดให้เป็นผงละเอียด) หาปริมาณตัวยาสำคัญตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ตามวิธีในมอโนกราฟเทียบกับวัตถุดิบยาที่ใช้เป็นสารมาตรฐานทดสอบความชำนาญ นำค่าที่ได้มาคำนวณดังนี้

- ทดสอบความแตกต่างของการวิเคราะห์ซ้ำ โดยใช้ Cochran's test

$$C = \frac{D^2_{max}}{\sum_{i=1}^{10} D_i^2}$$

โดย C = ค่าสถิติ Cochran's test

D_i = ค่าความแตกต่างของการวิเคราะห์ซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละตัวอย่างที่สุ่ม (i = 1,2,...,10)

D_{max} = ค่า D_i ที่มีค่ามากที่สุด

ถ้าค่า C ที่คำนวณได้น้อยกว่าค่าวิกฤต (C_{crit}) ในตาราง Cochran's test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ค่า C_{crit} = 0.602, p = 10, n = 2) แสดงว่าไม่มีความแตกต่างของการวิเคราะห์ซ้ำ

- เปรียบเทียบส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างตัวอย่าง (Between sample standard deviation, S_S) กับส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการประเมินผลการทดสอบความชำนาญ (Standard deviation for proficiency assessment, σ_{pt})

S_S คำนวณได้ดังนี้

การทดสอบสุ่มตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่าง (g = 10) แต่ละตัวอย่างวิเคราะห์ ซ้ำ 2 ครั้ง ($x_{t,1,} x_{t,2}$)

Sample averages, $\bar{x}_t = (x_{t,1} + x_{t,2})/2$

Between-test portion ranges, $w_t = |x_{t,1} - x_{t,2}|$

General average, $\bar{\bar{x}} = \frac{1}{g}\sum_{t=1}^{g} \bar{x}_t$

Standard deviation of sample average, $s_{\bar{x}} = \sqrt{\sum_{t=1}^{g} (\bar{x}_t - \bar{\bar{x}})^2/(g-1)}$

Within-sample standard deviation, $s_w = \sqrt{\sum_{t=1}^{g} w_t^2/(2g)}$

Between-sample standard deviation, $s_s = \sqrt{s_{\bar{x}}^2 - (s_w^2/2)}$

การกำหนด σ_{pt} [5]

สำหรับรหัสแผน D5901R1: กำหนด σ_{pt} = 1.00% โดยใช้ Horwitz model

$$\sigma_R = \begin{cases} 0.22c, & c < 1.2 \times 10^{-7} \\ 0.02c^{\ 0.8495}, & 1.2 \times 10^{-7} \le c \le 0.138 \\ 0.01c^{\ 0.5}, & c > 0.138 \end{cases}$$

โดย σ_R = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ซ้ำ

c mass fraction ของความเข้มข้นตัวอย่าง (มีค่าระหว่าง 0 ถึง 1)

(c เป็น mass fraction ของค่าเฉลี่ยโรบัสต์ที่ได้จากผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการสมาชิก)

สำหรับรหัสแผน D6001R1: กำหนด σ_{pt} = 2.0% LA ตามความเหมาะสมของความเที่ยง (precision) เพื่อให้สอดคล้องกับวิธีวิเคราะห์และลักษณะของตัวอย่างทดสอบซึ่งเป็นยาเม็ด โดยผ่านความเห็นคณะที่ปรึกษาทางวิชาการของสำนักยาและวัตถุเสพติด (By perception of experts)[7]

ถ้า $S_S \leq 0.3\,\sigma_{pt}$ แสดงว่าตัวอย่างทดสอบมีความเป็นเนื้อเดียวกัน (adequately homogeneous)[7]

การทดสอบความคงสภาพของตัวอย่างทดสอบ (Stability test)

ทดสอบความคงสภาพของตัวอย่างทดสอบที่สภาวะการจัดเก็บ

- รหัสแผน D5901R1 และ D6001R1 เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C และอุณหภูมิห้อง (ไม่เกิน 30 °C) ตามลำดับ
- สุ่มตัวอย่างมาทดสอบก่อนจัดส่งให้สมาชิก (เวลาเริ่มต้น) และถัดไปทุกเดือนโดยครั้งสุดท้ายของการทดสอบให้ครอบคลุมวันสุดท้ายของการส่งผลทดสอบ สุ่มครั้งละ 3 ตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วยวิธีเดียวกับการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์ก่อนจัดส่งให้สมาชิก คือ $\bar{y}_1$ (เวลาเริ่มต้น) ส่วนค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์ในแต่ละเดือน คือ $\bar{y}_2$

ทดสอบความคงสภาพของตัวอย่างควบคุมจากสภาวะการขนส่ง

- ส่งตัวอย่างให้ห้องปฏิบัติการสมาชิกที่อยู่ไกลสุดทางทิศเหนือและใต้แห่งละ 3 ตัวอย่าง เพื่อเป็นตัวอย่างควบคุมสำหรับทดสอบความคงสภาพจากการขนส่ง ห้องปฏิบัติการที่ได้รับตัวอย่างนี้ต้องคืนสำนักยาและวัตถุเสพติดโดยเร็วที่สุด วิเคราะห์ตัวอย่างที่ส่งคืนด้วยวิธีเดียวกับการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์ของตัวอย่างที่ส่งไปแต่ละแห่ง คือ $\bar{y}_2$
- เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่เวลาเริ่มต้น $\bar{y}_1$ กับค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์ $\bar{y}_2$

ตัวอย่างทดสอบมีความคงสภาพเมื่อ

$$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| \leq 0.3\sigma_{pt}$$

กรณีไม่ผ่านเกณฑ์ ขยายเกณฑ์การยอมรับ โดยเพิ่มค่าความไม่แน่นอนมาตรฐาน (standard uncertainty u)[7] ให้กับ σ_{pt}

$$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| \leq 0.3\sigma_{pt} + 2\sqrt{u^2(\bar{y}_1) + u^2(\bar{y}_2)}$$

โดย $u(\bar{y}_1)$ และ $u(\bar{y}_2)$[7] คือ ค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยผลวิเคราะห์ที่เวลาเริ่มต้น $\bar{y}_1$ และ $\bar{y}_2$ ตามลำดับ ซึ่งเป็นผลรวมของค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานจากปัจจัยต่าง ๆในกระบวนการวิเคราะห์ เช่น %RSD of peak area ของตัวอย่างและสารมาตรฐาน, ความเข้มข้นของตัวอย่างและสารมาตรฐาน, ค่ากำหนดของสารมาตรฐาน (% purity) และความเที่ยงของการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำ

$$u(\bar{y}) = \sqrt{u_{Asam}^2 + u_{Astd}^2 + u_{Csam}^2 + u_{Cstd}^2 + u_{Pstd}^2 + u_{Prec}^2}$$

$u(\bar{y})$ = ความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยผลวิเคราะห์การทดสอบความคงสภาพของตัวอย่างทดสอบ
u_{Asam} = ความไม่แน่นอนมาตรฐานของ peak area ของตัวอย่าง
u_{Astd} = ความไม่แน่นอนมาตรฐานของ peak area ของสารมาตรฐาน
u_{Csam} = ความไม่แน่นอนมาตรฐานของความเข้มข้นของตัวอย่าง
u_{Cstd} = ความไม่แน่นอนมาตรฐานของความเข้มข้นของสารมาตรฐาน
u_{Pstd} = ความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่ากำหนดของสารมาตรฐาน
u_{Prec} = ความไม่แน่นอนมาตรฐานของการวิเคราะห์ซ้ำ

การหาค่ากำหนด (Assigned value, x_{pt}) และค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่ากำหนด (standard uncertainty of assigned value, $u(x_{pt})$[7]

นำผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการสมาชิกมาวิเคราะห์ด้วยสถิติโรบัสต์ (Robust analysis) ตามวิธี Algorithm A ใน ISO 13528:2015 (E) Annex C[7] จะได้ค่าเฉลี่ยโรบัสต์ (Robust mean, x*) เพื่อใช้เป็นค่ากำหนด (Assigned value, x_{pt}) และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานโรบัสต์ (Robust standard deviation, s*)

ค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่ากำหนด จากสูตร

$$u(x_{pt}) = 1.25 \times \frac{s^*}{\sqrt{p}}$$

p = จำนวนผลการทดสอบที่รายงานโดยห้องปฏิบัติการสมาชิก

กรณี $u(x_{pt}) < 0.3\ \sigma_{pt}$ สามารถประเมินผลของสมาชิกด้วยการใช้ z score โดยไม่ต้องคำนึงถึงค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่ากำหนด[7]

การประเมินผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการสมาชิก

จัดส่งตัวอย่างทดสอบ วัตถุดิบยาที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน และวิธีการทดสอบให้ห้องปฏิบัติการสมาชิก นำผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการสมาชิกที่รายงานกลับมาประเมินผล ดังนี้

คำนวณค่าเฉลี่ยโรบัสต์ (x*) เพื่อใช้เป็นค่ากำหนด (x_{pt}) โดยใช้สถิติโรบัสต์ (robust analysis) ตามวิธี Algorithm A ใน ISO 13528:2015 Annex C[7] และประเมินผลทางสถิติด้วย z-score[7]

$$z_i = \frac{(x_i - x_{pt})}{\sigma_{pt}}$$

โดย z_i = z score
x_i = ผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการสมาชิก
x_{pt} = ค่ากำหนด
σ_{pt} = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการประเมินการทดสอบความชำนาญประเมินผล z-score ดังนี้

$|z| \leq 2.0$: acceptable
$2.0 < |z| < 3.0$: warning signal
$|z| \geq 3.0$: unacceptable

ผล

สำนักยาและวัตถุเสพติดจัดบริการทดสอบความชำนาญโปรแกรมการหาปริมาณตัวยาสำคัญด้วยเทคนิค HPLC ในปี พ.ศ. 2559 และ พ.ศ. 2560 จำนวน 2 โปรแกรม รหัสแผน D5901R1 การหาปริมาณตัวยาสำคัญในวัตถุดิบยา Gemfibrozil จัดขึ้นในปี พ.ศ. 2559 มีสมาชิกเข้าร่วมทดสอบ 95 ราย ส่งผลการทดสอบ 90 ราย (ร้อยละ 95) รหัสแผน D6001R1 การหาปริมาณตัวยาสำคัญในยาเม็ด Hydrochlorothiazide จัดขึ้นในปี พ.ศ. 2560 มีสมาชิกเข้าร่วมทดสอบ 69 ราย ส่งผลการทดสอบ 67 ราย (ร้อยละ 97) สมาชิกได้แก่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อื่น ๆ จากภาครัฐและเอกชน โรงงานผลิตยาในประเทศ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ รวมถึงห้องปฏิบัติการของประเทศสมาชิกอาเซียน ได้แก่ กัมพูชา มาเลเซีย ลาว ฟิลิปปินส์ สิงคโปร์ อินโดนีเซีย และเวียดนาม เป็นต้น

ตารางที่ 1 แสดงผลทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและค่ากำหนดของวัตถุดิบยาที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน วัตถุดิบยามีความเป็นเนื้อเดียวกัน Gemfibrozil และ Hydrochlorothiazide มีค่ากำหนด 99.57 และ 99.37% on as is basis ตามลำดับ ตัวอย่างทดสอบของทั้งสองแผน มีความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงสภาพตลอดช่วงเวลาทดสอบและขนส่งดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

การหาค่ากำหนดของตัวอย่างทดสอบของทั้งสองแผน ใช้ค่าเฉลี่ยโรบัสต์ (x^*) จากผลทดสอบของห้องปฏิบัติการสมาชิก เท่ากับ 99.24% on as is basis และ 99.6% LA ตามลำดับ และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานโรบัสต์ (s^*) เท่ากับ 0.64% on as is basis และ 1.3% LA ตามลำดับ ค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่ากำหนดมีค่า 0.08% on as is basis และ 0.2% LA ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 0.3 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการประเมินผลการทดสอบความชำนาญ (σ_{pt}) ค่า σ_{pt} ของรหัสแผน D5901R1 กำหนดจาก Horwitz model คือ 1.00 % on as is basis และรหัสแผน D6001R1 กำหนดตามความเหมาะสมของความเที่ยง (precision) คือ 2.0% LA เพื่อให้สอดคล้องกับวิธีวิเคราะห์และลักษณะของตัวอย่างทดสอบซึ่งเป็นยาเม็ด โดยผ่านความเห็นคณะที่ปรึกษาทางวิชาการของสำนักยาและวัตถุเสพติด ดังนั้นจึงประเมินผลของสมาชิกด้วยการใช้ z-score โดยไม่คำนึงถึงค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของค่ากำหนด สรุปผลการทดสอบความชำนาญและการประเมินผล z-score ได้ตามตารางที่ 4 แผนภูมิแท่งค่า z-score ของแผน D5901R1 และ D6001R1 แสดงในภาพที่ 1 และ 3 ตามลำดับ ส่วน histogram of mean แสดงในภาพที่ 2 และ 4 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและค่ากำหนดของวัตถุดิบยาที่ใช้เป็นสารมาตรฐานทดสอบความชำนาญ

รหัสแผน	Cochran's test		ผลการประเมิน	ANOVA	ผลการประเมิน	Grubbs's test		ค่ากำหนด % on as is basis (n=20)
	C	C_{crit}		F/F_{crit}/P-value		G	G_{crit}	
D5901R1	0.28	0.602	ไม่มีความแตกต่างของการวิเคราะห์ซ้ำ	2.04/3.02/0.14	วัตถุดิบยาที่ใช้เป็นสารมาตรฐานทดสอบความชำนาญมีความเป็นเนื้อเดียวกัน	0.55 (no outlier)	0.36	99.57
D6001R1	0.26	0.602		0.56/3.02/0.80		0.59 (no outlier)	0.36	99.37

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างทดสอบ

รหัสแผน	Cochran's test		ISO 13528	
	C	C_{crit}	s_s	$0.3\sigma_{pt}$
D5901R1	0.35	0.602	0.22 %on as is basis	0.30 %on as is basis
D6001R1	0.44	0.602	0.1 %LA	0.6 %LA
ผลการประเมิน	ไม่มีความแตกต่างของการวิเคราะห์ซ้ำ		ตัวอย่างทดสอบเป็นเนื้อเดียวกัน (adequately homogeneous)	

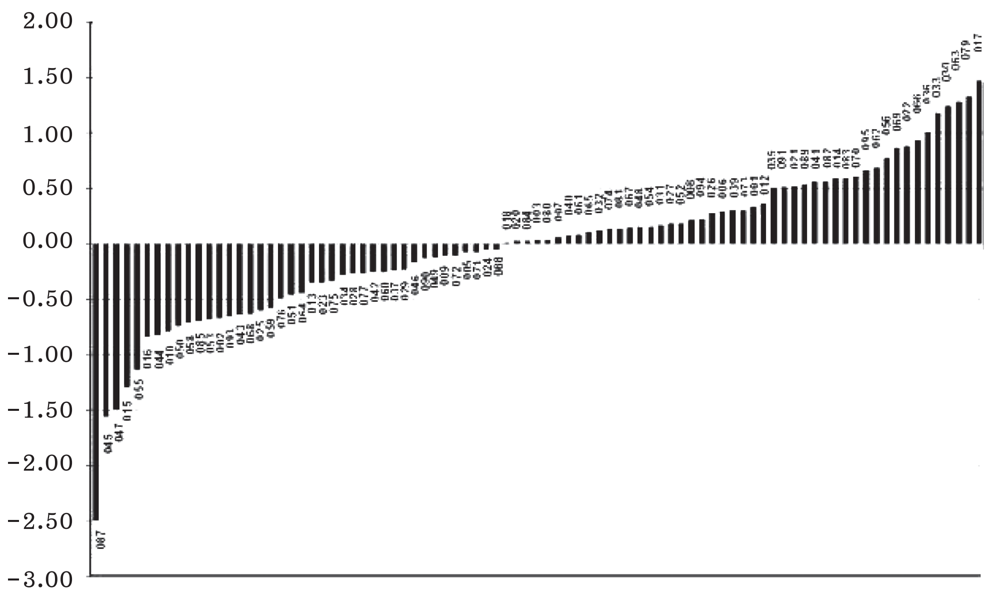
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความคงสภาพของตัวอย่างทดสอบ

สภาวะการทดสอบ	$\lvert\bar{y}_1-\bar{y}_2\rvert$	$0.3\sigma_{pt}$	$0.3\sigma_{pt}+2\sqrt{u^2(\bar{y}_1)+u^2(\bar{y}_2)}$
รหัสแผน D5901R1 (% on as is basis)			
สภาวะการจัดเก็บ 2-8˚C			
เดือนที่ 1	0.05	0.30	-
เดือนที่ 2	0.28	0.30	-
เดือนที่ 3*	0.57	0.30	1.87 ($u(\bar{y}_1)=0.34$, $u(\bar{y}_2)=0.71$)
สภาวะการขนส่ง			
เหนือ	0.23	0.30	-
ใต้	0.18	0.30	-
รหัสแผน D6001R1 (%LA)			
อุณหภูมิห้อง (ไม่เกิน 30˚C)			
เดือนที่ 1	0.0	0.6	-
เดือนที่ 2*	0.9	0.6	2.3 ($u(\bar{y}_1)=0.7$, $u(\bar{y}_2)=0.4$)
เดือนที่ 3	0.6	0.6	-
สภาวะการขนส่ง			
เหนือ	0.1	0.6	-
ใต้*	0.9	0.6	2.5 ($u(\bar{y}_1)=0.7$, $u(\bar{y}_2)=0.6$)

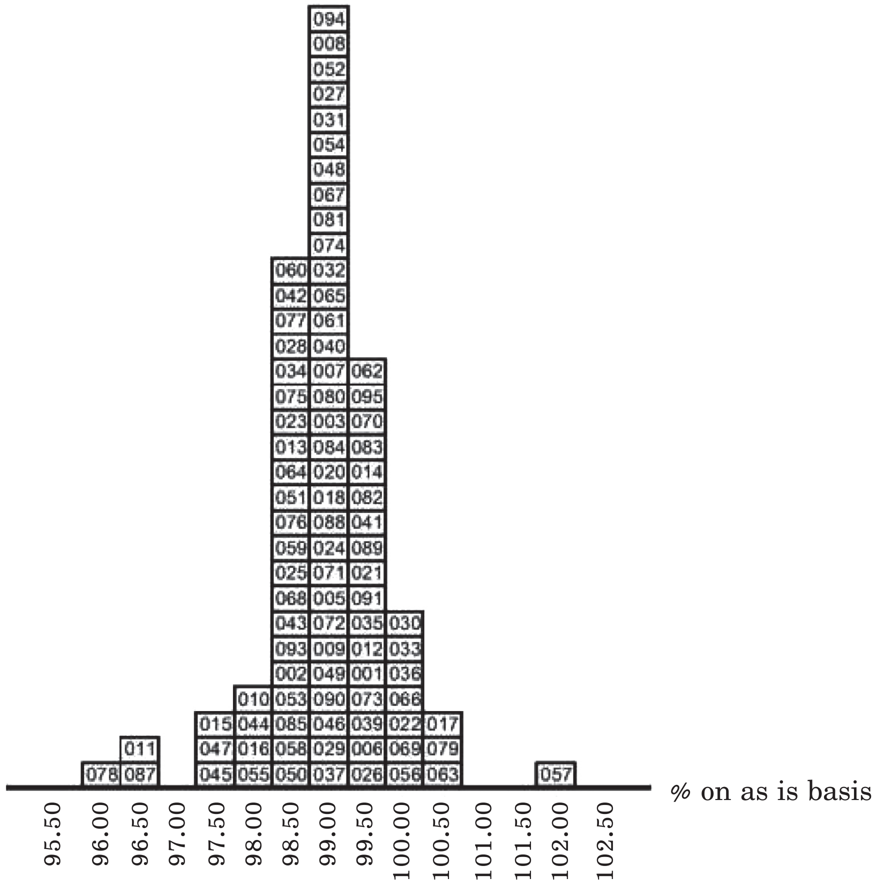
*ขยายเกณฑ์การยอมรับโดยเพิ่มค่าความไม่แน่นอนมาตรฐาน

ตารางที่ 4 สรุปผลการประเมินการทดสอบความชำนาญโปรแกรมการหาปริมาณตัวยาสำคัญด้วยเทคนิค HPLC

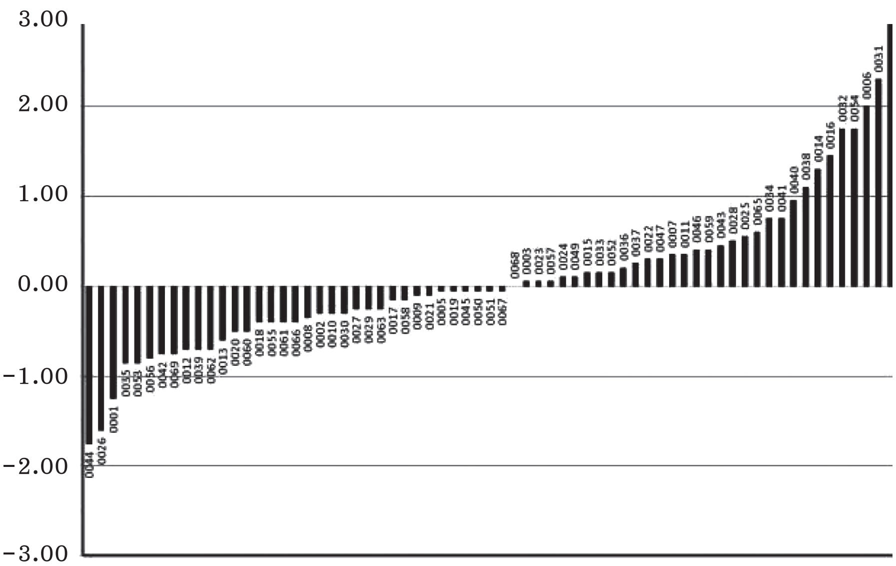
รหัสแผน/ตัวอย่างทดสอบ/วิธีทดสอบ	จำนวนห้องปฏิบัติการ(ราย)		Robust mean (x*)	Robust standard deviation (s*)	Standard deviation for PT assess-ment (σ_{pt})	Standard uncertainty of assigned value $u(x_{pt})$	ผลการประเมินห้องปฏิบัติการสมาชิก (ราย, ร้อยละ)		
	สมัครเข้าร่วมทดสอบ	ส่งผลทดสอบ (ร้อยละ)					$\lvert z\rvert \le 2$ accept-able	$2<\lvert z\rvert<3$ warning signal	$\lvert z\rvert \ge 3$ unac-cep-table
D5901R1/ Gemfibrozil/ USP 38	95	90 (95)	99.24% on as is basis	0.64% on as is basis	1.00% on as is basis	0.08% on as is basis	86 (96)	3 (3)	1 (1)
D6001R1/Hydro-chlorothiazide Tablets /USP 39	69	67 (97)	99.6% LA	1.3% LA	2.0% LA	0.2% LA	65 (97)	1 (1.5)	1 (1.5)



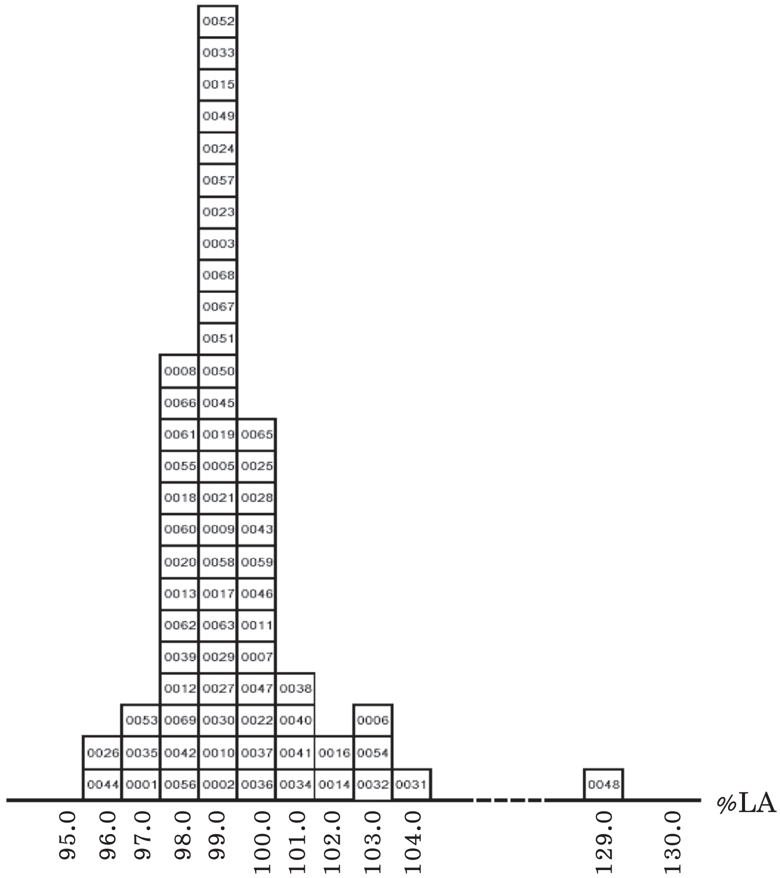
ภาพที่ 1 z-score ของห้องปฏิบัติการสมาชิกรหัสแผน D5901R1 การหาปริมาณ Gemfibrozil ในวัตถุดิบยา



ภาพที่ 2 histogram of mean ของรหัสแผน D5901R1 การหาปริมาณ Gemfibrozil ในวัตถุดิบยา



ภาพที่ 3 z-score ของการประเมินผลสมาชิกรหัสแผน D6001R1 การหาปริมาณ Hydrochlorothiazide ในยาเม็ด



ภาพที่ 4 histogram of mean ของรหัสแผน D6001R1 การหาปริมาณ Hydrochlorothiazide ในยาเม็ด

วิจารณ์

การทดสอบความชำนาญด้านการหาปริมาณตัวยาสำคัญด้วยเทคนิค HPLC เป็นการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบวัตถุดิบยาและเภสัชภัณฑ์ตามวิธีในตำรายาเทียบกับสารมาตรฐานที่จัดส่งไปพร้อมกัน สารมาตรฐานดังกล่าวเป็นวัตถุดิบยาที่ได้ประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันและให้ค่ากำหนดโดยเทียบกับ USP Reference Standard

การทดสอบมีความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างทดสอบ ไม่พบความแตกต่างของการวิเคราะห์ซ้ำ และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างตัวอย่าง (S_S) ไม่เกิน $0.3\sigma_{pt}$ แสดงว่าตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน รวมถึงมีความคงสภาพตลอดระยะเวลาของการจัดบริการทดสอบความชำนาญ โดยมีค่าอยู่ในเกณฑ์ $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| \leq 0.3\,\sigma_{pt}$ แต่มีการขยายเกณฑ์ด้วยค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานของการวิเคราะห์ในบางช่วงเวลาของการทดสอบ สาเหตุอาจเนื่องจากเป็นการวิเคราะห์เปรียบเทียบผลทดสอบต่างช่วงเวลากันและจำนวนตัวอย่างทดสอบที่สุ่มมามีจำนวนน้อย (3 ตัวอย่าง) จากค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานที่คำนวณได้ พบว่าความเที่ยงของการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้ต้องขยายเกณฑ์เพิ่มขึ้นหลายเท่า การจัดโปรแกรมการทดสอบนี้อาจแก้ไขโดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างทดสอบที่สุ่มมาทดสอบ อย่างไรก็ตามไม่พบแนวโน้มความไม่คงสภาพ จึงถือว่ามีความเหมาะสมสำหรับใช้ดำเนินการทดสอบความชำนาญ

การหาค่ากำหนด และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการประเมินผลการทดสอบความชำนาญ (σ_{pt}) และค่ากำหนด ที่เหมาะสมมีความสำคัญต่อการประเมินผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการสมาชิกด้วย z-score ค่ากำหนดที่ได้จากผลทดสอบของสมาชิกนำมาคำนวณด้วย robust analysis ตามวิธี Algorithm A ใน ISO 13528:2015 (E) Annex C[7] การกำหนด σ_{pt} ขึ้นอยู่กับความเหมาะสม วัตถุประสงค์ วิธีทดสอบและตัวอย่างทดสอบ รหัสแผน D5901R1 (วัตถุดิบยา Gemfibrozil) และรหัสแผน D6001R1 (ยาเม็ด Hydrochlorothiazide) กำหนด σ_{pt} เท่ากับ 1.00 % on as is basis และ 2.0 %LA ตามลำดับ ความละเอียดของค่าที่ใช้ในรายงานผลการวิเคราะห์จะเป็นไปตามรูปแบบการรายงานปริมาณตัวยาสำคัญในตำรายาสากล ค่า σ_{pt} ของรหัสแผน D6001R1 กำหนดตามความเหมาะสมของความเที่ยง (precision) เพื่อให้สอดคล้องกับวิธีวิเคราะห์ที่มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อช่วยละลายตัวยาสำคัญและลักษณะของตัวอย่างทดสอบซึ่งเป็นยาเม็ด โดยผ่านความเห็นคณะที่ปรึกษาทางวิชาการของสำนักยาและวัตถุเสพติด

ผลการทดสอบความชำนาญของทั้งสองแผนพบว่าห้องปฏิบัติการสมาชิกให้ผลทดสอบ “acceptable” มากกว่าร้อยละ 96 แสดงให้เห็นว่าห้องปฏิบัติการสมาชิกส่วนใหญ่มีความสามารถในการหาปริมาณตัวยาสำคัญด้วยเทคนิค HPLC ทั้งในวัตถุดิบยาและเภสัชภัณฑ์ เมื่อพิจารณารายละเอียดในรายงานที่ได้รับ พบว่าห้องปฏิบัติการบางรายแสดงข้อมูลระบบโครมาโทกราฟ และชนิดคอลัมน์ที่ใช้ไม่ตรงกับที่กำหนด ส่งผลให้ข้อมูลไม่น่าเชื่อถือแม้ว่าจะผ่านเกณฑ์ z-score ส่วนผลทดสอบ “warning signal” และ “unacceptable” อาจมีสาเหตุจากข้อผิดพลาดในขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง เช่น การชั่ง การดูดความชื้นของสารระหว่างชั่ง การบดตัวอย่างยาเม็ดไม่ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ห้องปฏิบัติการต้องหาสาเหตุข้อผิดพลาดและดำเนินการแก้ไขและป้องกันการเกิดซ้ำ

สรุป

การหาปริมาณตัวยาสำคัญด้วยเทคนิค HPLC เป็นสิ่งสำคัญในการควบคุมคุณภาพยา ห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องควรร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง เพื่อประเมินคุณภาพและพัฒนาระบบคุณภาพของตนให้สอดคล้องกับมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 ปัญหาต่าง ๆ ที่พบสามารถนำไปเป็นข้อมูลเพื่อแก้ไขและปรับปรุงต่อไป การทดสอบความชำนาญของทั้ง 2 แผนแสดงว่าห้องปฏิบัติการมากกว่าร้อยละ 96 ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพยาทุกแห่งที่ให้ความร่วมมือในการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญกับสำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และทำให้งานนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2005.
2. ISO/IEC 17043:2010. Conformity assessment--general requirements for proficiency testing. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2010.
3. EMD Millipore. Pharmacopoeia monograph methods: HPLC and UHPLC methods for regulated drug analysis. [online]. 2014; [cited 2019 Jul 7]: [68 screens]. Available from: URL: http://www.merckmillipore.com/Web-US-Site/en_CA/-/USD/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA_CHEM-101126&DocumentId=201602.015.ProNet&DocumentType=TI&Language=EN&Country=NF&Origin=PDP.
4. The United States pharmacopeia USP38, the national formulary NF33. 38th ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2015. p. 3661-2.
5. The United States pharmacopeia USP39, the national formulary NF34. 39th ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2016. p. 4212-3.
6. ISO 5725-2:1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results--Part 2: basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 1994.
7. ISO 13528:2015. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2015.

Proficiency Testing for Pharmaceutical Testing Laboratories: Assay by High Performance Liquid Chromatography

Methinee Nimnoi Nanthanut Seesuwan Sasida Yoosuk and Siriphorn Laomanacharoen
Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

Abstract Proficiency testing (PT) is an important complement for quality assessment and quality system development of testing laboratories. Participation in proficiency testing program is required for laboratories seeking recognition of their competence through ISO/IEC 17025:2005 accreditation which can lead to the confidence and reliability of test results. Bureau of Drug and Narcotic (BDN) has been accredited as a PT provider according to ISO/IEC 17043:2010 since 2016 under the scope of pharmaceutical assay by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Gemfibrozil raw material was used as PT item in 2016. There were 95 laboratories participated in the program and 96% got "acceptable" results. The program has continued to 2017 using Hydrochlorothiazide Tablets as PT item and 69 laboratories participated in the program with 97% of "acceptable" results. Participation in proficiency testing programs, testing laboratories can evaluate their performance and improve the quality system according to ISO/IEC 17025:2005.

Keywords: Proficiency Testing, pharmaceutical assay, HPLC